

**Interaktion verschiedener Reparaturmechanismen
für die Behebung von O⁶-Methylguanin-Schäden in der DNA**

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

der Fakultät
Biologie und Geographie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Ann-Christin Nickel

aus Bornheim (Rhl)
April 2010

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. Ann Ehrenhofer-Murray

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

Prof. Dr. George Iliakis

Tag der mündlichen Prüfung:

Mittwoch den 25.08.2010

The road goes ever on and on,
down from the door where it began.
now far ahead the road has gone,
and I must follow, if I can,
pursuing it with eager feet,
until it joins some larger way
where many paths and errands meet.
and whither then? I cannot say.

J.R.R. Tolkien

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I-III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abkürzungen	IV
Einheiten	V
<u>1. Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1. Alkylierungsschäden in der DNA.....	1
1.2. Zelluläre Reparatur von DNA-Schäden.....	3
1.2.1. Methyl-Guanin-DNA-Methyltransferase.....	4
1.2.2. Mismatch Reparatur.....	5
1.2.3. Basen-Exzisions-Reparatur.....	6
1.2.4. Reparatur von Doppelstrangbrüchen.....	7
1.3. Zytotoxizität und Mutagenität von O ⁶ -Methylguanin.....	10
1.4. Mögliche neue O ⁶ -Methylguanin Reparaturmechanismen.....	11
1.4.1. Nukleotid-Exzisions-Reparatur.....	11
1.4.2. Fanconi Anämie Signalweg.....	14
<u>2. Ziel dieser Arbeit</u>	<u>17</u>
<u>3. Material und Methoden</u>	<u>18</u>
3.1. Material.....	18
3.1.1. Geräte.....	18
3.1.2. Chemikalien, Enzyme und Lösungen.....	19
3.1.3. Kommerzielle Kits.....	19
3.1.4. Alkylierende Chemikalien und Inhibitoren.....	19
3.1.5. Antikörper.....	19
3.1.6. Primer.....	20
3.1.7. Mäuselinien.....	20
3.1.8. Zelllinien.....	21
3.2. Methoden.....	22
3.2.1. Zellkultur.....	22
3.2.2. Genotypisierung der Maus-Linien.....	22
3.2.3. <i>In vitro</i> Alkylierung von Primärzellen und Zelllinien.....	24
3.2.4. <i>In vivo</i> Behandlung von Mäusen.....	25
3.2.4.1. Organ und Knochenmark Entnahme.....	26
3.2.5. Nachweis von O ⁶ -Methylguanin in Zellen und Gewebe.....	27
3.2.5.1. Immunhistochemische O ⁶ -meG-Färbung.....	27
3.2.5.2. Immuno-Slot-blot.....	28
3.2.6. Einzelzellgelelektrophorese (Comet assay).....	29
3.2.7. Immuno-Blot Nachweis von Proteinen.....	30
3.2.7.1. Protein Isolation.....	30
3.2.7.3. Protein Bestimmung.....	31
3.2.7.4. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Transfer Bedingungen.....	31
3.2.7.5. Detektion des Proteins.....	32
3.2.7.6. "Strippen" der Nitrozellulosemembran.....	33

3.2.8. Detektierung von DNA-Reparatur Foci mittels Immunofluoreszenz	33
3.2.9. Kolonienbildungsversuche (Sensitivität Tests)	34
3.2.9.1. Zellkultur basierender CFA	34
3.2.9.2. Methylcellulose Kolonienbildungstest für Suspensionszellen	35
3.2.10. Apoptosenachweis mittels AnnexinV Färbung	36
3.2.10. Casapse 3/7 Aktivitätsnachweis	37

4. Ergebnisse 38

4.1. Immunanalytische Messung von O ⁶ -Methylguanin in der Kern-DNA einzelner Zellen	38
4.1.1. Eine Reparatur von O ⁶ -Methylguanin erfolgt in Säugerzellen auch bei pharmakologischer Inhibierung des Reparaturproteins MGMT	40
4.1.2. MNU-exponierte Lymphozyten zeigen eine erhöhte Rate an Reparatur-Einschnitten, wenn die zelluläre MGMT-Aktivität blockiert ist.	40
4.2. Entfernung von O ⁶ -Methylguanin durch die Nukleotid-Exzisions-Reparatur	42
4.2.1. Das Protein XPA aus dem NER-Weg spielt nur eine untergeordnete Rolle bei der MGMT-unabhängigen Reparatur von O ⁶ -MeG	42
4.2.2. Das Schadenserkenngsprotein XPC kann an O ⁶ -MeG-Addukte in der DNA binden und deren Reparatur einleiten	44
4.2.3. Das XPC-Protein ist ein wichtiger Erkennungsfaktor für die MGMT-unabhängige Reparatur	47
4.2.4. XPC-defiziente Zellen zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber alkylierende Substanzen	50
4.3. Die Bedeutung des Fanconi Anämie-Weges für die Reparatur von O ⁶ -MeG-Addukten	53
4.3.1. Einzelne Komponenten des FA-Weges beeinflussen die Reparatur der O ⁶ -MeG-Schäden	54
4.3.2. FancD2-defiziente Zellen zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber methylierenden Substanzen	57
4.3.3. Die Ubiquitinierung des FancD2-Protein ist wichtig um die Reparatur von O ⁶ -MeG-Schäden einzuleiten	58
4.4. <i>Ex vivo</i> und <i>in vivo</i> Situation der MGMT-unabhängigen O ⁶ -MeG-Reparatur	59
4.4.1. O ⁶ -MeG-Reparatur in Zellen von FancA-, FancC- bzw. FancD2-defizienten Mäusen	60
4.4.2. <i>Ex vivo</i> MNU-Behandlung von primären Lymphozyten aus DNA-Reparatur defizienten Mauslinien	62
4.4.3. <i>In vivo</i> Reparaturkinetiken in Zellen von DNA-Reparatur defizienten Mausstämmen zeigen den Einfluss der verschiedenen Signalwege auf die O ⁶ -MeG-Reparatur	64
4.4.4. Bestätigung der O ⁶ -MeG-Messung mittels Immuno-Slot-Blot-Verfahren	67
4.4.5. Primäre Lymphozyten mit Reparatur-Defizienz für O ⁶ -MeG zeigen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber methylierenden Reagenzien	68
4.5. Mögliche Interaktion von Proteinen der NER und des FA-Netzwerks bei der Reparatur von O ⁶ -MeG	71
4.5.1. Das NER-Protein XPC wird benötigt um FancD2-foci nach Alkylierungsschäden zu bilden	71

5. Diskussion	74
5.1. Reparatur von O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Schädens in der DNA.....	74
5.2. Einfluss der NER auf die Reparatur von O ⁶ -MeG.....	75
5.3. Der Fanconi Anämie-Signalweg und die MGMT-Unabhängige Reparatur.....	78
5.4. Interaktion verschiedener Reparatursysteme in der O ⁶ -Alkylguanin-Reparatur.....	81
5.4.1. Nukleotid Exzisions Reparatur und Fanconi Anämie Signalweg.....	81
5.4.2. Alkyltransferase-like Proteins.....	83
5.4.3. Weitere Kandidaten-Proteine für den alternativen O ⁶ -MeG-Reparaturweg.....	85
5.5. Entwurf eines Modells der alternativen O ⁶ -MeG-Reparatur: Fazit und Ausblick.....	87
6. Zusammenfassung	91
7. Referenzen	92
8. Anhang	100
Danksagungen	
Erklärungen	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

Abbkürzungen

(-/-)	Homozygot Knockout	GGR	Globale Genomische Reparatur (global genome repair)
(+/-)	Heterozygot	H2Ax	histone H2AX
(+/+)	Homozygot Wildtyp	HMG	High Mobility' Protein Gruppe
6-4-PP	Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidin-Photoprodukte	HR	Homologe Rekombination
8-oxoG	8-Oxoguanin	HU	Hydroxiharnstoff
αMEM	α-Modified Eagle Medium	I.p.	Intraperitoneal
A	Adenin	ICA	Immun-cytological Assay
APE	Apurinische-Endonuklease	IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
APS	Ammoniumsulfat	IR	Ionisierende Strahlung
AT	Ataxia Telangiectasia	ISB	Immuno-Slot-Blot
ATL	Alkyltransferase-like' Protein	KU	Ku autoantigen
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutierte Kinase	LIG	Ligase
ATR	Ataxia-telangiectasia und Rad3-bezogene Kinase	Max.	Maximal
BCA	Bicinchoninic acid	MGMT	Methylguanin-DNA methyltransferase
BER	Basen-Exzisions-Reparatur	Mind.	Mindestenz
BG	O ⁶ -Benzylguanin	MLH	'mutL homolog' -Protein
BLM	Bloom-Syndrom Protein	MMR	Mismatch Reparatur
BRAFT	BLM/RPA,FA/Topoisomerase III-Proteinkomplex	MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
BRCA	Breast-Cancer Protein	MNU	N-Nitroso-N-methylurea
BSA	Bovines Serumalbumin	MPG	Methylpurin
C	Cytosin	MRE	'Meiotic recombination' Proteine
CFA	Colony Forming Assay	MSH	'mutS homolog'-protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	N3-AlkA	Alkylierung am N3 Atom des Alanins
CPD	Cyclobutan-Dimere	N7-AlkG	Alkylierung am N7 Atom des Guanins
CPT	Cisplatin	NaCl	Natriumchlorid
CSA	Cockayne Syndrom Protein A	NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole	NHEJ	'Non-homologous recombination'
DDB	DNA-Schaden-Bindeproteine (damaged DNA binding protein)	O ⁶ -MeG	O ⁶ -Methylguanin
Dest.	Destilliert	P	Phosphorylierung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PAGE	Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid	PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
DNA-PK	DNA-Proteinkinase	PBST	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung + Tween20
DSB	Doppelstrangbruch	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PCR	Polymerasen-Ketten Reaktion (polymerase chain reaction)
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea	PFA	Paraformaldehyd
ERCC	Excision-Repair Cross-Complementing Proteingruppe	PI	Propidiumiodid
<i>et. al.</i>	et alteri/et alterae (und weitere)	PMS2	'postmeiotic segregation'-Protein 2
EXO	Exonuklease	PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
FA	Fanconi Anämie	PNK	Polynukleotid-Kinase
FEN	flap endonuclease	POL	Polymerase
G	Guanin	Post-	nach
G:T	Guanin-Thymidin Fehlpaarung	Prä-	vor
GADD45	Growth Arrest and DNA Damage Protein 45		

PS	Phosphatidylserin
Pt-(GG)	Cisplatin-G:G Intrastrang Verküpfungen
RAD	'radiation'-Protein Familie
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RPA	Replikations Protein A (replication protein A)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raum Temperatur
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
S-Phase	DNA Synthese-Phase des Zellzyklus
SSC	Natriumcitrat Salz Puffer (Saline Sodium citrate buffer)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (tris buffered Saline)
TBST	Tris gepufferte Salzlösung + Tween20
TCR	Transkriptionsgekoppelte Reparatur (transcription coupled repair)
TFIIH	Transkriptions Faktor IIH
TLS	Translasion DNA Synthese (Translesion DNA synthesis)
TMZ	Temozolomid
ü.N.	Über Nacht
Ub	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
WRN	Werner-Syndrom Protein
WT	Wildtyp
XP	Xeroderma pigmentosum
XRCC	'X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells'

Einheiten

A	Ampere
AFU	Arbitrary fluorescence unit
Bp	Basen Paar(e)
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde(n)
k	Kilo
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
M	Molar
m	Milli (10^{-3})
mA	Milliampere
ml	Milliliter
min	Minute
n x g	n-fache Erdbeschleunigung
pH	$-\log[H^+]$
rpm	"rounds per minute" Rotation pro Minute
s	Sekunde
U	Units
μ	Mikro (10^{-6})
V	Volt
v/v	Volumen per Volumen
w/v	Gewicht per Volumen
%	Prozent

1. Einleitung

1.1. Alkylierungsschäden in der DNA

Alkylierungsschäden können durch verschiedene exogene und endogene DNA-reaktive Verbindungen hervorgerufen werden. DNA-reaktive Substanzen sind in der Umwelt weit verbreitet, ein Beispiel sind die Nitrosamine im Magen-Darm-Trakt von Säugetieren. Hier werden Nitrosamine aus sekundären Aminen, die bei der Verdauung von Proteinen entstehen, gebildet (Rydberg und Lindahl, 1982; Bartsch *et al.*, 1996; Jakszyn und Gonzalez, 2006). Eine der ersten entdeckten kanzerogenen Nitrosamine wurde im Tabakrauch nachgewiesen (Hecht und Hoffmann, 1989; Hecht, 1999). DNA-alkylierende Substanzen sind des Weiteren wichtige chemische Mutagene, die gezielt in der Zell- und Tumorforschung eingesetzt werden. Diese Substanzen können unter anderem zu der Induktion von Mutationen, chromosomalen Aberrationen und malignen Transformationen führen, welches für die Bekämpfung von Tumorzellen dienlich sein kann (Roos *et al.*, 2004; Quiros *et al.*, 2010). Zu den in der Forschung verwendeten alkylierenden Substanzen gehören methylierende Reagenzien, wie zum Beispiel N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG), N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU) und Methylmethansulfonat (MMS), sowie ethylierende Reagenzien wie N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (ENU). Die in der Klinik verwendeten Chemotherapeutika mit methylierender Wirkung, wie Temozolomid und Procarbazin, bilden spontan oder nach enzymatischer Aktivierung in der Zelle hochreaktive Zwischenprodukte die mit nukleophilen Zentren in der DNA reagieren können. Dies führt zu einer Palette unterschiedlicher Methylierungsprodukte an den Nukleotiden (Beranek *et al.*, 1990; Thomale *et al.*, 1994). Die höchsten Alkylierungsraten durch DNA-reaktive Alkylanzien finden sich am N7-Atom des Guanins (N7-AlkG) und am N3-Atom von Adenin (N3-AlkA) gefolgt von Addukten an den Phosphor-Atomen zwischen den Desoxyribosen (Bildung von Phosphotriestern) (Dipple, 1995). Weitere typische Alkylierungsschäden, jedoch mit sehr viel niedriger Häufigkeit, sind O⁶-Methylguanin (O⁶-MeG) sowie O⁴- und O²-Alkylthymidin (Abb. 1).

Systematische Untersuchungen an einer großen Anzahl DNA-reaktiver Substanzen zeigten, dass die mutagene und karzinogene Wirkung von Alkylanzien direkt mit der relativen Bildungsrate von Sauerstoff-Addukten in den Basen korreliert (Vogel *et al.*,

Einleitung

1996). Bei den Verbindungen mit der höchsten Reaktivität für Sauerstoffatome, wie den N-Alkylnitrosoharnstoffen und ihren in der Tumorthherapie eingesetzten Derivaten Temozolomid, Procarbazin oder Dacarbazin, beträgt die Bildungsrate für O⁶-MeG in der DNA lediglich 8 % aller Alkyladdukte. Trotzdem stellt dieser Schadenstyp die Hauptursache sowohl für die genotoxische als auch für die zytotoxische Wirkung dieser Substanzen dar (Roos *et al.*, 2004).

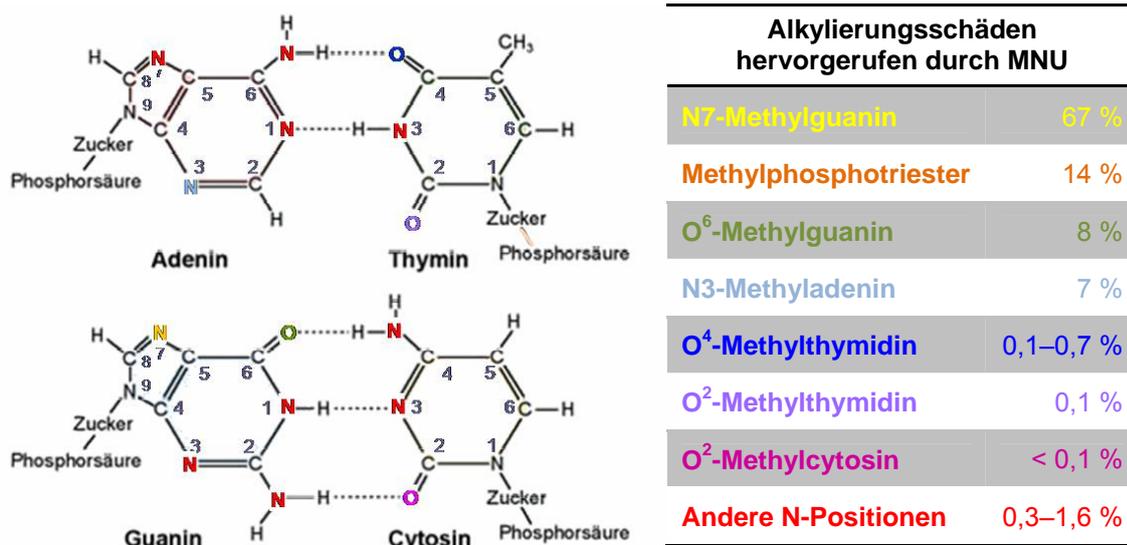


Abb. 1. Alkylierungsschäden in der DNA. Die Tabelle zeigt die am häufigsten vorkommenden Alkylierungsschäden und deren Lokalisation in der DNA an. Alkylierende Substanzen formen 15 verschiedene nitroso- und oxidative Schäden an den DNA-Basen (farbig markiert). Die am häufigsten auftretende Schädigung ist an der N7-Position von Guanin (~65 %). Für schwere biologische Effekte ist jedoch das O⁶-MeG verantwortlich, welches in nur 8 % aller Alkylierungsschäden vorkommt. (Modifiziert nach O'Connor und Saffhill, 1979; Drabløs *et al.* 2004; Friedberg *et al.*, 2005).

Eine der Ursachen der hochgradig mutagenen Wirkung von O⁶-MeG wurde schon relativ früh erkannt (Pegg, 1984). Sie beruht auf einer Störung der Basenpaarung während der DNA-Replikation und führt hier mit hoher Frequenz zum Fehleinbau von Thymin anstelle von Cytosin gegenüber dem O⁶-MeG im neu synthetisierten Strang. Nach einer weiteren Zellteilung trägt somit eine der vier Tochterzellen in ihrem Genom eine fixierte A:T-Mutation an dieser Position. Eine weitere Tochterzelle besitzt an dieser Stelle ein weiteres O⁶-MeG:T-Basenpaar. Der Mechanismus der die zytotoxischen Eigenschaften von O⁶-Alkyladdukten am Guanin hervorruft blieb lange unklar, da diese Schäden weder die Replikation noch die Transkription wesentlich behindern (Kaina *et al.*, 2007). Heute ist bekannt, dass die Apoptose-induzierende Wirkung von O⁶-MeG auf ein komplexes Wechselspiel verschiedener DNA-Reparaturmechanismen beruht, welcher weiter unten (1.3) näher erläutert wird.

Einleitung

1.2. Zelluläre Reparatur von DNA-Schäden

Die Beseitigung von DNA-Schäden ist ein in allen Zellen vorkommender Prozess. Täglich muss das Genom mit zahlreichen, durch externe umweltbedingte Einflüsse oder spontan endogenen Prozessen hervorgerufene Schäden fertig werden.

Nicht reparierte Schäden werden mit Zelltod, Degeneration, Alterung und Krebs assoziiert (Engelbergss *et al.*, 1998; Casorelli *et al.*, 2008). Daher sind das Erkennen und die Reparatur verschiedener Schäden von entscheidender Bedeutung für das Fortbestehen eines Organismus. Für die Schadensbeseitigung haben sich verschiedene Mechanismen ausgebildet, welche sich durch unterschiedliche Komplexität, Substratspezifität und Kinetik auszeichnen (Liu und Gerson, 2006). Für die Beseitigung von O⁶-MeG-Schäden sind mehrere Mechanismen bekannt (Abb.2), welche den Schaden entweder direkt oder postreplikativ beseitigen. Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten DNA-Reparaturmechanismen aufgeführt deren Beteiligung an der Prozessierung von O⁶-Alkylguanin-Addukten in Säugerzellen nachgewiesen ist oder diskutiert wird.

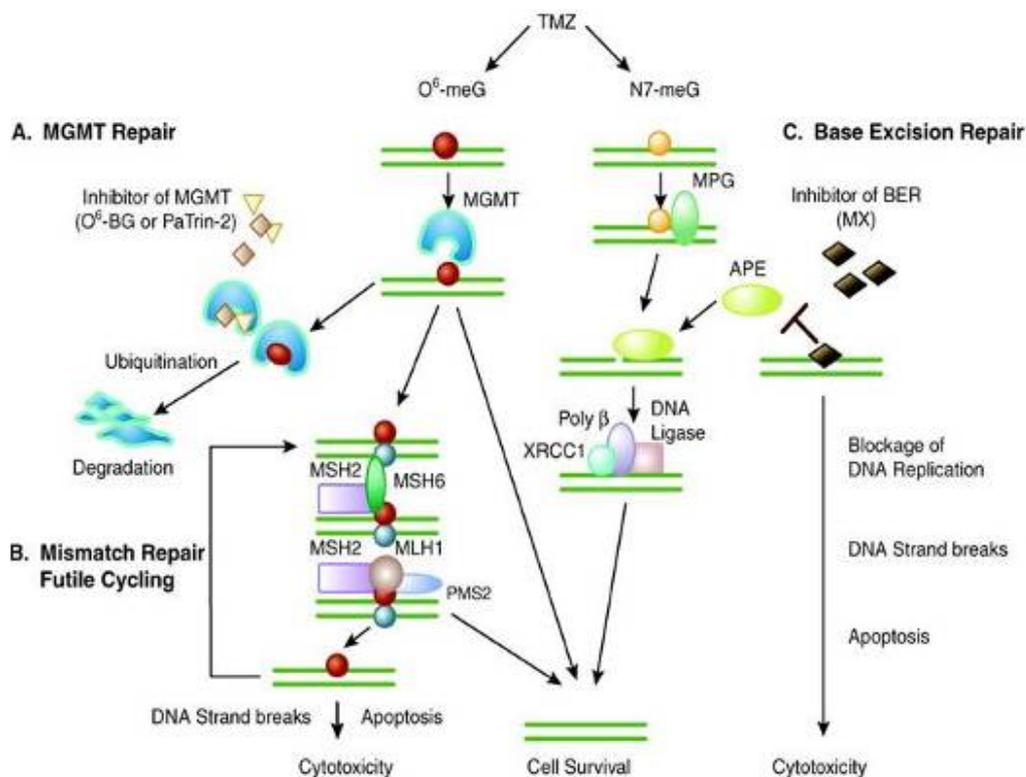


Abb. 2. DNA Reparaturwege die eine Rolle in der Beseitigung von O⁶-MeG und N7-MeG spielen. O⁶-MeG kann durch verschiedene Reparatur-Systeme beseitigt werden und so zu dem Überleben der Zelle beitragen oder zu deren Tod führen. N7-MeG wird weitgehend von der BER repariert. MSH, MLH und PMS2 sind Proteine, die die Mismatch-Reparatur einleiten. MPG, Methylpurin; APE, AP Endonuklease (Liu und Gerson, 2006).

1.2.1. Methyl-Guanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)

Die Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) und die Photolyasen sind die zwei wichtige Gruppen der schnellen und direkten Reparaturproteine für Alkylierungsschäden. Sie spalten in einer Einschrittreaktion die kovalente Bindung zwischen dem Alkylierungsschaden und der DNA (Kim *et al.*, 1995). Die direkt reagierenden Proteine zeichnen sich außerdem durch eine hohe Substratspezifität aus. So ist die Aktivität von MGMT auf O⁶-MeG, O⁴-MeT und einige weitere Alkyladdukte an der O⁶-Position von Guanin beschränkt. Die MGMT entfernt die O⁶-Alkylierungsschäden, indem ein Gruppenaustausch zwischen einem internen Thiolat-Anion im aktiven Zentrum des MGMT-Proteins und der Alkylgruppe stattfindet (Abb. 3). Diese Reaktion führt zur Übertragung der Methylgruppe auf den Cysteinrest im aktiven Zentrum der MGMT und damit zur irreversiblen Inaktivierung des Reparaturproteins (Suizid-Reaktion) (Pegg, 2004; Verbeek *et al.*, 2008). Die Effizienz, mit der O⁶-MeG-Schäden aus der DNA von Säugerzellen durch MGMT entfernt werden können, ist wegen der Beteiligung nur einer Proteinkomponente, im Vergleich zu anderen Reparaturmechanismen, sehr hoch. Auch hängt die Reparaturkinetik von O⁶MeG-Schäden im Wesentlichen vom zellulären Gehalt an aktiven MGMT-Molekülen ab (Gerson *et al.*, 1986, 2002).

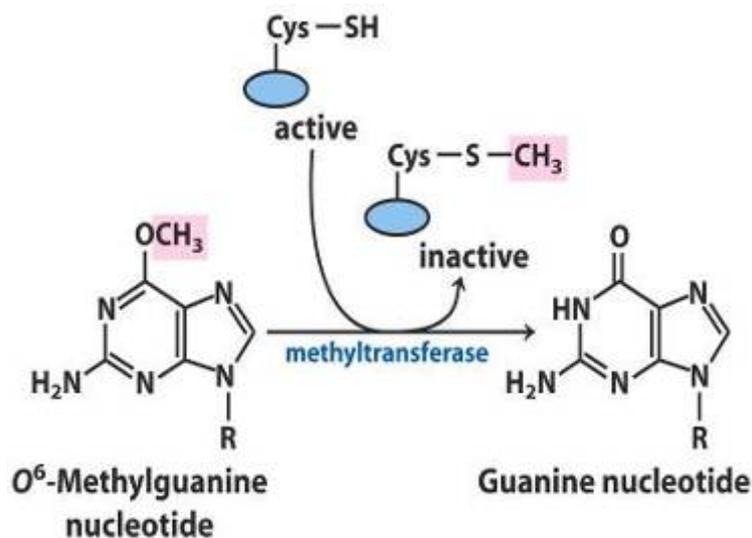


Abb. 3. Reparatur von DNA-Alkylierungsschäden durch MGMT. Transfer einer Alkyl- Gruppe von der O⁶-Position des Guanins an das interne Cystein der MGMT führt zu einer unwiderruflichen Inaktivierung des Enzymes und dessen proteosomaler Degradation. (nature review).

1.2.2. Mismatch-Reparatur

Die Mismatch-Reparatur (MMR) besteht aus verschiedenen Proteinen und ist darauf programmiert fehlerhafte Basenpaarungen zu korrigieren, welche entweder spontan entstehen oder während der Replikation dem „proofreading“ der Polymerase entgehen. Dabei entfernt dieser Multiproteinkomplex nicht nur die fehlgepaarte Base sondern auch eine große Anzahl benachbarter Nukleotide auf der 3'- oder 5'-Seite der DNA. Die Reparaturlücken werden anschließend durch DNA-Polymerasen aufgefüllt und durch Ligase I verschlossen (Sarkaria *et al.*, 2008; Kunz *et al.* 2009, Abb.4). Das MMR-System erkennt jedoch nicht nur Fehlpaarungen der vier Standardbasen, sondern auch die postreplikativ vorliegende Konstellation O⁶-MeG:T. Hierbei wird aber nicht der Alkylierungsschaden, der methylierte Guanin-Rest, aus dem Matrizenstrang entfernt, sondern das Thymin auf der Gegenseite. Da aber die DNA-Polymerase in der nachfolgenden Auffüllsynthese wiederum ein Thymin an dieser Stelle einbaut, kommt es an solchen Alkylierungsschäden zu einer Abfolge an Reparaturversuchen durch das MMR-System. Diese Reparaturversuche spielen eine entscheidende Rolle für die Weiterleitung des zytotoxischen Effekts von O⁶-MeG (siehe Punkt 1.3.). Da die MMR-Proteine an einer großen Anzahl von verschiedenen DNA-Transaktionen beteiligt sind, kann ein Verlust dieses Systems zu einer Anreicherung von Punktmutationen führen, welches sich für die betroffene Zelle entweder positiv oder negativ auswirken kann. Für alkylierende Substanzen wurde bereits gezeigt, dass ein fehlerhaftes MMR-System zu einer Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Temozolomid führt, welches sich am wahrscheinlichsten damit erklären lässt, dass die Zelle eine Toleranz gegenüber den fehlerhaften O⁶-MeG:T Fehlpaarungen entwickelt (Sarkaria *et al.*, 2008). Es ist auch bekannt, dass viele Tumore ein defektes MMR-System besitzen und somit auch eine Resistenz gegenüber vielen alkylierenden Substanzen besitzen. Ein Beispiel ist der Vererbare nicht-polypöse Darmkrebs. Hier befinden sich Mutationen in den Genen *hMLH1* und *hMSH2*, welche dazu führen das die Zytotoxizität von Temozolomid in diesen Geweben sehr gering ist (Fink *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass das MMR-System durch das sogenannte ‚futile repair cycling‘ auch eine zytotoxische Wirkung haben kann (siehe 1.3.).

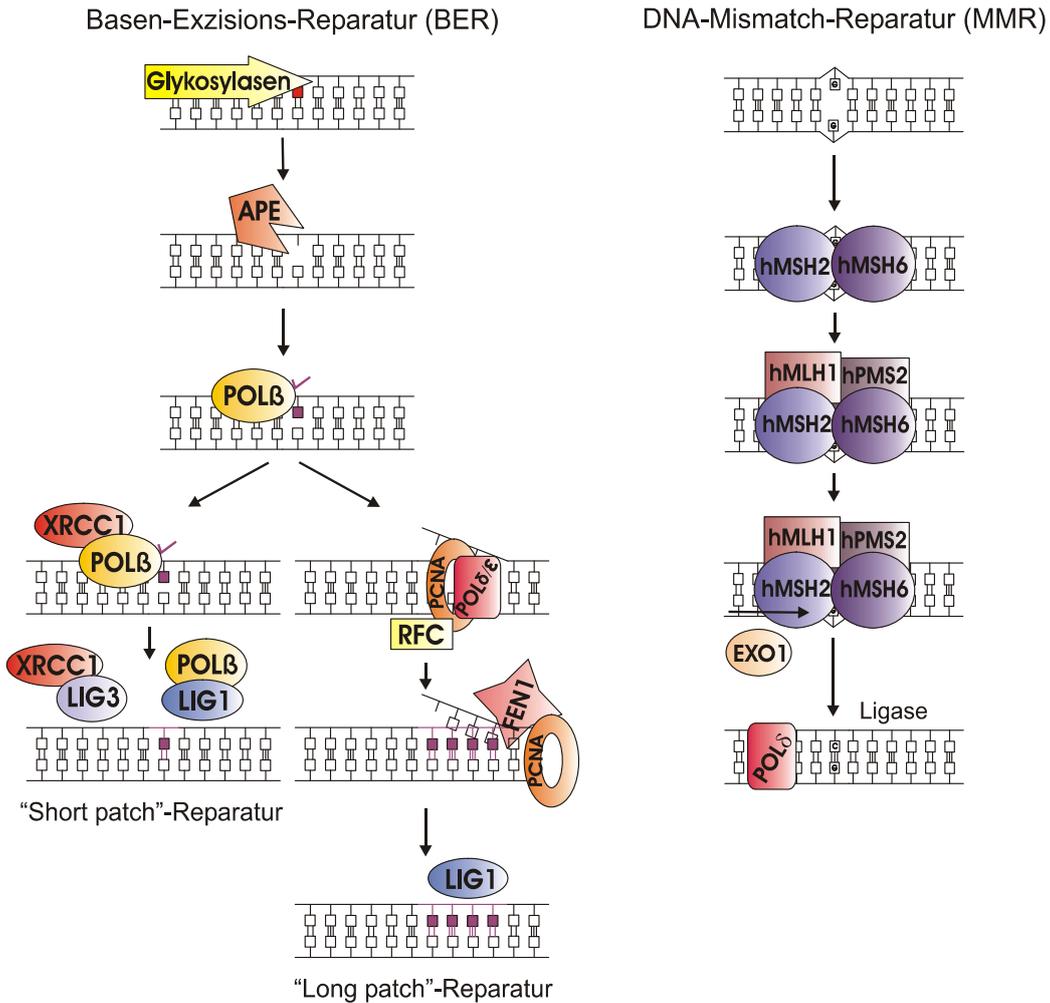


Abb. 4. Überblick über die Prozessierung von DNA-Schäden über die Basen-Exzisions-Reparatur und die DNA-Mismatch-Reparatur. (Modifiziert nach Buschfort-Papewalis *et al.*, 2002; Christmann *et al.*, 2003 und Sancar *et al.*, 2004)

1.2.3. Basen-Exzisions-Reparatur

Ein weiterer Mechanismus, der Alkylierungsschäden aus der genomischen DNA beseitigt, ist die Basen-Exzisions-Reparatur (BER), welche für die Reparatur von deaminierten, oxidativ geschädigten (z. B. 8-oxoG) und alkylierten Basen (z. B. N7-MeG) verantwortlich ist (Robertson *et al.*, 2009; Boysen *et al.*, 2009). Die BER ist der wirksamste Schutz bei Basen-Schäden, die durch den zellulären Metabolismus, wie oxidativen Stress, oder durch Ionisierende Strahlung (IR) induziert werden. Das BER-System benötigt prinzipiell nur 4 bis 5 verschiedene Proteine für die Reparatur der geschädigten Basen. Zu diesen Proteinen gehören die DNA-Glykosylasen, eine Apurinische (AP)-Endonuklease, eine DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase. Eingeleitet wird die BER durch das Ausschneiden der geschädigten Base mittels

Einleitung

Schadens-spezifischer DNA-Glykosylasen. Durch den Einschnitt der N-glykosolischen Bindung an der Base entsteht eine Abasischestelle, an der der DNA-Strang durch die AP-Endonuklease eingeschnitten wird. Die entstandene Reparaturlücke kann nun direkt durch Insertion des entsprechenden Nukleotids durch die DNA-Polymerase β , mit abschließender Ligation durch den DNA-Ligase-III-XRCC1 Komplex, verschlossen werden (*short-patch* BER) (Sancar *et al.*, 2004). Alternativ, und abhängig von der entstandenen AP-Seite, interagiert der XRCC1-Ligase-III Komplex mit der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) und der Polynukleotid-Kinase (PNK), und bereitet so die defekte Stelle auf die Reparatur vor. Nun wird mit Hilfe der DNA-Polymerasen δ oder ϵ und dem *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) Protein die entfernte Base sowie eine darauf folgende Sequenz in 5'-Richtung der DNA von bis zu 10 Nukleotiden ersetzt. Das ersetzte DNA Stück wird durch die Endonuklease FEN1 entfernt und es erfolgt eine abschließende Ligation des neu synthetisierten Stückes durch die DNA-Ligase I („long patch“ BER) (Hoeijmakers 2001; Tomkinson *et al.*, 2001). In zahlreichen Untersuchungen konnte zwar eine Rolle der BER für die Modulation der Zytotoxizität methylierender Reagenzien gezeigt werden, bisher gibt es jedoch keine Hinweise auf eine direkte Interaktion mit O⁶-MeG-Addukten (Cortellino *et al.*, 2003, Trivedi *et al.*, 2005 (Abb.4).

1.2.4. Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) spielt eine wesentliche Rolle für die zytotoxische Wirkung von alkylierenden Substanzen. Diese DSB entstehen u.a. wenn eine Replikationsgabel auf bestehende Einzelstrangbrüche trifft die beispielsweise durch die MMR oder durch andere Reparaturmechanismen verursacht wurden. Um zu verdeutlichen wie essenziell die DSB-Reparatur ist muss erwähnt werden, dass schon ein einziger nicht reparierter DSB in einem wichtigen Gen zu Zelltod durch Apoptose führen kann (Rich *et al.*, 2000) oder zu fehlerhaften Chromosomenpaarungen führt und eine genotoxische Wirkung hat. Die beiden wichtigsten Mechanismen zur Reparatur von DSB sind die nicht-homologe Strangverknüpfung (*non-homologous end joining*; NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) (Abb.5). Bei eukaryotischen Zellen stellt der NHEJ-Weg den entscheidenden Reparaturmechanismus in der G₁/G₀-Phase dar, um mögliche Chromosomentranslokationen und -deletionen zu verhindern (Haber, 2000). Dieser

Einleitung

Mechanismus benötigt keine homologen Chromosomen und kann deswegen über den ganzen Zellzyklus aktiv werden (Sonoda *et al.*, 2006). Der NHEJ-Mechanismus basiert auf der Verknüpfung der beiden DSB-Enden durch den Proteinkomplex Ku70/Ku80, welcher durch den MRN-Komplex rekrutiert wird. Zusammen mit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) werden weitere Proteinkomponenten, wie das *replication protein A* (RPA), das Werner Syndrom Protein (WRN) und Artemis für die Reparatur aktiviert. In einem finalen Schritt wird mit Hilfe der Enzyme DNA Ligase IV und XRCC4 der Bruch geschlossen. Da für das NHEJ keine homologen DNA-Bereiche als Matrize dienen, führt dieser Mechanismus gelegentlich zu Fehlverknüpfungen oder Mikrodeletionen an den Bruchstellen (Weterings *et al.*, 2008; Shrivastav *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu NHEJ arbeitet der HR-Prozess in der Regel fehlerfrei, da während der Reparatur die Sequenzinformation auf dem homologen Chromatid als Korrekturvorlage benutzt wird. Auch dieser Reparaturmechanismus besteht aus einem komplexen Proteinsystem, dass hauptsächlich in der S- und G2-Phase des Zellzyklus aktiv wird (Hakem, 2008). Eingeleitet wird die Reparatur von DSB durch die Aktivierung der Proteinkinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*AT-related*). Diese veranlassen u.a. die Rekrutierung verschiedener Proteine an der Schadensstelle. Dazu gehören die Komponenten des MRE-Komplexes und Exonukleasen, die die Strangenden bearbeiten, so dass die Proteine RPA, RAD51 und RAD52 schließlich den Strangaustausch katalysieren können (Shrivastav *et al.*, 2008). Im letzten Schritt erfolgt eine DNA-Neusynthese an den vorhandenen Matrizensträngen, die Ligation der Enden und die Auflösung der entstandenen *Holiday*-Struktur (Wyman *et al.*, 2004). Obwohl der HR-Weg für Reparatur von nur etwa 10 % aller DSB verantwortlich ist, verursachen Funktionsdefekte dieses Systems schwerwiegende Konsequenzen, die unter anderem zum Krankheitsbild Ataxia Telangiectasia (AT) führen, das durch Immundefizienz und hohes Leukämie- und Krebsrisiko gekennzeichnet ist (Lavin *et al.*, 2005).

