

Aus dem Institut für Zellbiologie (IFZ)  
der Universität Duisburg-Essen  
Arbeitsgruppe DNA-Reparatur

# **Bildung, Reparatur und Signaltransduktion von DNA-Alkylierungsschäden in Zellen des murinen und humanen hämatopoetischen Systems**

## **Inaugural-Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Biologie und Geographie

an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

**Moran Jerabek-Willemsen**

aus Eilat, Israel

Essen, im Oktober 2009

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Thomale

2. Gutachter: Prof. Dr. George Iliakis

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hensel

Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 DNA-Reparatur.....	2
1.1.1    Einschritt-Reparatur: O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT).....	2
1.1.2    DNA-Mismatch-Reparatur (MMR).....	3
1.1.3    Basen-Exzisions-Reparatur (BER).....	4
1.1.4    Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER).....	5
1.1.5    Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen .....	5
1.2 Regulation der Zellzyklusprogression nach DNA-Schädigung.....	7
1.3 Apoptose nach DNA-Schädigung.....	9
1.4 DNA-Reparatur in hämatopoetischen Stammzellen .....	12
1.4.1    Definition und Charakterisierung von Stammzellen.....	12
1.4.2    Hämatopoetische Stammzellen .....	12
1.4.3    DNA-Schäden und DNA-Reparatur in hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen .....	13
1.5 MGMT-Gentherapie im hämatopoetischen System.....	14
1.6 Transgen-vermittelte Chemoresistenz: MGMT-Gentherapie zum Schutz der Hämatopoese .....	14
1.7 Akylierende Zytostatika: Anwendungsspektrum, Wirkungsweise und DNA-Reparatur .....	16
<b>2. Ziel der Arbeit</b> .....	<b>19</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.1 Material.....	20
3.1.1    Chemikalien und Reagenzien .....	20
3.1.2    Zellkulturmedien und Zusätze.....	21
3.1.3    Wachstumsfaktoren.....	21
3.1.4    Antikörper.....	22
3.1.5    Kommerzielle „Kits“ .....	23
3.1.6    Geräte und Zubehör .....	23
3.1.7    Primäre Zellen, Zelllinien und Tiere .....	24
3.1.8    Retro- und lentivirale Vektoren .....	25
3.1.8.1    Retrovirale Vektoren für die MGMT <sup>P140K</sup> Expression in L1210-Zellen .....	25
3.1.8.2    Retrovirale Vektoren zur MGMT <sup>P140K</sup> Expression im murinen Knochen- mark-, 32D- und 3T3 Zellen.....	25
3.1.8.3    Lentivirale shRNA-Vektoren zur Herunterregulation von ATM- und ATR-Kinasen .....	26

3.2	Methoden.....	27
3.2.1	Molekularbiologische und biochemische Methoden .....	27
3.2.1.1	Plasmidpräparation aus Bakterien .....	27
3.2.1.2	DNA Agarosegelelektrophorese .....	28
3.2.1.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA .....	28
3.2.1.4	Design der shRNAs Sequenzen .....	28
3.2.1.5	Hybridisierung der shRNA Oligonukleotide .....	29
3.2.1.6	Klonierung von shRNAs in den pSuper-Vektor .....	29
3.2.1.7	Transformation des pSuper-Plasmids in Bakterien .....	30
3.2.1.8	Klonierung der shRNA-Kassete des rekombinierte pSuper Plasmids in lentivirale Vektoren .....	30
3.2.1.9	Herstellung von Zelllysaten.....	31
3.2.1.10	Herstellung von unlöslichem bzw. löslichem Zelllysat .....	32
3.2.1.11	Photometrische Bestimmungen der Proteinkonzentration.....	33
3.2.1.12	Detektion von Proteinen mittels Immunoblot.....	33
3.2.1.12.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese(SDS-PAGE).....	33
3.2.1.12.2	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran .....	34
3.2.1.12.3	Antikörperinkubation und Detektion.....	34
3.2.1.12.4	„Strippen“ der Nitrozellulosemembran .....	35
3.2.1.13	Immunofluoreszenzfärbung .....	35
3.2.1.13.1	MGMT Immunofluoreszenzfärbung .....	35
3.2.1.13.2	Detektion von DNA-Reparatur-Foci mittels Immunofluoreszenz.....	36
3.2.1.13.3	Intrazelluläre Detektierung von phospho-CDC2-Protein .....	37
3.2.1.14	Immunzytologischer Assay (ICA) .....	37
3.2.1.15	Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay).....	38
3.2.1.16	Quantitative Bildanalyse und Statistik .....	39
3.2.1.17	Bestimmungen der Apoptose mittels Annexin-V-Assay .....	39
3.2.1.18	Zellzyklusanalyse mittels BrdU/7AAD-Färbung.....	40
3.2.2	Zellbiologische Methoden .....	41
3.2.2.1	Kultivierung von Zellen.....	41
3.2.2.2	Gewinnung von primären humanen hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen (CD34 <sup>+</sup> ) bzw. Lymphozyten (CD34 <sup>+</sup> ) .....	43
3.2.2.3	Stimulation humaner hämatopoetischer Primärzellen mit Zytokinen .....	43
3.2.2.4	<i>In vitro</i> Exposition gegenüber DNA-reaktiven Agenzien .....	44
3.2.2.5	Inhibition der MGMT-Aktivität durch O <sup>6</sup> -Benzylguanin (BG) .....	44
3.2.2.6	Produktionen hochtitriger Lentiviraler Virusüberstände für shRNA Experimente.....	45
3.2.2.7	Titration lentiviraler Überstände .....	46
3.2.2.8	Transduktion von Zelllinien mit Lentivirus-basierten shRNA Vektoren .....	46
3.2.2.9	Transduktion von primären humanen hämatopoetischen Zellen mit lentivirus-basierten shRNA-Vektoren (LeGO) .....	47

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
4.1 Transgene Expression von MGMT <sup>P140K</sup> durch reteroviralen Gentransfer in murine L1210 Zellen.....	48
4.2 Die Überexpression von MGMT in L1210-Zellen führt zu einer effizienten Chemoprotektion gegenüber O <sup>6</sup> -meG-DNA-Addukten .....	49
4.3 <i>In vivo</i> Chemoprotektion von murinen hämatopoetischen Stammzellen.....	51
4.3.1 Inverse Korrelation zwischen MGMT <sup>P140K</sup> -Expression und <i>in vivo</i> Chemoprotektion .....	51
4.3.2 Ein MGMT <sup>P140K</sup> -Gentransfer führt zur effizienten Entfernung von O <sup>6</sup> -meG aus der DNA primärer hämatopoetischer Vorläuferzellen .....	52
4.4 Negative biologische Konsequenzen durch sehr hohe MGMT <sup>P140K</sup> -Expression: Mechanistische Studien an 32D- und 293T- Zellen.....	55
4.4.1 Sehr hohe MGMT <sup>P140K</sup> -Expression in 32D Zellen führt zur Wachstumsstörung .....	55
4.4.2 Das MGMT <sup>P140K</sup> Protein zeigt eine Fehllokalisation in transduzierten 3T3- und 32D-Zellen.....	56
4.4.3 Verlangsamter Proteinabbau von MGMT <sup>P140K</sup> nach DNA-Alkylierung mit TMZ.....	60
4.5 „DNA damage response“ in humanen primären hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen (CD34 <sup>+</sup> ) auf O <sup>6</sup> -methylierenden-Agenzien .....	62
4.5.1 Isolierung und Kultivierung von primären hämatopoetischen Zellen: Unreife Stamm/Vorläuferzellen und ausdifferenzierte Lymphozyten .....	64
4.5.2 CD34 <sup>+</sup> Zellen zeigen wesentlich höhere Apoptoseraten 12-24 h nach BG-TMZ Behandlung als CD34 <sup>-</sup> Zellen.....	66
4.5.3 Schnelle Caspase-Aktivierung in hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen als initialer Schritt in Richtung Apoptose .....	69
4.5.4 Hämatopoetische Stamm/Vorläuferzellen zeigen keinen O <sup>6</sup> -meG-abhängigen Zellzyklusarrest .....	71
4.5.5 Die Zellzyklus-Regulatoren CDC2 und CDK2 werden nach BG-TMZ-Exposition nur in ausdifferenzierten hämatopoetischen Zellen phosphoryliert.....	73
4.5.6 Reduzierte Aktivierung des ATR-CHK1-Signalwegs in hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen nach BG-TMZ-Behandlung .....	75
4.5.7 Eine reduzierte Expression von ATR sensitiviert Jurkat-Zellen gegenüber O <sup>6</sup> -meG .....	77
4.5.8 Frühe Entstehung von γH2AX- und Rad51-Foci im Kern BG-TMZ-behandelter hämatopoetischer Stamm/Vorläuferzellen.....	80

<b>5. Diskussion .....</b>	<b>85</b>
5.1 Rolle der MGMT-abhängigen Reparatur von O <sup>6</sup> -meG-Addukten für die murine Hämatopoese nach DNA-Alkylierung .....	85
5.1.1 Gentransfer des mutierten MGMT <sup>P140K</sup> -Proteins in L1210-Zellen führt zu einer effizienten Reparatur von O <sup>6</sup> -meG-Addukten und vermittelt Chemoresistenz gegenüber Alkylanzien .....	86
5.1.2 MGMT <sup>P140K</sup> Gentransfer vermittelt eine effiziente Chemoprotektion von hämatopoetischen Stammzellen <i>in vivo</i> .....	86
5.1.2.1 Eine sehr hohe Expression von mutantem MGMT <sup>P140K</sup> -Protein führt zu einer reduzierten <i>in vivo</i> Chemoprotektion hämatopoetischer Stammzellen .....	87
5.1.2.2 Die Mutation P140K führt zu einer veränderten subzellulären Lokalisation des MGMT-Proteins .....	88
5.2 "DNA damage response" bei humanen hämatopoetischer Stamm/Vorläuferzellen auf persistierende O <sup>6</sup> -meG-Schäden .....	89
5.2.1 Proliferationsaktive hämatopoetische Stamm/Vorläuferzellen zeigen eine sehr frühe Apoptose-Induktion .....	90
5.2.2 Der ausbleibende Zellzyklusarrest in hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen nach BG-TMZ-Behandlung beruht wahrscheinlich auf einer mangelhaften Aktivierung des ATR-CHK1-„checkpoints“ .....	91
5.2.3 Die frühe Bildung von γH2AX- und Rad51- Foci durch O <sup>6</sup> -meG-Addukte im Kern von Stamm/Vorläuferzellen weist auf einen Zusammenbruch der Replikationsgabel und die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüche hin .....	94
5.2.4 Die spezifische Antwort unterschiedlich differenzierter proliferationsaktiven hämatopoetischer Zellen auf O <sup>6</sup> -meG wird wahrscheinlich durch den jeweiligen ATR-Gehalt determiniert .....	95
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>7. Abkürzungen.....</b>	<b>100</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>111</b>
9.1 Sequenzen der eingesetzten shRNAs .....	111
9.2 Danksagung .....	112

## 1. Einleitung

### **„DNA-damage response“- Ein molekulares Netzwerk zur Regulation von DNA-Reparatur, Zellzyklusprogression und Apoptose**

Der Erhalt der genomischen Integrität spielt für das Überleben jedes Organismus eine entscheidende Rolle. Ein Verlust der genomischen Stabilität führt bei Menschen häufig zu einem erhöhten Risiko von Erbkrankheiten, vorzeitiger Alterung oder zur Entstehung maligner Erkrankungen. Die Integrität des Genoms wird durch eine stringent abgestimmte Regulation verschiedener zellulärer Prozessen wie DNA-Replikation, DNA-Reparatur, Seneszenz und Apoptose gewährleistet. Diese Vorgänge werden durch so genannte „DNA damage checkpoints“ kontrolliert und koordiniert (Shiotani & Zou, 2009).

Die Aktivierung von „checkpoint“-Signalen führt oft zur Arretierung des Zellzyklus oder der replikativen DNA-Synthese. Dieser Vorgang erlaubt es der Zelle, Läsionen rechtzeitig aus der DNA zu entfernen und dadurch die Entstehung von Mutationen oder den Zusammenbruch der Replikationsgabel zu vermeiden. Letzteres kann zur Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen und damit zu chromosomalen Schäden oder zum Zelltod führen. Ferner stimulieren „checkpoint“-Signale in vielen Fällen die zelluläre DNA-Reparaturmaschinerie und tragen deshalb entscheidend dazu bei, die toxische Wirkung von DNA-Schaden zu minimieren (Li & Zou, 2005).

Die Aktivierung von „checkpoint“-Signalen nach DNA-Schädigung wird in Säugerzellen durch zwei Masterregulatoren, die Proteine „Ataxia telangiectasia mutated (ATM)“ und „ATM and Rad3-related (ATR)“, koordiniert (Bakkenist and Kastan 2003; Abraham 2001; Brown & Baltimore 2003). Beide Proteine gehören zu den „phospho-inositol-3-kinase like“-Proteinkinasen (PIKK). Während ATM vor allem durch DNA-Doppelstrangbrüche angesprochen wird, kann ATR durch ein wesentlich breiteres Spektrum an DNA-Läsionen aktiviert werden. Dazu gehören neben DNA-Doppelstrangsbrüche eine Vielzahl verschiedener DNA-Schäden, die häufig mit der DNA-Replikation interferieren (Cimprich & Cortez, 2008; s. Abb. 1). ATR spielt demnach eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität einer Zelle (Brown & Baltimore, 2003).