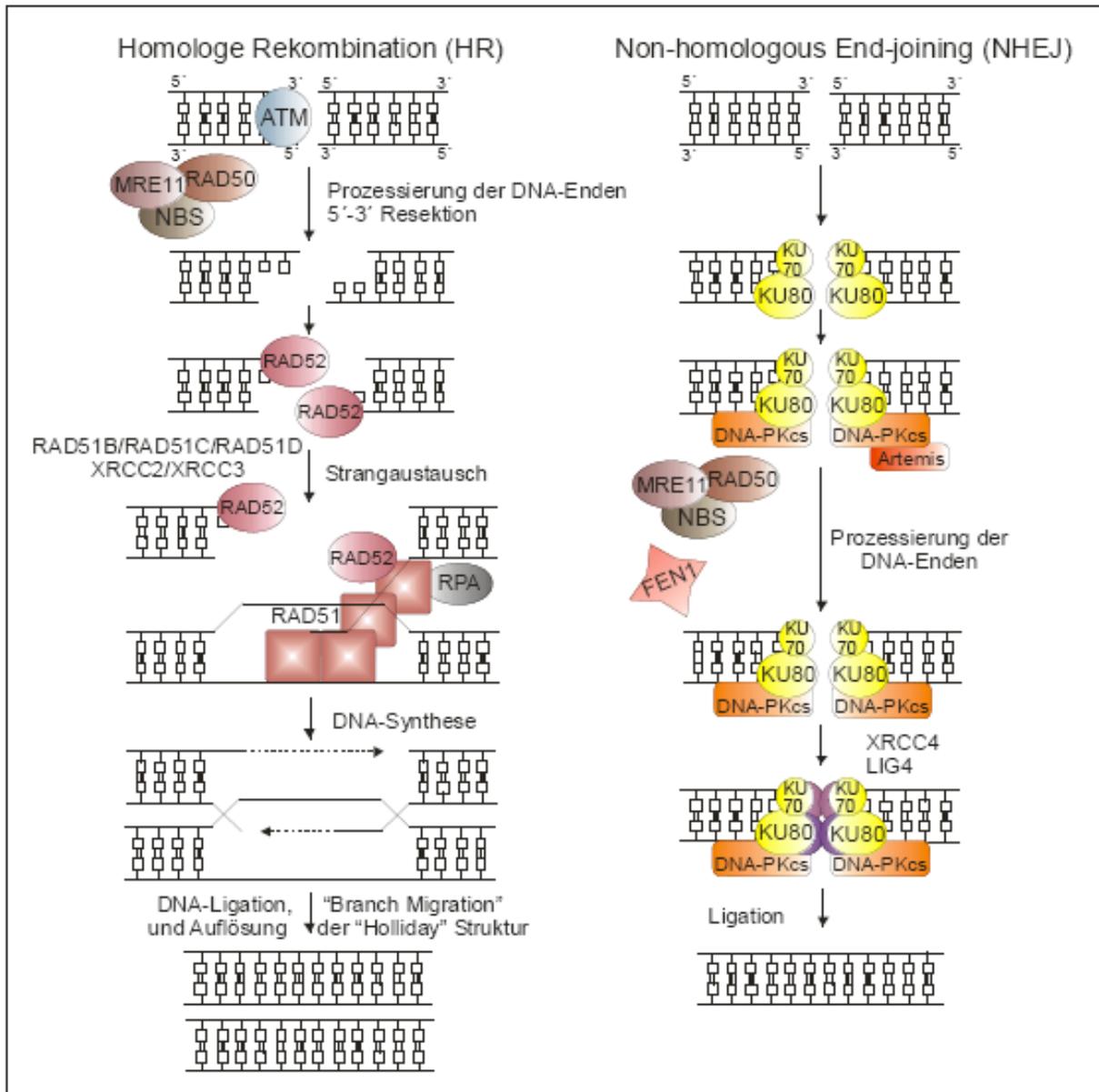


Abb. 5. Überblick über die Prozessierung von DNA-Doppelstrangbrüchen. DSB werden über die beiden Reparaturwege homologe Rekombination und *Non-homologous end-joining* beseitigt. (Modifiziert nach Christmann *et al.*, 2003 und Sancar *et al.*, 2004)

1.3. Zytotoxizität und Mutagenität von O⁶-Methylguanin

Die erläuterten Reparaturmechanismen zeigen, dass die Zelle verschiedene Möglichkeiten besitzt um einen O⁶-MeG-Schaden aus der DNA zu beheben. Jedoch zeigt bisher nur der Einsatz der MGMT eine schnelle und sehr effiziente Reparatur der Alkylierungsschäden. Die erwähnten Reparaturprozesse, MMR und DSB, nehmen alle die Möglichkeiten von Mutationen oder Sequenzverlusten in Kauf. Somit können die ca. 8 % O⁶-MeG-Schäden ausreichen um eine bleibende Schädigung des Genoms zu bewirken. Um dies zu verdeutlichen nehmen wir an, dass keine MGMT in Zellen vorhanden wäre. In diesen proliferations kompetenten Zellen persistieren nun O⁶-Alkylguanine, welche in der DNA-Replikation nicht zu einem O⁶-MeG:C Paar führen sondern in einem *Misspairing* in Form eines O⁶-MeG:T Basenpaar. Dies führt nach einer zweiten Replikation schließlich zu einer Punktmutation von G:C zu A:T (G:C → O⁶-MeG:C → O⁶-MeG:T → A:T), welches in verschiedensten Krebsarten nachgewiesen werden kann (Loechler *et al.*, 1984; Preston *et al.*, 1986;). Das bekannteste Beispiel ist die Punktmutation im Codon12 der Ha-*ras*- und Ki-*ras*-Gene (Engelbergs *et al.*, 1998). Wie O⁶-Alkylguanine führt auch ein nicht repariertes O⁴-MeT zu Transitionsmutationen von A:T → G:C (Samson *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 2009). Neben mutagenen Eigenschaften besitzt die O⁶-MeG-Läsion auch die unter Punkt 1.1. erwähnten zytotoxischen Eigenschaften, welche durch ein Zusammenspiel der Replikation mit der MMR hervorgerufen werden. Das MMR-System erkennt die Fehlpaarung der MeG:T-Nukleotide und entfernt jedoch das Thymidin-Nukleotid. Dies führt in der nächsten Replikation zu einer erneuten Fehlpaarung zwischen O⁶-MeG und Thymidin, welches erneut ein Eingreifen der MMR-Reparatur zufolge hat (*Futile-Repair-Cycle*). Die Folge der wiederholenden Reparaturzyklen sind lang persistierende Einzelstrangabschnitte in der DNA, aus denen in der folgenden S-Phase, Doppelstrangbrüche entstehen können (Abb.6). Diese wiederum können zu einer Aktivierung von Zellzykluscheckpunkten und Apoptoseprozessen führen (Karran und Bignami, 1992; Meikrantz *et al.*, 1998; Sarkaria *et al.*, 2008; Quiros *et al.* 2010).

Dieses komplexe Zusammenwirken von primärem DNA-Schaden, Replikation und vergeblichem Reparaturversuchen ist die molekulare Basis für die hohe zytotoxische Potenz von O⁶-MeG-Addukten in der DNA und das Wirkungsprinzip methylierender Tumortheraeutika wie Temozolomid oder Procarbazin.

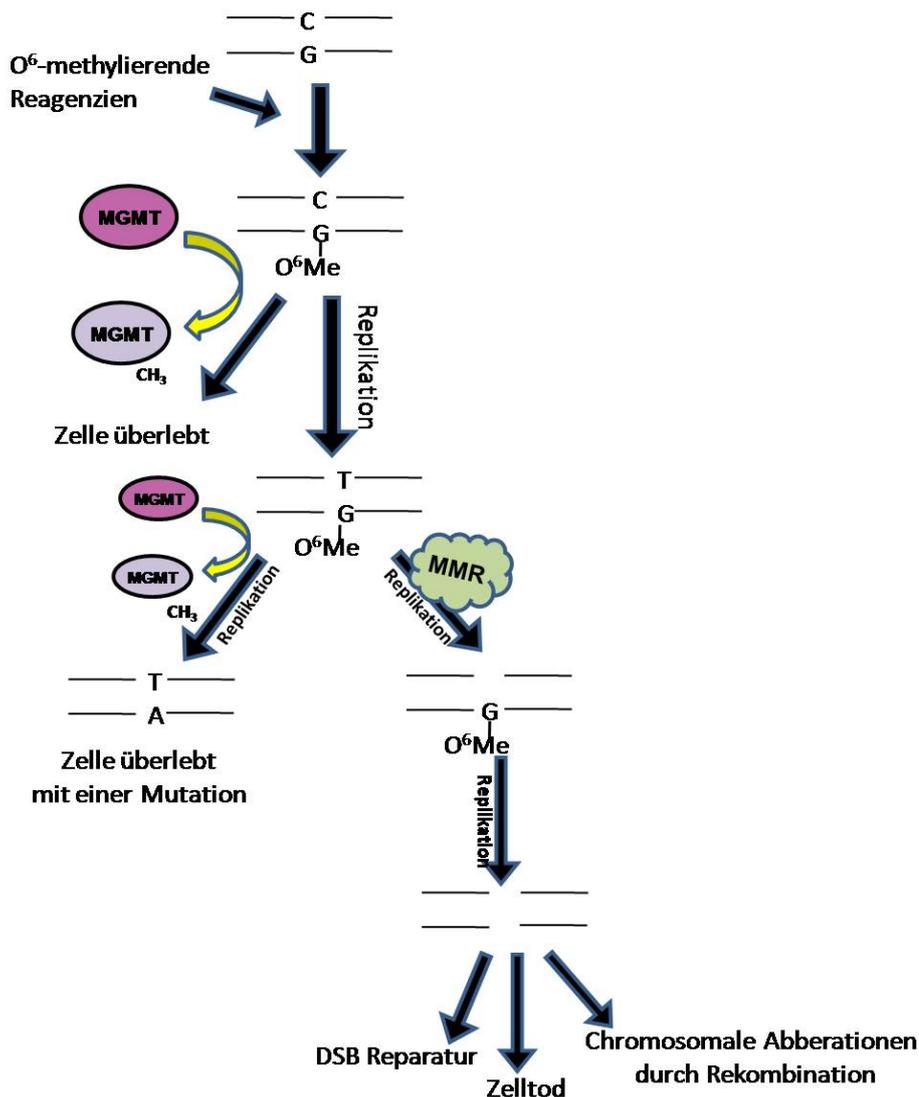


Abb. 6. Futile-Repair-Cycle. Wird das methylierte Guanin nicht vor der Replikation entfernt entsteht eine Basenfehlpaarung (O⁶MeG:T), welche von der MMR erkannt wird. Es wird nur das Thymidin entfernt, wodurch in der nächsten Replikation ein weiterer Mismatch entsteht, welcher nach weiteren Reparaturzyklen zu Strangbrüchen, chromosomale Abberationen durch Rekombination und den Tod der Zelle führen kann (Modifiziert nach Kaina et al.,2007).

1.4. Mögliche neue O⁶-Methylguanin Reparaturmechanismen

1.4.1. Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur ist ein Reparatursystem, das in der Lage ist strukturell sehr unterschiedliche Schäden aus der DNA zu entfernen. Hierzu gehören beispielsweise kovalente Verknüpfungen benachbarter Basen, wie die durch UV-Strahlung induzierten Cyclobutan-Dimere (CPDs) und Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidin-Photoprodukte (6-4-PP) oder die durch bifunktionelle Zytostatika, wie Cisplatin,

Einleitung

hervorgerufene Intrastrang-DNA-Vernetzungen (Nospikel *et al.*, 2009). Andere typische Substrate für die NER sind sogenannte *bulky adducts*, die beispielweise durch DNA-reaktive polyzyklische Aromate, wie Benzpyren-Derivate oder Pilzmetabolite, wie Aflatoxine, hervorgerufen werden (Costa *et al.* 2003). Gemeinsames Kriterium dieser Schadenstypen scheint eine erhebliche Störung der DNA-Helixstruktur und/oder eine Blockierung der Transkription durch die RNA-Polymerase II zu sein (Hoogstraten *et al.*, 2008). Für eine Rolle des NER-Systems bei der Reparatur der vergleichsweise kleinen O⁶-MeG-Addukte liegen bisher nur relativ wenige und zumeist indirekte Hinweise vor. Bei Reparaturanalysen an *E. coli*-Stämmen wurde gezeigt, dass die bakteriellen NER Proteine *uvrABC* einen Großteil der O⁶-MeG-Schäden auch in Abwesenheit des bakteriellen MGMT-Homologs Ada reparieren können (Samson *et al.* 1988). Neuere Studien lassen vermuten, dass in Bakterien der NER-Weg durch die Bindung von sogenannten *Alkyltransferase-like-Proteins* (ATL) an O⁶-MeG-Schäden aktiviert werden kann. Diese Bindung könnte das Vorhandensein von *bulky adducts* simulieren und damit den Zugriff der NER initiieren (Tubbs, 2008). Bronstein *et al.* beobachteten, dass NER-defiziente Zellen, die von Xeroderma Pigmentosum A-Patienten stammten, eine erhöhte Sensitivität gegenüber alkylierende Substanzen aufwiesen (Bronstein *et al.*, 1991,1992). Damit lieferten Sie erste Hinweise dass Komponenten des NER-System möglicherweise auch in humanen Zellen bei der Reparatur von O⁶-MeG beteiligt sind.

Die NER-Weg umfasst bei Säugerzellen zwei unterschiedliche Reparatursysteme, die globale genomischen Reparatur (*global genome repair*, GGR), und die Transkriptions-abhängige Reparatur (*transcription coupled repair*, TCR) (Abb.7). Die GGR entfernt DNA-Schäden vergleichsweise langsam aus dem gesamten Genom und schützt so vor Mutationen, welche Langzeiteffekte zur Folge haben könnten (Sugasawa *et al.*, 2002). Die TCR entfernt dagegen hocheffizient Schäden aus dem transkribierten Strang aktiver Gene. Eingeleitet wird diese Reparatur durch die Arretierung der RNA-Polymerase II während der Transkription an Läsionen, wie UV-induzierten Addukten (Tornaletti, 2009) und schützt damit vornehmlich vor der zytotoxischen Wirkung einer solchen Transkriptionsblockade. Beide Mechanismen unterscheiden sich hauptsächlich in der Art der Schadenserkennung.

Einleitung

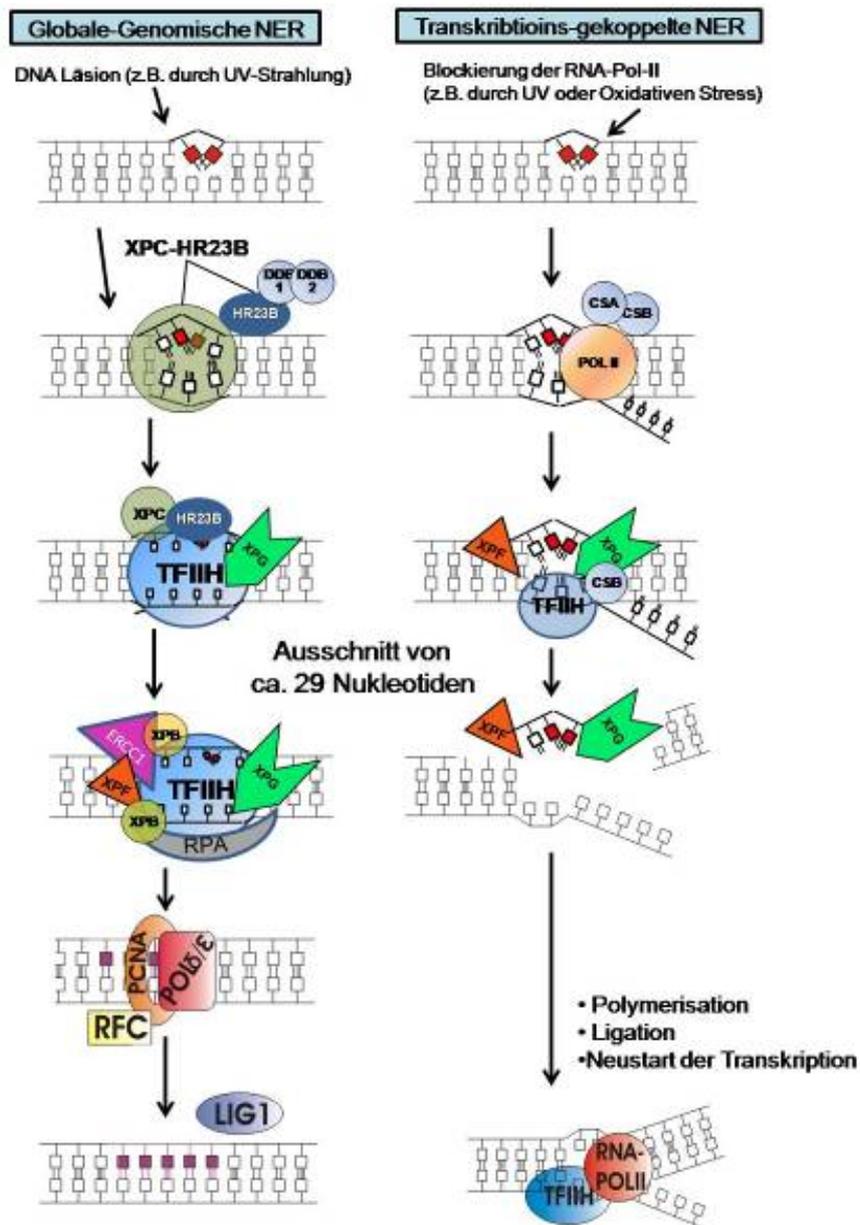


Abb. 7. Nucleotid-Exzisions-Reparatur. Schäden, die das NER System aktivieren werden je nachdem wo die Schädigung in der DNA stattfand, über die globale genomische Reparatur oder über die transkriptions gekoppelte Reparatur behoben. (Modifiziert nach Hoeijmakers, 2001; Buschfort-Papewalis *et al.*, 2002; Christmann *et al.*, 2003 und Sancar *et al.*, 2004)

Während bei der TCR nur die durch einen DNA-Schaden blockierte RNA-Polymerase II der auslösende Schritt ist und zur Rekrutierung der Proteine CSA und CSB an diese Stelle führt, wird bei der GGR ein DNA-Schaden durch das Heterodimer XPC-HR23B, den DDB1- DDB2 Komplex sowie durch Gadd45 α erkannt.

Dies führt zu einer Veränderung der DNA-Struktur und leitet so die weiteren Reparaturschritte ein (Zhan, 2005). Alle folgenden Schritte sind bei beiden

Reparaturmechanismen identisch. Nach dem Erkennungsschritt binden mehrere Proteine, XPA und RPA, zur Schadensvalidierung an die DNA. Diese rekrutieren den TFIIH-Komplex, welcher u.a. aus zwei Helikasen XPB und XPD besteht, und sorgen so für das lokale Entwinden der DNA und die Entstehung der sogenannten Reparaturblase. Durch die Endonukleasen XPG und XPF/ERCC1 wird in einem weiteren Schritt ein etwa 20 – 30 Nukleotide langes Stück Einzelstrang DNA, welches den Schaden beinhaltet, entfernt. Die entstandene Lücke wird nun durch die DNA-Polymerasen δ und ε aufgefüllt und durch die DNA-Ligase I mit dem bestehenden Strang verbunden (Hanawalt, 2002; Tornaletti, 2009).

1.4.2. Fanconi Anämie Signalweg

Die Fanconi Anämie (FA) ist eine seltene autosomal- sowie x-chromosomal-rezessive Erbkrankheit, welche 1927 von Guido Fanconi beschrieben wurde (Fanconi, 1927). Sie ist klinisch charakterisiert durch Symptome wie congenitale Fehlbildungen, chronisch progredientes Versagen der Hämatopoese und einer erhöhten Inzidenz von Malignomen. Auf zellulärer Ebene ist die FA durch eine erhöhte spontane Chromosomenbrüchigkeit sowie eine Hypersensitivität gegenüber DNA quervernetzenden Reagenzien, wie Cisplatin oder Mitomycin C, charakterisiert (D'Andrea and Grompe, 2003). Aufgrund der Hypersensitivität gegenüber diesen Reagenzien wird vermutet das FA Proteine an der DNA-Reparatur (HR, NHEJ, TLS) beteiligt sind (Taniguchi und D'Andrea, 2006; Wang, 2007). Diese Beteiligung an der DNA-Reparatur wird auch als der Fanconi Anämie Signalweg oder als FA-BRCA Netzwerk bezeichnet und setzt sich aus 13 bisher bekannten verschiedenen Komplementationsgruppen zusammen (Fanc-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L, -M, -N. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bekannten FA-Proteine. Diesen 13 Gruppen konnten jedoch erst 12 Gene zugewiesen werden (*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCJ*, *FANCL*, *FANCM*, *FANCN*) (Kennedy und D'Andrea, 2005). Die molekularen Funktionen der Fanconiproteine sind bisher noch nicht komplett aufgeklärt, aber ein aktuelles Modell sieht folgende Schritte in diesem Mechanismus vor. Acht der bekannten Proteine (FancA, B, C, E, F, G, L und M) und ein noch nicht identifiziertes Protein (FAAP100) bilden im Nukleus den sogenannten Kernkomplex, der eine E3 ubiquitin Ligase Aktivität besitzt (Grompe und van de Vrugt, 2007). Der Kernkomplex bildet mit weiteren Proteinen, BLM, RPA und der Topoisomerase III α , einen weiteren

Einleitung

sogenannten großen Superkomplex, namens BRAFT. Nach einer DNA-Schädigung in der S-Phase der Zelle durch Mitomycin C, Röntgen- oder Ultraviolettstrahlen monoubiquitiniert der Kernkomplex zusammen mit UBE2T das FancD2 Protein am Lysin 561, sowie dessen homolog FancI. Das aktivierte FancD2 translokalisiert zu DNA-Reparatur Foci und interagiert dort mit weiteren DNA Reparatur Proteinen (BRCA1, RAD51, BRCA2) um eine Reparatur einzuleiten (Taniguchi und D'Andrea, 2006).

Tab.1. Übersicht der Fanconi Anämie Proteine und deren Eigenschaften

Subtyp	Defektes Gen	Patienten (%)	Chromosomale Lokalisation	Protein (kDa)	FA-D2 - Ub	Aufgabe des Proteins	Bemerkung
A	<i>FANCA</i>	57	16q24.3	163	+	Kernkomplex	
B	<i>FANCB (FAAP95)</i>	0,3	Xp22.31	95	+	Kernkomplex	
C	<i>FANCC</i>	15	9q22.3	63	+	Kernkomplex	Zytoplasmatische Funktionen
D1	<i>FANCD1/BRCA2</i>	4	13q12-13	380	-	Rekrutierung vonRAD51	
D2	<i>FANCD2</i>	3	3p25.3	155,162	+		Mono-Ub-Protein
E	<i>FANCE</i>	1	6p21-22	60	+	Kernkomplex	Bindet direkt ans FANCD2
F	<i>FANCF</i>	2	11p15	42	+	Kernkomplex	
G	<i>FANCG/XRCC9</i>	9	9p13	68	+	Kernkomplex	
I		<0,1	15q25-26	~150	+	?	FANCD2 Homolog
J	<i>FANCI/BACH1/BRI P1</i>	1,6	17q22-q24	130	-	5'>3' DNA Helikase/ATPase	Bindet zu BRCA1
L	<i>FANCL/PHF9/POG (FAAP43)</i>	0,1	2p16.1	43	+	FA Kernkomplex/ Ubiquitinligase Ligase	
M	<i>FANCM/Hef (FAAP250)</i>	<0,1	14q21.3	250	+	Kernkomplex/ATPase/Translokase	Helikase/Nuklease Motif
N	<i>FANCN/PALB2</i>	1	16p12.1	130	-	Regulation der BRCA2 Lokalisation	

?, unbekannt; +, benötigt für *FANCD2* monoubiquitination; -, nicht benötigt für *FANCD2* monoubiquitination (Taniguchi T und D'Andrea, 2006, Smogorzewska *et al.*, 2007; Dorsman *et al.*, 2007)

Ein weitere wichtige Rolle in der DNA-schadensinduzierten Monoubiquitinierung von FancD2 und FancI spielen die zwei wichtigen Zellzyklus Checkpunkt Kinasen ATR und ATM. Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung von FancD2 durch diese beiden Kinasen für die Fokusformation des Proteins mit anderen Reparaturproteinen zuständig ist und zu einer Verstärkung der Phosphorylierung führt (Niedernhofer *et al.*, 2005). Interessanterweise werden die genannten Kinasen für verschiedene Schäden aktiviert. ATM phosphoryliert FancD2 hauptsächlich nach Schädigung durch Röntgenstrahlen, während ATR nach vielen verschiedenen Schäden, wie Crosslinks oder replikativem Stress aktiv wird (Taniguchi and D'Andrea, 2006).

Einleitung

Neuere Studien zeigten, dass auch andere FA-Proteine von ATR phosphoryliert werden, um unter anderem die Ubiquitin-Ligaseaktivität zu steigern.

BRCA2/FancD1, FancJ und FancN gehören zu den restlichen FA-Proteinen, die unabhängig von dem Kernkomplex und dem ID-Komplex agieren. Alle drei unterstützen den FA-Signalweg oder haben weitere noch nicht bekannte Funktionen (Patel und Joenje, 2007; Litman *et al.*, 2008). Für die Beteiligung an der Reparatur von Alkylierungsschäden ist bisher wenig beschrieben. Chen *et al.* (2007) zeigte in einer Studie, dass ein Ausfall des FancD2-Proteins zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber TMZ führt. Auf molekulare Mechanismen wird in diesem Bericht allerdings nicht weiter eingegangen, weshalb viele Fragen offen bleiben.

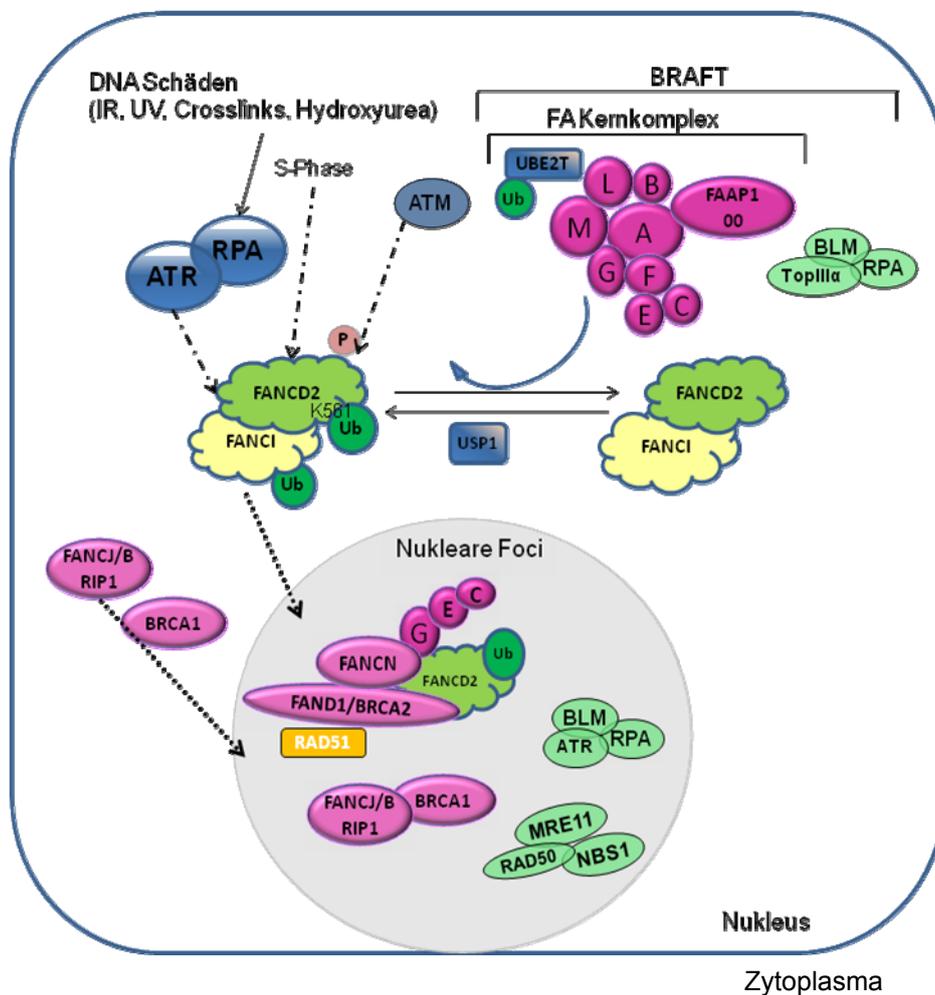


Abb. 8. Schematische Darstellung des Fanconi Anämie-Weges. Als Antwort auf einen DNA-Schäden wird FancD2 von verschiedenen Molekülen monoubiquitiniert und translokalisiert in den Kern, wo weitere Moleküle zusammen mit den FA-Proteinen Foci bilden und eine Reparatur einleiten. — • — Multistritt Stimulation, Translokation; Ub, Ubiquitin; P, Phosphorylation (Modifiziert nach Jacquemont und Taniguchi, 2007)

2. Ziel dieser Arbeit

Die Reparatur von O⁶-Methylguanin ist sehr gut beschrieben, jedoch werden immer noch Entdeckungen in diesem Gebiet gemacht, wie zum Beispiel die Regulierung der MGMT durch epigenetische Modifikationen. Auch steht die Frage noch offen, wie die MGMT zu den DNA-Schäden geleitet wird und ob das O⁶-MeG die Helixstruktur der DNA verändert. Eine weitere Fragestellung betrifft die Reparatur des DNA-Schadens. Was passiert wenn ein oder mehrere DNA Reparatur Mechanismen ausfallen? Bisher wurde gezeigt, dass ein Ausfall der MMR, der MGMT, sowie der DSB Reparatur nach einer Behandlung mit alkylierenden Substanzen zu erheblichen Schäden oder zum Zelltod führt. Weiter zeigte eine Beobachtung von Engelbergs *et al.* (1998), dass transkribierte Gene schneller repariert werden als die nicht-transkribierte, was für die genomische Stabilität von großem Nutzen ist. Jedoch wurde in dieser Arbeit auch gezeigt, dass ein Fehlen des NER Proteins XPA eine erhöhte Sensitivität gegenüber alkylierenden Substanzen zur Folge hatte. Diese Beobachtung wurde schon früher in human Zelllinien von XP-Patienten gemacht, jedoch nicht weiter untersucht (Bronstein *et al.*, 1992). Auch wurde schon früher in vereinzelt Studien gezeigt, dass das bakterielle NER-System einen O⁶-MeG Schaden in seiner DNA erkennen kann und die Reparatur einleitet (Samson *et al.*, 1988). Basierend auf den verschiedenen Hinweisen zur Existenz eines alternativen, MGMT-unabhängigen Reparaturweg für kritische O⁶-MeG-Addukte soll in dieser Arbeit der Mechanismus in Säugerzellen näher charakterisiert werden. Außerdem sollen beteiligte Proteinfaktoren identifiziert werden und die Folgen eines Funktionsverlustes nach DNA-Schädigung an geeigneten Zellsystemen untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Plastikmaterial für die Zellkultur wurde ausschließlich von den Firmen Greiner Bioscience, BD oder TPP verwendet.

3.1.1. Geräte

Gerät	Firma
Agarosegel Dokumentations System	PEQLab, Erlangen, DE
Agarosegel-Kammern	PEQLab, Erlangen, DE
CO ₂ -Inkubatoren (C200)	Labotect, Göttingen, DE
FACSCanto	BD bioscience, Franklin Lakes, NJ
Feinwaage	Bosch, Jungingen, DE
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena, DE
FLUOstar Omega	BMG Labtech, Offenburg, DE
LAS 3000 Gel Dokumentations System	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, DE
Mikroliterzentrifugen MIKRO 200	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, DE
Mikroliterzentrifugen MIKRO 200R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, DE
Mikroskop	Zeiss, Jena, DE
MiniProtean III System	BioRad, Hercules, USA
Nalgene Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, Rochester, USA
Neubauer Zählkammer	GLW, Würzburg, DE
Nirozollulose Membran Hybond	Amershan, GE Healthcare, Freiburg, DE
pH-Meter	Mettler-Toledo, Giessen, DE
Photometer	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipetus-akku, P 990 7001/0294	Hirschmann, Eberstadt, DE
Pipetus-standard, P990 30 01	Hirschmann, Eberstadt, DE
Präzisionswaage	Bosch, Jungingen, DE
PTC-200 PCR Cyclers	BioRad, Hercules, USA
Sicherheitswerkbank	NUAIRE, Plymouth, USA
Strom-Geber	BioRad, Hercules, USA
Vortexer	VWR
Zentrifuge Rotina 48	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, DE
Wasserbad TWB 22	Julabo, Seelbach
Mikrowelle	Bosch, Jungingen, DE
Ultraschallbad/ Laboson 200	Bender&Hobein GmbH, Ulm, DE

Material und Methoden

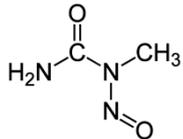
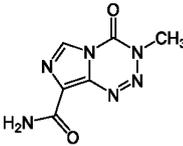
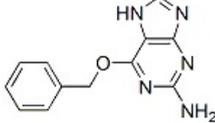
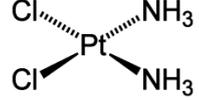
3.1.2. Chemikalien, Enzyme und Lösungen

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Amersham Pharmacia, Boehringer Mannheim, Cell signalin, Fermentas, GibcoBRL, Invitrogen, Lonza, Merck, New England Biolabs (NEB), PAA, Peprotek, Roth, Sigma-Aldrich, Serva und Stem Cell Tec. bezogen.

3.1.3. Kommerzielle Kits

Annexin-V: APC Apoptosis detection Kit	BD PharMingen, San Jose, CA
DNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Germany
innuPREP DNA Micro Kit	Analytik-Jena, Jena, Germany

3.1.4. Alkylierende Chemikalien und Inhibitoren

N-Nitroso-N-methylurea (MNU)	Serva, Heidelberg, DE	
Temozolomide (TMZ)	Chemodex, St. Gallen, CH	
O ⁶ -Benzylguanin (BG)	Sigma.Hamburg, DE	
Cisplatin	medac GmbH, Wedel, DE	

3.1.5. Antikörper

Kaninchen-anti-FancD2	Novus, Cambridge, UK
Maus-anti-β-actin	Sigma-Aldrich, München, DE
Maus-anti-O ⁶ -MeG (EM-2-3)	Squarrix, Marl, DE
Ratte-anti-Cisplatin	Dr. J. Thomale (Uni Duisburg-Essen)
Ziege-anti-Kaninchen-HRP	Dianova, Hamburg, DE
Kaninchen-anti-Maus-HRP	Dianova, Hamburg, DE
Kaninchen-anti-Maus-Cy3	Dianova, Hamburg, DE
Kaninchen-anti-Ratte-Cy3	Dianova, Hamburg, DE

Material und Methoden

3.1.6. Primer

FancD2:

D2MG 1008 : 5'-CAG GGA TGA AAG GGT CTT ACG C-3'
 D2MG 1280: 5'-GCT ACA CAG CATT GCC CAT AAA G-3'
 D2MG 968: 5'-TCA GCC TCA CAT GGA GTT TAA CG-3'

XPC:

F-PGK-864: 5'-CGC ACG CTT CAA AAG CGC ACG TCT GCC GCG-3'
 R-HPRT-988: 5'-CGA GCG TGG GAC TGC GGG TCG GCA TGA CGG-3'
 F-XPC in445: 5'-ACA GCC TAC CCA GGG GAT GTG ATG CTT CCT-3'
 R-XPC in670: 5'-TGG TCT GTG GAC AGA GAA CAC TGG CTG TGC-3'

XPA:

XPA-WT: 5'-GTG GGT GCT GGG CTG TCT AA-3'
 XPA-KO/WT: 5'-ATG GCG TGG GTT CTT CTT C-3'
 XPA-KO: 5'-ATG GCC GCT TTT CTG GAT TC-3'

3.1.7. Mäuselinien

Tab. 2. Mäuselinien, Genotyp und Herkunft

Mauslinie	Defekt	Phänotyp	Anmerkungen	Quelle
FancD2	FANCD2 knockout	Microphthalmia, perinatale Letalität, epithelialer Krebs	Sensitivität gegenüber <i>Cross-linking</i> Reagenzien	Houghtaling et al., 2003
XPA	XPA knockout	keinen	UV induzierbare Tumore	
B6;129s7- XPC ^{tml/Brd}	XPC knockout	keinen	UV induzierbare Tumore; Sands et al., 1995	Taconic (000557)
Gadd45α	GADD45α knockout	Kleinerer Körperbau		Dr. Niehrs DKFZ, Heidelberg
C57BL/6J	Wildtyp Inzuchtstamm	keinen		Jackson Laboratories

3.1.8. Zelllinien

Tab. 3. Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Spezies	Zellbank	Quelle	Anmerkungen
PD20.L	Lymphoblast	Human	Coriell (GM16756)	Whitney et al., 1995	FANC-D2 Defizient
PD20.L+D2	Lymphoblast	Human		Andreassen, Cincinnati, USA	FANC-D2 rekonstituiert
PD20.F	Haut-Fibroblasten	Human	Fanconi Anemia Cell Repository*	Jacob et al., 1996	FANC-D2 Defizient
PD20.F+D2	Haut-Fibroblasten	Human	Fanconi Anemia Cell Repository*	Jacob et al., 1996	FANC-D2 rekonstituiert
HSC72	Lymphoblast	Human		Ishida und Buchwald, 1982	FANC-A Defizient
HSC72+A	Lymphoblast	Human		Andreassen, Cincinnati, USA	FANC-A rekonstituiert
PD4	Lymphoblast	Human	Fanconi Anemia Cell Repository*	Andreassen, Cincinnati, USA	FANC-C Defizient
PD4+C	Lymphoblast	Human		Andreassen, Cincinnati, USA	FANC-C rekonstituiert
EUFA316	Lymphoblast	Human		Andreassen, Cincinnati, USA	FANC-G Defizient
EUFA316+G	Lymphoblast	Human		Andreassen, Cincinnati, USA	FANC-G rekonstituiert
PD7	Lymphoblast	Human	Fanconi Anemia Cell Repository*	Andreassen, Cincinnati, USA	Wildtyp
GM 00637	Haut-Fibroblasten	Human	Coriell (GM00637)	Hans-Peter Nägeli	Wildtyp
XP4PA-SV-EB	Haut-Fibroblasten	Human	Coriell (GM15983)	Emmert et al., 2000	XPC defiziente Zelle
XP4PA-SE1	Haut-Fibroblasten	Human	Coriell (GM16247)	Emmert et al., 2000	partiell korrigiert
XP4PA-SE2	Haut-Fibroblasten	Human	Coriell (GM16248)	Emmert et al., 2000	komplett korrigiert

* Oregon Health Sciences University

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Alle in der unten stehenden Tabelle aufgelisteten Zellen wurden bei einer Konfluenz von max. 90 % geteilt, welches einen Rhythmus von 2 bis 3 Tage darstellt. Aus der Tabelle ist zu entnehmen welche Kulturbedingungen die einzelnen Linien haben.

Tab. 4. Zelllinien und Ihre Kultur Bedingungen

Zelllinie	Zelltyp	Medium	FKS	Zusätze	CO ₂
PD20.L	Lymphoblast	RPMI	15 %	1 % Pen/Strep	5 %
PD20.L+D2	Lymphoblast	RPMI	15 %	1 % Pen/Strep	5 %
PD20.F	Haut-Fibroblasten	αMEM	20 %	1 % Pen/Strep, 1 % NEAA	5 %
PD20.F+D2	Haut-Fibroblasten	αMEM	20 %	1 % Pen/Strep, 1 % NEAA	5 %
HSC72	Lymphoblast	RPMI	15 %	1 % Pen/Strep	5 %
HSC72+A	Lymphoblast	RPMI	15 %	1 % Pen/Strep	5 %
PD4	Lymphoblast	RPMI	15 %	1 % Pen/Strep	5 %
PD4+C	Lymphoblast	RPMI	15 %	1 % Pen/Strep	5 %
EUFA316	Lymphoblast	RPMI	15 %	1 % Pen/Strep	5 %
EUFA316+G	Lymphoblast	RPMI	15 %	1 % Pen/Strep	5 %
GM 00637	Haut-Fibroblasten	DMEM	10 %	1 % Pen/Strep	5 %
XP4PA-SV-EB	Haut-Fibroblasten	DMEM	10 %	1 % Pen/Strep	8 %
XP4PA-SE1	Haut-Fibroblasten	DMEM	10 %	1 % Pen/Strep, Hygromycin B	8 %
XP4PA-SE2	Haut-Fibroblasten	DMEM	10 %	1 % Pen/Strep, 0,2 mg/ml Hygromycin B	8 %

Pen/Strep; Penicilin/Streptomycin Antibiotica, NEAA; non essential amino acids

3.2.2. Genotypisierung der Maus-Linien

DNA wurde aus Ohr Gewebe oder aus Schwanz Biopsien gewonnen und für PCR Analysen weiterverwendet. Die Gewebe wurden in ca. 200 µl MTB Puffer über Nacht bei 57 °C inkubiert bis das Gewebe verdaut war. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 100 °C aufgekocht und ab zentrifugiert. Die so gewonnene DNA wurde für die PCR Reaktion verwendet. Schwanz Biopsien wurden mit Hilfe des

Material und Methoden

DNeasy Kits der Firma Qiagen nach Protokoll isoliert. Die Primer Sequenzen der jeweiligen Genotypisierung sind unter Punkt 2.1.5. aufgelistet. Die jeweiligen PCR Konditionen werden in der folgenden Liste angezeigt. Die Auftrennung der DNA erfolgte auf einem 2 %igen Agarose Gel.