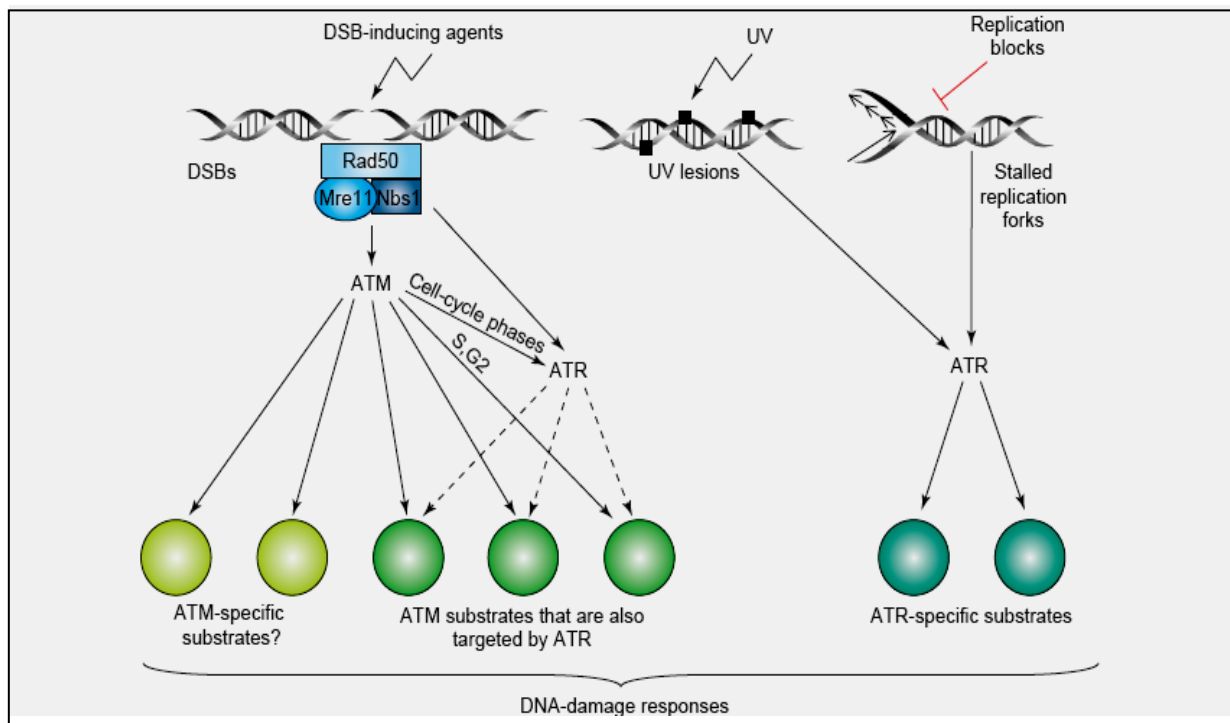


Abb. 1: Aktivierung von ATM und ATR Kinasen nach Beschädigung der DNA (Shilo, 2006).

## 1.1 DNA-Reparatur

Das zelluläre DNA-Reparatursystem ist ein komplexes Netzwerk, das aus verschiedenen Reaktionswegen besteht (Abb. 2). Es ist evolutionär hochkonserviert und findet sich in vergleichbarer Form sowohl bei Bakterien und eukaryontischen Einzellern wie auch in Säugerzellen. Seine wichtigste Aufgabe ist es, die genomische Stabilität einer Zelle aufrechtzuerhalten indem es endogen oder exogen induzierte Strukturveränderungen der DNA rasch und fehlerfrei eliminiert. Im Folgenden werden die wichtigsten derzeit bekannten Reparaturwege näher beschrieben.

### 1.1.1 Einschritt-Reparatur: O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT)

Die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) ist ein DNA-Reparatur-Protein, das kurzketzige Alkyladdukte (Methyl-, Ethyl.) am O<sup>6</sup>-Atom des Guanin in einer Einschritt-Reaktion fehlerfrei entfernen kann. Es nimmt damit eine Sonderstellung unter den bekannten DNA Reparaturmechanismen ein, die ansonsten nur als große Multiproteinkomplexe in vielen, komplex koordinierten Teilschritten wirksam werden. Diese Eigenschaft prädestiniert die MGMT-Funktion auch als geeignetes Ziel für eine Gentherapie, weil keine weiteren Komponenten benötigt werden (Gerson, 2004).



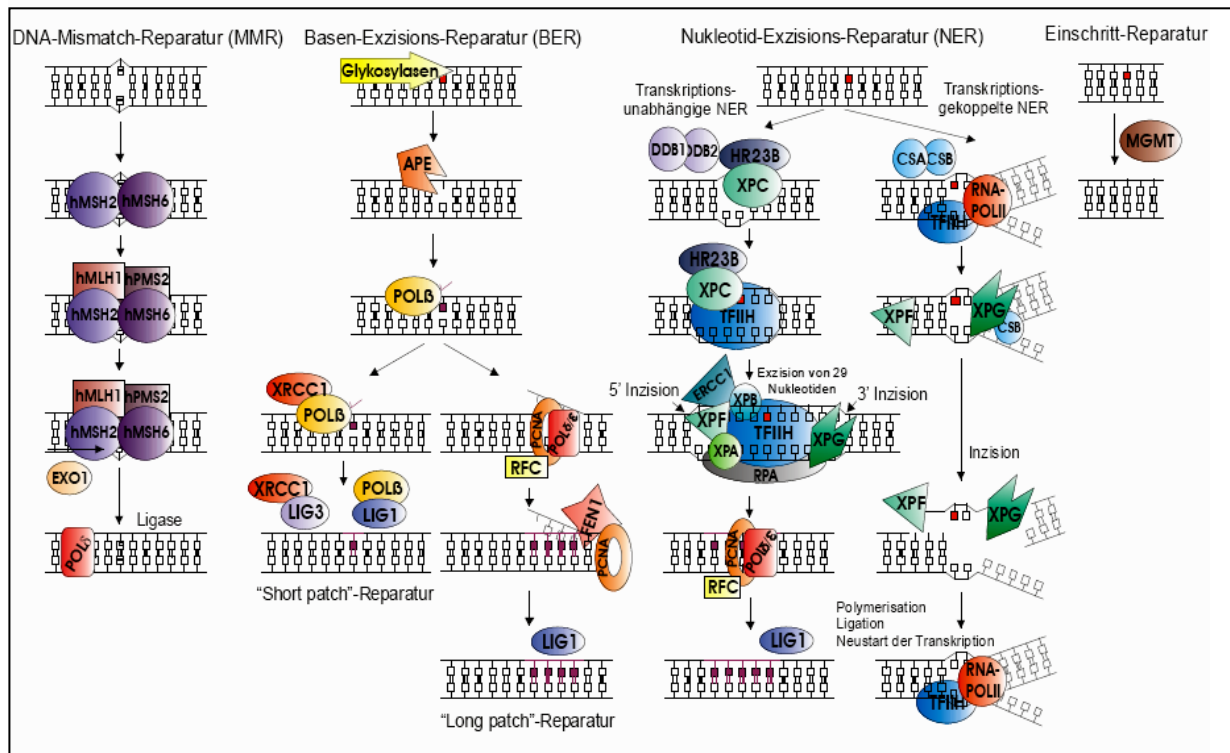
Struktur und Funktion des MGMT-Proteins sind hochkonserviert, es findet sich in allen daraufhin untersuchten Pro- und Eukaryoten (Gerson, 2004). In Säugern wird das Protein in fast allen Geweben exprimiert, Die Expressionsaktivität variiert jedoch sehr stark zwischen einzelnen Zell- und Gewebetypen. Leber, Lunge und Niere weisen in der Regel einen hohen mRNA- und Proteinspiegel auf, während beispielsweise Zellen des Gehirns, des Pankreas und des blutbildenden Systems eine vergleichsweise niedrige MGMT-Aktivitäten haben (Gerson, 2004).

Beim Reparaturvorgang transferiert das MGMT-Protein eine Alkyl-Gruppe von der O<sup>6</sup>-Position der Guanin-Base direkt auf das Cystein 145 in seinem aktiven Zentrum und wird dadurch irreversibel inaktiviert. Durch die erfolgte Strukturänderung wird MGMT von der reparierten DNA freigesetzt und anschließend durch Ubiquitinierung degradiert (Wibley, Pegg & Moody, 2000; Gerson, 2004).

### 1.1.2 DNA-Mismatch-Reparatur (MMR)

Die Hauptaufgabe des *Mismatch*-Reparatur (MMR) Systems, das bei Säugerzellen aus etwa 15 unterschiedlichen Proteinen besteht, ist die Erkennung und Entfernung von fehlgepaarten Nukleotiden in der DNA, die durch Replikationsfehler, Replikationsintermediaten oder durch Basenmutationen entstehen können (Jiricny *et al.*, 2000). Der MMR-Komplex besteht aus Mismatch-Erkennungsproteinen, einer Endonuklease, die hunderte benachbarte Nukleotide entfernt, und einer Polymerase, die die Einzelstrangregion wieder auffüllt (Gerson, 2004, s. Abb. 2).

MMR ist für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität von Säugerzellen von großer Bedeutung. Eine besondere Rolle spielt die MMR für den Erhalt und die Funktionsfähigkeit von Stammzellen (Tichy & Stambrook, 2008). MMR-defiziente Mäuse, denen das Erkennungsprotein Msh2 fehlt, entwickeln Lymphome und kolorektale Tumore nach Exposition zu DNA-schädigenden Agenzien (Friedberg & Meira, 2006). Die erhöhte Karzinogeneserate hängt sehr wahrscheinlich mit der verringerten genomischen Stabilität von MMR-defizienten Stammzellen zusammen. Parallel dazu zeigen embryonale Stammzellen (ES-Zellen) mit einem Msh2-Defekt eine wesentlich höhere spontane Mutationsfrequenz gegenüber MMR-profizienten Zellen (Tichy & Stambrook, 2008).



**Abb. 2: Überblick über die Prozessierung von DNA-Schaden über *Mismatch*-Reparatur, Basen-Exzisions-Reparatur, Nukleotid-Exzisions-Reparatur und Einschritt Reparatur (Modifiziert nach Buschfort-Papewalis et al., 2002; Christmann et al., 2003 und Sancar et al., 2004).**

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

Der BER-Reparaturweg entfernt kleinere Struktur-Anomalien aus der DNA, wie Methyladdukte an N-Atomen von Guanin und Adenin oder Oxidationsschäden, die in der Regel durch endogene Stoffwechselprodukte in der Zelle induziert werden (Abb. 2). Eingeleitet wird dieser Reparaturweg durch spezielle Glykosylasen. In Säugerzellen konnten bisher 11 verschiedene DNA-Glykosylasen charakterisiert werden, die zum Teil sehr spezifisch eine bestimmte Basenmodifikation erkennen und die betroffene Base durch Spaltung der N-glykosidischen Bindung aus dem DNA-Strang entfernen (Christmann et al., 2003). Bei dieser Prozessierung entsteht eine abasische Stelle in der DNA, die Ansatzpunkt für die Exzision des Zuckerrestes durch die AP-Endonuklease (APE) ist (Abb. 2). Weitere Reparaturenzyme entfernen dann entweder nur den betroffenen Zuckerrest („*short patch*“) oder ein längeres Einzelstrang-Fragment („*long patch*“) um die Läsionstelle herum (Sancar et al., 2004). Eine funktionelle Basen-Exzision scheint für Säugerzellen essentiell zu sein, da alle bisherigen Versuche homozygot BER-defiziente Mauslinien zu etablieren an der embryonalen Letalität gescheitert sind. Darüber hinaus ist, anders als für andere

Reparaturwege, kein humanes genetisches Syndrom bekannt, das auf dem Funktionsverlust eines BER-Gens beruht (Park & Gerson, 2005).

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

Das NER-System repariert in der Regel DNA-Läsionen, die eine größere Störung der Helixstruktur bewirken (Abb. 2). Dazu gehören beispielsweise durch UV-Strahlung induzierte Thymin-Dimere und 6-4-Photoprodukte, aber auch durch DNA-reaktive Substanzen gebildete Inter- und Intrastrang-Quervernetzungen, sowie großvolumige Addukte und Ringsysteme wie Benzpyren- oder Aflatoxin-Reste (Friedberg, 2001; Hoeijmakers *et al.*, 1990). NER umfasst einen Transkriptions-unabhängigen, global-genomischen (GG-NER) und einen Transkriptions-gekoppelten (TC-NER) Reparaturweg (Hanawalt *et al.*, 2003; Pastoriza-Gallego & Sarasin, 2003).

Während ein Heterodimer aus den Proteinen XPC und RAD23B die Läsionen über die GG-NER im gesamten Genom erkennt, werden Addukte im abgelesenen Strang transkribierter Gene durch die Blockierung der RNA-Polymerase II und die NER-Proteine CSA und CSB sehr effizient der TC-NER zugeführt (Hanawalt, 2002). Anschließend erfolgt die weitere Bearbeitung des Schadens über die Bindung eines Multi-Enzymkomplexes (TFIIH) an die DNA, die Exzision des beschädigten DNA-Einzelstrangfragments (Länge: 27-30 Nukleotide) durch die Endonukleasen ERCC1/XPF und XPG, und die Auffüllung der Reparaturlücke mit Hilfe von DNA-Polymerasen und Ligasen.

Eine defekte Nukleotid-Exzisions-Reparatur ist zwar nicht embryonal lethal, führt aber in der Regel zu schweren Erkrankungen, wie Xeroderma Pigmentosum oder Trichothiodystropie, häufig verbunden mit erhöhtem Tumorrisiko (Friedberg *et al.* 2006).