Tab. 5. Genotypisierungs Bedingungen

Genotyp	PCR Kondition		Bandengrößen	
FancD2	94 °C	3 min	FancD2 WT: 303 bp FancD2 KO : 459 bp	
	94 °C	25 s		
	46 °C	25 s		
	68 °C	60 s		
	72 °C	2 min		
	4 °C	for ever		
XPA	94 °C	2 min	XPA WT: 279 bp XPA KO : 205 bp	
	94 °C	25 s		
	58 °C	30 s		
	72 °C	60 s		
	72 °C	4 min		
	4 °C	for ever		
B6;129s7-XPC ^{tml/Brd}	94 °C	3 min	XPC WT: 238 bp XPC KO: 180 bp	
	94 °C	30 s		
	65 °C -0,5 °C /Zyklus	30 s		
	72 °C	1 min		
	94 °C	30 s		
	58 °C	30 s		
	72 °C	1 min		
	72 °C	10 min		
	4 °C	for ever		

Lösungen für die Genotypisierung

1x TAE: 40 mM Tris
 1,14 ml/L Essigsäure
 2 mM EDTA
 pH 8,0

1x TE: 10 mM Tris
 75 mM
 pH 7,2

Material und Methoden

PCR 1x Ansatz: 12,5 µl GoTaq Green Mix (Promega)
1 µl primer (A)
1 µl primer (B)
1 µl primer (C) (Nur bei Genotypisierung von XPA und FancD2)
8 µl Wasser
1,5 µl DNA

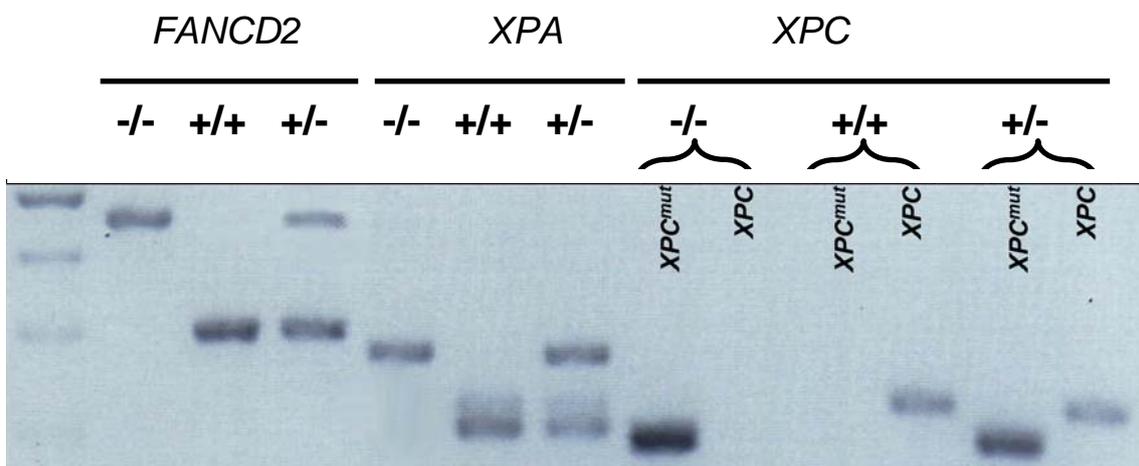


Abb. 9. Genotypisierungs-Produkte. Repräsentatives Bild von PCR Produkten einer Genotypisierung. Für die Bestimmung des Genotypen wurden für die Linien FancD2 und XPA eine 3 Primer Methode gewählt, bei der man in einer PCR Reaktion den Haplotypen bestimmen kann. Für die Bestimmungen der XPC Mäuse wurde eine 2 Schritt PCR Methode Etabliert. Hierzu wurde ein Primer Paar entwickelt das im Wildtyp Gen liegt. In einer weiteren PCR wird ein Primer Paar verwendet welches das der Knockout eingefügten menschlichen PKG-HPRT Gen detektiert.

-/-, Homozygot Knockout; +/+ Homozygot Wildtyp; +/-, Heterozygot

3.2.3. *In vitro* Alkylierung von Primärzellen und Zelllinien

Um DNA-Schäden, DNA-Reparatur und zelluläre Reaktion einzuleiten, wurden die zu behandelnden Zellen mit subtoxischen Dosen von Methylnitroserharnstoff (MNU) (3-25 µg/ml), Hydroxyharnstoff (1mM) oder dem MGMT Inhibitor O⁶-Benzylguanin (BG) (15-25 µM) behandelt. BG inhibiert das MGMT-Protein indem das enthaltene Benzylmolekül an den Internen Cysteinrest im aktiven Kern der MGMT bindet und so die MGMT-Proteine degradiert (Abb 10., Dolan *et al.*, 1990; Pegg *et al.*, 2001). Die Behandlung mit dem Inhibitor erfolgte 60 min vor der Alkylierung, um sicher zustellen dass der größte Teil der MGMT Proteine durch das BG blockiert wird. Anschließend erfolgte die Alkylierung mit MNU in der jeweiligen versuchsabhängigen Konzentration. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben der behandelten Zellen zur Analyse entnommen.

Material und Methoden

Lösungen für *In vitro* Exposition gegenüber DNA-reaktive Agenzien

Methylnitroseharnstoff	100 mg/ml Methylnitroseharnstoff in DMSO (1M). Lagerung: -20°C
Hydroxyharnstoff	0,2 M Hydroxyharnstoff in IMDM-Medium. Lagerung: -20°C
O ⁶ -Benzylguanin	100 mM in DMSO. Lagerung: -20°C

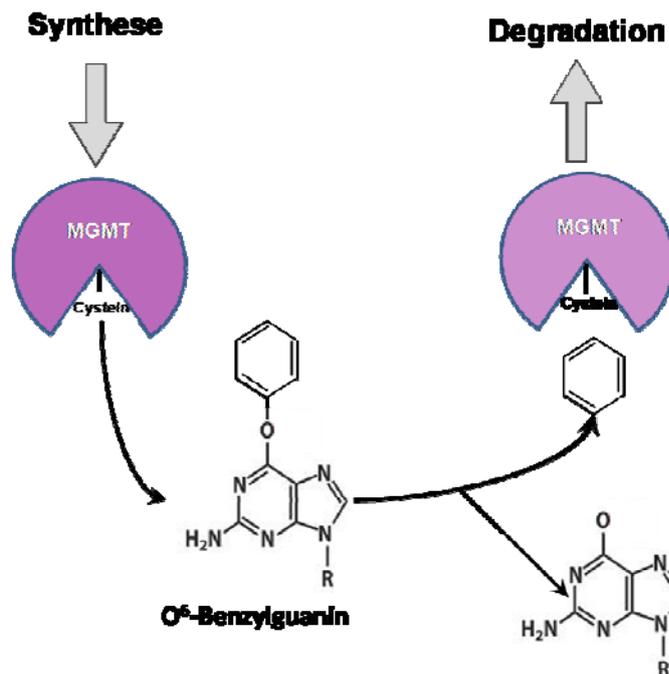


Abb. 10. Mechanismus der MGMT Inhibition durch O⁶Benzylguanin. Die Benzylgruppe des Inhibitors BG ist ein favorisiertes Substrat für die MGMT. Nach dem die Benzylgruppe an den internen Cysteinrest gebunden ist, wird diese Gruppe abgespalten und das MGMT-Protein degradiert. www.mgmt-agt.net (Modifiziert).

3.2.4. *In vivo* Behandlung von Mäusen

Die zu behandelnden Mäuse wurden mit 25 mg/kg BG für mind. 1 Stunde vorbehandelt. Hierfür wurde die entsprechende Menge der Stock Lösung (50 mg/ml) in sterilem PBS resuspendiert. Die zu behandelnden Mäuse wurden gewogen und anhand ihres Gewichtes die jeweilige Menge des Inhibitors I.P. verabreicht. Nach der Vorbehandlung wurde den Mäusen an Hand Ihres Körpergewichtes die Entsprechende Menge an MNU gegeben, so dass eine Endkonzentration von 25 mg/kg erreicht wurde.

Material und Methoden

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

Lösungen für die *in vivo* Behandlung

MNU Stock Lösung	100 mg/ml
BG Stock Lösung	50 mg/ml

3.2.4.1. Organ- und Knochenmark-entnahme

Für die Entnahme von Organen und dem Knochenmark wurden die behandelten Mäuse mit CO₂ euthanasiert. Die entnommenen Organe (Leber, Niere) wurden direkt auf Trockeneis gestellt und für weitere Verwendungen bei -80 °C gelagert.

Die entnommene Milz wurde sofort in PBS aufbewahrt. Für die Isolation der Lymphozyten wurde die Milz unter sterilen Bedingungen in 5 ml PBS zerkleinert. Das so gewonnene Extrakt wurde durch ein Zellsieb gegeben um eine Einzelzellkultur zu erhalten. Um eine saubere Lymphozyten Kultur zu erreichen wurden die isolierten Zellen über einen Ficoll Gradient von den restlichen Blutkompartimenten getrennt. Die Trennung erfolgte bei 1900 rpm für 30 min (ohne Bremse). Anschließend wurde die entstandene Interphase, welche die mononukleären Zellen enthält, entnommen und 2x mit PBS gewaschen. Die isolierten Zellen wurden in IMDM Medium resuspendiert und konnten nach einer Zellzahl Bestimmung für Versuche verwendet werden.

Für die Isolation von Knochenmarks Zellen wurden die Oberschenkel- und Schienbein-Knochen entnommen und in PBS gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurden die Knochen vorsichtig auf beiden Seiten geöffnet und mit Hilfe einer PBS beladenen 5ml-Spritze mit 20-Gauge-Kanüle das Knochenmark ausgespült. Falls Klumpen vorhanden waren, wurden diese resuspendiert. Anschließend wurde die gewonnene Lösung durch ein Zellsieb geben und auf einen Ficoll-Gradienten aufgetragen. Die Separation und Kultivierung der Lymphozyten erfolgte wie weiter oben schon beschrieben.

3.2.5. Nachweis von O⁶-Methylguanin in Zellen und Gewebe

3.2.5.1. Immunhistochemische O⁶-meG-Färbung (ICA)

Nach *in vitro* oder *in vivo* Alkylierung wurden die Zellkultur- oder Primär-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in HAES-Lösung suspendiert. Jeweils 10⁴ Zellen der verschiedenen Proben wurden auf speziell beschichtete Immunoselect Objektträger aufgebracht. Nach der Trocknung wurden die Proben bei -20 °C zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Der Nachweis der O⁶-MeG Schäden erfolgte mit dem Immunzytologischen Assay entwickelt von Seiler *et al.* (1993). Hierzu wurden die Proben für 30 min bei -20 °C in Methanol fixiert und anschließend für 5 min in PBS rehydriert. Damit die Zugänglichkeit des Antikörpers in die DNA gewährleistet wird, wurde die DNA für 5 min in Alkali-Lösung (4 °C) entspiralisiert. Nach dem Waschen in PBS erfolgte ein Pepsin-Verdau (60 µg /ml in PBS/HCl, pH 6) für 10 min bei 37 °C. Nach wiederholtem Waschen erfolgte ein weiterer Verdau, diesmal mit Proteinase K (20-40 µg/ml in Proteinase K-Puffer) für 10 min bei 37 °C. Danach wurden die Proben in Glycin/PBS für 10 min gewaschen. Anschließend erfolgte ein 30-minütiger Blockierungsschritt um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen mit 5 % Magermilchpulver in PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-O⁶MeG (EM-2-3) erfolgte in einer 1:1000 Verdünnung in 1%BSA/PBS für 16 h bei 4 °C in einer Feuchtkammer.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen für 5 min in PBST und für weitere 5 min in PBS gewaschen und erneut mit Magermilchpulver behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Kaninchen anti-Maus IgG (H+L) Cy3; 1:100, 1 % BSA/PBS) für 1 h bei 37 °C. Die Proben wurden wiederum für 5 min mit PBST und PBS gewaschen (s. o.). Zum Schluss erfolgte die Färbung der DNA mit DAPI (1 µg/ml in PBS) für 30 min und die Eindeckung der Präparate. Die Auswertung erfolgte mittels eines Computerunterstützten Mikroskop. Es wurden mind. 100 Zellen von jedem Präparat gemessen.

Material und Methoden

Lösungen für die ICA

HAES-steril-Lösung: 25 % HAES-steril (10 %) in PBS

10 x PBS: 0,1 M Na_2HPO_4
1,3 M NaCl
pH 7,5

Alkali-Lösung:
70 mM NaOH
140 mM NaCl
40 % (v/v) Methanol

Proteinase K-Puffer: 20 mM Tris
2 mM CaCl_2
pH 7,5

Glycin/PBS: 0,2 % (w/v) Glycin in PBS

PBST: 0,25 % (v/v) Tween 20 in PBS

3.2.5.2. Immuno-Slot-blot

Für die O^6 -MeG-Bestimmung von *in vivo* behandelten Mäusen wurde eine weitere Methode verwendet, welche nicht durch die DNA Neusynthese beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurde DNA aus der Leber von behandelten Mäusen mittels DNeasy Säulen isoliert. Die DNA wurde auf eine Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt. Jeweils 50 μl der isolierten DNA-Lösungen wurden anschließend für 10 min bei 100 $^\circ\text{C}$ denaturiert. Damit die DNA einzelstängig bleibt wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und mit 50 μl Ammoniumacetat (2 M) versetzt. Die so erhaltene Einzelstrang-DNA wurde nun zusammen mit einem Standard und der Verwendung einer Vakuum-Slot-blot-Kammer auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Nachdem die DNA auf der Membran eingetrocknet war wurde der Filter für 5 min in 5-fach SSC gelegt und anschließend für 3 min in einem Auto-Crosslinker vernetzt. Danach erfolgte ein Blockierungsschritt für 1 h mit 5 % BSA/TBST und eine darauf folgende über Nacht Inkubation mit dem O^6 -MeG-spezifischen Antikörper (EM-2-3, 1:1000). Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurde die Membran 3-mal mit TBST gewaschen und für 1 h mit dem Zweitantikörper, Ziege anti Maus-HRP (1:1000), bei RT inkubiert. Es erfolgten drei weitere Waschschrte mit TBST und die anschließende Detektion mittel ECL-Substrat.

Material und Methoden

Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe des Detektionssystem LAS3000 und einer anschließenden Quantifizierung mit dem Programm MultiGauge v3.0 (Futjifilm).

Lösungen für den Slot-blot

2 M Ammoniumacetat

20X SSC: 3 M NaCl
 0,3 M Natriumcitrat
 Wasser
 pH 7,0

TE-Puffer: 10 mM Tris
 5 mM EDTA
 pH 7,2

TBST: TBS + 0,1 % Tween-20

3.2.6. Einzelzellgelelektrophorese (*Comet assay*)

DNA-Strangbrüche wurden mit Hilfe der Einzelzellgelelektrophorese (*Comet assay*) bestimmt (Singh *et al.*, 1988; McNamee *et al.*, 2000). Hierzu wurden Silikon 8-well-Kammern (flexiPERM) auf GelBond Folien (LONZA) geklebt. Dies diente dazu verschiedene Zeitpunkte auf einem Objektträger darzustellen. Nach Exposition mit Alkylanzien bzw. zu verschiedenen Reparaturzeitpunkten wurden Aliquots von 5×10^3 - 1×10^4 Zellen genommen, 2x mit PBS gewaschen und in $40 \mu\text{l}$ 40°C warme LMP-Agarose (0,75 %) aufgenommen. Diese Lösung wurde anschließend in eine der Kammer auf die Folie aufgetragen. Nach dem Erstarren wurde die Kammer entfernt und die Gele in Lyse-Puffer ü.N. bei 4°C inkubiert. Wurden die Zeitpunkte genommen die länger als 2 h auseinander lagen wurde ca. 20 - 50 μl des Lysepuffers in die Kammer gegeben um ein austrocknen der Gele zu verhindern. Nach dem Lyseschritt wurde die DNA der Zellen für 20 min bei RT in Elektrophorese-Puffer denaturiert und unter den gleichen Bedingungen elektrophoretisch getrennt (20 min; 4°C ; 1,5 V/cm). Es erfolgte eine Neutralisation in Tris-Puffer für 30 min bei RT. Anschließend wurden die Gele für 30 min in Ethanol entwässert und über Nacht getrocknet. Für die Auswertung wurde die DNA mit SYBRGreen (1:10000 in TAE-Puffer) angefärbt und fotografiert. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ‚Cometscore‘ der Firma TriTek Corp.

Material und Methoden

Lösungen für den Comet assay

Lyse-Puffer :	2,5 M	NaCl
	0,1 M	EDTA
	10 mM	Tris
	1 % (v/v)	n-Laurylsarkosinat
	10 % (v/v)	DMSO
	1 % (v/v)	Triton X-100

Elektrophorese-Puffer:	0,3 M	NaOH
	1 mM	EDTA
	10 mM	Tris
		pH 12,7

Neutralisierungs-Puffer: 0,4 M Tris/HCl pH 7,4

3.2.7. Immuno-Blot Nachweis von Proteinen

3.2.7.1. Protein Isolation

Für die Isolation von Proteinen wurden ca. 90 % konfluent gewachsene 10 cm Kulturschalen oder min. 3×10^6 Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA vom Boden gelöst und bei 200 x g zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde danach in das 5-fache Volumen an RIPA Puffer gelöst. Die Suspension wurde dann für 30 s auf dem Vortexer gemischt und anschließend bei 4 °C für eine Stunde oder ü.N. auf einem Schüttler gemischt. Anschließend an der Inkubation wurden die Proben für 20 s mit Ultraschall behandelt um die Kernproteine zu isolieren. Die so gewonnenen Zelllysate wurden dann für 20 min bei 13000 rpm und 4 °C, abzentrifugiert. Drei µl des gewonnenen Überstandes wurden anschließend für eine Protein Bestimmung abgenommen. Nach der Konzentrations-Bestimmung wurde die entsprechende Menge Protein mit 5x SDS-Ladepuffer und Wasser gemischt und für 5 min bei 100 °C aufgekocht. Die Proben wurden entweder sofort verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Material und Methoden

Lösungen für Zell-Lysatsherstellung

1x RIPA-Puffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1 % (v/v)	Nonidet NP-40
	1 %	Na-deoxycholate
	0,1 % (v/v)	SDS
Proteinaseinhibitoren:	1mM	PMSF
	1 mM	Natrium Orthovanadat
	2 µg/ml	Aprotinin
	3 µl/ml	proteinaseinhibitor Cocktail (sigma)
SDS-Ladepuffer	250 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	12 %	SDS
	40 % (v/v)	Glycerin
	0,6%	Bromphenolblau
	5 %	β-Mercaptoethanol

3.2.7.3. Proteinbestimmung

Die Konzentration des Proteins wurde photometrisch nach der Bicinchoninsäure (BCA) Methode von Smith *et al.* (1985) bestimmt. Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine mit Cu^{2+} -Ionen einen Komplex bilden, welcher in alkalischer Lösung zu Cu^{1+} -Ionen reduziert welcher dann mit der BCA einen violetten Farbkomplex bildet. Die Absorption wird bei 562 nm gemessen. Die BCA-Methode zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und eine geringe Störanfälligkeit aus.

Die Proteinbestimmung wurde mit dem *BCA Protein Assay Reagen^t* von Pierce durchgeführt, mit einem leicht abgewandelten Protokoll. Die angegebenen Mengen wurden auf 0,5 ml BCA-Reagenz und 3 µl Probe reduziert. Eine Standardreihe mit BSA wurde für jede Messung angefertigt.

3.2.7.4. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Transfer Bedingungen

Die Auftrennung der isolierten Proteine erfolgte über einenedenaturierende SDS-PAGE nach Laemmli *et al.* (1970). Für die Trennung von großen Proteinen, ab 100 kDa wurden 6 %ige Gele verwendet. Für alle anderen Anwendungen wurden 4-15 %ige Gradientengele (*Precast polyacrylamid tris-HCl gels*, Bio-Rad) benutzt. Die zu analysierenden Proben wurden auf eine Proteinkonzentration angeglichen und mit

Material und Methoden

dem SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min aufgeköcht. Abhängig von dem zu detektierenden Protein wurden 15-40 µg auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-100 V für ca. 1,5 h. Die fertigen Gele wurden anschließend für einen Proteintransfer weiter verwendet.

Für den Transfer wurde wahlweise ein *Semi-dry*- oder ein *Wet-tank*-Blotter (beide von BioRad) verwendet. Der Transfer in der Wet-Blot-Kammer fand für 2 h bei 80 V und 4 °C, im 1x Transferpuffer statt. Für den Semi-Dry-Blot wurden folgende Konditionen gewählt: 1,5-2 h, 200 mA, 1x Transferpuffer (+ 1 % SDS). Der Erfolg des Transfers wurde anhand des aufgetragenen gefärbten Markers und einer Ponceau S Färbung beurteilt.

Lösungen für SDS-PAGE und Transfer

10x SDS-Laufpuffer:	0,25 M	Tris Base
	1,92 M	Glycin
	1 %	SDS
	Aqua dest. bis 1000 ml auffüllen	

10x Transferpuffer:	0,25 M	Tris Base
	1,92 M	Glycin
	Aqua dest. ad	

1x Transferpuffer (1000 ml):	200 ml	Methanol
	100 ml	10x Transferpuffer
	1 %	SDS
	Aqua dest. ad 1000 ml	

3.2.7.5. Detektion des Proteins

Die Detektion des Proteins erfolgte über einen Antikörpernachweis und einer anschließenden Peroxidase-Reaktion. Zu diesem Zweck wurde die Nitrozellulose Membran mit dem transferierten Protein für 1,5 h mit 5 % Milch/TBST oder 5 % BSA/TBST (Nach Hersteller Angaben) geblockt, um unspezifische Bindungen zu verringern. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper ü.N. bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3-Mal für 4 min mit TBST gewaschen und mit einem HRP-konjugierten Zweit-Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Reagenz mit Hilfe eines elektronischen Dokumentationssystems (LAS3000). Für einen weiteren Proteinnachweis wurden die Membran mit Hilfe eines Stripping Reagenzes (Pierce)

Material und Methoden

von den verwendeten Antikörpern befreit. Nach mehrmaligen waschen und einem weiteren Blockierungsschritt, konnte ein neuer Primärantikörper aufgetragen werden.

Lösungen für die Detektion von Proteinen

10X TBS:	250 mM	Tris
	1,5 M	NaCl
	20 mM	KCl
		Aqua dest.
	pH 7,4	
TBST:	100 ml	10X TBS
	900 ml	ddH ₂ O
	0,1 %	Tween-20

3.2.7.6. „Strippen“ der Nitrozellulosemembran

Mit Hilfe von „Strippen“ lässt sich die Nitrozellulosemembran für die Detektion anderer Proteine wieder verwenden. Für diesen Zweck wurde die Membran für 10 bis 20 min mit Stripp-Puffer (Pierce) bei Raumtemperatur behandelt. Alternativ wurde auch ein selbst hergestellter *Strip*-Puffer verwendet. In diesem Fall wurde die Membran für 30 min bei 50 °C mit dem *Strip*-Puffer inkubiert. Anschließend erfolgten 3 Waschriffe in TBST für jeweils 5 Minuten. Im Anschluss wurde die Membran erneut mit 5% Milch/TBST geblockt. Die Membran konnte nun erneut mit primären bzw. sekundären Antikörpern inkubiert werden.

Lösungen für den Strip-Puffer

100 mM	β-Mercaptoethanol
2 %	SDS
62,5 mM	Tris (pH 6,7)
	Dest. Wasser

3.2.8. Detektion von DNA-Reparatur Foci mittels Immunofluoreszenz

Mit Hilfe dieser Methode lassen sich nukleare Foci, Stellen an denen Proteine akkumulieren, im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen. Für diesen Zweck wurden 1×10^5 Zellen auf Deckgläsern kultiviert und mit dem angegebenen Chemotherapeutikum behandelt. Für die Färbung wurde das Medium entfernt und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 20 min in

Material und Methoden

4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und noch einmal mit PBS gewaschen. Für die Permeabilisierung folgte eine 10 minütige Inkubation mit 0,4% Triton-X-100.

Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 5% Milch/PBS-Lösung für eine Stunde blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte im IF-Puffer für eine Stunde bei 37 °C. Nicht gebundener Antikörper oder unspezifische Bindungen wurden anschließend durch dreimal Waschen mit PBST reduziert. Weiter erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden an Farbstoffgekoppelten Sekundärantikörpern. Schließlich wurden die Objektträger erneut dreimal mit PBST gewaschen bevor sie mit DAPI-haltigen Eindeckmedium eingedeckt wurden. Die Objektträgern wurden mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 200M Mikroskop und einer Hamamatsu Kamera aufgenommen. Von jeder Färbung wurden drei unabhängige Auszählungen von jeweils 50 Zellkernen durchgeführt bei denen der Anteil an nukleare Foci mehr als 5 betrug.

Lösungen für Immunofluoreszenzfärbung

8% PFA	4 g PFA 50 ml PBS 1 Tropfen konz. NaOH, pH 7,4 1h 65°C
IF-Puffer	3 % BSA 0,05 % Triton-X-100 0,05 % Natriumazid In PBS
TBST:	100 ml 10X TBS 900 ml ddH2O 0,1 % Tween-20
DAPI	1 µg/ml in PBS

3.2.9. Kolonienbildung sversuche (Sensitivität Tests)

3.2.9.1. Zellkultur basierender CFA

Die Kolonienbildungsrate von adhärent wachsenden Zellen wurde in 6-Well Platten durchgeführt. Hierzu wurden je nach Zelllinie 100 oder 500 Zellen in jedes Well ausgesät. Nachdem adhären der Zellen wurden diese entweder mit dem Inhibitor

Material und Methoden

BG vorbehandelt oder direkt mit dem Alkylanz behandelt. Die Bildung der Kolonien wurde nach 7-10 Tagen überprüft. Der Inhibitor BG wurde in dieser Zeit alle 2-3 Tage erneut auf die Zellen gegeben um eine dauerhafte Inhibition der MGMT zubewirken. Für die Auszählung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit einer Kristallviolett-Lösung angefärbt. Es erfolgten mehrere Waschriffe mit PBS, bis die angefärbten Kolonien gut sichtbar waren. Jeder Versuch bestand aus dreifach Ansätzen.

Substanzen für den Koloniebildungstest

Kristallviolett-Lösung: 0.05 % Kristallviolett
 20 % Ethanol
 PBS

3.2.9.2. Methylzellulose Koloniebildungstest für Suspensionszellen

Die Sensitivität der myeloiden Zellen aus dem Knochenmark wurde mit Hilfe eines Kolonienbildungs-Versuches getestet. Zu diesem Zweck wurden bis zu 2×10^4 isolierte Zellen aus dem Knochenmark mit 25 μM des Inhibitor BG behandelt. Nach 1 h wurden die Zellen in Methylzellulose, welches Zytokine und die entsprechenden Dosen an MNU beinhaltet, gebetet und bei 37°C für 7 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien unter dem Mikroskop ausgezählt. Jeder Versuch bestand aus Triplex-Ansätzen. Die Methylzellulose wurde entweder gebrauchsfertig mit allen Zytokinen gekauft (StemCell Tech) oder nach dem unten folgendem Rezept angesetzt.

Substanzen für das Methylzellulose Medium

Methokult base	40 ml
FCS	30 ml
BSA (10 % in IMDM)	10 ml
IL3	100 ng/ml
mSCF	100 ng/ml
EPO	4 U/ml
β -ME [10 mM]	1 ml
Pen/Strep	1 ml
L-Glutamin	1 ml
IMDM	6 ml

Methylzellulose Medium + Zytokine (gebrauchsfertig) (Stem Cell Tec)

3.2.10. Apoptosenachweis mittels Annexin V Färbung

Der Nachweis von Apoptose mittels einer Annexin V Färbung, gehört zu einer der häufigsten angewendeten Methode in der Durchflusszytometrie. Annexin V ist ein Kalzium-abhängiges Phospholipid-Bindeprotein, welches eine hohe Affinität zu dem Plasmamembran Phospholipid Phosphatidylserin (PS) besitzt. Einer der frühen Ereignisse in der Apoptose ist die Translokation von PS von dem inneren der Zellmembran an die Außenseite. Dies führt dazu, dass Annexin V an PS bindet und zeigt somit das frühe Stadium der Apoptose an. Die Kombination mit einer Propidiumiodidfärbung (PI) ermöglicht es außerdem noch zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen zu unterscheiden. Das Propidiumiodid dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran ein, also in nekrotische Zellen. Lebende Zellen sind daher Annexin-negativ und PI-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-negativ, nekrotische und spät Apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-positiv (siehe Abbildung 11).

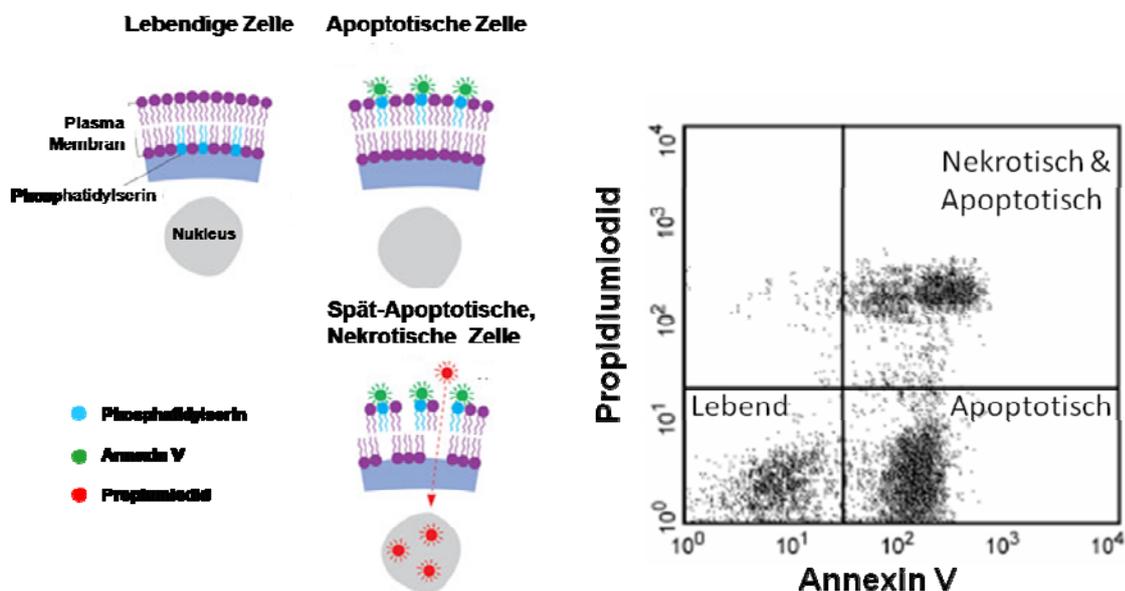


Abb.11. Apoptosenachweis mittels Annexin V Durchflusszytometrie. Zellen werden mit Annexin V Antikörpern und PI angefärbt und mittels FACS Analyse beurteilt. Lebendige Zellen sind Annexin und PI Negativ. Apoptotische Zellen sind Annexin V Positiv. Zellen welche Nekrotisch oder sich in einer späten Apoptotischen Phase befinden sind Annexin V und PI positiv. www.imgenex.com und <http://www.bd.com> (modifiziert).

Die Färbung erfolgte nach Hersteller Anweisungen mit dem Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD). Hierfür wurden die behandelten Zellen 2 x mit PBS gewaschen und in 100 µl 1 x „Annexin-binding“-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2,5 µl Annexin V-FITC-mAK und 2,5 µl PI für 15 min angefärbt. Abschliessend wurden 400 µl des 1x Annexin-binding“-Puffer hinzugefügt

und die Proben innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer (FACScanto) analysiert und mit der FACSdiva Software ausgewertet.

3.2.10. Caspase 3/7 Aktivitätsnachweis

Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde mit dem Caspase Glo 3/7 Assay (Promega) bestimmt. Das Prinzip des Tests beruht auf der Messung der Lumineszenzzunahme, die zustande kommt, wenn ein künstliche Substrat für die Caspasen 3 und 7 (Z-DEVD Aminoluziferin) gespalten wird. Das bei der durch die Caspase katalysierten, hydrolytischen Spaltung freiwerdende Aminoluziferin dient als Substrat für die im Test enthaltene Luziferase. In einem weiteren Schritt bewirkt die Luziferasereaktion die Produktion von Lumineszenz (Abb. 12). Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben mit leichten Modifizierungen. 5000 Suspensionszellen wurden mit steigenden Konzentrationen an MNU \pm BG behandelt. Anschließend wurden die Suspensionszellen in einem Volumen von 50 μ l in einer weißen 96-Well-Platte ausgesät und für 4 h in den Inkubator gestellt. Nach dieser Inkubation wurde 50 μ l des Caspase-Glo[®] 3/7 Reagenz in jedes Loch der Platte gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer halbstündigen Inkubation im Dunkeln wurde die Lumineszenz mit dem Gerät FLUOstar Omega gemessen und ausgewertet.

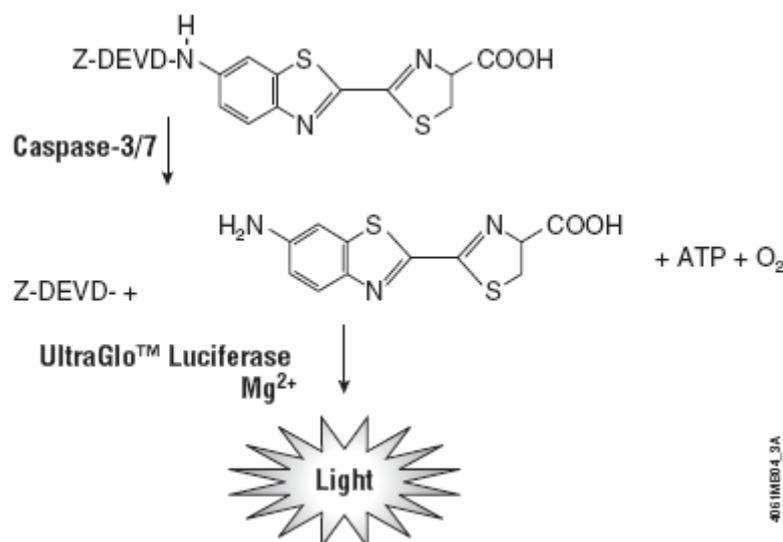


Abb.12. Prinzip der Caspase-glo 3/7 Methode. Z-DEVD Aminoluziferin und eine Luziferase werden zu Zellysaten gegeben. In dem Fall das die Caspasen 3 und 7 aktiv sind spalten diese das Molekül und geben so der Luziferase ein Substrat zum reagieren. Diese Reaktion produziert ein Luminiszenzsignal. (Promega)

4. Ergebnisse

4.1. Immunanalytische Messung von O⁶-Methylguanin in der Kern-DNA einzelner Zellen

Für die Detektion und Quantifizierung der O⁶-MeG-Addukte wurde eine immunhistologische Färbung eingesetzt, welche die Schäden direkt in den Zellkernen sichtbar macht. Um die Korrelation zwischen der Menge der Alkylierungsschäden und der Fluoreszenzstärke zu demonstrieren, wurden primäre Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Spendern ex vivo mit einer ansteigenden Dosis von MNU behandelt. Anschließend wurden die O⁶-MeG-Schäden im Zellkern mit einem Addukt-spezifischen Antikörper angefärbt und der jeweilige DNA-Gehalt durch DAPI-Färbung ermittelt. Mittels eines speziellen Mehrkanal-Bildanalyse-Systems (ACAS II) wurden die angefärbten Zellen am Fluoreszenzmikroskop quantitativ ausgewertet (Abb. 13).

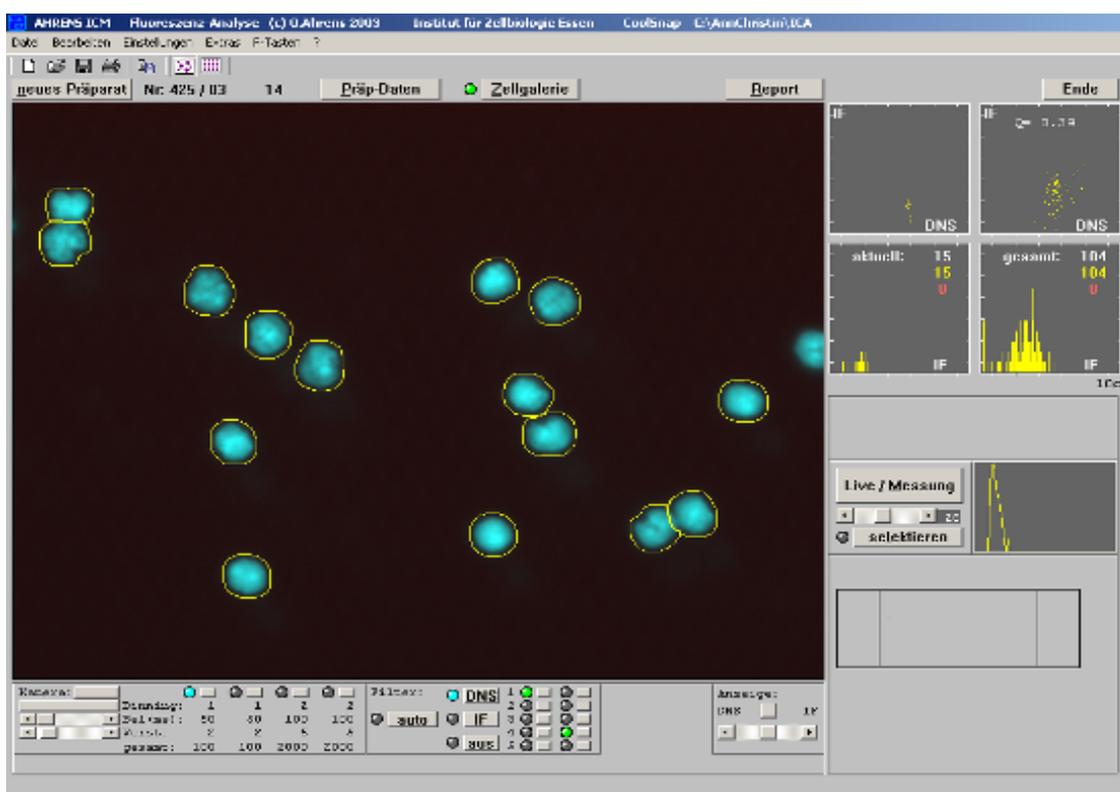


Abb.13 Quantitative Auswertung der Fluoreszenzfärbung. Das Programm ACAS ermöglicht es die Fluoreszenzintensitäten der Färbungen zu messen und miteinander zu vergleichen.

Ein Beispiel einer solchen O⁶-MeG-Färbung ist in Abb. 14 gezeigt. In unbehandelten Zellen lässt sich kein oder kaum O⁶-MeG nachweisen (Abb. 14, B). Dagegen sieht man nach einer Behandlung mit MNU ein starkes Fluoreszenzsignal im Kern (Abb. 14, D), welches den DNA-Schaden darstellt. Die quantitative Auswertung der Fluoreszenzsignale der behandelten Zellen zeigt, dass sich mit steigender MNU

Ergebnisse

Konzentration auch eine steigende Anzahl an O⁶-MeG-Addukten in der DNA nachweisen lässt (Abb. 14, E). Der relative O⁶-MeG-Gehalt in den einzelnen Zellen wurde errechnet aus dem Fluoreszenzsignal der O⁶-MeG-Antikörper und dem DNA-Signal (DAPI) derselben Zellen und wird hier angegeben als *arbitrary fluorescence units* [AFU]. Somit kann mit dieser Methode eine sichere Aussage über den relativen O⁶-MeG -Gehalt in Zellen gemacht werden.