#### 1.1.5 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Doppelstrangbrüche (DSB) entstehen in der DNA vor Allem durch Einwirkung ionisierender Strahlung, aber auch als Folge von Radikalreaktionen oder bei der DNA-Replikation über Einzelstrangbrüche hinweg (Valerie & Povrik, 2003). Nicht-reparierte DSB besitzen ein hohes zytotoxisches und genotoxisches Potential (Dikomey *et al.*, 1998; Pfeiffer *et al.*, 2004). In Säugerzellen können solche DNA-Schäden über mindestens zwei unterschiedliche Wege repariert werden, durch „nicht-homologe *Endjoining*“ (NHEJ) oder durch homologe Rekombination (HR)

(Abb.3). In nicht-replizierenden Zellen werden DSB hauptsächlich durch NHEJ repariert (Haber, 2000). Dabei werden die beiden DNA-Enden durch das KU70/KU80-Heterodimer und die DNA-Proteinkinase (DNA-PK) zusammengehalten und durch die Enzyme XRCC4 und Ligase 4 verknüpft (Lieber *et al.*, 2004). Die NHEJ-Reparatur setzt keine Sequenzhomologie voraus und kann je nach der chemischen Struktur der Enden am DNA-Doppelstrangsbruch fehlerhaft sein.

Im Gegensatz zur NHEJ-Reparatur, die zu Deletionen in der DNA-Sequenz führen kann, repariert die Homologe Rekombination (HR) die DNA fehlerfrei und wird hauptsächlich in der späten S- und der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus aktiv, wenn Schwesterchromatide vorhanden sind und als Matrize verwendet werden können (Haber *et al.*, 2000; Morrison *et al.*, 2000; Takata *et al.*, 1998). Ein DSB kann durch die Proteinkinase ATM („ataxia telangiectasia mutated“) erkannt werden, die dann eine Reihe von Reparaturenzymen und Zellzyklusregulatoren phosphorylieren und somit aktivieren kann (Kurz und Lees-Miller, 2004; Suzuki *et al.*, 1999). Der DNA-Strang austausch wird durch die Reparaturenzyme RAD51, RAD52 und RPA katalysiert. Es folgen DNA-Neusynthese, Ligation, „*Branch Migration*“ und Auflösung der dabei entstandenen kreuzförmigen „*Holliday*“-Struktur (Wyman & Kanaar, 2004). Für das ATM-Protein wird eine Rolle als übergeordneter Regulator für die HR postuliert (Shilo, 2006).

Da für Vielzeller das Aufrechterhalten der genomischen Stabilität ihrer Stammzellen von besonderer Bedeutung ist, spielt eine effiziente DSB-Reparatur bei ihnen vermutlich eine große Rolle. Diese Hypothese konnte durch Untersuchungen an Mauszellen belegt werden. Saretzki *et al.* (2004) zeigten, dass ES-Zellen strahleninduzierte Doppelstrangbrüche wesentlich schneller reparieren als ausdifferenzierte embryonale Fibroblasten (MEF) (Tichy & Stambrook, 2006).

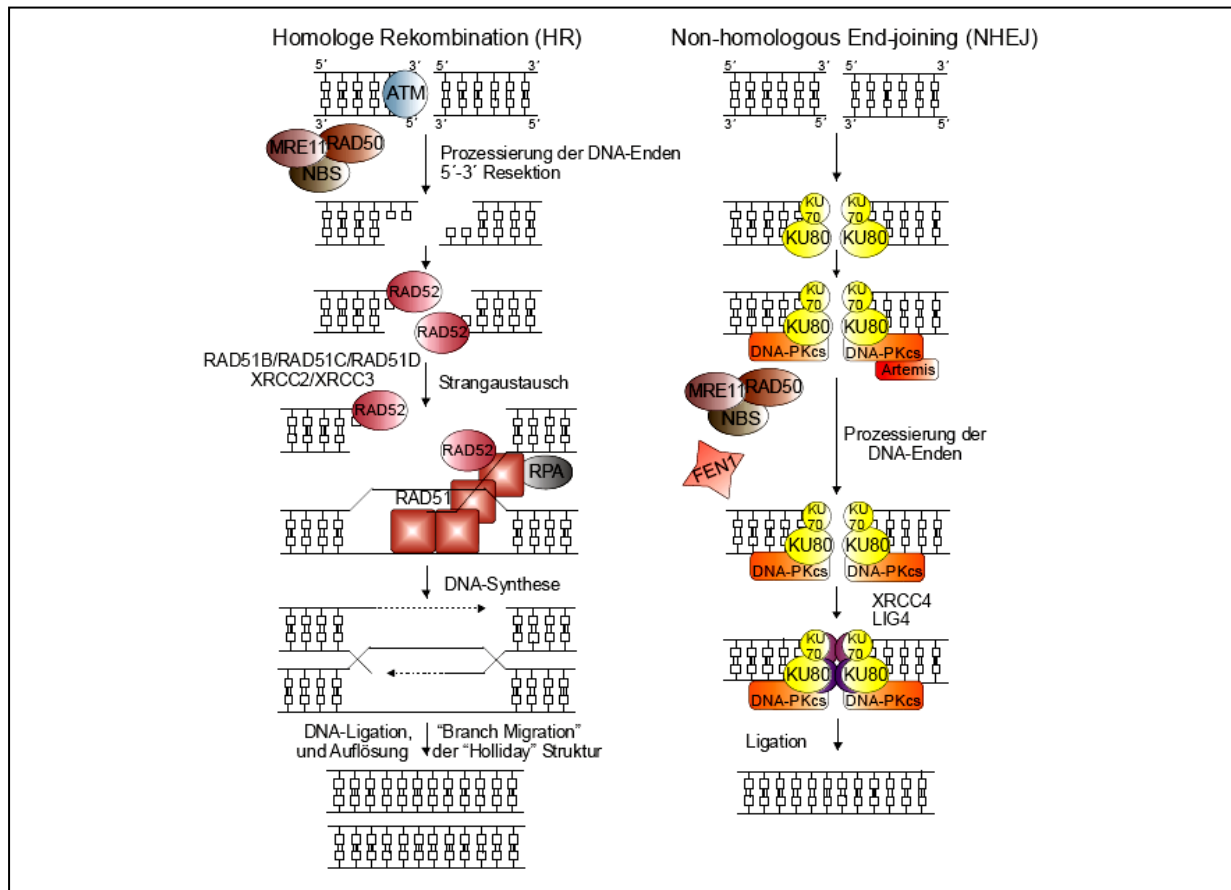


Abb. 3: Überblick über die Prozessierung von DNA-Doppelstrangbrüchen über „Nicht homologe End-joining“ (NHEJ) oder der homologe Rekombination (HR) (Modifiziert nach Christmann *et al.*, 2003 und Sancar *et al.*, 2004).