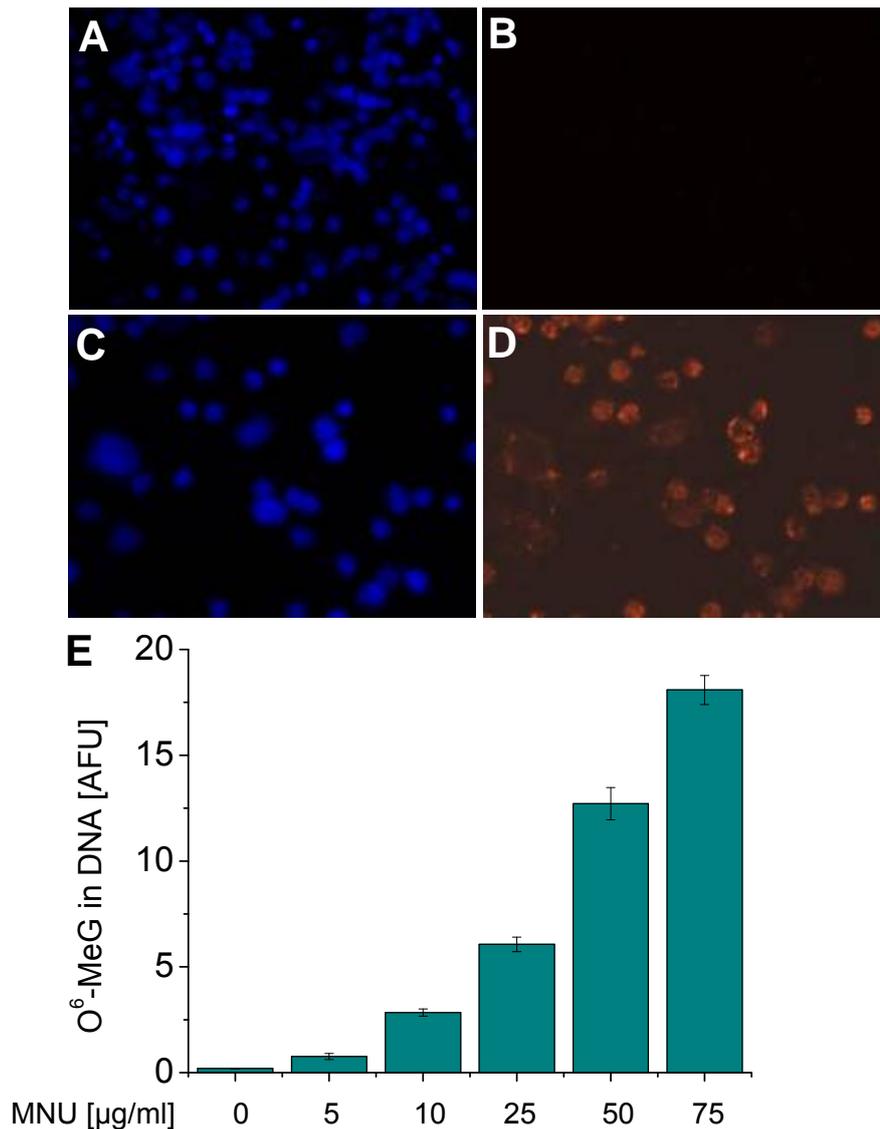


Abb.14. O⁶-MeG Nachweis mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers. Zellen, welche mit MNU [25 µg/ml] behandelt und nach zwei Stunden mit einem O⁶-MeG spezifischen Antikörper angefärbt wurden fluoreszieren stark, enthalten also viele Alkylierungsschäden (D). Unbehandelte Zellen zeigen keine Fluoreszenz (B). Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (A und C). (E) Humane Lymphozyten wurden mit steigenden Konzentrationen an MNU [µg/ml] behandelt. Nach 2 Stunden wurden die Zellen für die Immunfluoreszenz Färbung vorbereitet und angefärbt. Mit Hilfe der Auswertungssoftware ACAS kann ein anhand der Fluoreszenzstärke und die Menge der O⁶-MeG Schäden gemessen werden.

Ergebnisse

4.1.1. Eine Reparatur von O⁶-Methylguanin erfolgt in Säugerzellen auch bei pharmakologischer Inhibierung des Reparaturproteins MGMT

Vorversuche an Lymphozyten von gesunden Blutspendern wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine Depletion der zellulären MGMT-Aktivität zu einer vollständigen Persistenz der O⁶-MeG-Schäden in der DNA führt. Hierfür wurden Lymphozyten aus Vollblut isoliert und ex vivo mit dem Inhibitor O⁶-Benzylguanin (BG) vorbehandelt, der die MGMT-Aktivität blockiert. Anschließend wurden die Lymphozyten mit MNU [25 µg/ml] inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für weitere Untersuchungen entnommen. Der Nachweis von O⁶-MeG mittels ICA-Messung belegt in Zellen ohne Inhibitor-Behandlung eine individuell unterschiedlich schnelle Reparatur der Schäden. Wurden die Zellen des gleichen Spenders mit BG und MNU behandelt, zeigten sie trotzdem eine Elimination von O⁶-MeG, aber mit teilweise verlangsamter Kinetik (Abb.15). Dieses Ergebnis deutet auf einen MGMT-unabhängigen Reparaturmechanismus für O⁶-MeG in diesen Zellen hin und steht damit im deutlichen Gegensatz zu der bisherigen Annahme in der publizierten Literatur.

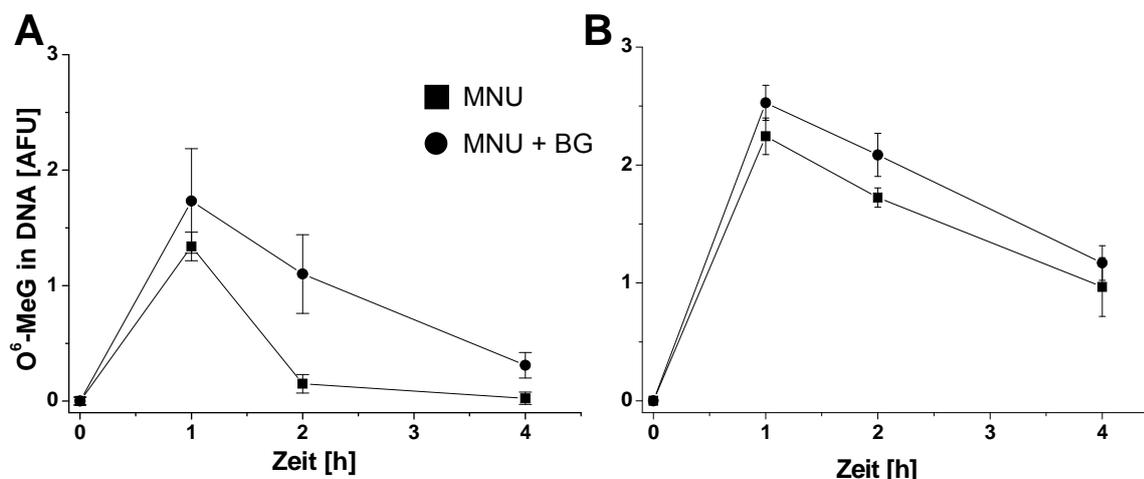


Abb.15. Reparaturkinetiken für O⁶-MeG-Schäden in der DNA von humanen Lymphozyten. Primäre Lymphozyten von gesunden Spendern wurden isoliert und entweder mit MNU [25 µg/ml] alleine (●) oder in Kombination mit dem MGMT Inhibitors [25 µM] (■) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, mit einem O⁶-MeG spezifischen Antikörper angefärbt, und mit dem ACAS-System ausgewertet. Die Standardabweichung bezieht sich auf mindestens drei unabhängige Versuche.

4.1.2. MNU-exponierte Lymphozyten zeigen eine erhöhte Rate an Reparatur-Einschnitten, wenn die zelluläre MGMT-Aktivität blockiert ist

Ein möglicher weiterer Mechanismus zur Entfernung von O⁶-MeG aus dem Genom von Säugerzellen könnte sich nach einer MNU-Behandlung und der gleichzeitigen Depletion der zellulären MGMT durch vermehrte Reparatur-Einschnitte in der

Ergebnisse

beschädigten DNA detektieren lassen. Um dies zu überprüfen, wurden humane Lymphozyten nach einer Behandlung mit MNU \pm BG mit Hilfe der Einzelzellgelelektrophorese (*comet assay*) auf Reparatur-induzierte Strangbrüche hin untersucht (Abb. 16). Mit Hilfe dieser Methode können alle mit einer Inzision einhergehenden Reparaturprozesse im Genom der Zelle detektiert werden. Die Messungen zeigten, dass nach Inaktivierung der MGMT bei den meisten der untersuchten Zellproben eine deutliche Zunahme der Strangbruchraten feststellbar war (Abb. 16; A - E). Unter diesen Umständen wird demnach O⁶-MeG offensichtlich über einen anderen, MGMT-unabhängigen Mechanismus prozessiert, der mit Einschnitten in die DNA einhergeht. Bei den Zellen eines Spenders fand sich keine Zunahme der Strangbruchraten nach Zugabe von BG (Abb. 16; F). Hierbei handelte es sich um die Probe aus Abb. 16 B, die auch bei der Reparatur der O⁶-MeG-Addukte nur einen sehr geringen Anstieg der Schäden bei BG-Zugabe aufwies. Das Ergebnis deutet auf einen sehr geringen MGMT-Gehalt bei diesen Zellen hin, und könnte bedeuten, dass auch ohne Inhibition der größte Teil der O⁶-MeG-Addukte über den alternativen Reparaturweg entfernt werden.

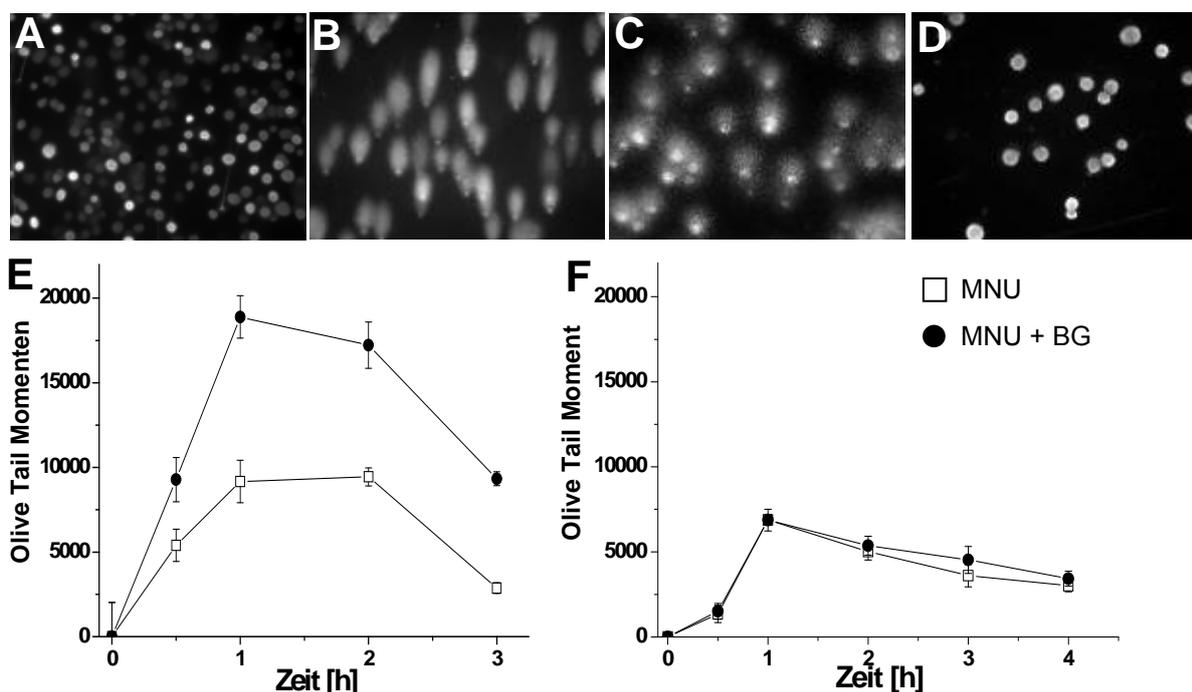


Abb. 16. Comet assay für den Nachweis von Einzelstrangbrüchen. Humane Lymphozyten aus peripherem Blut wurden mit MNU [25 µg/ml] \pm BG behandelt und auf reparaturinduzierte Einzelstrangbrüche untersucht. Bilder A bis D zeigen eine Auswertung des comet assays von unbehandelten Zellen (A) und behandelten Zellen (B - D). Es ist zu erkennen, dass die Kometengröße, und somit die Strangbrüche, mit der Zeit repariert wurden und abnehmen 10 x Vergrößerung. Bilder E und F zeigen zwei verschiedene Spender und deren individuellen Unterschied in der Reparatur von Strangbrüchen. □ ; MNU [25 µg/ml], ● ; MNU [25 µg/ml] + BG [25 µM]. Die Standardabweichung bezieht sich auf mind. drei unabhängige Versuche.

4.2. Entfernung von O⁶-Methylguanin durch die Nukleotid-Exzisions-Reparatur

4.2.1. Das Protein XPA aus dem NER-Weg spielt nur eine untergeordnete Rolle bei der MGMT-unabhängigen Reparatur von O⁶-MeG

Durch die Voruntersuchungen an humanen Lymphozyten kann ein Exzisions-Mechanismus in Betracht gezogen werden, der O⁶-MeG-Addukte erkennen und aus der DNA eliminieren kann. Weiter ist aus früheren Untersuchungen eine Beteiligung des bakteriellen NER Systems an der Beseitigung von Alkylierungsschäden bekannt. Daher lag es nahe, den Einfluss des Eukaryotischen-NER-Systems auf die O⁶-MeG-Reparatur zu analysieren. Da an den verschiedenen Schritten der klassischen NER-Reaktion eine relativ große Anzahl unterschiedlicher Proteinkomponenten beteiligt ist (Abb.7), wurde zunächst die Rolle des XPA-Proteins untersucht, da diese Komponente eine essenzielle Rolle in beiden NER-Signalwegen, GGR und TCR, spielt. Um eine Beteiligung an der Reparatur von O⁶-MeG nachzuweisen, wurden Adduktkinetiken von Milz-Lymphozyten aus Wildtyp Mäusen, mit aktiver NER, verglichen mit XPA-Knockout-Tieren. Zu diesem Zweck wurden die Zellen sowohl in vivo (durch *i.p.*-Injektion) als auch ex vivo mit MNU behandelt. Für die ex vivo Behandlung wurden Lymphozyten aus der Milz von XPA^(-/-) und XPA^(+/+) Mäusen gewonnen und über einen Zeitraum von 24 h in serumhaltigem IMDM Medium mit MNU [20 µg/ml] ± BG [20 µM] behandelt. Nach 1, 2, 4, 8, 16 und 24 Stunden wurden Proben entnommen und mittels ICA Färbung ausgewertet. XPA^(+/+)-Zellen, die nur mit MNU behandelt wurden und somit eine intakte MGMT-Reparatur aufwiesen, konnten die Schäden effizient aus der DNA beseitigen (Abb. 17). Lymphozyten von Tieren mit einem homozygoten Funktionsverlust für XPA zeigten demgegenüber einen durchweg leicht höheren Adduktspiegel über die gesamte Beobachtungszeit (Abb. 17; A). Nach einer Behandlung mit MNU plus BG (MGMT-depletiert) wiesen die Zellen initial deutlich höhere Adduktspiegel auf, die aber nach 4 h auf ein ähnliches Niveau absanken wie bei den MGMT-profizienten Zellproben (Abb. 17; B). Auch hier lagen die Messwerte für die XPA^(-/-)-Zellen zu allen Zeitpunkten über denen der NER-profizienten Zellen. Dieses Experiment belegt, dass die MGMT-Reparatur nur die frühe Phase der Addukt-Kinetik signifikant beeinflusst, der alternative Reparaturweg den O⁶-MeG-Spiegel auch in Abwesenheit von aktivem MGMT effizient reduzieren kann und dass die Abwesenheit von funktionellem XPA-Protein diesen Prozess nur geringfügig verlangsamt.

Ergebnisse

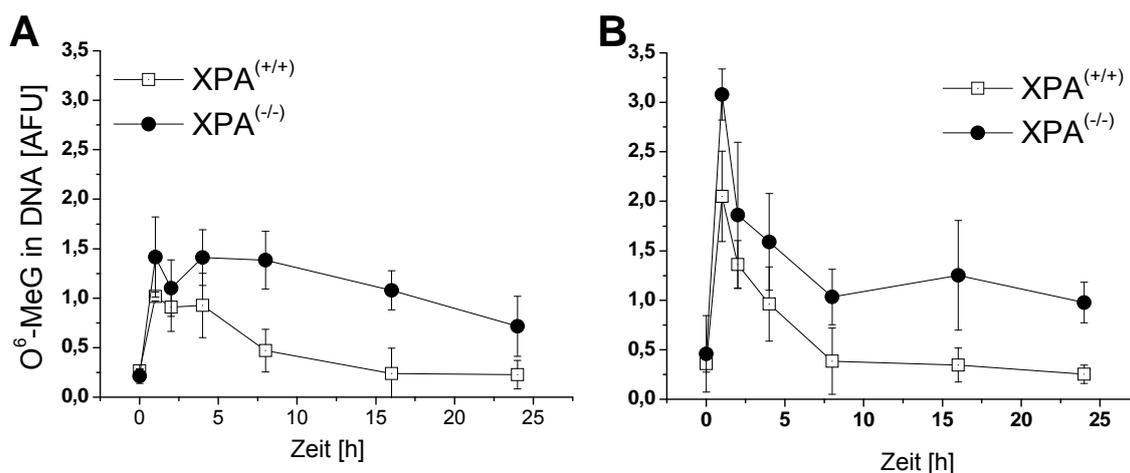


Abb. 17. Färbung von O⁶-Methylguanin in XPA^(-/-) und XPA^(+/+) Maus Lymphozyten. Lymphozyten wurden aus der Milz von XPA Wildtyp- und Knockout-Mäusen gewonnen und mit MNU (A) oder mit MNU [20 µg/ml] und BG [20 µM] (B) behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben der Zellen entnommen und eine O⁶-MeG-Färbung durchgeführt.

In einem weiteren Versuch wurden XPA^(-/-)- und XPA^(+/+)-Mäuse *in vivo* mit MNU behandelt, um festzustellen, ob dieser Mechanismus in Lymphozyten auch unter diesen Bedingungen aktiv ist. Für alle Zeitpunkte wurden je zwei Mäuse mit BG [25 mg/kg, *i.p.*] für eine Stunde vorbehandelt, um sicherzustellen, dass die MGMT blockiert ist. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit MNU [25 mg/kg, *i.p.*]. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die behandelten Tiere euthanasiert, die Lymphozyten aus der Milz gewonnen und der Adduktgehalt durch eine ICA-Analyse bestimmt. Ähnlich wie bei der *ex vivo* Behandlung wurde O⁶-MeG sowohl in MGMT-aktiven (Abb. 18; A) als auch in MGMT-depletierten Zellen effizient repariert, beginnt hier jedoch auf einem initial höheren Adduktniveau. Auch konnte die vorhergehende Beobachtung bestätigt werden, dass in MGMT-defizienten Zellen bei gleichzeitigem Fehlen von XPA die Reparatur langsamer erfolgt aber nicht vollständig ausbleibt (Abb. 18; B).

Ergebnisse

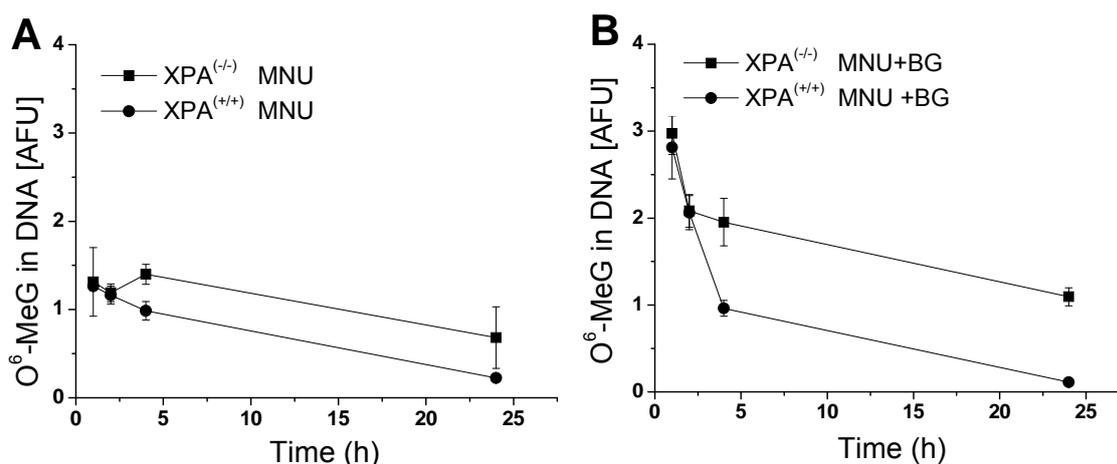


Abb. 18. *In vivo* Reparatur von O⁶-Methylguanin in XPA^(-/-) Maus Lymphozyten. Lymphozyten wurden aus der Milz von XPA Wildtyp- und Knockout-Mäusen gewonnen, welche zuvor *in vivo* mit MNU [20 mg/kg] (A) oder mit MNU [20 mg/kg] und BG [20 mg/kg] (B) behandelt worden sind. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben aus je zwei Mäusen entnommen und eine O⁶-MeG-Färbung durchgeführt. Die Standardabweichung setzt sich aus drei unabhängigen Experimenten zusammen.

4.2.2. Das Schadenserkennungsprotein XPC kann an O⁶-MeG-Addukte in der DNA binden und deren Reparatur einleiten

Die Ergebnisse aus den vorherigen Versuchen zeigten, dass das Protein XPA offenbar an dem alternativen Reparaturmechanismus beteiligt ist, aber, anders als beispielsweise bei der Entfernung von UV-Schäden aus der DNA durch das NER-System, keine essenzielle Komponente darstellt. Um eine Beteiligung des NER-Weges näher zu untersuchen, wurde nun in einem biochemischen Ansatz geprüft, ob dieser Mechanismus in der Lage ist, einzelne O⁶-MeG-Addukte in der DNA zu erkennen.

Durch Bindungsstudien (EMSA) mit rekombinanten humanen Reparaturproteinen ließ sich nachweisen, dass das NER-Protein XPC an O⁶-meG-Addukten in der DNA bindet (Abb. 19; A). Hierzu wurden in einer Kooperation mit Dr. K. Tanaka und Dr. K. Sugasawa, Oligonukleotide entworfen, welche an einer definierten Stelle entweder eine natürliche Basenpaarung von G:C oder einen O⁶MeG:C Schaden besaßen. Weiter wurde auch überprüft, ob dieser Mechanismus postreplikativ aktiv ist, da hier ein Mismatch von O⁶-MeG:T entsteht. Aus den EMSA-Daten lässt sich außer der eindeutigen Bindung von XPC an den Alkylierungsschaden auch erkennen, dass diese Reparatur verstärkt nur vor der Replikation aktiv ist (Abb. 19; B). Der Erkennungskomplex XPC-HR23B zeigt nur sehr schwache Bindungen zu einer

Ergebnisse

klassischen postreplikativen G:T Fehlpaarung. Auch wird der Mismatch von O⁶-MeG:T kaum von dem Proteinkomplex erkannt und gebunden.

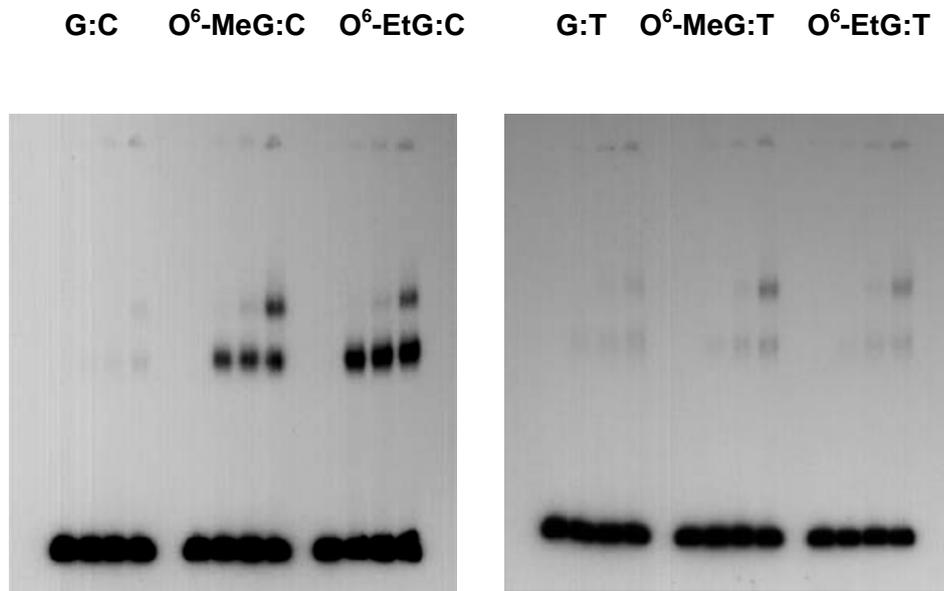


Abb.19. Das NER Schadenserkenngsprotein XPC erkennt Alkylierungsschäden und bindet an diese verstärkt nur in der präreplikativen Situation. Oligonukleotide mit den entsprechenden Basenpaarungen wurden zusammen mit rekombinatem XPC inkubiert und auf eine Bindung getestet. Dieser Versuch wurde von Dr. K. Tanaka und Dr. K. Sugawawa, durchgeführt.

In einem weiteren Versuch wurde nun geklärt, ob ein Binden des XPC-HR23b Komplexes an das O⁶-MeG ausreichend ist, um die normale NER einzuleiten. Hierfür wurde getestet, ob das NER-System Einschnitte in die beschädigte DNA macht, was dazu führt, dass Fragmente von ca. 25 Nukleotiden entstehen, welche sichtbar gemacht werden können. Mit Hilfe von Dr. K. Tanaka und Dr. K. Sugawawa wurden Plasmide entworfen, die neben einer radioaktiven Markierung entweder normale Basenpaarungen oder verschiedene Fehlpaarungen mit und ohne O⁶-MeG Schäden aufwiesen. Diese Plasmide wurden mit Zellextrakten aus XPC-defizienten Zellen gemischt und anschließend mit rekombinatem XPC-HR23B und BG inkubiert. Abbildung 20 (A) zeigt, dass XPC gezielt nur das NER-System aktiviert, wenn ein Alkylierungsschaden gegenüber einem Thymin steht und folglich noch nicht in die Replikation gegangen ist. Das Erscheinen von DNA Stücken nach einer UV-Behandlung zeigt, dass eine normale NER in diesen Zellen möglich ist. Hierbei entstehen 6-4-Photo-Produkte (6-4PP), die überwiegend von der NER behoben werden und daher zu Reparatereinschnitten in der Plasmid DNA führen.

Ergebnisse

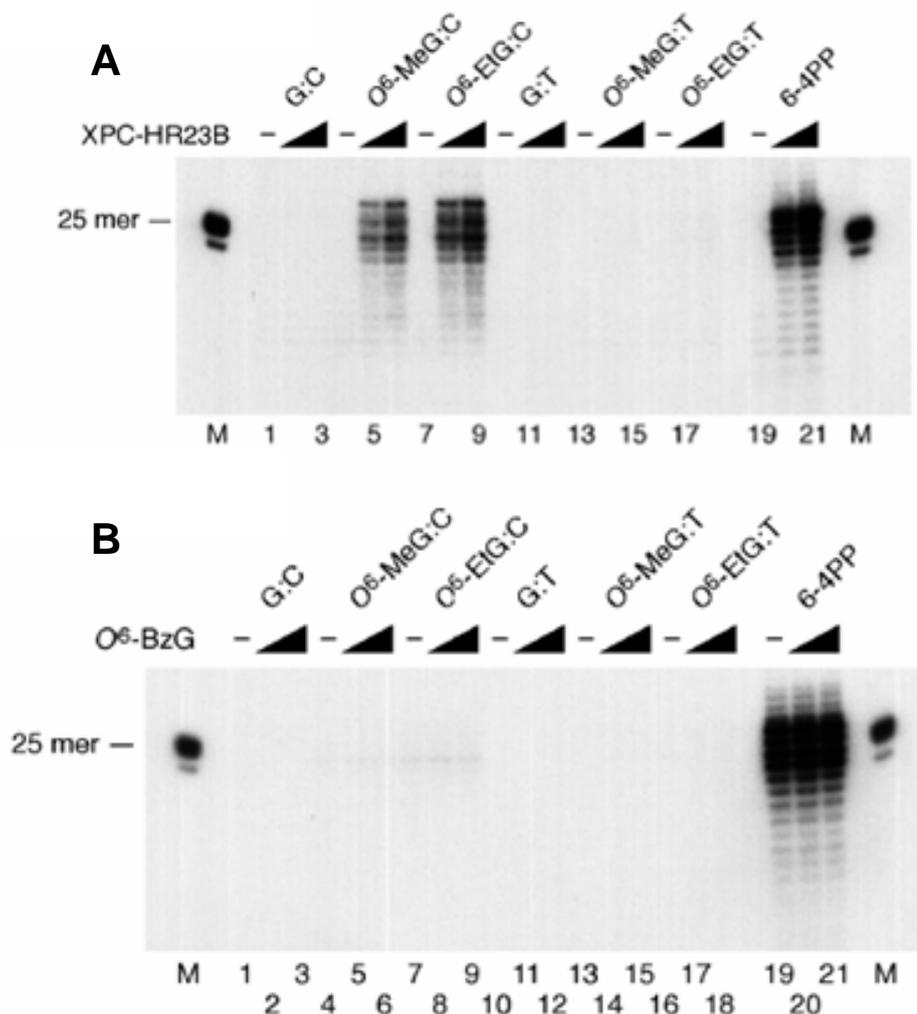


Abb. 20. O⁶MeG kann Reparaturinzisionen auslösen. (A) Zellextrakten von XPC-defizienten Zellen (GM02248) wurden zusammen mit rekombinanten XPC-HR23B Komplex und einem Plasmid mit den oben angegebenen Schäden inkubiert. Die radioaktive Markierung des Plasmids erlaubt es die ca. 25 bp die durch die NER Aktivität ausgeschnitten werden zu detektieren. (B) Zellextrakte gewonnen aus HeLa-Zellen wurden zusammen mit BG auf die im Bild angegebenen Plasmide gegeben und auf Reparaturinzisionen Inzisionen überprüft. M; 25mer Marker

Ein weiteres Inzisionsexperiment wurde durchgeführt, um zu überprüfen ob ein aktives NER-System ausreicht die O⁶-MeG-Schäden aus der DNA zu entfernen. Hierfür wurden aus HeLa-Zellen Extrakte gewonnen und mit den unter Punkt 3.2.2. erwähnten Plasmiden in Abwesenheit der MGMT inkubiert. Um sicherzustellen, dass die MGMT tatsächlich blockiert ist, wurden die Zellextrakte mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors BG behandelt. Werden die Plasmide mit den O⁶-MeG-Schäden mit den HeLa-Zellextrakten inkubiert, entstehen keine 25mer DNA Fragmente aufgrund von NER-Inzisionen in der DNA (Abb. 20; B; Reihen 4 - 18).

Ergebnisse

Damit ausgeschlossen werden kann, dass bei der verwendeten HeLa-Zelllinie die NER nicht funktioniert, wurden die Zellen mit einem 6-4PP Schaden konfrontiert. Der Inzisionstest zeigt, dass HeLa-Zellen die Plasmide mit den 6-4-PP-Schäden ausschneiden, da durch diese Inzisionen die ca. 25mer großen DNA Fragmente sichtbar waren (Abb. 20; B; Reihen 19 - 21). Dieser Versuch zeigt, dass in HeLa-Zellen eine funktionierende NER nicht ausreicht, um O⁶-MeG-Schäden unabhängig von der MGMT zu reparieren.

4.2.3. Das XPC-Protein ist ein wichtiger Erkennungsfaktor für die MGMT-unabhängige Reparatur

Da die bisherigen Hinweise für die Beteiligung von Komponenten des NER-Weges an der Reparatur von O⁶-MeG auf biochemischen Daten basierten, war es wichtig diesen Nachweis auf der zellulärer Ebene zu erbringen. Dazu wurden Reparaturkinetiken an XPC-defizienten humanen Fibroblasten und an mit dem Wildtyp-XPC-Gen rekonstituierten Varianten dieser Zellen aufgenommen. Die Ausgangslinie XP4PA-SV-EB stammte ursprünglich ab von einem Xeroderma Pigmentosum Patienten mit Funktionsverlust-Mutationen in beiden XPC-Allelen und ist vollständig defizient für die NER-Reparatur von UV-induzierten DNA-Läsionen. Die beiden rekonstituierten Varianten XP4PA-SE1 und XP4PA-SE2 unterscheiden sich in der Expressionsaktivität des Wildtyp-XPC-Proteins. Die Zelllinie XP4PA-SE1 (XPC^{Low}) besitzt nur eine niedrige Expression des XPC-Proteins, während XP4PA-SE2 (XPC^{High}) ein ungefähr gleiches Level an XPC-Protein besitzt wie vergleichbare Wildtyp Zelllinien. Von diesen drei Zelllinien wurden Reparaturkinetiken für O⁶MeG aufgenommen (Abb. 21). Hierfür wurden die Fibroblasten bis zu einer Konfluenz von ca. 70 – 80 % in einer 6-Loch-Schale herangezogen und anschließend mit BG [20 µM] für eine Stunde vorbehandelt. Die Alkylierung erfolgte dann mit MNU [20 µg/ml]. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (1 - 24 h) Proben genommen und mittels Antikörperbasierter-Technik analysiert. Außerdem wurde ein Teil der Zellen ohne BG-Inkubation behandelt, um den Verlauf der MGMT-abhängigen Reparatur darzustellen. Eine partielle oder vollständige XPC-defizienz in MGMT-aktiven Zellen führte zu keinen nennenswerten Änderungen der Reparaturkinetiken nach MNU-Exposition (Abb. 21; A). Dagegen wiesen XPC-defiziente Zellen, bei denen zusätzlich die MGMT blockiert war, keinerlei Reparatur der O⁶-MeG-Schäden mehr auf (Abb. 21; A). Beide XPC-

Ergebnisse

rekonstituierten Zelllinien waren jedoch in der Lage O^6 -MeG-Schäden in Abwesenheit von MGMT zu entfernen. Die Reparatur bei der Zelllinie mit nur partiell funktionierendem XPC-Protein verlief etwas langsamer als bei der vollständig rekonstituierten Zelllinie. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das XPC-Protein notwendig ist, um die Entfernung der O^6 -MeG-Schäden aus der genomischen DNA einzuleiten.

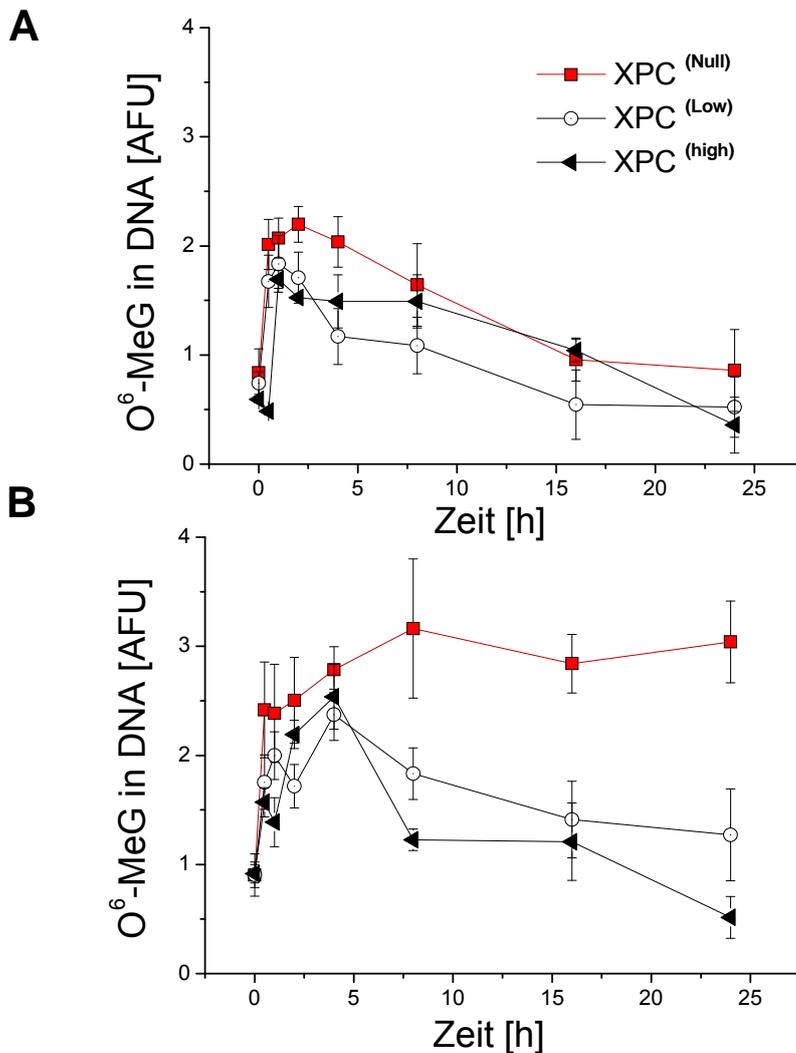


Abb. 21. XPC ist ein notwendiger Bestandteil für die Einleitung der MGMT-unabhängigen Reparatur. Humane Fibroblasten welche entweder XPC-Defizient ($XPC^{(Null)}$), zu 50 % funktionsfähig ($XPC^{(High)}$) oder vollständig Funktional sind ($XPC^{(High)}$), wurden entweder mit MNU [20 μ g/ml] alleine behandelt (A) oder zuvor mit BG [20 μ M] inkubiert (B). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels ICA analysiert. Die Standardabweichung errechnet sich aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Um zu überprüfen, ob die hier verwendeten Fibroblasten ein ähnliches Reparaturverhalten auch gegenüber anderen Typen von DNA-Schäden zeigen, die ebenfalls Substrate für den NER-Weg sind, wurden die drei Zelllinien mit dem Zytostatikum Cisplatin [10 μ g] behandelt. Die zeitabhängige Reparatur der

Ergebnisse

induzierten Pt-(GG)-Intrastrangcrosslinks wurde mit Hilfe adduktspezifischer Antikörper im ICA-Test ermittelt (Abb. 22). Ähnlich wie für O⁶MeG gezeigt, waren XPC-defiziente Zellen nicht in der Lage, die gebildeten Cisplatin-Addukte aus der DNA entfernen, während eine partielle bzw. vollständige Rekonstitution mit dem Wildtyp-Protein zu einer ansteigenden Reparaturkompetenz führte.

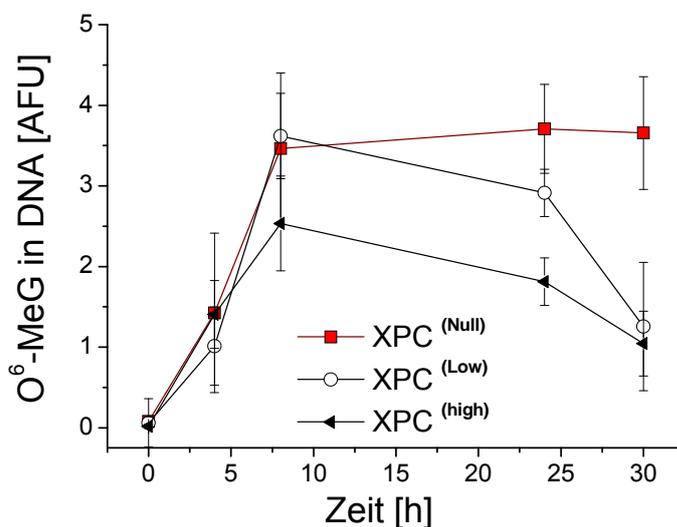


Abb. 22. Zelllinien, die ein funktionsfähiges XPC-Protein besitzen, können Interstrang-Vernetzungen reparieren. Zelllinien, die entweder XPC-Defizient oder -rekonstituiert waren, wurden mit 10 µg CPT behandelt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Färbung mit spezifischen CPT Interstrang-Vernetzungs-Antikörpern durchgeführt.

Anders als bei den in 4.2.1 untersuchten terminal differenzierten Primärzellen (humane bzw. murine Lymphozyten), welche sich in der G₀-Phase befinden und nicht proliferieren, treten bei der Reparaturanalyse von Zelllinien zwei Probleme auf. Einerseits greift der hier gefundene Reparaturweg für O⁶MeG laut der biochemischen Befunde nur auf die präreplikative Situation in Paarung mit C zu, nicht aber auf die postreplikative O⁶-MeG:C Konstellation. Andererseits lässt sich bei Adduktanalyse von replizierenden Zellen nicht sauber zwischen Reparatur und relativer Adduktabnahme durch DNA-Neusynthese unterscheiden. Deshalb wurden von allen verwendeten Zelllinien Wachstumskurven aufgenommen (Abb. 23). Hierbei zeigte sich, dass nur die Kontrollansätze ein normales Wachstumsverhalten zu beobachten war, nicht aber nach Behandlung mit MNU. Die weitgehend konstanten Zellzahlen in diesen Ansätzen deuten auf einen vollständigen Zellzyklusarrest bei allen drei MNU-exponierten Zelllinien hin und schließt somit eine Verdünnung der DNA-Schäden durch Replikationssynthese aus.

Ergebnisse

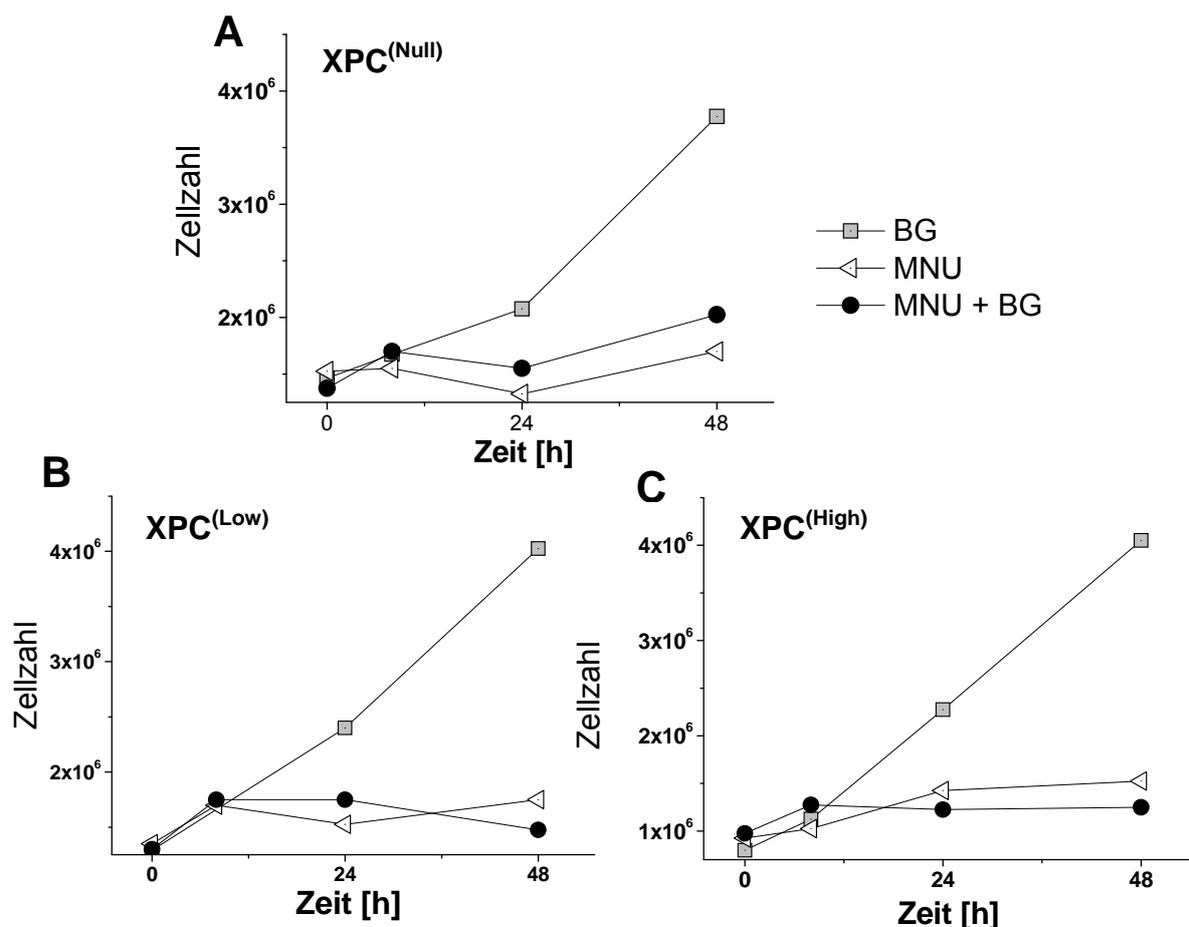


Abb. 23. Die Abnahme der O⁶-MeG-Schäden wird nicht durch eine replikationsbedingte Verdünnung verursacht. Die Gesamtzellzahlen von XPC^(Null)- (A), XPC^(Low)- (B) und XPC^(High)-Zellen (C) wurde nach einer Behandlung mit MNU [15 µg/ml] ± BG [25 µM] zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

4.2.4. XPC-defiziente Zellen zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber alkylierenden Substanzen

Die vorhergehenden Versuche haben auf biochemischer und zellulärer Ebene gezeigt, dass eine hinreichende Menge an funktionellem XPC-Protein nötig ist, um O⁶-MeG-Reste in der DNA zu erkennen und ihre Reparatur einzuleiten. Ob jedoch eine XPC-Defizienz einen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung von alkylierenden Verbindungen wie MNU hat und damit das Überleben von Säugerzellen negativ beeinflusst, war bisher ungeklärt. Um dies zu prüfen, wurde mit den drei Fibroblastenlinien, mit unterschiedlichem XPC-Expressionstatus, ein Koloniebildungstest unter MNU-Exposition durchgeführt. Nach Aussaat von jeweils 100 Zellen der drei Linien wurden diese am folgenden Tag mit unterschiedlichen MNU-Konzentrationen allein oder in Verbindung mit BG, behandelt und die Koloniezahlen nach einer Woche ausgezählt.

Ergebnisse

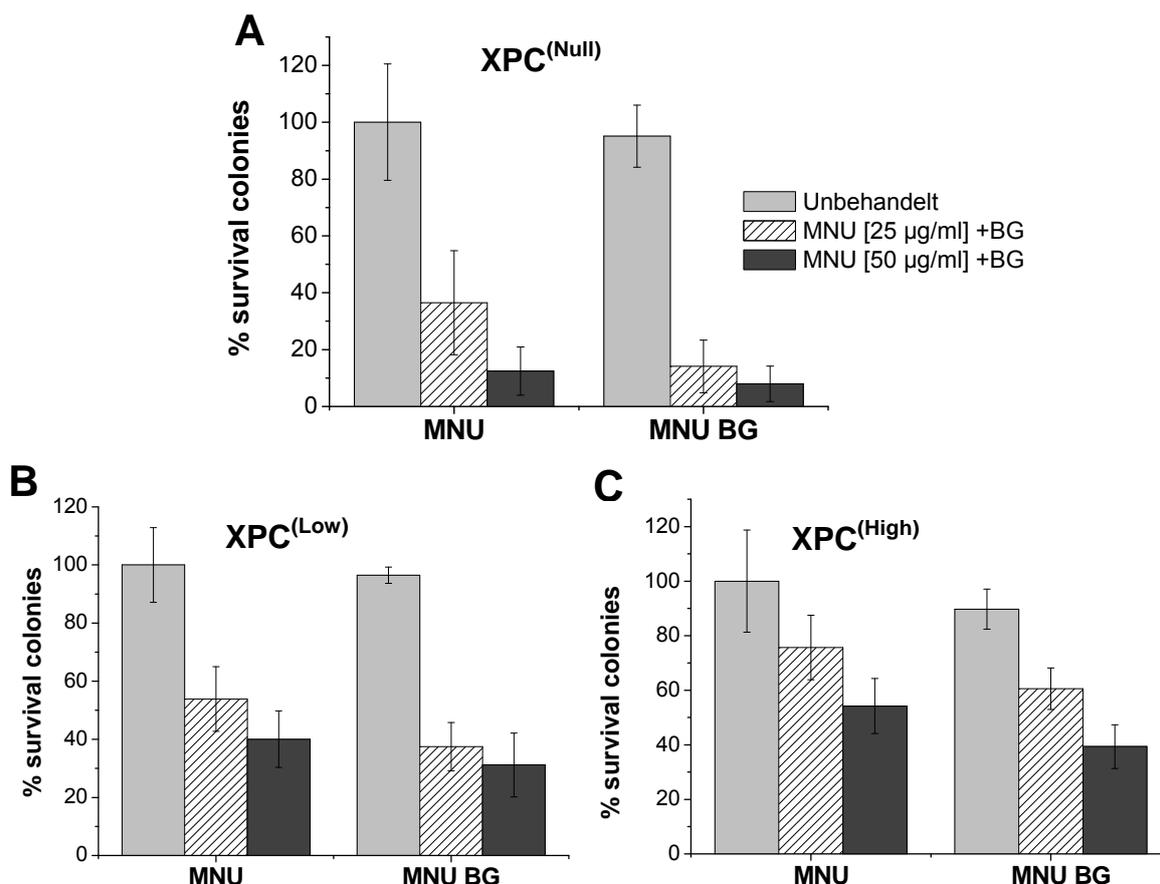


Abb. 24. XPC-defiziente Zellen verlieren ihre Koloniebildungsfähigkeit nach einer Behandlung mit MNU und BG. Jeweils 100 Zellen der verschiedenen XPC-Zelllinien wurden ausgesät und nach 24 h mit steigender Konzentration an MNU behandelt. Ein Teil der Zellen wurde mit BG [25 µM] vorbehandelt um die MGMT-Aktivität zu blockieren. Nach zwei Wochen wurden die Kolonien mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt. (A) Zelllinie XP4PA-SE-EB; $XPC^{(Null)}$, (B) Zelllinie XP4PA-SE-1; $XPC^{(Low)}$, (C) Zelllinie XP4PA-SE-2; $XPC^{(High)}$.

Zellen, ohne funktionales XPC und aktiver MGMT, zeigen mit steigender MNU-Dosis eine bis zu 80 %-ige Abnahme an Kolonien (Abb. 24; A). Dieser zytotoxische Effekt wurde durch Inaktivierung der MGMT noch weiter verstärkt. In diesem Fall reduzierten sich die CFU-Werte auf ca. 15 bzw. 10 %. Zellen mit einer partiellen Rekonstitution von XPC (XP4PA-SE-1) zeigten eine deutliche Verbesserung der Koloniebildung auf 50 bzw. 40 % mit nur einem marginalen Effekt durch die MGMT-Inaktivierung (Abb. 24; B). Fibroblasten mit hoher XPC-Expression (XP4PA-SE-2) zeigten eine verringerte Dosis-abhängige Zytotoxizität gegenüber MNU. Diese Zellen konnten zu 75 bzw. 60 % Kolonien bilden. Auch fand nur eine vergleichsweise geringe Zunahme der Zytotoxizität gegenüber MNU durch zusätzliche Blockierung der MGMT statt (Abb. 24; C). In Abbildung 25 werden die drei Zelllinien in einem

Ergebnisse

direkten Vergleich zueinander aufgeführt. Aus den Daten lässt sich erkennen, dass der protektive Effekt vor der zytotoxischen Wirkung von O^6 -MeG bei diesen Zelllinien im Wesentlichen durch den alternativen, XPC-abhängigen Reparaturweg vermittelt wird und das MGMT-Protein hier nur eine untergeordnete Rolle spielt.

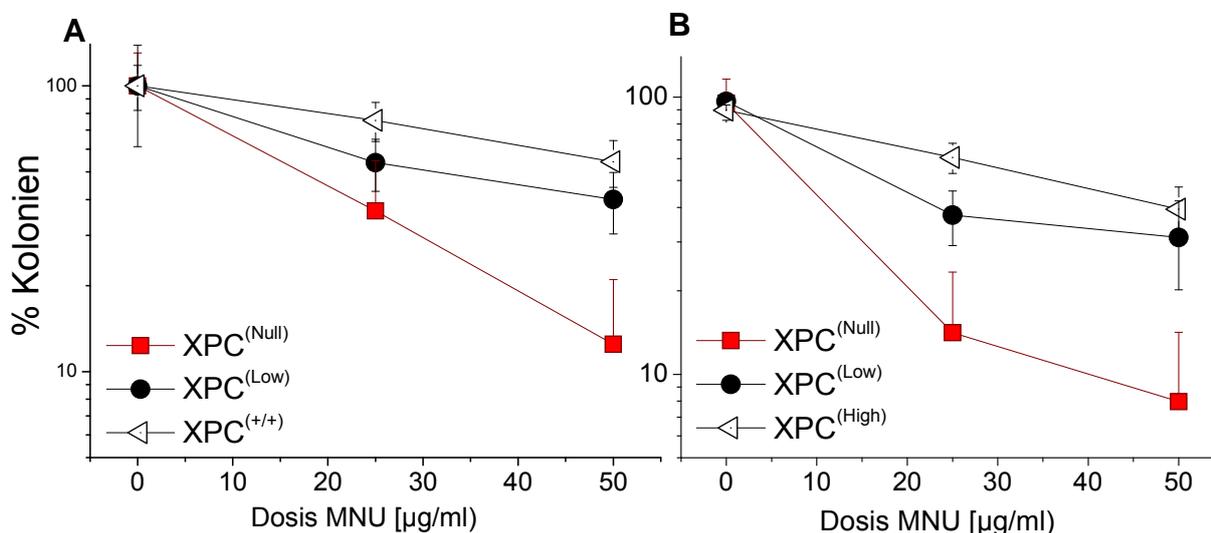


Abb. 25. Vergleich der XPC-Zelllinien in einem Koloniebildungstest. Zelllinien mit verschiedenen funktionsfähigen XPC-Protein wurden mit einer steigenden Dosis an MNU alleine (A) oder in Kombination mit einer BG-Vorinkubation (B) behandelt. Nach 14 Tagen wurden die überlebenden Kolonien ausgezählt.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die im Koloniebildungstest gefundenen Sensitivitätsunterschiede zwischen den drei Fibroblastenlinien gegenüber MNU auch durch Messung der Apoptoseinduktion mittels eines Annexin V-Tests bestätigen ließen. Hierzu wurden die Zellen mit unterschiedlichen MNU-Konzentrationen \pm BG behandelt, und nach 48 h mit einem Antikörper für den Apoptosemarker Annexin V gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 26). Während die drei Zelllinien bei der niedrigsten eingesetzten MNU-Konzentration [10 $\mu\text{g/ml}$] keine Unterschiede aufwiesen, zeigen die beiden XPC-rekonstituierten Zelllinien bei höheren MNU-Dosen signifikant niedrigere Apoptoseraten, als die XPC-defizienten Zellen. Ähnlich wie bei der CFU-Bestimmung ist auch hier ein, wenn auch nicht signifikanter, Trend zu niedrigeren Apoptoseraten bei höherer XPC-Expression zu erkennen.

Die Zelllinie GM637 wurde als Kontrolle für die komplett rekonstituierte Linie XP4PA-SE-2 herangezogen. Beide Zelllinien besitzen eine vergleichbare Expression des XPC Proteins und stellen somit den Wildtypstatus dar. Ca. 30 % der Fibroblasten zeigen nach einer MNU/BG Behandlung von 50 $\mu\text{g/ml}$ ein positives Annexin V-Signal.

Ergebnisse

Diesen Grad an Apoptose zeigten auch die vollständig rekonstituierten XPC-Zellen. Somit kann angenommen werden das die Zelllinie XP4PA-SE-2 ein ähnliches Verhaltensmuster wie eine Wildtypzelle zeigt.

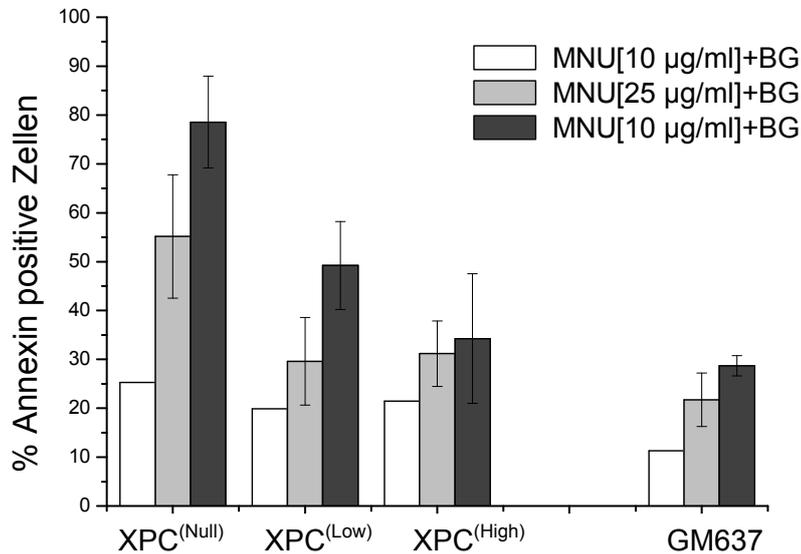


Abb. 26. Apoptose-Sensitivitätstest der XPC-Zelllinien mittels Annexin V Analyse. Die verwendeten Zelllinien wurden mit BG und verschiedenen Konzentrationen an MNU behandelt. Nach 48 h wurde der Apoptosemarker Annexin V mittels FACS-Analyse bestimmt.

4.3. Die Bedeutung des Fanconi Anämie-Weges für die Reparatur von O⁶-MeG-Addukten

Die bisherigen Daten deuten daraufhin, dass das NER-System an der Reparatur des O⁶-MeG-Schadens beteiligt ist. Jedoch konnte auch gezeigt werden das es sich nicht um eine „klassische“ NER handelt, denn die Aktivität dieses Reparatursystems reichte alleine nicht aus für die O⁶-MeG Beseitigung. Aus diesem Grund wurden weiter Reparatursysteme in Betracht gezogen, die möglicherweise an der Reparatur der Alkylschäden beteiligt sein könnten. Ein Reparaturweg, der Fanconi Anämie (FA)-Signalweg, fiel bei der Recherche besonders auf.

Der FA-Signalweg umfasst eine Gruppe von Proteinen, die durch die Anwesenheit unterschiedlicher DNA-Schäden aktiviert werden und an deren Reparatur beteiligt sind. Dazu zählen vor allem DNA-Strangveknüpfungen und DNA-Doppelstrangbrüche. Der Einfluss dieses Signalwegs auf die Reparatur von O⁶-MeG-Schäden wurde bisher kaum untersucht. Lediglich in einer Arbeit von Chen *et al.* (2007) wurde anhand von Zytotoxizitätstests festgestellt, dass bestimmte FA-

Ergebnisse

defiziente Zellen sensitiver gegenüber alkylierenden Substanzen reagieren, als die entsprechenden Wildtyp-Zellen. Aus diesem Grund wurde der Einfluss einzelner Komponenten des FA-Signalweges auf die O⁶-MeG-Reparatur genauer untersucht.

4.3.1. Einzelne Komponenten des FA-Weges beeinflussen die Reparatur der O⁶-MeG-Schäden

Eine mögliche Beteiligung des FA-Signalwegs an der Reparatur von DNA-Alkylierungsschäden wurde anhand der O⁶-MeG-Reparaturfähigkeit von FA-defizienten Zellen im Vergleich zu den jeweils mit dem Wildtyp-Gen rekonstituierten Zellen getestet. Zu diesem Zweck wurden lymphoblastoide Zellen von FA-Patienten, bei denen jeweils ein FA-Gen funktionell mutiert war, mit einer MNU-Konzentration von 15 µg/ml behandelt. Ein Teil der Zellen wurde jeweils mit BG [20 µM] vorbehandelt, und stellt die MGMT-negative Fraktion dar. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben der behandelten Zellen entnommen und im ICA-Test analysiert. Die O⁶-MeG-Färbung zeigte, dass FA-Zellen denen jeweils ein funktionsfähiges FA-Protein aus dem Kernkomplex fehlt, FancA, FancC- oder FancG (Abb. 27; A, B, E und F), das gleiche Reparaturverhalten zeigen wie die FA-Wildtyp-Zellen PD7 und 2254 (Abb. 27; C, D, G und H). Alle Zelllinien waren in der Lage sowohl in Anwesenheit der MGMT (Abb.27; A - D), als auch nach Inhibition durch BG (Abb. 27; E - H) die O⁶-MeG-Schäden zu reparieren. Wie bei den XPC-Zelllinien konnte eine „Verdünnung“ der Addukte durch DNA-Neusynthese während der Replikation ausgeschlossen werden, da die Zellzahlen während der beobachteten Reparaturphase nach einer MNU-Behandlung konstant blieben. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die drei untersuchten FA-Komponenten nicht essenziell für den alternativen Reparaturweg für O⁶-MeG sind.

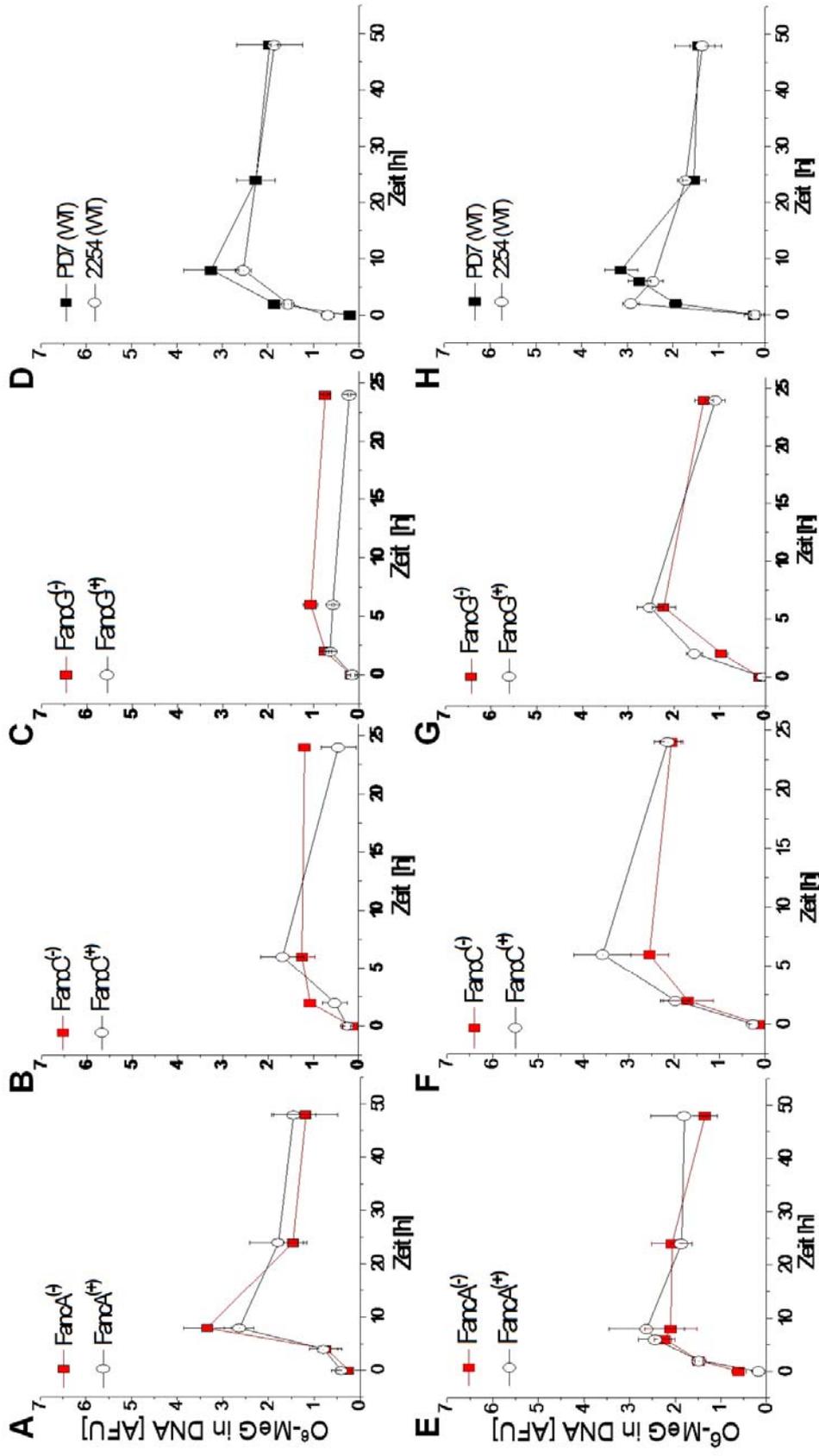


Abb. 27. Zellen, denen Fanconi Anämie-Proteine aus dem Kernkomplex fehlen, können O⁶-MeG-Schäden MGMT-unabhängig reparieren. Fanconi-Zelllinien, defizient in den Fanconi Anämie-Proteinen A, C und G, wurden mit BG [25 µM] für eine Stunde vorbehandelt. Im Anschluss erfolgte die Alkylierung mit MNU [15 µg/ml] (E -H). Dieselbe Behandlung wurde bei zwei Wildtyp-Zelllinien (PD7 und 2254) durchgeführt (D und H). Die obere Reihe (A - D) zeigt die Ergebnisse von Zellen, die nur mit MNU alleine behandelt wurden, und somit eine aktive MGMT besitzen. Nach den angegebenen Zeiträumen wurden Proben entnommen und der O⁶-MeG-Gehalt der Zellen gemessen.

Ergebnisse

Im Anschluss wurde der Einfluss einer weiteren Proteinkomponente dieses Signalweges untersucht, die nicht dieser Gruppe angehört, die nach DNA-Schädigung den großen Fanconi-Kernkomplex bilden. Hierbei handelte es sich um das Protein FancD2, welches für die Ubiquitinierung und somit für die Aktivierung des Kernkomplexes zuständig ist. Wie bei den FA-Proteinen A, C und G zeigte sich, dass FancD2-defiziente Zellen mit aktiver MGMT O^6 -MeG effizient aus der DNA entfernen können (Abb. 28; A). Nach Inhibition der MGMT-Aktivität verlieren FancD2-defiziente Zellen diese Eigenschaft vollständig und können die O^6 -MeG-Schäden nicht beheben (Abb. 28; B). Werden diese Zellen jedoch mit dem entsprechenden FancD2-Wildtyp-Gen rekonstituiert, gewinnen sie ihre Reparaturfähigkeit wieder zurück. Diese Befunde konnten an hier nicht gezeigten primären Fibroblasten von Fanconi-Patienten bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass das FancD2-Protein an dem alternativen Reparaturweg für O^6 -MeG-Schäden in humanen Zellen essenziell beteiligt ist.

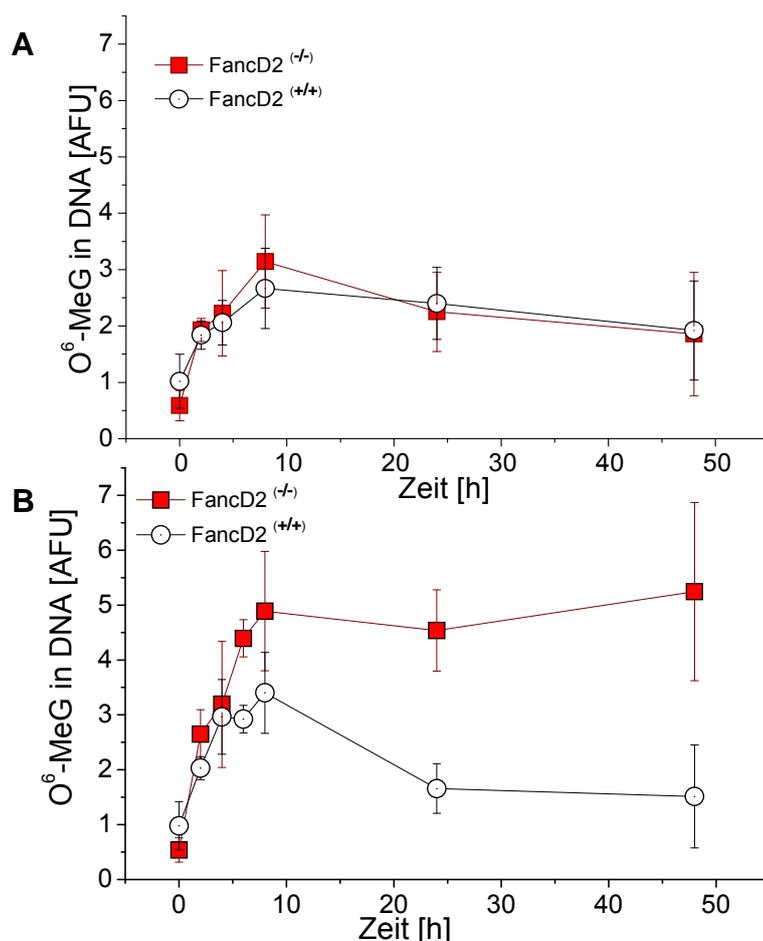


Abb. 28. Fanconi Anämie-Protein D2 wird für eine MGMT unabhängige Reparatur benötigt. FancD2-defiziente Zellen wurden mit MNU [15 µg/ml] alleine (A) oder in Kombination mit dem Inhibitor BG [25µM] behandelt (B). Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen mit einem O^6 -MeG-spezifischen Antikörper angefärbt und über die ACAS-Software ausgewertet.

Ergebnisse

4.3.2. FancD2-defiziente Zellen zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber methylierenden Substanzen

Die Empfindlichkeit gegenüber alkylierenden Substanzen wurde in diesem Fall mittels der Aktivität der Kaspasen-3/7 bestimmt, da eine hohe Autofluoreszenz der Zellen eine FACS-Auswertung der Annexin V-Färbung nicht erlaubte. Zu diesem Zweck wurden jeweils 15000 FancD2-defiziente oder -rekonstituierte Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und mit unterschiedlichen MNU-Konzentrationen +/- BG behandelt. Nach 24h wurde mit Hilfe des Caspase-3/7-Kit von Promega die Caspase-Aktivität gemessen. Dabei zeigte sich, dass FancD2-defiziente Zellen bei allen gemessenen Konzentrationen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber MNU aufweisen, als die rekonstituierten Zellen (Abb. 29). Durch Inhibition der MGMT-Aktivität wurde die Caspase-Aktivität nach MNU-Zugabe in der FancD2-defizienten Zellen weiter erhöht, nicht aber in den rekonstituierten Zellen. Dieser Befund belegt, zusammen mit den im vorigen Abschnitt beschriebenen Reparaturkinetiken, die wichtige Rolle dieses FA-Proteins bei der Entfernung von O⁶-MeG aus dem Genom und damit für die Reduktion der zytotoxischen Wirkung methylierender Reagenzien.

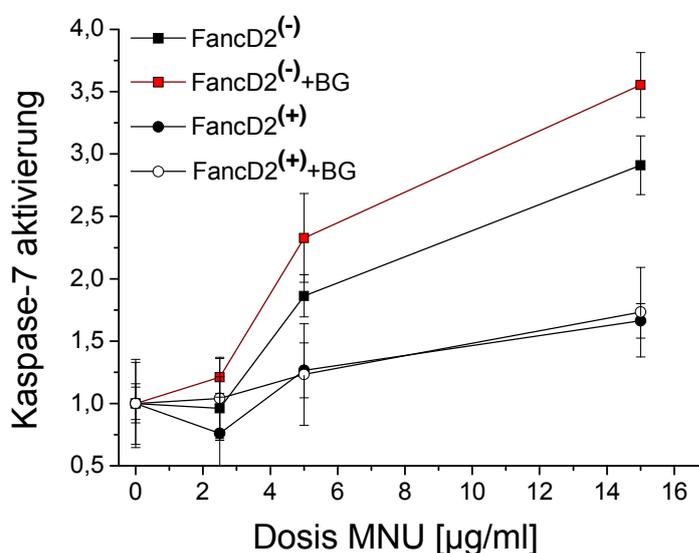


Abb.29. FancD2- und MGMT-Inhibition erhöhen die Kaspase-3/7-Aktivität in MNU behandelten Zellen. FancD2-defiziente und -profiziente Zellen wurden in einer Dichte von 15×10^3 Zellen/Well in eine 96-Well Platte gesät. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit BG vorbehandelt und die Zellen dann mit einer steigenden Konzentration an MNU inkubiert. Die Caspase-Aktivität wurde nach 24 h mittels des Caspase3/7-Kit luminometrisch gemessen.

Ergebnisse

4.3.3. Die Ubiquitinierung des FancD2-Protein ist wichtig um die Reparatur von O⁶-MeG-Schäden einzuleiten

Die Ubiquitinierung (Ub) des FancD2-Proteins ist ein wichtiges Signal für die Bildung des FA-Kernkomplexes und für seine Beteiligung an der Reparatur verschiedener DNA-Schäden. Weiterhin ist bekannt, dass eine Ub dieses Proteins notwendig ist, um seine Interaktion mit dem Chromatin zu ermöglichen. Deshalb wurde als Nächstes untersucht, ob eine solche Ub-Modifikation auch durch Methylierungsschäden in der DNA induziert wird und ob dies für die Funktion von FancD2 bei der O⁶-MeG-Reparatur essenziell ist. Zu diesem Zweck wurden lymphoblastoide Zellen mit einem Funktionsverlust für FancD2 untersucht, die mit einem in der Ubiquitinierungssequenz mutierten (K651R) FancD2-Protein rekonstituiert waren, welches nicht mehr Ub-modifizierbar war. Der Ub-Status des Proteins wurde dabei mittels Western-Blot überprüft (Abb. 30; A). Nach einer Behandlung mit MNU und BG zeigten die mit dem Wildtyp-Gen rekonstituierten PD20.L+D2-Zellen eine Doppelbande. Die untere Hauptbande repräsentiert das ca. 150 kDa große FancD2-Protein, die obere Bande das um 7 kDa größere ubiquitinierte Protein. Der Klon PD20.L+D2 (K651R) wies bei gleicher Behandlung jedoch erwartungsgemäß keine Ub-Bande auf. Um zu überprüfen, ob die Ausgangslinie PD20.L wirklich FancD2-negativ ist, wurden diese Zellen ebenfalls im Western-Blot getestet. Hier konnte keine FancD2-Bande detektiert werden.

Im nächsten Schritt wurden Reparaturkinetiken mit dem Klon K561R durchgeführt (Abb. 30; B). Nach einer Behandlung mit MNU alleine waren die Zellen in der Lage, O⁶-MeG relativ effizient aus der DNA zu entfernen. Wurde zusätzlich die MGMT-Aktivität durch BG blockiert, verlief die Reparatur in diesen Zellen deutlich langsamer und der Adduktspiegel stagnierte auf hohem Niveau. Daraus lässt sich schließen, dass eine Ub-Modifizierbarkeit des FancD2-Proteins in der Position 651 die Effizienz des alternativen Reparaturweges zumindest deutlich steigert oder für seine Funktion sogar notwendige Voraussetzung ist.

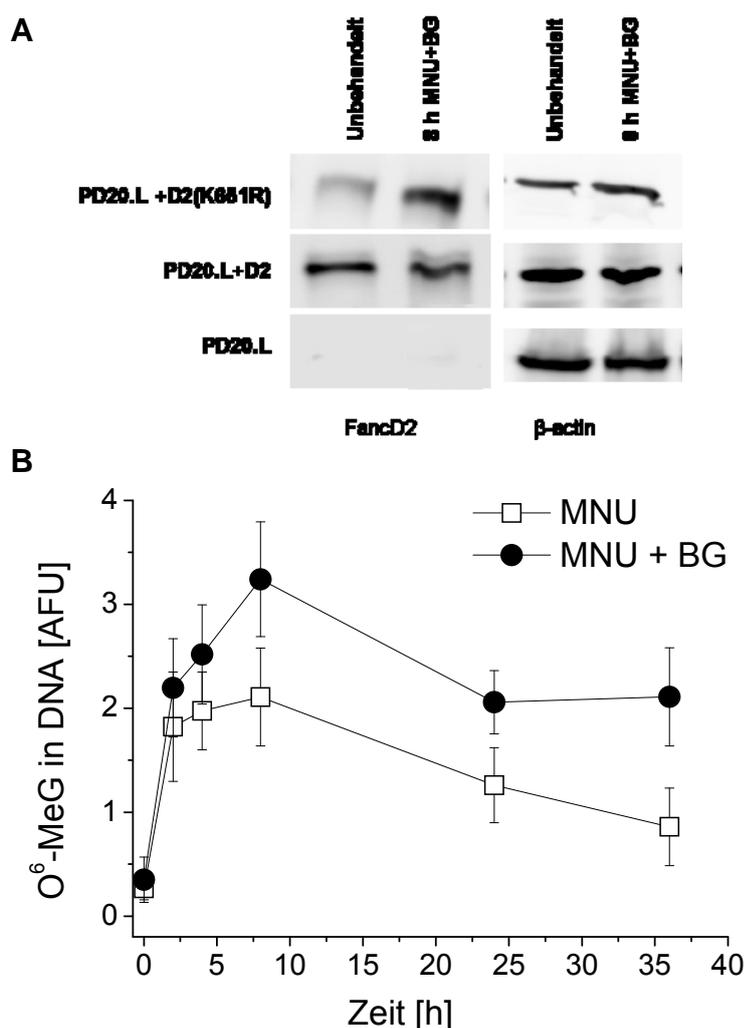


Abb. 30. Eine Ubiquitinierung ist wichtig für eine O⁶-MeG Reparatur ohne MGMT. (A) Western Blot-Analyse der verschiedenen Zelllinien. Fanconi-defiziente Zellen (PD20.L) sowie deren rekonstituiertes Gegenstück (PD20.L+D2) und der Klon PD20.L+D2(K651R) wurden mit 15 µg/ml MNU und 25 µM BG behandelt, und auf Ihren FancD2-Gehalt hin überprüft. (B) Quantitative Auswertung der O⁶-MeG-Färbung des nicht ubiquitinierbaren Klon PD20.L+D2(K651R). Zellen wurden mit MNU [15 µg/ml] ± BG [25 µM] behandelt und nach den angegebenen Zeitpunkten angefärbt.

4.4. *Ex vivo* und *in vivo* Situation der MGMT-unabhängigen O⁶-MeG-Reparatur

Die biochemischen Untersuchungen mit synthetischen DNA-Substraten (3.2.1.) ließen vermuten, dass der alternative Reparaturweg auch unter zellulären Bedingungen mit hoher Präferenz auf O⁶-MeG-Addukte in der präreplikativen Paarung mit einem C zugreift, nicht aber auf die postreplikative Situation gegenüber einem T im Gegenstrang. Für den exakten Vergleich und die Interpretation von Adduktkinetiken ist es aber wichtig, die Einflüsse von DNA-Synthese (Addukt-Verdünnung, Unterschiede in der Reparatureffizienz) und anderen Zellzykluseffekten

Ergebnisse

dabei möglichst auszuschalten. Deshalb wurden im Folgenden versucht, die wichtigsten der bisher an Zelllinien erhobenen Befunde an primären Mauszellen zu bestätigen. Eingesetzt wurden dafür Tiere mit bzw. ohne Funktionsverlust für verschiedenen Faktoren des NER- und des FA-Weges.

4.4.1. O⁶-MeG-Reparatur in Zellen von FancA-, FancC- bzw. FancD2-defizienten Mäusen

Mäuse mit einer Keimbahn-Defizienz für die Fanconi-Proteine FancA oder FancC wurden mit einer einmaligen Dosis [25 oder 50 mg/kg; *i.p.*] des DNA-methylierende Reagenz Temozolomid (TMZ) behandelt, welches das gleiche Spektrum an DNA-Addukte wie MNU hervorruft. Zwölf und 24 Stunden nach der Behandlung wurden jeweils zwei Mäuse euthansasiert und die Lymphozyten aus der Milz mittels Ficoll-Präparation isoliert. Eine zweite Gruppe von FancA- und FancC-defizienten Mäusen bekam zusätzlich eine Vorbehandlung mit BG [25 mg/kg]. Die O⁶-MeG-Färbung zeigte, dass bei Mäusen, die nur mit TMZ behandelt waren, der Adduktgehalt in den Lymphozyten, unabhängig vom FA-Status, innerhalb von 24 Stunden deutlich abnahm (Abb. 31; A). Eine Blockierung der MGMT durch BG führte bei keiner der Lymphozytenpopulationen zu einer Abnahme der Reparaturleistung (Abb. 31; B).

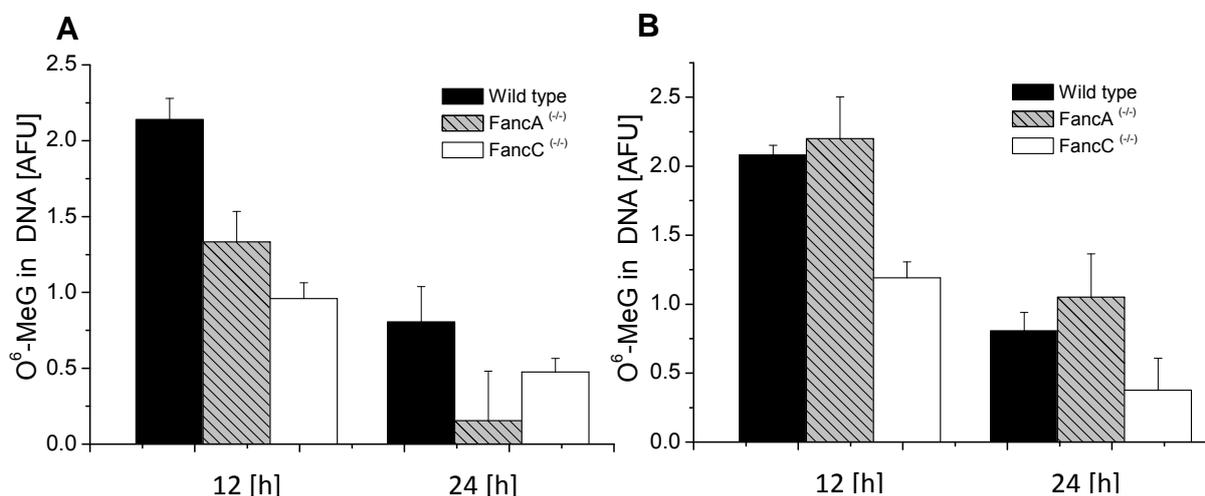


Abb.31. O⁶-MeG Reparatur in FancA und FancC Knockout-Mäusen. FancA- und FancC-defiziente Mäuse wurden mit MNU [25 mg/kg] ± BG [25 mg/kg] *i.p.* behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden zwei Mäuse euthansasiert und deren Lymphozyten aus der Milz isoliert. Der O⁶-MeG-Gehalt dieser Zellen wurde mittels O⁶-MeG-Antikörper nachgewiesen. (A) MNU [25 mg/kg], (B) MNU [25 mg/kg] ± BG [25 mg/kg].