### 1.2 Regulation der Zellzyklusprogression nach DNA-Schädigung

Die Steuerung der Zellzyklusprogression bei Säugerzellen ist sehr komplex und unterliegt einer Reihe von positiven und negativen Regulationsmechanismen (Nigg, 2001). Der Zellzyklus besteht aus der Interphase und aus der Kern- bzw. Zellteilung (Mitose bzw. Zytokinese). Während die Mitose nur ca. eine Stunde dauert, ist die Interphase wesentlich länger. Die Interphase wird weiterhin unterteilt in die G<sub>1</sub>-Phase, dem Zeitabschnitt vom Ende der Mitose bis zu Beginn der S-Phase, die S-Phase, in der die DNA verdoppelt wird, und die G<sub>2</sub>-Phase, dem Abschnitt zwischen Ende der S-Phase und dem Beginn der Mitose. In der G<sub>1</sub>-Phase werden die Zellorganelle vermehrt und hier findet die Histonsynthese statt. Am Restriktionspunkt wird entschieden, ob die Zelle in die S-Phase übergeht und mit der replikativen DNA-Synthese beginnt, oder in die Ruhephase (G<sub>0</sub>) eintritt. In G<sub>2</sub> werden Mitose-relevante Proteine synthetisiert.

Treten strukturelle Schäden in der DNA auf, kann die Progression des Zellzyklus in jeder Phase angehalten werden. Hierfür sind komplexe Kontrollprozesse

(„*checkpoint*“-Signale) verantwortlich, die nach Detektion solcher Schäden aktiviert werden und die Arretierung des Zellzykluses induzieren (Nurse, 1997).

Das Fortschreiten von einer Zellzyklusphase zur nächsten wird von einer Reihe von Serin/Threonin-Kinasen reguliert, die zur Proteinfamilie der „*cyclin dependent kinases*“ (CDKs) gehören. Die CDKs sind als Monomere inaktiv und werden nach Bindung an ihren jeweiligen Cyclin-Partner aktiviert. Die Cycline wiederum sind Proteine, deren Neusynthese und Degradation von der Zellzyklusphase abhängt (Evans *et al.*, 1983). Spezifische Cyclin-CDK-Komplexe kontrollieren verschiedene Phasen des Zellzyklus: Cyclin D-CDK 4/6 regulieren die G<sub>1</sub>-Phase, Cyclin A/E-CDK 2 steuern die Transition von G<sub>1</sub> zur S-Phase und die S-Phase-Progression, während Cyclin A-CDK 1/2 sowie Cyclin B-CDK 1 für den Übergang G<sub>2</sub>/M notwendig sind. Darüber hinaus wird die Aktivität der CDKs durch reversible Phosphorylierung reguliert (Takizawa & Morgan, 2000). Der Zellzyklus wird mehrdimensional in Raum und Zeit reguliert. Die zeitliche Kontrolle wird durch die zyklische Synthese und Proteolyse bestimmter Proteine gewährleistet. Die räumliche Kontrolle erfolgt durch die Lokalisation bzw. den Transport zyklisch regulierter Faktoren in bestimmten zellulären Kompartimenten (Ohi & Gould, 1999; Takizawa & Morgan, 2000).

„*Checkpoint*“-Signale werden in der Regel in drei Komponenten aufgeteilt: Sensoren (*sensor/signal initiator*), Vermittler (*transducer/mediator*) und Zielmoleküle (*target/effector*) (Kasten & Bartek, 2004; Abb. 4). Dabei spielen die Kinasen ATM und ATR eine zentrale Rolle für die Regulation und Aktivierung von „*Checkpoint*“-Signalen nach DNA-Schädigung. Die Aktivierung von ATR erfordert die Assoziation sowohl mit dem Protein ATRIP als auch mit den Proteinkomplexen RAD17 und 9-1-1. Bei der ATM-vermittelten Antwort spielt die Aktivierung der MNR (MRE11-NBS1-RAD50)-Komplexes eine entscheidende Rolle. Von großer Bedeutung für die Signalübertragung sind Vermittler wie TOPBP1 und BRCA1. Fast alle Vermittler besitzen BRCT (BRCA1 C-Terminus)-Domänen. Nach Aktivierung dieser Vermittler und der übertragenden Kinasen CHK1 und CHK2 wird das Signal vom DNA-Schaden an Zielproteine wie CDC25 Phosphatasen, SMC1 und p53 weitergeleitet. Diese Proteine regulieren die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen, sodass die Arretierung des Zellzyklus eingeleitet werden kann (Kasten & Bartek, 2004).

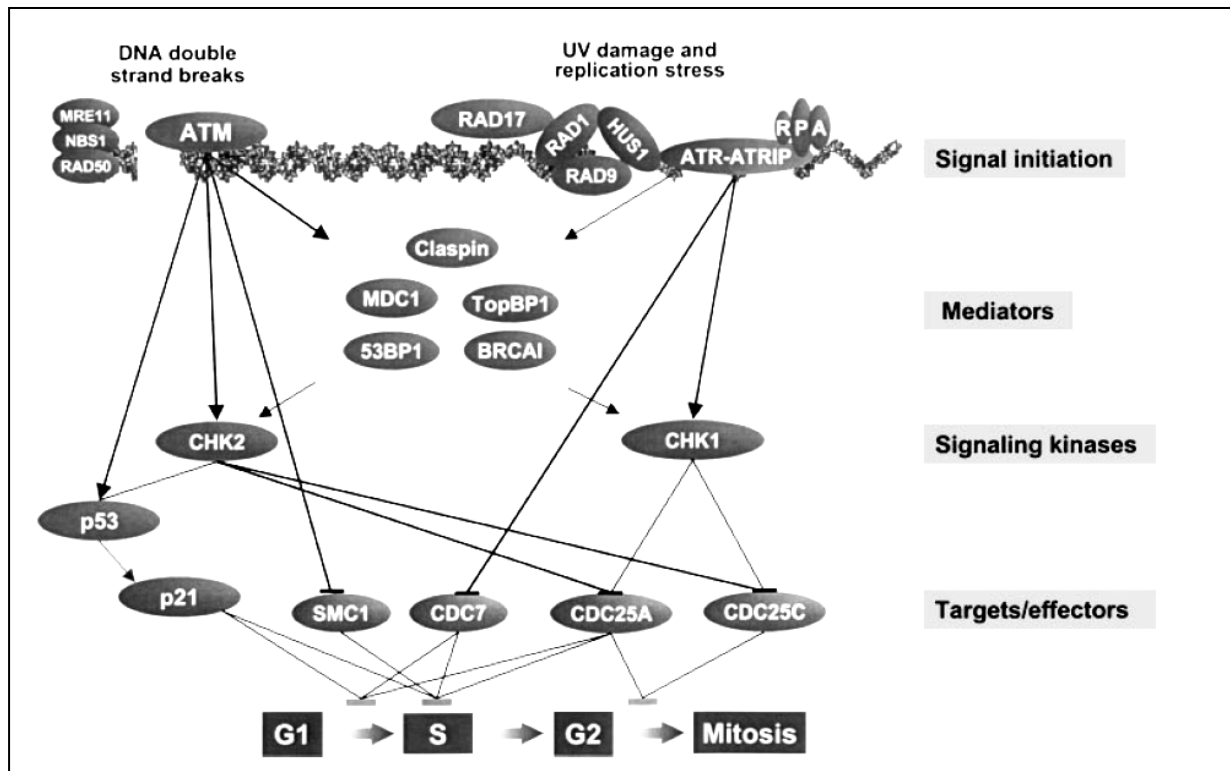


Abb. 4: Schematische Darstellung des „DNA-damage-checkpoint“-Netzwerks (Li & Zou, 2005)