Ergebnisse

Eine Verdopplung der TMZ-Dosis ergab einen insgesamt höhere Adduktspiegel, beeinflusste aber nicht das generelle Reparaturverhalten (ohne Abb.). Die Zellen beider FA-defizienten Mausstämmen konnten also, ähnlich wie die entsprechenden humanen Zelllinien, O⁶-MeG-Schäden auch in Abwesenheit der MGMT-Aktivität effizient aus der DNA entfernen.

Im nächsten Schritt wurde die Rolle des FancD2-Proteins bei Primärzellen analysiert. Da aufgrund der niedrigen Reproduktionsrate der FancD2-Knockout-Mäuse nur eine geringe Anzahl an Tieren verfügbar war, wurden die ersten Reparaturkinetik an Lymphozyten nach *ex vivo*-Exposition mit MNU ermittelt. Dazu wurden jeweils 3 Wildtyp- und FancD2-Knockout-Mäuse euthanasiert, die Lymphozyten aus der Milz über Ficoll isoliert und in Zellkultumedium alleine mit MNU [15 µg/ml] oder mit MNU plus einer Vorinkubation mit BG [25 µM] behandelt. Anschließend wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben genommen und der Gehalt an O⁶-MeG gemessen (Abb. 32). Wie schon bei den lymphoblastoide humanen Zelllinien zeigten auch die primären Mauslymphozyten keine Reparatur der Schäden, wenn gleichzeitig die MGMT inaktiviert war und das FancD2-Protein fehlte. Eine Behandlung mit MNU alleine zeigte dagegen, dass der endogene MGMT-Spiegel ausreichte, um die Schäden zu reparieren.

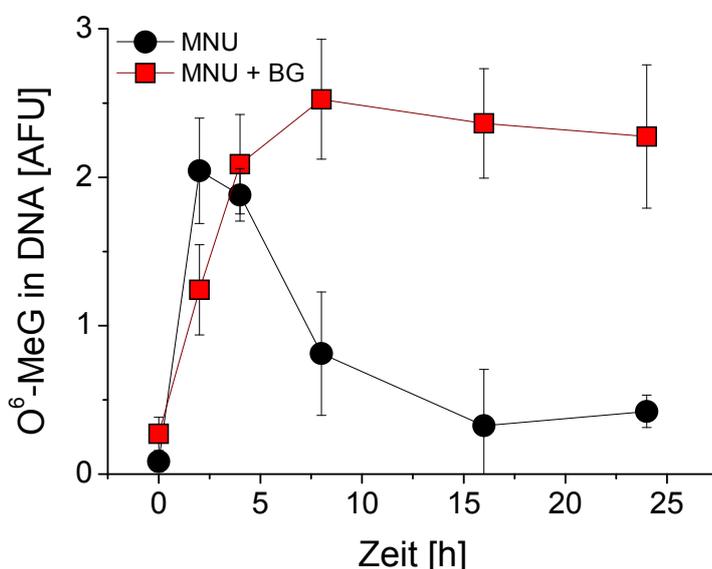


Abb.32. O⁶-MeG-Reparaturkinetik von *ex vivo* behandelten Maus-Lymphozyten. FancD2-defiziente Mäuse wurden euthanasiert und die Lymphozyten aus der Milz isoliert. Die Lymphozyten wurden anschließend mit MNU [15 µg/ml] ± BG [25 µM] behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und auf ihren O⁶-MeG-Gehalt überprüft. Die Standardabweichungen setzen sich aus mind. 3 unabhängigen Experimenten zusammen.

4.4.2. *Ex vivo* MNU-Behandlung von primären Lymphozyten aus DNA-Reparatur defizienten Mauslinien

Der Einfluss verschiedener DNA-Reparaturfaktoren wurde anhand unterschiedlicher Knockout-Mausmodelle untersucht. Hierzu wurden Stämme verwendet, die jeweils für eines der Proteine, FancD2, XPA, XPC oder GADD45 α defizient waren. GADD45 α spielt in verschiedenen Reparatursystemen eine wichtige Rolle, daher wurde beschlossen dieses multifunktionelle Protein mit in die Untersuchungen einzuschließen. Für die *ex vivo* Versuche wurden jeweils zwei Mäuse aus einem Stamm euthanasiert und deren Lymphozyten aus der Milz und dem Knochenmark isoliert. Diese Zellen wurden anschließend unter Zellkulturbedingungen entweder mit MNU alleine inkubiert oder in Kombination mit einer BG-Vorbehandlung. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und eine O⁶-MeG-Färbung durchgeführt. Lymphozyten aus der Milz zeigen, dass eine unabhängige MGMT-Reparatur von O⁶-MeG in Wildtyp, sowie in XPA- und Gadd45 α -defizienten Mäusen stattfand (Abb. 33; A, C, D). Diese Proteine scheinen kaum oder gar nicht an dem alternativen Reparaturweg beteiligt zu sein.

Das XPC-Protein zeigt wie bei den *in vitro* Versuchen, dass es essentiell ist, um die Reparatur von O⁶-MeG einzuleiten (Abb. 33; E). Wie die aus der Milz isolierten Lymphozyten zeigen die Lymphozyten aus dem Knochenmark, dass eine O⁶-MeG-Reparatur ohne die MGMT in Zellen die entweder kein XPC oder kein FancD2 besitzen nicht funktioniert (Abb. 33; B und E). Bei allen anderen Knockout-Stämmen, sowie der Wildtyp Kontrolle, ist eine Reparatur ohne die MGMT im Knochenmark möglich (Abb. 33; C und D).

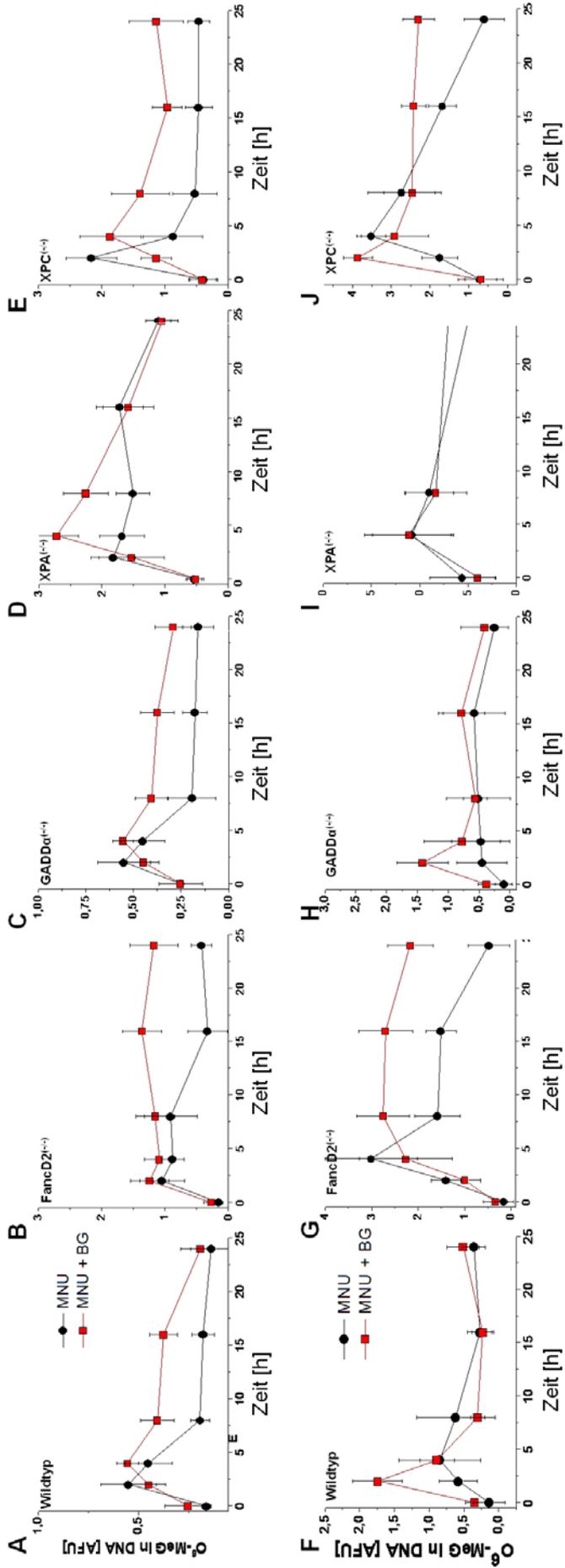


Abb.33. Lymphozyten aus der Milz und dem Knochenmark verschiedener DNA-Reparatur defizienter Knockout-Mäuse nach MNU Behandlung. Lymphozyten aus der Milz (A-E) und dem Knochenmark (F-J) von Wildtyp, Fancd2^(-/-), Gadd45^(-/-), Xpa^(-/-) und Xpc^(-/-)-Mäusen wurden isoliert und ex vivo mit MNU [15 µg/ml] ± BG [25 µM] behandelt. Der Alkylierungsgrad wurde mittels O⁶-MeG-Antikörper-Färbung und anschließend mit dem ACAS System Auswertet. Die Standardabweichung setzt sich aus mid. 3 unabhängigen Versuchen zusammen.

4.4.3. *In vivo* Reparaturkinetiken in Zellen von DNA-Reparatur defizienten Mausstämmen zeigen den Einfluss der verschiedenen Signalwege auf die O⁶-MeG-Reparatur

Um zu überprüfen ob die an *ex vivo* exponierten Milzlymphozyten gewonnenen Daten repräsentativ für die *in vivo*-Situation sind, wurden Reparaturkinetiken an hämatopoetischen Zellen sowie an Zellen anderer Gewebetypen nach Methylierung *in vivo* erhoben. Dazu wurden jeweils Gruppen der Knockout-Mauslinien FancD2, XPA und GADD45 α sowie Wildtypiere zunächst mit BG [25 mg/kg; *i.p.*] und eine Stunde später mit MNU [15 mg/kg; *i.p.*] behandelt. Zu den Zeitpunkten 4, 8, und 24 Stunden nach MNU wurden jeweils zwei Tiere pro Gruppen euthanasiert und die Milz, das Knochenmark sowie Leber und Niere entnommen. Aus Milz und Knochenmark wurde die Lymphozytenfraktion über einen Ficoll-Gradienten isoliert und der Gehalt an O⁶-MeG in der DNA dieser Zellen gemessen. Die Analyse zeigt, dass die Adduktspiegel in den primären Milzlymphozyten von Wildtyp- und XPA-defizienten Mäusen bereits nach acht Stunden auf ein sehr niedriges Niveau abgefallen waren, während dies bei den GADD45 α ^{-/-}-Zellen erst nach 24 Stunden zu beobachten war (Abb. 34; A). Jedoch glich der O⁶-MeG-Gehalt der untersuchten Zellen, denen von Wildtyp- und XPA-Zellen. Demgegenüber persistierten die Addukte in der DNA von FancD2^{-/-}-Lymphozyten auf hohem Niveau über die gesamte Beobachtungszeit. Sehr ähnliche Reparaturkinetiken wurden auch in der Lymphozytenfraktion aus dem Knochenmark der vier Mausstämmen gefunden (Abb 34; B). Zusammengefasst ergibt sich aus den *in vivo*-Daten, dass der alternative Reparaturweg für O⁶-MeG in hämatopoetischen Zellen der Maus auch in Abwesenheit von MGMT die kritischen Addukte sehr effizient aus der DNA entfernen kann. Diese Funktion ist dabei weitgehend unabhängig vom Vorhandensein des XPA-Proteins, aber essentiell angewiesen auf eine intakte FancD2-Komponente. Das Fehlen von Gadd45a scheint die Reparatur zwar prinzipiell noch zu erlauben, aber mit deutlich reduzierter Effizienz.

Als nächstes wurde geprüft, ob die Funktion des alternativen Reparaturweges auf hämatopoetische Zellen beschränkt ist. Dazu wurde der O⁶-MeG-Gehalt auf Gefrierschnitten der Niere von Wildtyp- bzw. FancD2^{-/-}-Mäusen gemessen, welche von Tieren stammten, die für 8 bzw. 24 Stunden mit BG und MNU behandelt waren.

Ergebnisse

In Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Analysen an Lymphozyten konnten die Nierenkortex-Zellen von FancD2-defizienten Mäusen die DNA-Schäden nicht reparieren (Abb. 35; D - F), während der Adduktgehalt bei Wildtyp-Mäusen nach 24 Stunden auf das Niveau der unbehandelten Kontrollen abgesunken war. (Abb. 35; A – C).

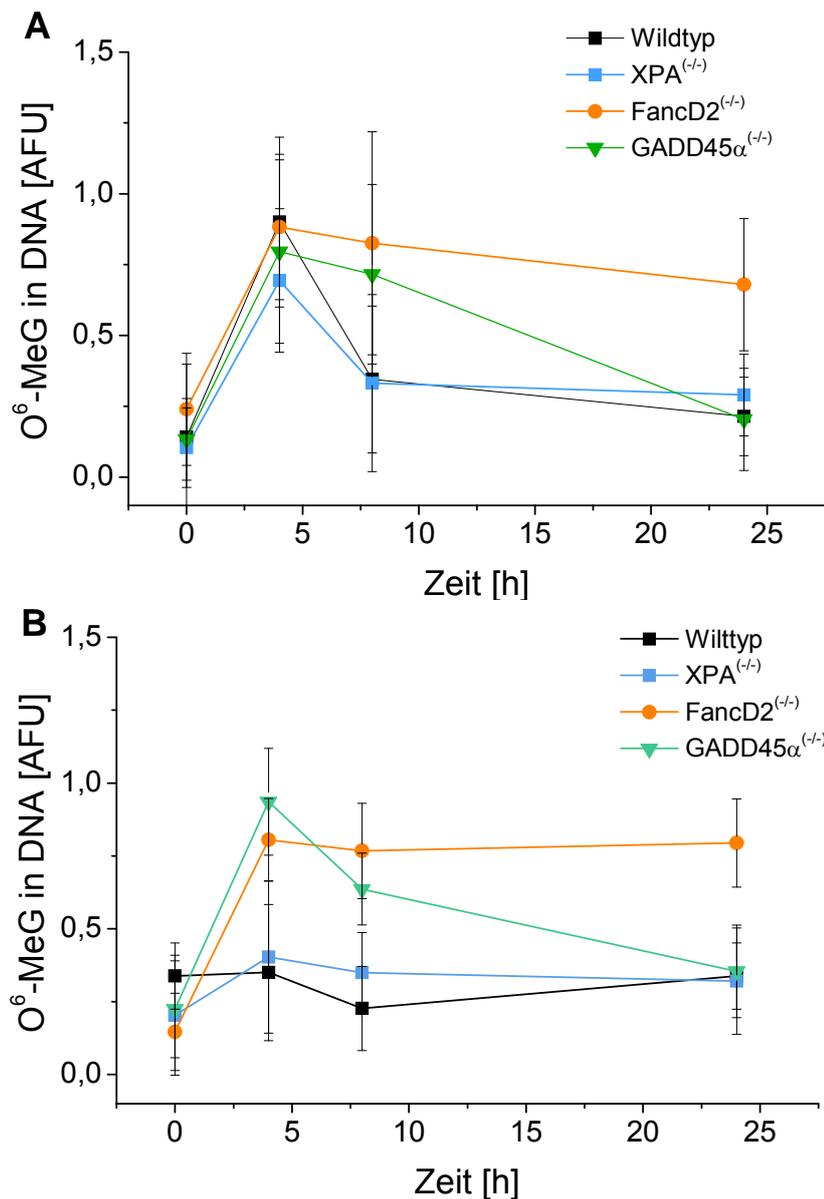


Abb 34. O⁶-MeG Reparaturkinetiken in Mäuse Lymphozyten. Verschiedenen Knockout Mausstämmen wurden *i.p.* mit BG [25 mg/kg] und MNU [15 mg/kg] behandelt. Vier, 8 und 24 h post-Behandlung wurden die Lymphozyten aus der Milz (A) und dem Knochenmark (B) gewonnen und auf ihren O⁶-MeG Gehalt getestet. Die Standardabweichung setzt sich aus zwei Versuchen mit jeweils 3 Tieren pro Zeitpunkt zusammen.

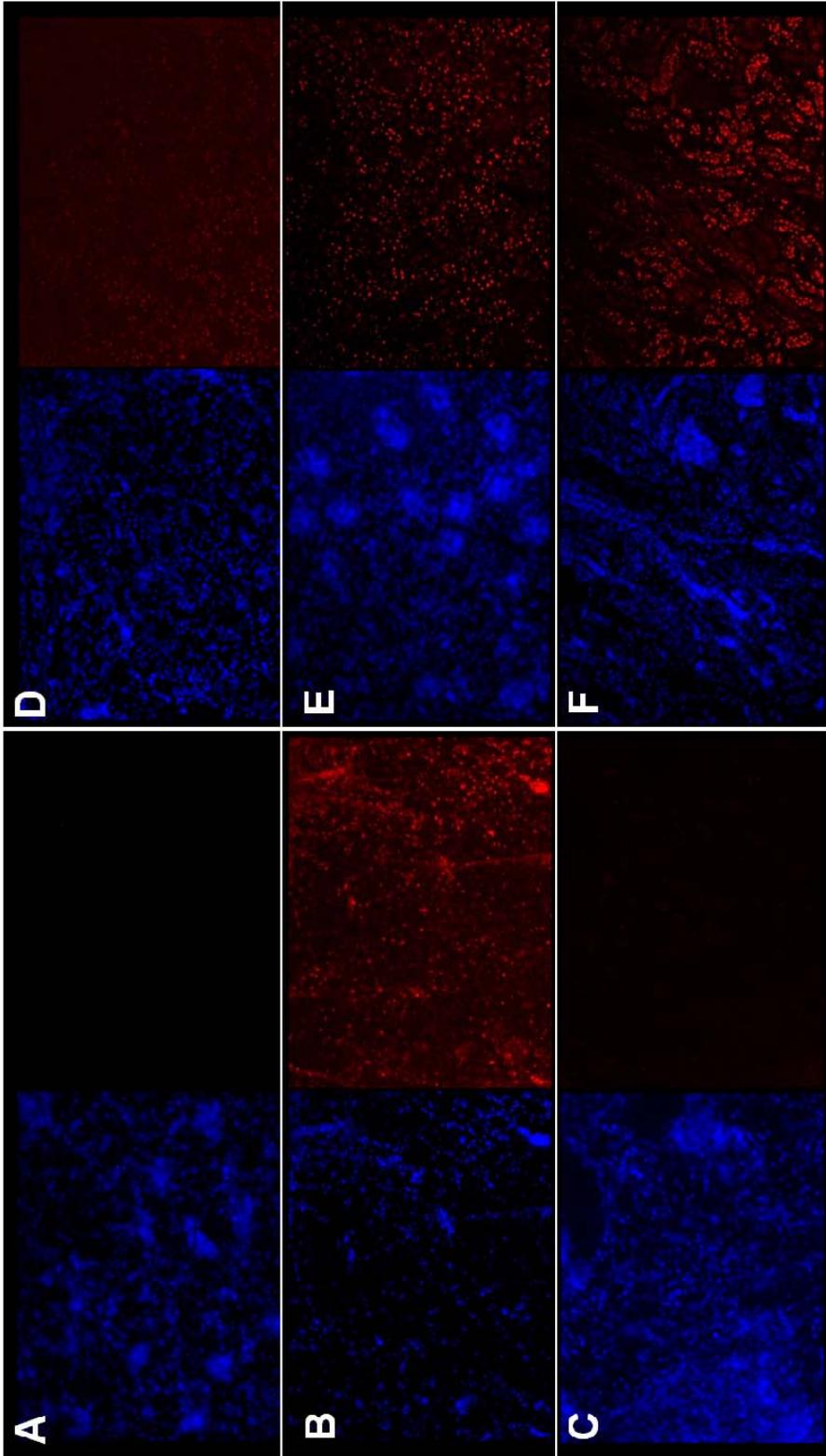


Abb.35. Immunfluoreszenz-Färbung der Nieren von Wildtyp und Fancd2^{-/-} Mäusen nach einer Alkylierungsbehandlung. Wildtyp (A – C) und Fancd2^{-/-} (D – F) Mäuse wurden i.p. mit BG [25 mg/kg] behandelt. Nach einer Stunde wurde den Mäusen MNU [25 mg/kg, i.p.] verabreicht. Nach 8 h (B und E) und 24 h (C und F) wurden die Nieren der Mäuse entnommen und Dünnschnitte angefertigt, welche mit einem O⁶-MeG-spezifischen Antikörper angefärbt wurden. A und D; unbehandelte Mäuse, Blau; DAPI, Rot; O⁶-MeG, Vergrößerung 20x

Ergebnisse

4.4.4. Bestätigung der O⁶-MeG-Messung mittels *Immuno-Slot-Blot-Verfahren*

Die bis hierher durchgeführten Adduktmessungen für O⁶-MeG beruhen alle auf der quantitativen immunhistologischen *in situ*-Färbung im Kern einzelner Zellen. Um potentielle Störfaktoren bei dieser Methode auszuschließen, wie beispielsweise eine unterschiedliche Zugänglichkeit für die Antikörper zum Addukt in der Chromatinstruktur des Kerns, wurde als zweites Nachweisverfahren eine *Immuno-Slot-Blot-Analyse* (ISB) an isolierter DNA durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde aus der Leber der MNU-behandelten Mäuse (3.4.2.) die genomische DNA isoliert und jeweils 2 µg dieser Proben denaturiert und auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Reihe von DNA-Standards mit ansteigendem Alkylierungsgrad aufgetragen, um die Sensitivität des ISB-Test zu überprüfen. Nach der Inkubation mit dem anti-O⁶-MeG-Antikörper und einem Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper wurden die Blots mit einem ECL-Reagenz entwickelt und die Signale mit der Multigauge-Software von Fuji ausgewertet. Die eingesetzte Standardreihe zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Signalstärke und somit die Validität dieser Versuchsanordnung (Abb. 36; A, B).

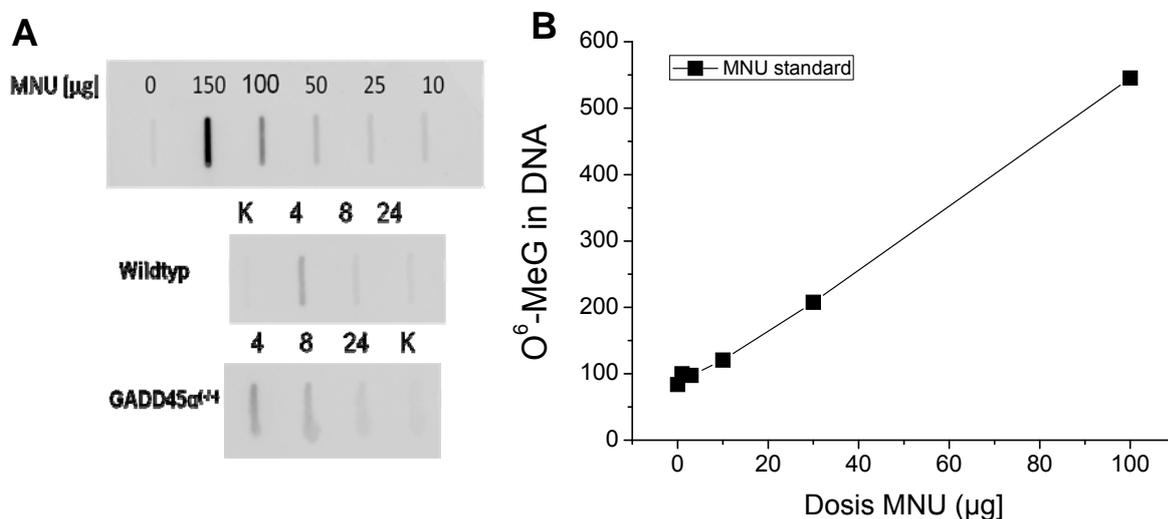


Abb. 36. Dotblot Analyse des O⁶-MeG Gehalts in der DNA. (A) Beispiel einer Slot-blot Analyse. 2 µg mit verschiedenen Dosen MNU behandelter DNA und aus behandelten Mäusen Leber-DNA wurden auf eine Nitrozellulosemembran gegeben und mit einem O⁶-MeG-spezifischen Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL und anschließender Auswertung mittels der Multigauge Software (B, FujiFilm). K; Unbehandelte Kontrolle

Ergebnisse

Die ISB-Analyse der DNA aus den Mäuselebern zeigte, dass die Addukte in den Zellen der *FancD2*^(-/-)-Mäuse nicht repariert werden. Nach 8 und 24 h lag der O⁶-MeG-Gehalt hier jeweils deutlich über dem der Wildtyp- und der XPA-Knockout-Mäuse (Abb. 37). Interessanterweise lag auch bei dieser Messung der O⁶-MeG-Gehalt in der DNA aus *GADD45α*^(-/-) Mäusen acht Stunden nach der MN-Behandlung höher als bei den anderen Mäusen. Jedoch konnte auch in diesem Versuch gezeigt werden dass diese Schäden innerhalb von 24 h komplett entfernt werden (Abb. 37). Damit entsprechen die im ISB erhobenen Reparaturkinetiken im prinzipiellen Verlauf denen der im ICA-Test auf Einzelzell-Ebene gemessenen Daten in den hämatopoetischen Zellen und in der Niere. Und bestätigen die Vermutung dass dieser alternative O⁶-MeG-Reparaturmechanismus nicht nur auf Zellen des Hämatopoetischensystems beschränkt sind.

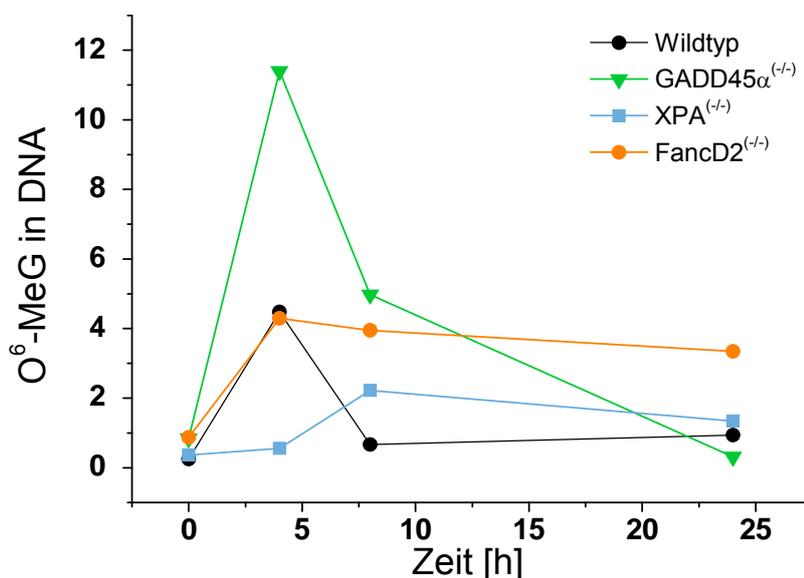


Abb. 37. Quantifizierung der Slot-blot-Analyse des O⁶-MeG-Gehalts der Leber-DNA aus Knockout-Mäusen. Die DNA von reparaturdefizienten Mäusen wurde nach einer Behandlung mit MNU [15 mg/kg] und BG [25 µg/mg] aus der Leber isoliert. 2 µg DNA wurden für den Slot-blot verwendet und auf Ihren O⁶-MeG-Gehalt überprüft. Die Detektion erfolgte mittels ECL und anschließender Auswertung mit der Multigauge Software (FujiFilm).

4.4.5. Primäre Lymphozyten mit Reparatur-Defizienz für O⁶-MeG zeigen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber methylierenden Reagenzien

Die in den humanen Zelllinien beobachtete Zytotoxizität von MNU beruht nach derzeitigem Verständnis auf der postreplikativen Prozessierung von nicht-reparierten O⁶-MeG-Schäden durch das Mismatch-Reparatursystem. Um einen entsprechenden Nachweis auch für primäre hämatopoetische Zellen der Maus zu erbringen, wurden Knochenmark-Lymphozyten aus verschiedenen Reparatur-defizienten Mäusen

Ergebnisse

isoliert, *ex vivo* mit BG [25 μ M] und MNU behandelt und in ein Zytokin-haltiges Methylzellulose-Medium überführt. Dieses semisolid Medium erlaubt es Stamm- und Vorläuferzellen zu proliferieren und lokale Kolonien (CFU) zu bilden. Nach 7 Tagen wurden die entstandenen Kolonien unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellen von Wildtyp-, XPA- und GADD45 α -defizienten Mäusen zeigten eine weitgehend ähnliche MNU-Dosis-abhängige Reduktion der Koloniebildung, wie die unbehandelten Kontrollen. Diese lag bei einer Dosis von 7,5 μ g MNU/ml bei ca. 40 % und bei 15 μ g MNU/ml bei ca. 60 % (Abb. 38). Dies belegt, dass die verminderte Reparaturgeschwindigkeit der GADD45 α -defizienten Zellen offenbar noch ausreicht, die kritischen O⁶-MeG-Schäden rechtzeitig vor der einsetzenden Replikation nach Zytokin-Stimulierung aus ihrem Genom zu entfernen. Knochenmarkzellen aus FancD2- oder XPC-defizienten Mäusen zeigten dagegen schon bei der Zugabe von 7,5 μ g MNU/ml einen Verlust der CFU von 60 - 70 %. Bei der höheren Dosis von 15 μ g MNU/ml wurde die CFU sogar um 80 % reduziert. Dieser Befund weist darauf hin, dass auch in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen der alternative Reparaturweg für O⁶-MeG auf die beiden Proteine XPC und FancD2 essenziell angewiesen ist und dass er diese Zellen effektiv vor der zytotoxischen Wirkung methylierender Agenzien schützen kann.

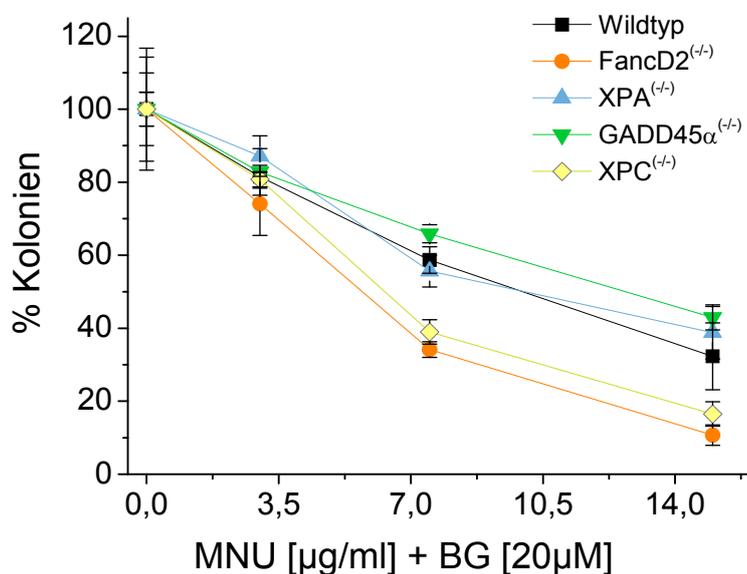


Abb. 38. Koloniebildungstest der Stamm- und Vorläuferzellen verschiedener reparaturdefizienter Mausstämmen nach einer MNU + BG-Behandlung. Aus dem Knochenmark von FancD2-, GADD56 α -, XPA- und XPC-defizienten Mäusen wurden Lymphozyten isoliert und in zytokinhaltigem Methylzellulose-Medium mit BG [25 μ M] und verschiedenen MNU Konzentrationen behandelt. Nach 7 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Die Standardabweichung setzt sich aus drei unabhängigen Versuchen zusammen.

Ergebnisse

Da bekannt war, dass Zellen von Fanconi-Patienten eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Reihe verschiedener DNA-reaktiver Reagenzien wie beispielsweise Mitomycin C (MMC) aufweisen, wurde ein weiterer Koloniebildungsversuch durchgeführt, um zu prüfen, ob eine FancD2-Defizienz auch zu Problemen bei der Reparatur anderer DNA-Schadentypen als O^6 -MeG führt. Hierzu wurden die Lymphozytenfraktion aus dem Knochenmark von Wildtyp und FancD2-defizienten Mäusen isoliert und in Methylzellulose-Medium mit steigenden Konzentrationen von Cisplatin behandelt. Die Auswertung nach 7 Tagen zeigte deutlich, dass die FancD2-defizienten Lymphozyten schon bei einer Dosis von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ CPT eine um 90 % reduzierte CFU-Rate aufwies. Isolierte Zellen aus Wildtyp-Mäusen zeigten dagegen bei derselben Konzentration eine Reduzierung der CFU von 10-15 %. (Abb. 39).

Da die zytotoxische Wirkung von Cisplatin im wesentlichen von den gebildeten Pt-(GG)-Intrastangaddukten in der DNA ausgeht, liegt der Schluss nahe, dass auch diese Schäden bei fehlendem FancD2-Protein nicht adäquat repariert werden können.

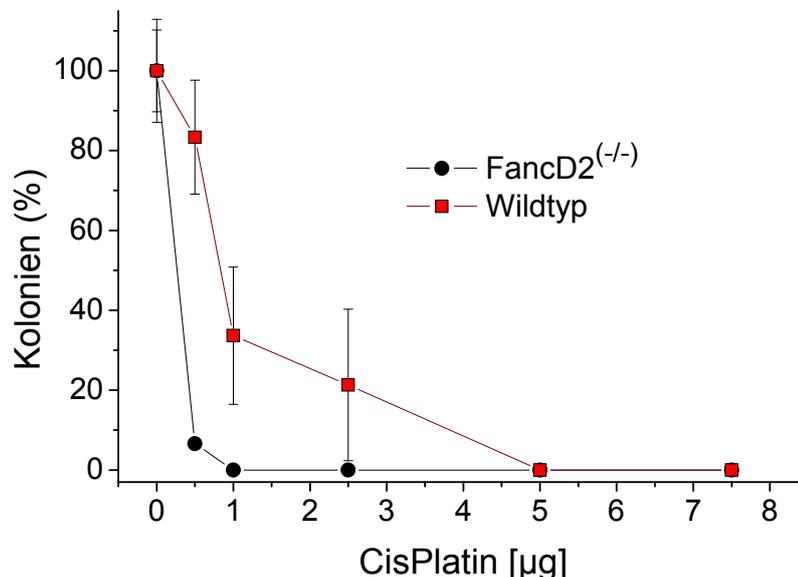


Abb. 39. Koloniebildungstest der Stamm- und Vorläuferzellen FancD2-defizienter Mäusestämme nach einer Behandlung mit CPT. Aus dem Knochenmark von FancD2-defizienten und Wildtyp Mäusen wurden Lymphozyten isoliert und in Zytokin-haltigem Methylzellulose-Medium mit verschiedenen Konzentrationen an CPT behandelt. Nach 7 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Die Standardabweichung setzt sich aus drei unabhängigen Versuchen zusammen.

4.5. Mögliche Interaktion von Proteinen der NER und des FA-Netzwerks bei der Reparatur von O⁶-MeG

In den vorangehenden Kapiteln wurde gezeigt, dass sowohl Komponenten des NER- als auch des FA-Systems an der MGMT-unabhängigen Reparatur von O⁶-MeG-Schäden beteiligt sind. Ob es sich bei diesem Mechanismus um zwei individuelle Reparatursignalwege oder um eine Interaktion von NER- und FA-Proteinen handelt, wird in diesem Kapitel untersucht.

4.5.1. Das NER-Protein XPC wird benötigt um FancD2-foci nach Alkylierungsschäden zu bilden

Aus der Literatur ist bekannt, dass das FancD2-Protein bei Typen von DNA-Schäden Reparaturfoci an den Schadensstellen bildet. Ob sich diese Foci auch nach einer Behandlung mit methylierenden Substanzen bilden, wurde bisher noch nicht beschrieben. Es ist auch nicht bekannt, ob die Anwesenheit des Schadenserkenntungsproteins XPC notwendig ist, um FancD2 zu den O⁶-MeG-Schäden zu führen. Um dies herauszufinden, wurden XPC-defiziente und -profiziente Fibroblasten auf Deckgläsern kultiviert, und mit MNU [15 µg/ml] alleine oder in Kombination mit BG [25 µM] behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen PFA-fixiert und mit einem FancD2-spezifischen Antikörper angefärbt. Anhand der Bilder lässt sich erkennen, dass in XPC-defizienten Zellen kaum oder gar keine stressinduzierten Foci entstehen, sondern eine relativ homogene Kernfärbung erkennbar ist. Diese Beobachtung ist unabhängig von der MGMT-Aktivität. Sowohl MNU alleine, also auch in Kombination mit BG, löst keine Focibildung in den XPC-defizienten Zellen aus (Abb. 40; A - C). Die XPC-rekonstituierten Zellen zeigen dagegen einen deutlichen Anstieg der Focibildung in den einzelnen Zellkernen (Abb. 40; D - F).

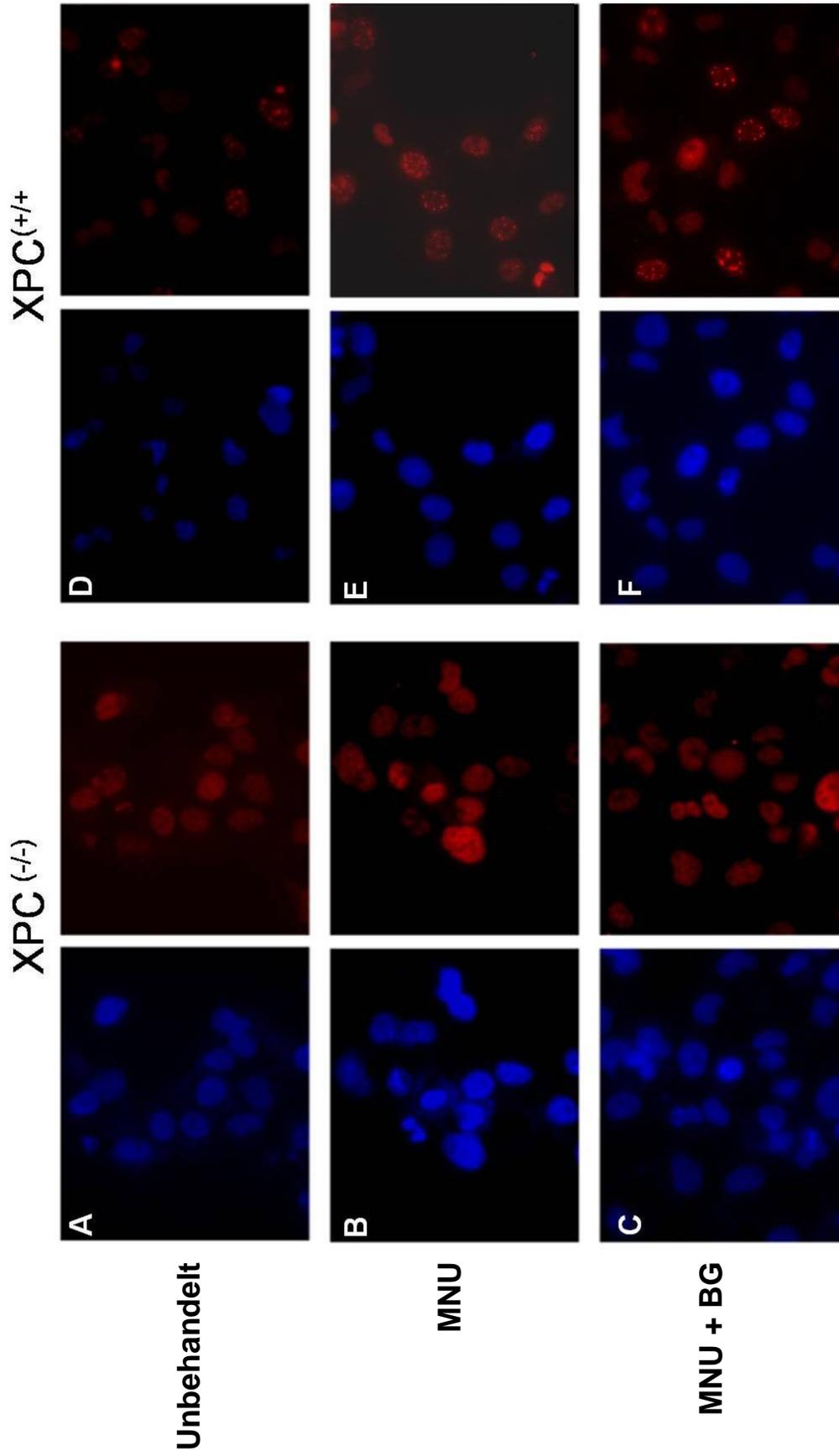


Abb. 40. FancD2 Immunfluoreszenz-Färbung in XPC-defizienten und -profizienten Fibroblasten. XPC^(-/-) Fibroblasten und deren rekonstituierte Gegenstücke wurden auf Deckgläsern kultiviert und mit MNU [15 µg/ml] ± BG [25 µM] behandelt. 24 h nach der Behandlung wurden die Zellen PFA-fixiert und mit einem FancD2-spezifischen Antikörper angefärbt. Bilder A - D: XPC^(-/-) Zellen. Bilder D - F: XPC rekonstituierte Zellen. Blau: DAPI, Rot: FancD2 Antikörper. Die Zellen wurden mit einem Zeiss Mikroskop bei 20 x Vergrößerung mit der AxioVision Software (Zeiss) aufgenommen.