### 1.3 Apoptose nach DNA-Schädigung

Auf Strukturveränderungen in ihrer DNA kann eine Zelle entweder mit dem Versuch reagieren, diese zu beheben und dadurch zu überleben, oder durch Induktion der Apoptose zu verhindern, dass Folgeschäden, wie Mutationen, auftreten. Welcher der beiden Wege eingeschlagen wird, ist abhängig sowohl vom Zelltyp als auch von Art und Häufigkeit der DNA-Schäden. Apoptose kann dabei durch zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege eingeleitet werden, dem intrinsischen mitochondrialen Weg und dem extrinsischen Rezeptorweg (Ashkenazi, 2002; Abb. 5). Der intrinsische Weg wird durch unterschiedliche zelluläre Signale wie DNA-Schäden, Hypoxie oder fehlerhafte Zellzyklusprogression aktiviert (Thornberry & Lazebnik, 1998). Im ersten Schritt erfolgt eine Überexpression von pro-apoptotischen Proteinen wie PUMA und NOXA, welche andere Multidomänen-Proteine wie BAX oder BAK aktivieren, die dann an die Membran der Mitochondrien wandern. Durch diese Translokation wird dort die Funktion von anti-apoptotischen BCL2 Proteinen unterdrückt und die mitochondriale Membran permeabilisiert. Das wiederum führt zur Freisetzung von Cytochrom C und des pro-apoptotischen Proteins DIABOLO in das Zytosol. Im Zytosol bindet Cytochrom C an das Protein APAF-1 und führt damit zur Ausbildung so genannter Apoptosome. An diese Multiproteinkomplexe wird Capase-9 rekrutiert,

das seinerseits weitere nachgeschaltete Caspasen (3 und 7) aktiviert, die dann die Apoptose einleiten (Fulda, 2006).

Im Gegensatz zum intrinsischen Weg beginnt den extrinsische Weg durch die Bindung von pro-apoptotischen Liganden wie APO2L/TRAIL (Rezeptor DR4, DR5) oder CD95L/FasL (Rezeptor 95/Fas) an pro-apoptotischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Debatin & Krammer, 2004; Fulda, 2006). Nach extrazellulärer Aktivierung der pro-apoptotischen Rezeptoren bindet deren intrazelluläre Domäne an ein Adaptorprotein (FADD), wodurch der „*death-inducing signaling komplex*“ (DISC) entsteht (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Kischkel *et al.*, 1995). Dieser Komplex rekrutiert die pro-Caspasen 8 und 10, welche durch gegenseitige Spaltung aktiviert werden und ihrerseits die Caspasen 3 und 7 aktivieren, die dann die Apoptose einleiten (Fulda, 2006).



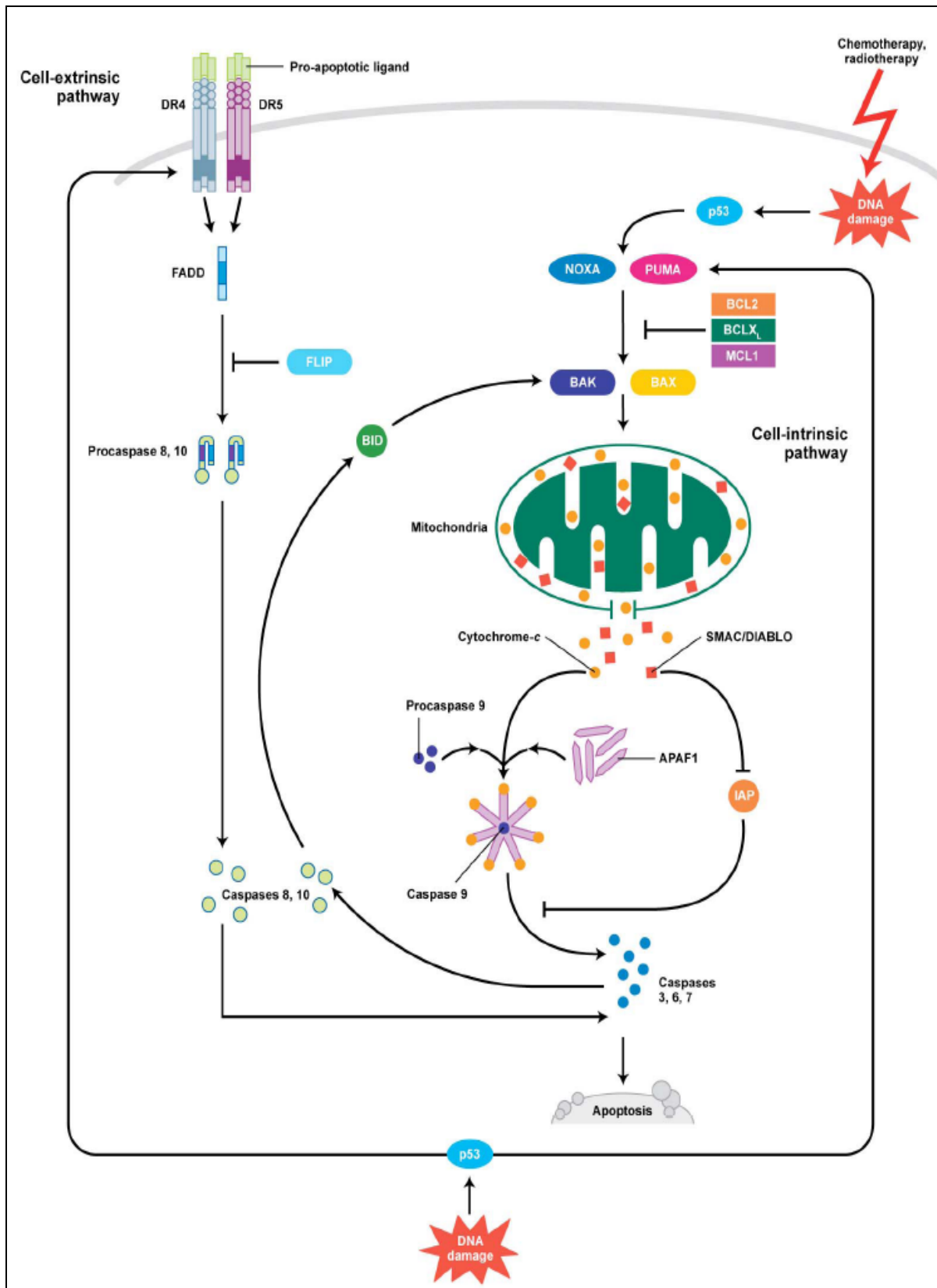


Abb. 5: Übersicht über die intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Signaltransduktionswege (modifiziert nach Ashkenazi, 2002).