Ergebnisse

Eine Quantifizierung der Foci erfolgte durch Auszählen der XPC-positiven Zellen mit mehr als 5 FancD2-Foci. Dreißig Prozent der Zellen weisen *per se* eine Focibildung auf, da das FancD2-Protein in der S-Phase auch zu Foci akkumuliert (Abb. 41). Eine Behandlung mit 15 µg/ml MNU verstärkt diesen Effekt nur unwesentlich, sodass ca. 40 % der Zellen Foci aufwiesen. Bei MGMT-Inhibition durch BG steigt der Wert jedoch auf ca. 90 % aller Zellen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Focusbildung von FancD2 im wesentlichen O⁶-MeG-abhängig ist und damit direkt an der Prozessierung dieser DNA-Addukte beteiligt ist

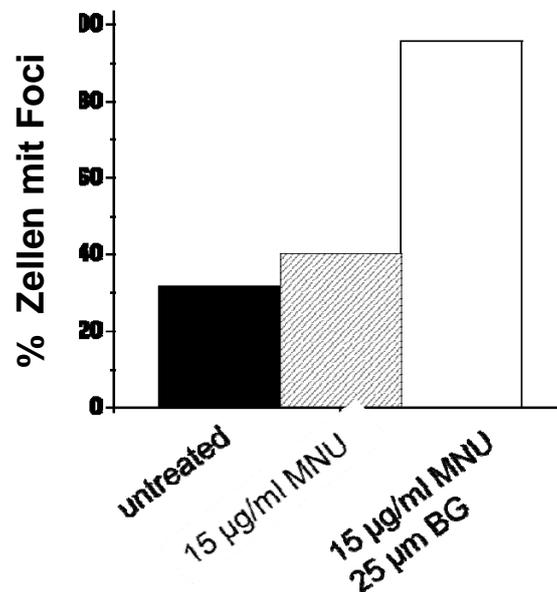


Abb. 41. Quantitative Auswertung der FancD2-Foci in XPC-profizienten Zellen nach Alkylierungsbehandlung. Wildtyp-Fibroblasten wurden auf Deckgläsern kultiviert und mit MNU [15 µg/ml] ± BG [25 µM] behandelt. Die Färbung mit einem FancD2-spezifischen Antikörper erfolgte 24 h nach der Behandlung. Es wurden jeweils 100 Zellen untersucht.

5. Diskussion

5.1. Reparatur von O⁶-Alkylguanin-Schäden in der DNA

Die Reparatur von O⁶-MeG-Addukten in der DNA, die durch alkylierende Reagenzien verursacht werden, ist für die genomische Integrität der Zelle von entscheidender Bedeutung. Es ist lange bekannt, dass dieser Schadenstyp sowohl zytotoxische als auch mutagene Wirkungen in der Zelle ausübt (Sedgwick *et al.*, 2007; Rajesh *et al.*, 2010). Die zytotoxische Eigenschaft dieses Adduktes wird für die Behandlung verschiedener Krebsarten mit alkylierenden Chemotherapeutika wie TMZ, Prokarbazin, Dacarbazin oder Carmustin genutzt. Alkylierungsschäden in der DNA entstehen jedoch nicht nur bei einer Behandlung mit solchen Krebsmedikamenten, sondern werden auch durch endogene Stoffwechselprozesse oder durch Kontakt mit verschiedenen umweltbedingten Toxinen induziert (Sedgwick *et al.*, 2007). Um den negativen Folgen dieser Alkylierungsschäden entgegenzuwirken, besitzen Zellen das Reparaturprotein MGMT, das in einer Einschrittreaktion die Methylgruppe aus der O⁶-Position des betroffenen Guanins entfernen kann.

Es wurde schon früh über die Möglichkeit diskutiert, ob andere Reparatursysteme bei der Reparatur oder der Prozessierung von O⁶-MeG-Schäden mitwirken (Goldmacher *et al.*, 1986). Eines der am besten untersuchten Reparatursysteme ist die postreplikativ eingreifende *Mismatch*-Reparatur (MMR), welche hauptsächlich für die zytotoxischen Wirkungen von O⁶-MeG verantwortlich gemacht wird (Liu und Gerson, 2006). Neue Studien zeigen, dass die MMR auch für genotoxische Schäden nach einer Alkylierungsbehandlung verantwortlich sein kann. Durch den *futile repair cycle* entstehen persistierende Einzelstrangbrüche, welche zur Apoptose oder zu Doppelstrangbrüchen führen können. Letztere leiten wiederum eine DSB-Reparatur ein, die je nach Zellzyklus-Phase entweder durch HR oder NHEJ erfolgt (Quiros *et al.* 2010). Die möglichen Einflüsse weiterer Reparatursysteme wurden bisher kaum untersucht. Dass es in Säugerzellen mindestens einen weiteren Reparaturmechanismus für O⁶-MeG-Schäden geben müsse, konnte in dieser Arbeit aus der kontinuierlichen Abnahme der Schadensmenge in MGMT-blockierten, nicht proliferierenden humanen Lymphozyten geschlossen werden (Abb. 15). Die Zunahme der reparaturinduzierten Strangbrüche in diesen Zellen ließ weiterhin vermuten, dass eine Form der Exzisionsreparatur an der Schadensbeseitigung beteiligt ist (Abb. 16). Aus diesen Gründen sollte gezeigt werden, dass noch weitere

Mechanismen den Alkylierungsschaden erkennen und dessen Reparatur einleiten können.

5.2. Einfluss der NER auf die Reparatur von O⁶-MeG

Die Hauptaufgabe des NER-Mechanismus ist die Beseitigung von DNA-Addukten, die eine erhebliche Störung der normalen Helixstruktur bewirken, wie die von UV-Strahlung verursachten 6-4PP oder Cyclopyrimidin-Dimeren (CPDs). Daneben werden aber auch relativ kleine Addukte erkannt und repariert, die nur zu vergleichsweise geringen Strukturveränderungen führen (Sancar *et al.*, 2004). Die ersten Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der NER an der Reparatur von O⁶-AlkG wurden in prokaryontischen Systemen gefunden. Samson *et al.* (1988) zeigten, dass dieses Alkyladdukt in *E. coli* nicht nur von dem bakteriellen MGMT-homolog Ada, sondern parallel dazu auch durch das bakterielle NER-System Uvr erkannt und repariert wird.

Eine Kooperation von MGMT und NER bei der O⁶-MeG-Reparatur in humanen und murinen Zellsystemen wurde von Bronstein *et al.* (1992) vermutet. Publikationen aus den frühen 80er Jahren zeigten schon, dass die NER bei der Reparatur von O⁶-MeG mitwirken könnte, und dass sie anders als die normale UV-induzierte NER verläuft (Sklar und Strauss, 1981). Die Studie von Bronstein *et al.* (1992) zeigte, dass ein Fehlen des XPA-Proteins humane Fibroblasten erheblich gegenüber den zytotoxischen Wirkungen von Ethylnitrosoharnstoff (ENU) sensitiviert. Die hier erhobenen Daten an *in vivo* und *ex vivo* mit MNU exponierten Lymphozyten der Maus führen zu einem anderen Ergebnis (Abb. 17 und 18). Primärzellen ohne funktionelles XPA-Protein zeigten auch bei steigender Alkylierungsdosis und MGMT-Inhibition keinen deutlichen Sensitivitätsunterschied zu den entsprechenden Wildtyp-Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Versuche mit ENU-Exposition an XPA-defizienten Mäusen durchgeführt. Auch hier war keine signifikante Erhöhung der Sensitivität gegenüber den Wildtyp-Zellen zu beobachten. Der Grund für diese Diskrepanz könnte darin liegen, dass in der Arbeit von Bronstein *et al.* individuell etablierte Zelllinien miteinander verglichen wurden, die, unabhängig vom jeweiligen XPA-Status, möglicherweise grundsätzlich unterschiedlich auf Alkylierungsschäden reagieren. Außerdem ist unklar, ob die von Bronstein *et al.* beschriebene Sensitivität der verwendeten Zelllinien wirklich auf die O⁶-MeG-Schäden zurückzuführen ist. In den hier durchgeführten Versuchen konnten alle XPA-defizienten Zellen O⁶-MeG

Diskussion

reparieren, wenn auch mit verlangsamter Kinetik. Weiter berichten Bronstein *et al.*, dass eine Kooperation von MGMT und NER eine Voraussetzung für die Reparatur von O⁶-Alkylguanin in der DNA ist (Bronstein *et al.*, 1992a; Bronstein *et al.*, 1992b).

Dies wurde jedoch durch die hier gezeigten Versuche widerlegt, bei denen NER-defiziente Zellen nur mit MNU behandelt wurden. Hier konnte die intakte MGMT O⁶-MeG-Schäden ohne größere Schwierigkeiten reparieren (Abb. 17 und 21). Ein Eingreifen der NER in die Reparatur von Alkylierungsschäden wurde weiterhin anhand von Mutationsstudien in verschiedenen Organismen untersucht (*Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *E. coli*; Tosal *et al.*, 2001; Engelberg *et al.*, 1999 und 2000). In den Studien wurde gezeigt, dass ein Funktionsverlust von XPA in MGMT-defizienten Zellen zu erhöhten Mutationsraten nach einer Alkylierungsbehandlung führte. Zusammenfassend ist anzunehmen, dass das NER-System und die MGMT parallel und unabhängig voneinander in der Lage sind, O⁶-Alkylierungsschäden in der DNA zu erkennen und zu beheben.

Basierend auf den Analysen zur Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden wurde angenommen, dass das XPA-Protein eine wesentliche Komponente des Verifizierungsschrittes der NER ist. Da einerseits XPA aber für den hier beschriebenen neuen Reparaturweg für O⁶-MeG offenbar nicht essenziell ist (Abb. 17, 18), andererseits die Funktionsfähigkeit des „klassischen“ NER-Weges aber nicht für die Exzision der UV-Alkyladdukte ausreicht (Abb. 20), muss es noch weitere notwendige Faktoren für deren effiziente Reparatur geben, die beispielsweise in den untersuchten Kernextrakten von HeLa-Zellen fehlen. Gestützt wird diese Annahme auch durch eine Untersuchung von Kusumoto *et al.* (2001), die ebenfalls zeigte, dass bei HeLa-Zellen keine XPC-abhängige DNA-Inzision nach Behandlung mit O⁶-methylierenden Substanzen stattfindet. Ein endgültiger Nachweis auf zellulärer Ebene könnte durch die Aufnahme von Reparaturkinetiken für O⁶-MeG mit der in dieser Arbeit verwendeten antikörperbasierten Methode erbracht werden. Weiterhin könnte die Erstellung von Expressionsprofilen aller DNA-Reparaturgene bei der verwendeten HeLa-Linie dazu beitragen, die fehlenden Faktoren zu identifizieren.

Die meisten der bisherigen Studien befassten sich mit der Auswirkung einer DNA-Alkylierung bei XPA-Defizienz. Dies mag daran liegen, dass das XPA-Protein, zumindest bei UV-Schäden, sowohl für deren Genspezifische Reparatur (TCR) als auch für ihre gesamtgenomische Reparatur (GGR) notwendig ist. Da die hier erhobenen Ergebnisse jedoch zeigen, dass XPA in den analysierten Zellsystemen

Diskussion

nur eine untergeordnete Rolle bei der MGMT-unabhängigen Reparatur von O⁶-MeG spielt, war es von besonderem Interesse, welche Komponenten an der Erkennung des Schadens in der DNA beteiligt sind. Die biochemischen Analysen zeigten, dass der Proteinkomplex XPC-HR23B spezifisch an DNA-Moleküle mit einem O⁶-MeG- oder einem O⁶-EtG-Addukt bindet und essenziell für die Einleitung der Exzisionsreparatur ist (Abb 19 und 20). Dieser Befund widerspricht der Vermutung von Engelbergs *et al.* (2000), dass nur größere Alkylierungsschäden, wie z.B. O⁶-EthylG oder die von BCNU induzierten Chloroethyladdukte am Guanin eine MGMT-unabhängige Reparatur über Inzisionen hervorrufen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Ausfall des XPC-Proteins in humanen und murinen Zellen zu persistierenden O⁶-MeG-Schäden und zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber alkylierenden Reagenzien führt, wenn die endogene MGMT-Aktivität inhibiert ist. Dies gilt sowohl bei *in vitro*- als auch bei *in vivo*-Exposition. Die Vermutung, dass das NER-System keine einfachen Basenmethylierungen erkennt, ist nicht unberechtigt, da ausgeschlossen werden muss, dass nicht auch die epigenetisch wichtigen 5-Methyl-Cytosin-Markierungen entfernt werden und somit das Expressionsprofil überlebenswichtiger Gene verändert wird. Überraschenderweise zeigen neuere Studien, dass das NER-System eventuell aktiv an der Demethylierung von 5-Methyl-Cytosin beteiligt ist (Schmitz *et al.*, 2009). Hier wird die Rolle des *DNA damage response*-Proteins Gadd45 α für die Einleitung der „Reparatur-Inzision“ an solchen Modifikationen und für die epigenetischen Regulationen diskutiert. Da eine Beteiligung von Gadd45 α an initialen Schritten des NER-Mechanismus postuliert wurde, gilt dies möglicherweise auch für die Reparatur von O⁶-MeG.

Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von XPC an der Reparatur von O⁶-MeG gaben die Ergebnisse von Uehara *et al.* (2009). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass XPC-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren in verschiedenen Geweben erhöhte Spontanraten von G:C zu A:T Mutationen aufwiesen. Dies könnte, zumindest partiell, auf nicht-reparierte O⁶-MeG-Addukte zurückzuführen sein, die ständig in niedriger Frequenz aus dem endogenen C1-Stoffwechsel der Zelle entstehen. Jedoch führen nicht nur O⁶-MeG-Schäden, sondern vermutlich auch oxidative Veränderungen an Guaninen zu diesen Punktmutationen, sodass die erhöhte Mutationsrate wahrscheinlich durch verschiedene Einflüsse hervorgerufen wurde. Ein weiteres Argument für die Beteiligung von XPC an der Reparatur von O⁶-MeG-Addukten liefert eine Studie von Sugawara *et al.* (2001), in der gezeigt

wurde, dass das humane XPC-Protein an sehr unterschiedlich modifizierte DNA-Regionen binden kann. Diese Modifikationen reichen von kleinen *loop*-Strukturen bis hin zu großen sogenannten *bulky lesions* und schließen somit nicht aus, dass ein O⁶-MeG-Schaden erkannt werden könnte.

5.3. Der Fanconi Anämie-Signalweg und die MGMT-unabhängige Reparatur

Der FA-Signalweg wird in Zellen häufig als Antwort auf DNA-Schäden oder auf einen hierdurch bedingten Replikationsarrest aktiviert. Auch zytotoxische Sekundärschäden, die beispielsweise durch Alkylanzien wie TMZ oder BCNU verursacht werden, führen zu einem Replikationsarrest und zu der Aktivierung des FA-Signalweges (Chen *et al.*, 2007). Bisher wurde diesem Signalweg eine vorwiegend indirekte Wirkung nach einer DNA-Schädigung zugeschrieben. Neuere Untersuchungen weisen jedoch auch auf eine direkte Beteiligung an der Reparatur von DNA-Interstrangverknüpfungen hin (Andreassen *et al.*, 2009). Es wird angenommen, dass bestimmte FA-Proteine dabei an der Erkennung, Stabilisierung und Reparatur von blockierten DNA-Replikationsgabeln beteiligt sind (Kennedy und D'Andrea, 2005; Kachnic *et al.*, 2009).

Der FA-Signalweg umfasst eine Interaktion von bisher 13 bekannten FA-Proteinen, von denen mindestens neun den sogenannten Kernkomplex bilden. Zusammen mit den vier restlichen FA-Proteinen bildet dieser Kernkomplex einen Ubiquitin-Ligase-Komplex, dessen Untereinheit FancL für die Monoubiquitinierung der Proteine FancD2 und FancI (ID-Komplex) verantwortlich ist. Nach der Aktivierung relokalisiert der ID-Komplex zu nukleären Foci und interagiert vermutlich mit verschiedenen Reparatur- und Kinase-Proteinen (Wang *et al.*, 2004). Die große Anzahl an verschiedenen Proteinen, die in diesem Netzwerk zusammenarbeiten, lässt die Vermutung zu, dass einige der FA-Proteine unabhängig vom FA-Netzwerk mit anderen Reparatur-Proteinen interagieren. Dazu liegen bereits einige Beobachtungen vor (Moldovan und D'Andrea, 2009).

Zellen mit einer Defizienz für eines der FA-Proteine haben eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem DNA-crosslinker MMC (Moldovan und D'Andrea, 2009). Demgegenüber zeigen FancA-defiziente Mäuse keine ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin oder Oxaliplatin, die ebenfalls DNA-Strangverknüpfungen induzieren (Kachnic *et al.*, 2010). Zellen aus FancC- oder FancD2-defizienten

Diskussion

Mäusen zeigen jedoch nach einer Cisplatin- oder Oxaliplatin-Behandlung eine verminderte Koloniebildungsrate im Vergleich zu den vergleichbaren Wildtyp-Zellen (Kachnic *et al.*, 2010). Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit teilweise bestätigt werden. So zeigten primäre humane Fibroblasten und murine Knochenmarkszellen mit FancD2-Verlust nach einer Behandlung mit Cisplatin jeweils eine deutlich erhöhte Chemosensitivität gegenüber den entsprechenden profizienten Vergleichszellen (Abb. 39). Ob dieser Beobachtung eine veränderte Reparatur der Cisplatin-induzierten DNA-Addukte zugrunde liegt, muss noch genauer untersucht werden. Vorversuche zeigten, dass bei Lymphozyten aus FancD2^(-/-) Mäusen die Entfernung der Pt-GG-Intrastrangaddukte wesentlich verlangsamt abläuft. Der Befund deutet auf eine direkte Beteiligung von FancD2 an der NER-vermittelten Reparatur Cisplatin-induzierter DNA-Addukte hin.

Für DNA-Methylierungsschäden nach einer MNU-Behandlung konnte ein ähnlicher Effekt wie nach einer Cisplatin-Behandlung festgestellt werden. Die Abwesenheit von funktionellem FancD2 führte in FancD2-defizienten Zellen zu einer erhöhten Aktivierung der Caspasen 3 und 7, die besonders ausgeprägt war, wenn die endogene MGMT-Aktivität blockiert war (Abb. 29). Chen und D'Andrea (2007) hatten in einer zellkulturbasierten Studie mit verschiedenen humanen Glioblastomlinien ebenfalls über eine besonders hohe Sensitivität nach DNA-Methylierung berichtet, wenn sowohl FancD2 als auch MGMT inaktiv sind. Diese Beobachtung und der Verdacht, dass das FancD2-Protein insbesondere an der Prozessierung von O⁶-AlkG beteiligt ist, konnten in dieser Arbeit an verschiedenen FancD2-defizienten und rekonstituierten Zelllinien sowie an humanen und murinen Primärzellen bestätigt werden. Um einen direkten Beweis dafür zu erbringen, dass die erhöhte Sensitivität von FancD2-defizienten Zellen durch unreparierte O⁶-MeG-Addukte verursacht wird, wurden in dieser Arbeit Adduktkinetiken bei Zellen mit Funktionsverlust von unterschiedlichen FA-Proteinen gemessen. Die Analyse zeigte, dass Zellen denen FA-Proteine aus dem Kernkomplex fehlen auch ohne eine aktive MGMT die O⁶-MeG-Schäden in der DNA reparieren können. Lediglich Zellen, denen die Komponente FancD2 fehlte, zeigten nach MGMT-Inaktivierung keinerlei Reparatur dieser Addukte (Abb. 28). Ähnliche Ergebnisse konnten bei *in vivo* Experimenten mit FancA-, FancC- und FancD2-Knockout-Mäusen in verschiedenen Geweben und Zelltypen erzielt werden (Abb. 31 u. 32). Daraus lässt sich erstens schließen, dass der O⁶-MeG-Schaden die Hauptursache für die Sensitivität gegenüber MNU oder TMZ ist, und

Diskussion

zweitens, dass ein funktionelles FancD2-Protein für die Reparatur dieses Schadens notwendig ist.

Eine weitere Bedingung für die Reparatur von O⁶-MeG scheint die Ubiquitinierung des FancD2-Proteins zu sein. Anhand einer Zelllinie, in der die Ubiquitinierungsstelle des FancD2-Proteins mutiert wurde, konnte gezeigt werden, dass ohne eine Ubiquitinierung des Proteins keine Reparaturaktivität für O⁶-MeG vorhanden war (Abb. 30). Interessant ist die Tatsache, dass im Allgemeinen angenommen wird, dass FancD2 durch den aktiven Kernkomplex ubiquitiniert wird. Demgegenüber konnte hier gezeigt werden, dass die getesteten Kernkomplexproteine FancA, FancC und FancG nicht für die Reparatur von O⁶-MeG notwendig und vermutlich inaktiv sind. Es ist deshalb möglich, dass FancD2 entweder von der Komponente FancL alleine oder in Verbindung mit weiteren Proteinen die eine E3-Ubiquitinligase- (E3-ubLig-) Aktivität besitzen aktiviert wird. Eine Interaktion von FancD2 mit anderen Proteinen wie BRCA1 oder PCNA, die ebenfalls eine E3-ubLig-Aktivität besitzen, wurde schon beschrieben (Howlett *et al.*, 2009). Eine Beteiligung von FancD2 an der Reparatur von O⁶-MeG ohne vorangehende Ubiquitinierung kann aber nicht ausgeschlossen werden, da ein direkter Nachweis dieser Modifikation nach MNU-Exposition von Zellen bisher nicht erbracht wurde.

FancD2 kann nicht nur ubiquitiniert, sondern durch die Kinasen ATR und ATM auch phosphoryliert werden. Es wurde bisher jedoch nicht genauer untersucht, welche Auswirkungen eine Phosphorylierung von FancD2 auf die Signal- und Reparaturwege hat. Ein Modell für die Bedeutung der FancD2-Phosphorylierung wurde von Lyakhovich und Surrallés (2007) erstellt. In diesem Modell wurde gezeigt, dass durch MMC und γ -Strahlen hervorgerufene DNA-Schäden die ATR-Kinase aktivieren, und die ATR-Kinase ihrerseits FancD2 und das Histonprotein H2Ax phosphoryliert. Die Phosphorylierung durch die ATR-Kinase diene in diesem Modell als Signalverstärker, was zu einer schnelleren Monoubiquitinierung durch den Kernkomplex führte. Es wurde auch vorgeschlagen, dass FancD2 dadurch effizienter an das Chromatin und an die Schadensstelle bindet, die durch γ H2Ax markiert ist. Dieses Modell konnte durch viele weitere Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden (Andreassen *et al.*, 2004; Smogorzewska *et al.*, 2007; Bogliolo *et al.*, 2007; Bhagwat *et al.*, 2009). Die Phosphorylierung von FancD2 durch die ATM-Kinase spielt hingegen keine Rolle für die Aktivierung des FA-Netzwerkes (Nakanishi *et al.*, 2002). Bisher ist noch unklar, welchen Einfluss die durch die ATM-Kinase

verursachten Phosphorylierungen auf die DNA-Reparatur oder auf die Zellzyklus-Checkpunkte haben. Es wird jedoch vermutet, dass dieser Signalweg nach Schädigung durch ionisierende Strahlung eingeschlagen wird (Taniguchi *et al.*, 2002).

Ob der FA-Signalweg nun durch direkte molekulare Interaktion oder indirekt an der Beseitigung von O⁶-MeG-Schäden beteiligt ist, steht noch offen. Bei der Reparatur von DNA-Interstrang-Verknüpfungen (*interstrand-crosslinks*, ICL) wird eine direkte Beteiligung der FA-Proteine durch den HR-Signalweg angenommen (Moldovan und D'Andrea, 2009). Dagegen weisen andere Studien darauf hin, dass der FA-Weg nach DNA-Schädigung vor allem für die Aktivierung von Zellzyklus-Checkpunkten zuständig ist und damit eher eine indirekte Rolle bei der Reparatur spielt (Knipscheer *et al.*, 2009). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass der FA-Signalweg sowohl direkt als auch indirekt die Reparatur von ICLs moduliert (Grompe und D'Andrea, 2001). Dies könnte auch auf die O⁶-MeG-Reparatur zutreffen. Da ein Fehlen von FancD2 zu persistierenden Alkylschäden führt, müsste dieses Protein direkt an der Reparatur beteiligt sein. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass FancD2 auch bei der Rekrutierung von verschiedenen weiteren Reparaturkomponenten mitwirkt. Dies könnte über eine mögliche Phosphorylierung oder Ubiquitinierung von FancD2 nach DNA-Schäden geschehen und so zu Interaktionen mit diversen DNA-Reparaturproteinen, wie z.B. BRCA1, BRCA2, RAD51 oder PCNA führen, um eine präzise DNA-Reparatur zu ermöglichen.

5.4. Interaktion verschiedener Reparatursysteme bei der O⁶-Alkylguanin-Reparatur

5.4.1. Nukleotid Exzisions Reparatur und Fanconi Anämie-Signalweg

Eine direkte Interaktion des NER- und des FA-Signalweges konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise auf eine Kooperation einzelner Komponenten aus beiden Mechanismen, z.B. bei der Reparatur von Cisplatin verursachten Intra- und Inter-Strangverknüpfungen in der DNA (McVey, 2010). In diesem Zusammenhang wird häufig die Endonuklease XPF-ERCC1 erwähnt. Es wird vermutet, dass dieser Komplex von FancD2 an die Schadensstelle rekrutiert wird und den ersten Reparaturschnitt bei DNA-Quervernetzungen macht. Die weiteren Reparaturschritte werden dann durch HR und Translasiations-Polymerasen durchgeführt (Zhang *et al.*, 2009; Bhagwat *et al.*,

Diskussion

2009). An diesem Modell wird zurzeit intensiv geforscht. Unter anderem gilt es zu klären, ob XPF-ERCC1 schon vor oder erst während der ersten Schritte des FA-Reparatursignalsweges aktiv ist. Neben FancD2 ist PCNA ein weiteres Protein, das eine Brücke zwischen den beiden Mechanismen bilden könnte. Es ist bekannt das PCNA und XPG im NER-System zusammenwirken (Gary *et al.*, 1997). Offen bleibt jedoch, ob eine Interaktion beider Proteine schon vor der DNA-Inzision notwendig ist oder erst danach, um z.B. die DNA-Resynthese einzuleiten (Mocquet *et al.*, 2008; Staresincic *et al.*, 2009). Howlett *et al.* (2009) zeigten, dass PCNA bei einer DNA-Schädigung auch mit FancD2 interagiert, ohne dass bisher geklärt werden konnte, welche genaue Rolle diese Interaktion bei dem Reparaturprozess spielt. Eine mögliche direkte Interaktion von XPG und FancD2 ist folglich jedoch nicht auszuschließen.

Für die Reparatur von Monoalkyladdukten ist eine direkte molekulare Wechselwirkung von Komponenten der beiden Reparaturwege NER und FA bisher nicht beschrieben. Die *in situ*-Fluoreszenzfärbung für FancD2 in XPC-profizienten und -defizienten Zellen (Abb. 40) lässt vermuten, dass beide Proteine im gleichen Mechanismus arbeiten. XPC könnte hier ein Erkennungssignal für die Bindung von FancD2 im O⁶-MeG-Reparaturkomplex sein, da nach Behandlung mit MNU und BG nur in XPC-profizienten aber nicht in XPC-defizienten Zellen FancD2-Foci detektiert werden konnten. Es wurde auch gezeigt, dass ohne funktionierendes XPC bei verschiedenen Addukten keine NER stattfindet, was vermuten lässt, dass ein weiterer auf Inzisionen basierender Mechanismus an der Reparatur von O⁶-MeG beteiligt ist, welcher womöglich auf Komponenten des FA-Weges zurückzuführen sein könnte (Batty und Wood, 2000; Sugasawa, 2008). Die Notwendigkeit weiterer NER Komponenten, wie die der Endonukleasen XPG oder XPF, ist für die O⁶-MeG-Reparatur bisher nicht untersucht worden. Andererseits wurde bereits gezeigt, dass der Komplex XPF-ERCC1 unabhängig vom restlichen NER-System eine Inzisionsreaktion katalysieren kann (Bhagwat *et al.*, 2009). Es bleibt also zu klären, ob XPF-ERCC1 die Einschnittreaktion auf der 5'-Seite von O⁶-MeG einleiten kann. Über das Protein PCNA könnte eine Verbindung von FancD2 und XPG bestehen, welches für die 3'-seitigen Einschnitte in der DNA notwendig sein könnte. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um zu untersuchen, ob sich NER- und FA-Komponenten gemeinsam an den O⁶-MeG-Schäden befinden.

5.4.2. Alkyltransferase-like Proteins

Allgemein wird angenommen, dass eine Alkylierung am O⁶-Atom des Guanins keine großen sterischen Störungen in der DNA-Helix verursacht und somit kein Substrat für die NER ist. Daher ist es nicht auszuschließen, dass weitere Faktoren, welche hier nicht untersucht wurden, den Schaden eventuell für das NER-System erkennbar machen. Für diese Hypothese sprechen mehrere Publikationen. Tubbs *et al.* (2007) beschrieben, dass das MGMT-Protein bei dem Demethylierungsprozess die alkylierte Base aus der Helix leicht herausdreht und dabei längere Zeit an der Schadensstelle verweilt. Ein solcher Protein-DNA-Komplex wäre theoretisch ein Ansatzpunkt für die NER. Dies konnte jedoch bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass eine O⁶-AlkG-Reparatur auch in MGMT-inhibierten Zellen erfolgt, kann dieser Erkennungsmechanismus ausgeschlossen werden.

Neuere Arbeiten im prokaryontischen System zeigen eine weitere Möglichkeit, wie O⁶-MeG in der DNA für die NER sichtbar gemacht werden könnte (Tubbs *et al.*, 2009). Neben dem MGMT-Protein Ada gibt es in *Escherichia coli* eine Gruppe von *alkyltransferase like proteins* (ATLs). ATLs binden ebenfalls an DNA-Alkylierungsschäden, können diese jedoch nicht reparieren, da sie in ihrem aktiven Zentrum keine Cystein-Gruppen besitzen, die als Methylgruppenakzeptor dienen könnten (Margison *et al.*, 2003). Allerdings veranlassen die gebundenen ATLs offenbar eine Veränderung der Helixstruktur und initiieren dadurch die Rekrutierung des NER-Systems an die Schadensstellen (Abb. 42). Es wird vermutet, dass es sich bei den ATLs, die deutliche Sequenzhomologien zu dem *ada*-Gen aufweisen, um noch nicht beschriebene Komponenten des bakteriellen NER-Systems handelt. Nach Beobachtungen von Tubbs *et al.* (2009) und Pearson *et al.* (2005) kann die Reparaturaktivität des Ada-Proteins durch die Anwesenheit von hohen ATL-Konzentrationen blockiert werden, da diese sich an den O⁶-MeG-Schäden festsetzen und somit deren Reparatur verhindern.

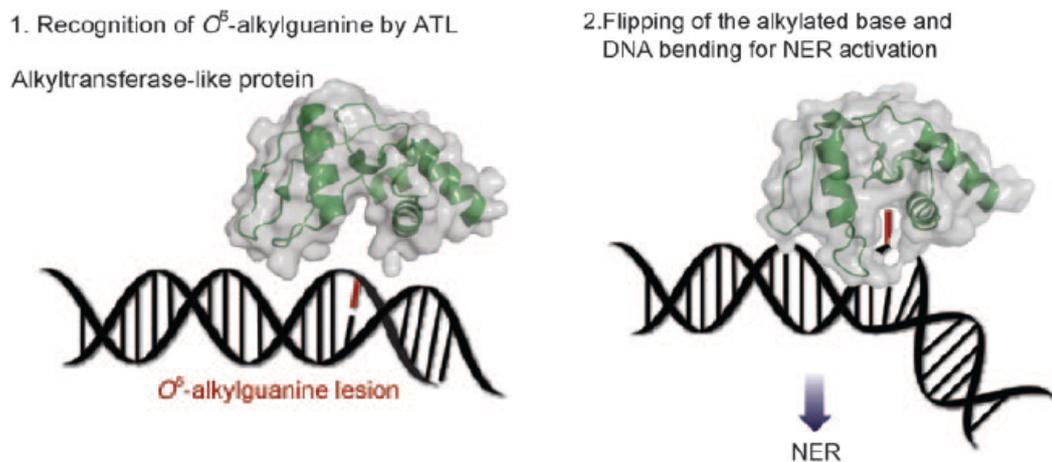


Abb. 42. ATLS erkennen O⁶-MeG-Addukte. 1. ATL Proteine erkennen den Alkylschaden und binden irreversibel an die DNA. 2. Dieser DNA-Protein-Komplex aktiviert die NER, da durch ihn eine starke Biegung der DNA vorliegt und die beschädigte Base herausgestülpt ist. (Abbildung aus Reißner *et al.*, 2009)

Zusammenfassend zeigt der von ATLS eingeleitete Prozess eine interessante Möglichkeit, wie in Prokaryonten die ansonsten für das zelluläre Reparatursystem unkenntlichen Schäden erkennbar gemacht werden können. Allerdings konnten in Säugerzellen trotz intensiver Suche bisher keine Homologe der bakteriellen ATLS gefunden werden. Deshalb ist ein Mitwirken der ATLS bei der Rekrutierung des NER-Systems an O⁶-MeG-Addukte eher unwahrscheinlich. Auch zeigen die biochemischen Bindungsstudien in dieser Arbeit, dass der XPC-Rad23B-Komplex durchaus in der Lage ist, Alkylierungsprodukte am O⁶-Atom von Guanin in synthetischen Oligonukleotiden und in großen DNA-Molekülen selbständig zu erkennen. Möglicherweise wird diese Bindung durch sogenannte *damaged DNA binding* (DDB)-Proteine unterstützt, die ihrerseits in der Lage sind, XPC zu ubiquitinieren. Die DDBs gehören zu den ersten Komponenten, die an kleinere, nicht-strukturändernde DNA-Schäden binden und daraufhin XPC rekrutieren (Nospickel, 2009). Andere Untersuchungen zeigten jedoch, dass DDB-Proteine für die Einleitung der NER nicht unbedingt notwendig sind und XPC auch alleine dazu in der Lage ist (Hoogstraten, 2008). Dies müsste für O⁶-MeG-Addukte anhand von DDB-defizienten Modellen überprüft werden. Ein weitere Studie zeigte interessanterweise, dass in Glioma-Zelllinien nach einer Behandlung mit ACNU, einem Zytostatikum das Chloroethyl-Addukte am Guanin-O⁶ induziert, die Expression von XPC und von DDB2 hochreguliert wurde (Batista *et al.*, 2007). Möglicherweise wird also die Rolle,

Diskussion

die die ATL-Proteine bei Bakterien spielen, bei Säugerzellen von den DDB-Proteinen übernommen. Dies muss in weiteren Versuchen noch bestätigt werden.

5.4.3. Weitere Kandidaten-Proteine für den alternativen O⁶-MeG-Reparaturweg

Die Liste der Proteine, die neben den hier identifizierten Komponenten eventuell an der Reparatur von O⁶-MeG beteiligt sein könnten, ist lang. Neben den bekannten Reparaturmechanismen gehören sehr wahrscheinlich die anderen Hauptkomponenten des NER-Signalweges und möglicherweise auch einzelne Proteine, die mit den Reparaturprozessen MMR und HR assoziiert sind, dazu. Eine Interaktion von MMR und Fanconi-Proteinen wurde für die Komponenten MutL α und FancJ sowie für MLH1 und FancD2 gezeigt (Peng *et al.*, 2007; van de Vrugt *et al.*, 2009).

Die Mitglieder der so genannten *high mobility group* (HMG)-Superfamilie stellen in diesem Zusammenhang interessante Kandidaten dar. Diese Proteine sind u.a. an der Modulation der Chromatinstruktur beteiligt und vermitteln die Zugänglichkeit für Endonukleasen (Ueda und Yoshida, 2001; Stros, 2010). Insbesondere für das HMGB1-Protein konnte eine Interaktion mit XPA, XPC und verschiedenen anderen Reparatur-Proteinen gezeigt werden (Adair *et al.*, 2007). Die HMG-Proteine sind aber vermutlich auch an der Erkennung verschiedener anderer Modifikationen beteiligt. Für das HMGA1-Protein wurde z.B. bereits gezeigt, dass es die von Cisplatin hervorgerufenen Addukte erkennt und an diese bindet (Travers, 2000). Die HMG-Proteine sorgen weiterhin auch für eine Inhibition der NER bei UV-induzierten CPDs in AT-reichen DNA-Sequenzen (Reeves und Adair, 2005). Außerdem könnten die HMG-Proteine bei Zellen mit DNA-Schädigung auch an der Entscheidung beteiligt sein, ob eine Zelle einen Schaden repariert und wohlmöglich eine Mutation davonträgt, oder ob das Risiko der genomischen Instabilität zu groß ist und die Apoptose eingeleitet wird (Reeves und Adair, 2005). Ein Beispiel für solch einen Mechanismus konnte nach einer Behandlung von Zellen mit der methylierenden Substanz N-Methyl-N-Nitronitrosoguanidin (MNNG) gezeigt werden. Hier wurde nachgewiesen, dass nach der Behandlung eine Translokation von HMGB1 vom Zellkern ins Zytosol erfolgte und so die Apoptose eingeleitet wurde (Zong *et al.*, 2007). Da diese Beobachtung jedoch in Zusammenhang mit einer Modulation der BER gemacht wurde (PARP-Inhibition), könnten hier eher die N7-Methyladdukte am Guanin für den parallel dazu beobachteten Zelltod verantwortlich sein. Die HMG-

Diskussion

Proteine sind also möglicherweise an der Erkennung und Prozessierung von Alkylschäden beteiligt. Eine Rolle für die Reparatur von O⁶-MeG-Schäden muss jedoch noch nachgewiesen werden.

Ein weiteres DNA-Reparaturprotein welches bei der Reparatur von O⁶-MeG mitwirken könnte, ist das *growth arrest and DNA-damage-inducible Protein 45 alpha* (Gadd45α). Dieses Protein ist dafür bekannt, dass es bei verschiedenen DNA-Stresssignalwegen mitwirkt. Es ist aber auch aktiv an der DNA-Reparatur beteiligt, u.a. in dem GGR-Weg der NER (Smith und Seo, 2002; Liebermann und Hoffman, 2008; Cretu *et al.*, 2009). Diese Interaktion von Gadd45α in der NER wird vermutlich durch PCNA vermittelt, welches wiederum auch mit XPC und FancD2 interagieren kann. Um den Kreis der Interaktionen der DNA-Reparaturwege zu schließen, kann Gadd45α außerdem noch von BRCA1 reguliert werden, welches zu dem FA/BRCA-Netzwerk gehört (Jin *et al.*, 2000).

Interessanterweise gibt es neue Hinweise darauf, dass Gadd45α auch an der Demethylierung von epigenetischen Markierungen beteiligt ist (Barreto *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009). Dieser Mechanismus scheint über Reparaturinzisionen zu funktionieren. Im Zebrafisch-Modell konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus über eine Kupplung von Deaminasen, Glycosylasen und Gadd45β verläuft (Rai *et al.*, 2008). Dagegen zeigte die Studie von Barreto *et al.*, dass die Endonuklease XPG benötigt wird, um eine Gadd45α-induzierte aktive DNA-Demethylierung durchzuführen. Das methylierte Cytosin wird anscheinend durch die NER ausgeschnitten und durch ein unmethyliertes Cytosin ersetzt.

Auch die Demethylierung von O⁶-MeG ohne MGMT könnte über die Aktion von Gadd45α verlaufen. Um dies zu zeigen, wurden Gadd45α-Knockout-Mäuse *ex vivo* oder *in vivo* mit MNU behandelt. Die Ergebnisse zeigten jedoch *in vitro* keinen Unterschied zwischen der O⁶-MeG-Reparatur bei aktiver und bei inhibierter MGMT. Auch konnte keinerlei Steigerung der Sensitivität gegenüber alkylierenden Substanzen festgestellt werden. Gadd45α scheint somit nicht an der Reparatur der O⁶-MeG-Addukte beteiligt zu sein. Auffällig ist jedoch, dass Gadd45α^(-/-) Zellen auch in Abwesenheit der MGMT einen höheren Adduktgehalt besitzen als alle anderen getesteten Zellen. Diese Addukte werden jedoch effizient repariert, sodass nach 24 h kein Unterschied mehr zu Wildtyp-Zellen zu erkennen ist. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die O⁶-MeG-Schäden durch das Fehlen von Gadd45α erst später entdeckt werden und somit die Zeitspanne bis zum Einsetzen

der Reparatur länger ist als ohne Gadd45 α . Da aber alle anderen Komponenten der MGMT-unabhängigen Reparatur vorhanden sind, kann der Schaden letztendlich komplett beseitigt werden. Eine Beteiligung des Gadd45 α -Proteins an der Reparatur von O⁶-MeG-Schäden ist also nicht auszuschließen, es scheint aber in dieser Hinsicht kein essenzielles Protein zu sein.

Zusätzlich zu den oben erwähnten Proteinen sind sicherlich viele weitere Proteine an möglichen Reparaturwegen für O⁶-MeG-Schäden beteiligt. Es ist jedoch so gut wie unmöglich, alle involvierten Proteine zu erwähnen, da neue Studien vermehrt zeigen, dass in dem DNA-Reparatur-Netzwerk die meisten Mechanismen miteinander vernetzt sind und bei Schäden kooperieren und/oder interagieren.

5.5. Entwurf eines Modells der alternativen O⁶-MeG-Reparatur: Fazit und Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Säugerzellen eine Reparatur des zytotoxischen und mutagenen O⁶-MeG-Schadens auch in Abwesenheit einer aktiven MGMT erfolgen kann. Die Entfernung aus dem beschädigten Strang wird höchstwahrscheinlich über das NER-Protein XPC eingeleitet und erfolgt als Exzision eines Oligonukleotids von ca. 30 Basen. Weitere Faktoren, wie DDB1, DDB2 oder Gadd45 α können die Effizienz dieser Reparatur möglicherweise steigern, indem sie den Schaden für XPC kenntlich machen. XPA spielt in diesem Mechanismus, zumindest auf der gesamtgenomischen Ebene, nur eine untergeordnete Rolle, stattdessen scheinen weitere NER-unabhängige Proteine essenziell beteiligt zu sein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das FancD2-Protein aus dem FA-Netzwerk benötigt wird, um O⁶-MeG-Schäden effektiv aus der DNA zu entfernen. Vermutlich wird das FancD2-Protein durch die ATR- und/oder die ATM-Kinase aktiviert und akkumuliert XPC-abhängig an der Schadensstelle. Dort könnte FancD2 mit PCNA und Gadd45 α interagieren, und so möglicherweise die Endonukleasen XPF-ERCC1 und XPG rekrutieren, die ein Oligonukleotid mit dem DNA-Addukt ausschneiden. Ob die Lücke in der DNA im Anschluss durch HR oder durch die DNA-Polymerasen δ und ϵ des NER-Systems verschlossen wird, steht noch offen. Abbildung 43 zeigt ein Schema des hier neu beschriebenen Reparaturweges für O⁶-MeG mit den bisher identifizierten oder vermuteten Komponenten im Vergleich zu den weiteren bekannten Mechanismen MGMT, MMR und HR.

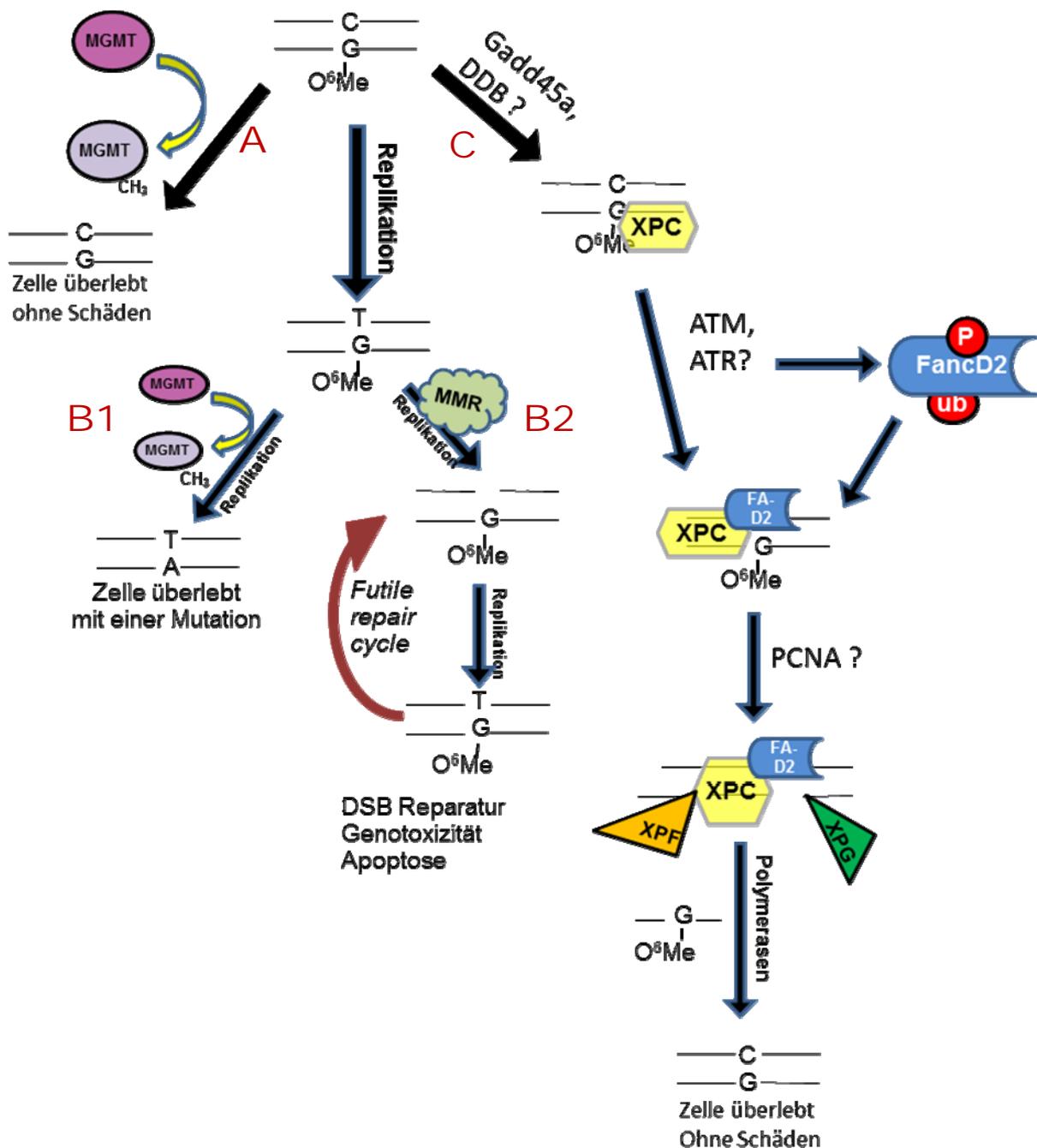


Abb. 43. Zusammenfassung der möglichen O⁶-MeG-Reparaturwege. Nach einer Alkylierung entstehen zu einem kleinen Teil O⁶-MeG-Addukte in der DNA (oben). Dieser Schaden kann entweder durch eine direkte Demethylierung durch MGMT (A) behoben werden, oder durchläuft die Replikation (B) und wird so zu einer O⁶-MeG:T Fehlpaarung. Durch eine weitere Replikation kann sich nun eine G:C zu A:T Mutation verfestigen (B1). Die O⁶-MeG:T Fehlpaarung kann aber auch von der MMR erkannt werden (B2), welche das falsche T herauschneidet und die methylierte Base in der DNA lässt. Gleichzeitig wird von der Polymerase wieder eine falsche Base gegenüber dem O⁶-MeG eingebaut und es beginnt ein sich wiederholender Reparaturzyklus, welcher zu Strangbrüchen und Apoptose führen kann. Ein weiterer präreplikativ eingreifender O⁶-MeG-Reparaturweg (C) behebt den Schaden durch eine Interaktion von NER, FA-Proteinen und weiteren Reparaturproteinen. Der Schaden wird entweder von XPC selbst erkannt oder durch weitere Proteine für XPC kenntlich gemacht. Ein Signal von ATR oder ATM aktiviert FancD2, welches zu dem Schaden wandert und, möglicherweise zusammen mit PCNA, die beiden Endonukleasen XPF/ERCC1 und XPG rekrutiert. Diese schneiden nun den Schaden aus und eine Polymerase sorgt für eine DNA-Neusynthese an dieser Stelle. (Modifiziert nach Kaina *et al.*,2007)

Diskussion

Trotz der hier gewonnenen wichtigen Grunderkenntnisse zur Existenz und Funktion eines neuen DNA-Reparaturweges bleiben viele Fragen zum molekularen Mechanismus, zur Regulation in bestimmten Zellsystemen und zur biologischen Relevanz des Reparaturweges weiterhin offen. Ob FancD2 und XPC kooperativ im gleichen Reparaturkomplex agieren, könnte beispielsweise durch Analysen an primären Zellen von Mäusen mit dem entsprechenden Doppel-Knockout untersucht werden. Es ist aber fraglich, ob eine FancD2^(-/-)/XPC^(-/-) Einkreuzung überlebensfähig ist, denn schon eine FancD2-Defizienz führt zu einer verstärkten embryonalen Letalität.

Die hier durchgeführte Charakterisierung des alternativen Reparaturweges basiert in vielen Experimenten auf der pharmakologischen Inhibition der zellulären MGMT-Aktivität durch BG. Um diese Befunde abzusichern wäre es sinnvoll, einzelne Reparaturkinetiken an primären Zellen von Mäusen mit einer genetischen MGMT-Defizienz zu wiederholen. Weitere Studien, um den Einfluss der Reparaturproteine Gadd45 α , p53, PCNA und HMGB1 genauer zu untersuchen, sollten ebenfalls durchgeführt werden.

Weiterhin gilt es noch zu klären, welches Molekül die Einschnitte in diesem Mechanismus durchführt. Die wahrscheinlichste Möglichkeit hierfür sind die beiden aus der NER bekannten Endonukleasen XPF und XPG, wobei andere Nukleasen jedoch nicht ausgeschlossen werden können. Diese Untersuchungen würden alle dazu beitragen, den Mechanismus der MGMT-unabhängigen O⁶-MeG-Reparatur besser zu verstehen.

Zuletzt bleibt noch die Frage nach der biologischen Bedeutung dieses alternativen Signalweges. Neben dem Konzept „Mehr Sicherheit durch Redundanz“ könnte dieser Reparaturtyp insbesondere in Zellen oder Geweben mit intrinsisch niedriger MGMT-Expression, wie dem hämatopoetischen System oder dem zentralen Nervensystem, eine eigenständige Schutzfunktion vor Alkylierungsschäden darstellen. Im Mausmodell ließe sich die Frage nach der Schutzwirkung vor den genotoxischen Effekten alkylierender Substanzen beispielsweise mit Hilfe von *in vivo*-Mutagenese Tests in definierten Zelltypen durchführen. Dies könnte durch Einkreuzen in den sogenannten MutaMaus-Stamm erfolgen. Mit diesem Testsystem kann man nicht nur die induzierten Mutationsraten bestimmen, sondern auch das spezifische Mutationsspektrum. Bei einer eigenständigen Schutzfunktion des alternativen Weges würde man in den Reparatur-defizienten Mäusen nicht nur eine insgesamt erhöhte

Diskussion

Mutationsfrequenz erwarten, sondern auch eine deutliche Verschiebung zu den O⁶-MeG-induzierten G:C zu A:T Mutationen. Eine weitere Möglichkeit für die biologische Bedeutung des neuen Signalweges zielt auf dessen Substrat-Spezifität ab und somit auf die Frage, ob dies, wie die MGMT, ein hochspezifischer Mechanismus zur Reparatur von O⁶-MeG ist oder ob über ihn auch andere DNA-Läsionen eliminiert werden können. Dies würde die biologische Bedeutung des neu beschriebenen Reparaturweges in der DNA-Schadensantwort verstärken.

5. Zusammenfassung

O⁶-Methylguanin (O⁶-MeG) ist ein DNA-Schaden, der durch endogene und exogene alkylierende Substanzen oder tumortherapeutisch eingesetzte Verbindungen hervorgerufen wird und sowohl mutagen als auch zytotoxisch wirken kann. Biochemische Analysen dieser Arbeitsgruppe ließen vermuten, dass es in Säugerzellen zusätzlich zu der direkten Demethylierung durch das spezifische Reparatur-Protein MGMT einen weiteren Mechanismus zur Entfernung von O⁶-MeG gibt, bei dem offenbar Komponenten aus bereits bekannten Reparaturwegen verwendet werden. Der neue Mechanismus entfernt durch duale Einschnitte das alkylierte Guanin und weist auf eine Beteiligung des Nukleotid Exzisions Reparatur (NER)-Systems hin. In dieser Dissertation wurde der neu beschriebene Reparatur-Mechanismus weiter charakterisiert, einzelne essenzielle Komponenten identifiziert und die zellulären Konsequenzen bei einem Ausfall dieses Systems untersucht.

Anhand von Bindungsstudien mit rekombinanten Reparaturproteinen konnte gezeigt werden, dass das NER-Protein XPC an O⁶-MeG-Läsionen in der DNA bindet und für die Einleitung des Exzisionsvorganges essenziell ist. Dies wurde durch Reparaturkinetiken für O⁶-MeG an XPC-defizienten humanen Fibroblasten und an rekonstituierten Varianten und an primären hämatopoetischer Zellen aus XPC^(-/-)-Mäusen nach einer *ex vivo*-Exposition mit Alkylanzien belegt. Ein funktioneller Ausfall führte zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber alkylierenden Substanzen. Die Ergebnisse zeigen, dass die NER nicht alleine für die O⁶-MeG-Reparatur zuständig ist. Daher wurde die Beteiligung des Fanconi-Anämie(FA)-Systems analysiert, dem bisher nur eine Rolle bei der Prozessierung von DNA-Doppelstrang-Brüchen zugeschrieben wurde. Von den humanen Zelllinien mit Funktionsverlustmutationen für jeweils eines der FA-Proteine zeigten nur die Zellen mit Defekt im FancD2-Gen einen vollständigen Ausfall des alternativen Reparaturweges.

Die essenzielle Rolle von FancD2 in diesem Prozess konnte durch einen Vergleich von primären Zellen und Gewebe aus FancD2^(+/+) und FancD2^(-/-) Mäusen bestätigt werden. Eine Interaktion von XPC und FancD2 konnte bisher nicht gezeigt werden, jedoch bilden XPC-defiziente Zellen nach einer Alkylierungsbehandlung keine FancD2-Foci an DNA-Schäden, wohingegen rekonstituierte Zellen dies können. Somit bleibt noch unklar, wie und in welcher Weise FancD2 und XPC nach einem Alkylierungsschaden miteinander reagieren oder koordiniert werden, um den DNA-Schaden zu beheben. Weitere Forschungen sind nötig um die Interaktion der beiden Proteine genauer zu definieren und um weitere Komponenten des alternativen O⁶-MeG-Reparatur-Mechanismuses zu beschreiben.

Referenzen

- Adair, J.E. *et al.* High-mobility group A1 proteins inhibit expression of nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A. *Cancer Res* 67, 6044-6052 (2007).
- Andreassen, P.R., D'Andrea, A.D. & Taniguchi, T. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev* 18, 1958-1963 (2004).
- Andreassen, P.R. & Ren, K. Fanconi anemia proteins, DNA interstrand crosslink repair pathways, and cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 9, 101-117 (2009).
- Barreto, G. *et al.* Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445, 671-675 (2007).
- Bartsch, H. & Spiegelhalder, B. Environmental exposure to N-nitroso compounds (NNOC) and precursors: an overview. *Eur J Cancer Prev* 5 Suppl 1, 11-17 (1996).
- Batista, L.F., Roos, W.P., Christmann, M., Menck, C.F. & Kaina, B. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 67, 11886-11895 (2007).
- Batty, D.P. & Wood, R.D. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* 241, 193-204 (2000).
- Beranek, D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231, 11-30 (1990).
- Bhagwat, N. *et al.* XPF-ERCC1 participates in the Fanconi anemia pathway of cross-link repair. *Mol Cell Biol* 29, 6427-6437 (2009).
- Bogliolo, M. *et al.* Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *Embo J* 26, 1340-1351 (2007).
- Boysen, G., Pachkowski, B.F., Nakamura, J. & Swenberg, J.A. The formation and biological significance of N7-guanine adducts. *Mutat Res* 678, 76-94 (2009).
- 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 Res* 51, 5188-5197 (1991).
- Bronstein, S.M., Skopek, T.R. & Swenberg, J.A. Efficient repair of O6-ethylguanine, but not O4-ethylthymine or O2-ethylthymine, is dependent upon O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and nucleotide excision repair activities in human cells. *Cancer Res* 52, 2008-2011 (1992).
- Buschfort-Papewalis, C., Moritz, T., Liedert, B. & Thomale, J. Down-regulation of DNA repair in human CD34(+) progenitor cells corresponds to increased drug sensitivity and apoptotic response. *Blood* 100, 845-853 (2002).
- Casorelli, I., Russo, M.T. & Bignami, M. Role of mismatch repair and MGMT in response to anticancer therapies. *Anticancer Agents Med Chem* 8, 368-380 (2008).
- Chen, C.C., Taniguchi, T. & D'Andrea, A. The Fanconi anemia (FA) pathway confers glioma resistance to DNA alkylating agents. *J Mol Med* 85, 497-509 (2007).
- Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P. & Kaina, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193, 3-34 (2003).
- Cortellino, S. *et al.* The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15071-15076 (2003).

Referenzen

- Costa, R.M., Chigancas, V., Galhardo Rda, S., Carvalho, H. & Menck, C.F. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85, 1083-1099 (2003).
- Cretu, A., Sha, X., Tront, J., Hoffman, B. & Liebermann, D.A. Stress sensor Gadd45 genes as therapeutic targets in cancer. *Cancer Ther* 7, 268-276 (2009).
- D'Andrea, A.D. & Grompe, M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 3, 23-34 (2003).
- Dipple, A. DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 16, 437-441 (1995).
- Dolan, M.E., Moschel, R.C. & Pegg, A.E. Depletion of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O6-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5368-5372 (1990).
- Dorsman, J.C. *et al.* Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cell Oncol* 29, 211-218 (2007).
- Drablos, F. *et al.* Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* 3, 1389-1407 (2004).
- Emmert, S., Kobayashi, N., Khan, S.G. & Kraemer, K.H. The xeroderma pigmentosum group C gene leads to selective repair of cyclobutane pyrimidine dimers rather than 6-4 photoproducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2151-2156 (2000).
- Engelbergs, J., Thomale, J., Galhoff, A. & Rajewsky, M.F. Fast repair of O6-ethylguanine, but not O6-methylguanine, in transcribed genes prevents mutation of H-ras in rat mammary tumorigenesis induced by ethylnitrosourea in place of methylnitrosourea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1635-1640 (1998).
- Engelbergs, J. Zelltyp-spezifische Kanzerogenese durch N-Nitroso Verbindungen: Bedeutung der genspezifischen DNA-Reparatur für das Mutations- und Krebsrisiko. 1998 Essen, Dissertation
- Engelbergs, J., Thomale, J. & Rajewsky, M.F. Role of DNA repair in carcinogen-induced ras mutation. *Mutat Res* 450, 139-153 (2000).
- Fanconi, G. Familiäre, infantile, perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jb Kinderheilk.*, 257 (1927).
- Fang, Q., Kanugula, S., Tubbs, J.L., Tainer, J.A. & Pegg, A.E. Repair of O4-alkylthymine by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferases. *J Biol Chem* 285, 8185-8195.
- Fink, D. *et al.* The effect of different chemotherapeutic agents on the enrichment of DNA mismatch repair-deficient tumour cells. *Br J Cancer* 77, 703-708 (1998).
- Fink, D., Aebi, S. & Howell, S.B. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* 4, 1-6 (1998).
- Fischer, J.L. *et al.* The Xpc gene markedly affects cell survival in mouse bone marrow. *Mutagenesis* 24, 309-316 (2009).
- Fisher, L.A., Bessho, M. & Bessho, T. Processing of a psoralen DNA interstrand cross-link by XPF-ERCC1 complex in vitro. *J Biol Chem* 283, 1275-1281 (2008).
- Friedberg, E., Walker, GC, Siede, W, Wood, RD, Schultz, RA, Ellenberger, T DNA Repair And Mutagenesis, Edn. 2nd. (ASM Press, Washington, D.C.; 2005).

Referenzen

- Gary, R., Ludwig, D.L., Cornelius, H.L., MacInnes, M.A. & Park, M.S. The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol Chem* 272, 24522-24529 (1997).
- Gerson, S.L., Trey J.E., Miller B., Berger N.A. Comparisson of O6-alkylguanine alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis* 7, 745-749 (1986)
- Gerson, S.L. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol* 20, 2388-2399 (2002).
- Glassner, B.J. *et al.* DNA repair methyltransferase (Mgmt) knockout mice are sensitive to the lethal effects of chemotherapeutic alkylating agents. *Mutagenesis* 14, 339-347 (1999).
- Goldmacher, V.S., Cuzick, R.A., Jr. & Thilly, W.G. Isolation and partial characterization of human cell mutants differing in sensitivity to killing and mutation by methylnitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Biol Chem* 261, 12462-12471 (1986).
- Grompe, M. & D'Andrea, A. Fanconi anemia and DNA repair. *Hum Mol Genet* 10, 2253-2259 (2001).
- Grompe, M. & van de Vrugt, H. The Fanconi family adds a fraternal twin. *Dev Cell* 12, 661-662 (2007).
- Haber, J.E. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* 16, 259-264 (2000).
- Hakem, R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *Embo J* 27, 589-605 (2008).
- Hanawalt, P.C. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21, 8949-8956 (2002).
- Hecht, S.S. & Hoffmann, D. N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev* 7, 165-166 (1998).
- Hecht, S.S. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat Res* 424, 127-142 (1999).
- Hoeijmakers, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374 (2001).
- Hoogstraten, D. *et al.* Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC. *J Cell Sci* 121, 2850-2859 (2008).
- Houghtaling, S. *et al.* Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Genes Dev* 17, 2021-2035 (2003).
- Howlett, N.G., Harney, J.A., Rego, M.A., Kolling, F.W.t. & Glover, T.W. Functional interaction between the Fanconi Anemia D2 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) via a conserved putative PCNA interaction motif. *J Biol Chem* 284, 28935-28942 (2009).
- Ishida, R. & Buchwald, M. Susceptibility of Fanconi's anemia lymphoblasts to DNA-cross-linking and alkylating agents. *Cancer Res* 42, 4000-4006 (1982).
- Jacquemont, C. & Taniguchi, T. The Fanconi anemia pathway and ubiquitin. *BMC Biochem* 8 Suppl 1, S10 (2007).
- Jakobs, P.M. *et al.* immortalization of four new Fanconi anemia fibroblast cell lines by an improved procedure. *Somat Cell Mol Genet* 22, 151-157 (1996).

Referenzen

- Jakszyn, P. & Gonzalez, C.A. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol* 12, 4296-4303 (2006).
- Jin, S. *et al.* BRCA1 activation of the GADD45 promoter. *Oncogene* 19, 4050-4057 (2000).
- 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 (Amst)* 6, 1079-1099 (2007).
- Karran, P. & Bignami, M. Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage. *Nucleic Acids Res* 20, 2933-2940 (1992).
- Kennedy, R.D. & D'Andrea, A.D. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev* 19, 2925-2940 (2005).
- Kim, S.T. & Sancar, A. Photorepair of nonadjacent pyrimidine dimers by DNA photolyase. *Photochem Photobiol* 61, 171-174 (1995).
- Knipscheer, P. *et al.* The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science* 326, 1698-1701 (2009).
- Kunz, C., Saito, Y. & Schar, P. DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme. *Cell Mol Life Sci* 66, 1021-1038 (2009).
- Kusumoto, R. *et al.* Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro. *Mutat Res* 485, 219-227 (2001).
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
- Lavin, M.F. *et al.* ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res* 569, 123-132 (2005).
- Liebermann, D.A. & Hoffman, B. Gadd45 in stress signaling. *J Mol Signal* 3, 15 (2008).
- Litman, R., Gupta, R., Brosh, R.M., Jr. & Cantor, S.B. BRCA-FA pathway as a target for anti-tumor drugs. *Anticancer Agents Med Chem* 8, 426-430 (2008).
- Liu, L. & Gerson, S.L. Targeted modulation of MGMT: clinical implications. *Clin Cancer Res* 12, 328-331 (2006).
- Loechler, E.L., Green, C.L. & Essigmann, J.M. In vivo mutagenesis by O6-methylguanine built into a unique site in a viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6271-6275 (1984).
- Lyakhovich, A. & Surralles, J. FANCD2 depletion sensitizes cancer cells repopulation ability in vitro. *Cancer Lett* 256, 186-195 (2007).
- Ma, D.K., Guo, J.U., Ming, G.L. & Song, H. DNA excision repair proteins and Gadd45 as molecular players for active DNA demethylation. *Cell Cycle* 8, 1526-1531 (2009).
- Margison, G.P. *et al.* Alkyltransferase-like proteins. *DNA Repair (Amst)* 6, 1222-1228 (2007).
- McNamee, J.P., McLean, J.R., Ferrarotto, C.L. & Bellier, P.V. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutat Res* 466, 63-69 (2000).
- McVey, M. Strategies for DNA interstrand crosslink repair: Insights from worms, flies, frogs, and slime molds. *Environ Mol Mutagen*.
- Meikrantz, W., Bergom, M.A., Memisoglu, A. & Samson, L. O6-alkylguanine DNA lesions trigger apoptosis. *Carcinogenesis* 19, 369-372 (1998).
- Moldovan, G.L. & D'Andrea, A.D. How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet* 43, 223-249 (2009).

Referenzen

- Nakanishi, K. *et al.* Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat Cell Biol* 4, 913-920 (2002).
- Naumann, S.C. *et al.* Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br J Cancer* 100, 322-333 (2009).
- Niedernhofer, L.J., Lalai, A.S. & Hoeijmakers, J.H. Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell* 123, 1191-1198 (2005).
- Nouspikel, T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 66, 994-1009 (2009).
- O'Connor, P.J. & Saffhill, R. The action of rat cytosol enzymes on some methylated nucleic acid components produced by the carcinogenic N-nitroso compounds. *Chem Biol Interact* 26, 91-102 (1979).
- Patel, K.J. & Joenje, H. Fanconi anemia and DNA replication repair. *DNA Repair (Amst)* 6, 885-890 (2007).
- Pearson, S.J., Ferguson, J., Santibanez-Koref, M. & Margison, G.P. Inhibition of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by an alkyltransferase-like protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 33, 3837-3844 (2005).
- Pegg, A.E. Methylation of the O6 position of guanine in DNA is the most likely initiating event in carcinogenesis by methylating agents. *Cancer Invest* 2, 223-231 (1984).
- Pegg, A.E. *et al.* Inactivation of human O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase by modified oligodeoxyribonucleotides containing O(6)-benzylguanine. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 958-965 (2001).
- Peng, M. *et al.* The FANCD2/MutL α interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells. *Embo J* 26, 3238-3249 (2007).
- Preston, B.D., Singer, B. & Loeb, L.A. Mutagenic potential of O4-methylthymine in vivo determined by an enzymatic approach to site-specific mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8501-8505 (1986).
- Quiros, S., Roos, W.P. & Kaina, B. Processing of O6-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. *Cell Cycle* 9, 168-178.
- Rai, K. *et al.* DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell* 135, 1201-1212 (2008).
- Rajesh, P., Rajesh, C., Wyatt, M.D. & Pittman, D.L. RAD51D protects against MLH1-dependent cytotoxic responses to O(6)-methylguanine. *DNA Repair (Amst)*.
- Reeves, R. & Adair, J.E. Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. *DNA Repair (Amst)* 4, 926-938 (2005).
- Reissner, T., Schorr, S. & Carell, T. Once overlooked, now made visible: ATL proteins and DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 7293-7295 (2009).
- Rich, T., Allen, R.L. & Wyllie, A.H. Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-783 (2000).
- Robertson, A.B., Klungland, A., Rognes, T. & Leiros, I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci* 66, 981-993 (2009).
- Roos, W., Baumgartner, M. & Kaina, B. Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* 23, 359-367 (2004).

Referenzen

- Rosa, D. The Life and Times of \$crooge McDuck, Gemstone,2005. 'The native warned Scrooge that a terrible fate awaited those who trespassed on the domain of the Man of gold, but nobody warned El Dorado that he should steer clear of the equally legendary duck with just oodles of gold fever.'
- Sakumi, K. *et al.* Methylnitrosourea-induced tumorigenesis in MGMT gene knockout mice. *Cancer Res* 57, 2415-2418 (1997).
- Samson, L., Thomale, J. & Rajewsky, M.F. Alternative pathways for the in vivo repair of O6-alkylguanine and O4-alkylthymine in Escherichia coli: the adaptive response and nucleotide excision repair. *Embo J* 7, 2261-2267 (1988).
- Samson, L., Han, S., Marquis, J.C. & Rasmussen, L.J. Mammalian DNA repair methyltransferases shield O4MeT from nucleotide excision repair. *Carcinogenesis* 18, 919-924 (1997).
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K. & Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 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, 162-165 (1995).
- Sarkaria, J.N. *et al.* Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. *Clin Cancer Res* 14, 2900-2908 (2008).
- Schmitz, K.M. *et al.* TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Mol Cell* 33, 344-353 (2009).
- Sedgwick, B., Bates, P.A., Paik, J., Jacobs, S.C. & Lindahl, T. Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair (Amst)* 6, 429-442 (2007).
- 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).
- Shrivastav, M., De Haro, L.P. & Nickoloff, J.A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 18, 134-147 (2008).
- Singh, N.P., Tice, R.R., Stephens, R.E. & Schneider, E.L. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat Res* 252, 289-296 (1991).
- Sklar, R. & Strauss, B. Removal of O6-methylguanine from DNA of normal and xeroderma pigmentosum-derived lymphoblastoid lines. *Nature* 289, 417-420 (1981).
- Smith, P.K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85 (1985).
- Smith, M.L. & Seo, Y.R. p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis* 17, 149-156 (2002).
- Smogorzewska, A. *et al.* Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* 129, 289-301 (2007).
- Sonoda, E., Hocegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y. & Takeda, S. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 5, 1021-1029 (2006).
- Staresinic, L. *et al.* Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *Embo J* 28, 1111-1120 (2009).

Referenzen

- Stros M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta*, 1799,101-13. (2010)
- Sugasawa, K. *et al.* A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev* 15, 507-521 (2001).
- Sugasawa, K. XPC: its product and biological roles. *Adv Exp Med Biol* 637, 47-56 (2008).
- Sugasawa, K., Akagi, J., Nishi, R., Iwai, S. & Hanaoka, F. Two-step recognition of DNA damage for mammalian nucleotide excision repair: Directional binding of the XPC complex and DNA strand scanning. *Mol Cell* 36, 642-653 (2009).
- Takimoto, R. *et al.* BRCA1 transcriptionally regulates damaged DNA binding protein (DDB2) in the DNA repair response following UV-irradiation. *Cancer Biol Ther* 1, 177-186 (2002).
- Taniguchi, T. *et al.* Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 109, 459-472 (2002).
- Thomale, J., Hochleitner, K. & Rajewsky, M.F. Differential formation and repair of the mutagenic DNA alkylation product O6-ethylguanine in transcribed and nontranscribed genes of the rat. *J Biol Chem* 269, 1681-1686 (1994).
- Tomkinson, A.E. *et al.* Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68, 151-164 (2001).
- Tornaletti, S. DNA repair in mammalian cells: Transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed. *Cell Mol Life Sci* 66, 1010-1020 (2009).
- Tosal, L., Comendador, M.A. & Sierra, L.M. In vivo repair of ENU-induced oxygen alkylation damage by the nucleotide excision repair mechanism in *Drosophila melanogaster*. *Mol Genet Genomics* 265, 327-335 (2001).
- Travers, A. Recognition of distorted DNA structures by HMG domains. *Curr Opin Struct Biol* 10, 102-109 (2000).
- Tubbs, J.L., Pegg, A.E. & Tainer, J.A. DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. *DNA Repair (Amst)* 6, 1100-1115 (2007).
- Tubbs, J.L. *et al.* Flipping of alkylated DNA damage bridges base and nucleotide excision repair. *Nature* 459, 808-813 (2009).
- Ueda T. & Yoshida M. HMGB proteins and transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1799,114-8. (2010)
- Uehara, Y. *et al.* XPC is involved in genome maintenance through multiple pathways in different tissues. *Mutat Res* 670, 24-31 (2009).
- van de Vrugt, H.J. *et al.* Embryonic lethality after combined inactivation of Fancd2 and Mlh1 in mice. *Cancer Res* 69, 9431-9438 (2009).
- Verbeek, B., Southgate, T.D., Gilham, D.E. & Margison, G.P. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *Br Med Bull* 85, 17-33 (2008).
- Vogel, E.W. *et al.* DNA damage and repair in mutagenesis and carcinogenesis: implications of structure-activity relationships for cross-species extrapolation. *Mutat Res* 353, 177-218 (1996).
- Wang, X., Andreassen, P.R. & D'Andrea, A.D. Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol* 24, 5850-5862 (2004).

Referenzen

- Wang, W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet* 8, 735-748 (2007).
- Weterings, E. & Chen, D.J. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* 18, 114-124 (2008).
- Whitney, M. *et al.* Microcell mediated chromosome transfer maps the Fanconi anaemia group D gene to chromosome 3p. *Nat Genet* 11, 341-343 (1995).
- Wyman, C. & Kanaar, R. Homologous recombination: down to the wire. *Curr Biol* 14, R629-631 (2004).
- Yoshizawa, K. *et al.* N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in mice is independent of the p53 gene. *Mol Vis* 15, 2919-2925 (2009).
- Zhan, Y. *et al.* TCR-mediated activation promotes GITR upregulation in T cells and resistance to glucocorticoid-induced death. *Int Immunol* 16, 1315-1321 (2004).
- Zhang, X.Y. *et al.* Xpf and not the Fanconi anaemia proteins or Rev3 accounts for the extreme resistance to cisplatin in *Dictyostelium discoideum*. *PLoS Genet* 5, e1000645 (2009).
- Zong, W.X., Ditsworth, D., Bauer, D.E., Wang, Z.Q. & Thompson, C.B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev* 18, 1272-1282 (2004).

Danksagungen

An erster Stelle möchte ich Dr. Jürgen Thomale für die Möglichkeit der Promotion im Rahmen des Graduiertenkollegs, die Überlassung des interessanten Themas und die stete Bereitschaft zu anregenden Diskussionen, Ideenaustauschen und beim Lösen schwieriger Aufgaben im Verlauf dieser Arbeit danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Arbeitsgruppe (ehemalige, wie derzeitige) für die Atmosphäre, die wir zusammen geschaffen haben, für die vielen Diskussionen und die drei Umzüge, die wir gemeistert haben. Ich danke Dr. Moran Jerabek-Willemsen für die unzähligen Besprechungen der Ergebnisse und das Einarbeiten in neue Methoden.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an all die Personen, die mir bei verschiedenen wissenschaftlichen Dingen geholfen haben. Dazu gehören u.a. die Sarkomarbeitsgruppe der inneren Klinik, alle Mitarbeiter des Tierstalles die mir bei meinem Mäuseexperimenten beiseite gestanden haben und viele Mitarbeiter des IFZ.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Beteiligten des Graduiertenkollegs. Prof. Dr. George Iliakis und Prof. Dr. Andrea Vorkamp danke ich für die Unterstützung im Rahmen des Promotionskomitees.

Mein besonderer Dank geht an Nicholas Wagner, der mich immer wieder ermutigt hat die Dissertation und das Studium durchzuhalten. Auch möchte ich mich hiermit für seine Geduld, Hilfe, Englischkorrekturen, Kochkünste und ganz besonders seiner Taschenrechnerfunktion (wo wäre ich ohne sie) bedanken.

Meinen Eltern gilt auch ein großes Dankeschön ohne Ihre großzügige Unterstützung wäre mein Studium so nicht möglich gewesen.

Als Letztes möchte ich mich bei meinem Klassenlehrer aus der Realschulzeit bedanken, ohne seine motivierenden Worte: „Aus euch wird höchstens mal eine Putzfrau“, hätte ich mich bestimmt nicht für ein Studium auf Englisch und eine Promotion entschieden.

Anhang

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Interaktion verschiedener Reparaturmechanismen für die Behebung von O6-Methylguanin-Schäden in der DNA“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Ann-Christin Nickel befürworte.

Essen, den _____

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

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Anhang

Lebenslauf

Ann-Christin Nickel
*09.06.1982 in Bonn

45357 Essen
Germany

Promotion

Dez.2006- Apr.2010

Graduiertenkolleg: "Transcription, Chromatin Structure and DNA Repair in Development and Differentiation",
Universität Duisburg-Essen,

Promotion im Fach Biologie am Institut für Zellbiologie,
Universität Duisburg-Essen.
Betreuer: PD Dr. Jürgen Thomale

Studium:

2004-2006

Fachhochschule Bonn-Rhein-Sieg, Rheinbach, Deutschland
Abschluss: Master of Science (M.Sc.) in Biology
with Biomedical Sciences

Titel der Studie: Signaling pathways involved in cholinergic
Gene expression

Betreuer: Prof Dr.. Edda Tobiasch (FH Bonn-Rhein-Sieg)
Dr. Brygida Berse (Boston University Medical School)

2001 – 2004

Fachhochschule Bonn-Rhein-Sieg, Rheinbach, Deutschland
Abschluss: Bachelor of Science (B.Sc.) in Applied Biology

Titel der Studie: Analysis of Co-transfected HeLa cells
with Connexin 34/36

Betreuer: Prof. Dr. Edda Tobiasch(FH Bonn-Rhein-Sieg)
Dr. Otto Traub (Universität Bonn)

Ausbildung:

1998– 2001

**Rheinische Akademie e.V.,
Höhere Berufsfachschule für Technik, Köln**

Abschluss: Staatlich geprüfte Biologisch-technische Assistentin
und Fachhochschulreife

Schulausbildung:

1992-1998

Erich-Kästner Realschule, Brühl

1988-1992

Kath. Grundschule Merten, Bornheim-Merten

Arbeitserfahrungen:

03/2006-09/2006 **Boston University Medical Center, USA**
Department of Pathology and Laboratory Medicine
Supervisor: Dr. Brygida Berse

03/2005 – 12/2005 **Center for Advanced European Studies and Research
(caesar), Bonn**
Dentale Zellbiologie (Dental Cell Biology)
Head: Dr. Michael Thie

Publikationen:

Madziar B, Shah S, Brock M, Burke R, Lopez-Coviella I, Nickel AC, Cakal EB, Blusztajn JK, Berse B. Nerve growth factor regulates the expression of the cholinergic locus and the high-affinity choline transporter via the Akt/PKB signaling pathway. *J Neurochem.* 2008 Dec;107(5):1284-93

Brock M, Nickel AC, Madziar B, Blusztajn JK, Berse B.; “ Differential regulation of the high affinity choline transporter and the cholinergic locus by cAMP signaling pathways.” *Brain Res.* 2007 May 11;1145:1-10. Epub 2007 Feb 2

(Ann-Christin Nickel)