## 1.4 DNA-Reparatur in hämatopoetischen Stammzellen

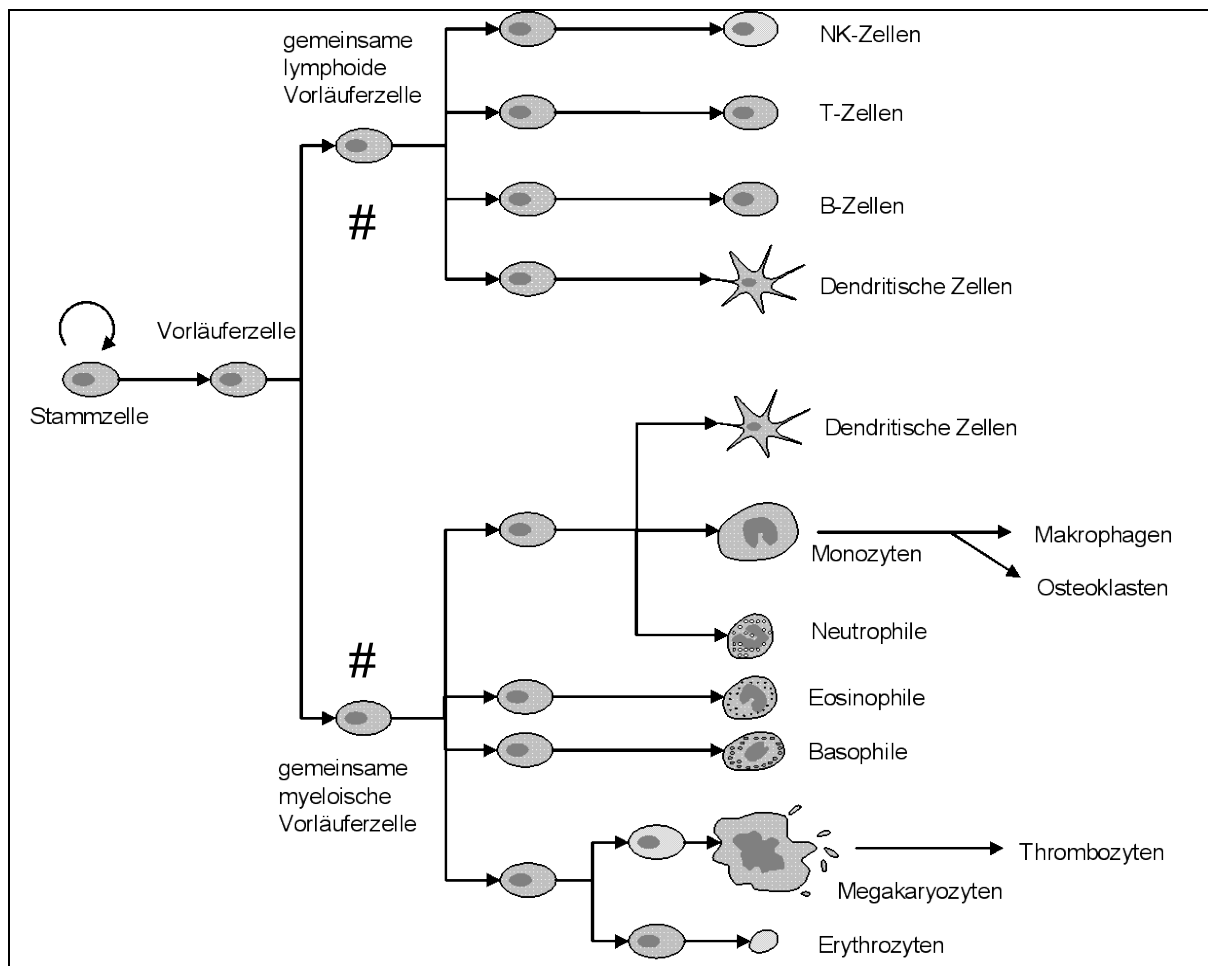
### 1.4.1 Definition und Charakterisierung von Stammzellen

Als Stammzellen bezeichnet man Zellen, die keine oder nur geringe Differenzierung aufweisen und noch nicht auf ihre Funktion im späteren Organismus festgelegt sind. Durch asymmetrische Zellteilung entstehen aus primären Stammzellen weitere Stammzellen („*self-renewal*“) und bereits stärker differenzierte Vorläuferzellen (Reya *et al.*, 2001). Prinzipiell kann man zwischen zwei Basistypen an Stammzellen unterscheiden, die nach Ihrer Herkunft benannt sind. Es gibt so genannten „adulte“ Stammzellen, die mit wenigen Ausnahmen in allen Gewebetypen höherer vielzelliger Organismen vorkommen. Zu diesem Zelltyp gehören beispielsweise auch die hämatopoetischen Stammzellen im blutbildenden System von Säugern. Die zweite Klasse von Stammzellen wird aus frühem embryonalem Gewebe gewonnen und wird als embryonale Stammzellen (ES-Zellen) bezeichnet. ES-Zellen sind pluripotent und können sich prinzipiell in alle Gewebetypen entwickeln (Placzek *et al.*, 2008).

### 1.4.2 Hämatopoetische Stammzellen

Das hämatopoetische System zeichnet sich dadurch aus, dass sich aus einer pluripotenten Stammzelle lebenslang alle Blut- und Immunzellen, wie Granulozyten, Lymphozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und Makrophagen, entwickeln können (Akashi *et al.*, 2000; Abb. 6).

Humane hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche neben anderen Antigenen das CD34-Antigen. Dieses Markerprotein kann für die Isolierung solcher Zellen aus dem Knochenmark, dem Nabelschnurblut und aus der Plazenta genutzt werden (Krause *et al.*, 1996). Der Anteil an CD34<sup>+</sup>-Zellen liegt in den oben genannten Zellpopulationen bei 0,5 bis 1%. Daher sind besondere Anreicherungsmethoden notwendig. In der Regel erfolgt die Isolierung hämatopoetischer Stammzellen nach einer Antikörper-Markierung der spezifischen Oberflächenmarker (wie CD34), entweder durchflusszytometrisch oder mit Hilfe von magnetischen Partikeln (Sandstrom *et al.*, 1995; Kekarainen *et al.*, 2006).



**Abb. 6: Hierarchischer Aufbau des hämatopoetischen Systems (modifiziert nach Akashi *et al.*, 2000).**

### 1.4.3 DNA-Schäden und DNA-Reparatur in hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen

Der Zusammenhang zwischen reduzierter oder defekter DNA-Reparatur in hämatopoetischen Stammzellen und der Entstehung hämatologischer Erkrankungen ist inzwischen gut belegt (Park & Gerson, 2005). Die Inaktivierung der Reparatur von Doppelstrangbrüchen über den NHEJ-Weg (Mutation im DNA-Ligase IV-Gen) führt bei Mäusen zu Wachstumsstörungen, zur Immundefizienz und zu einem altersabhängigen Verlust an Stammzellfunktion (Nijnik *et al.*, 2007). Ähnliche Effekte auf die Hämatopoese wurden bei Mäusen mit defekter homologer Rekombination oder Nukleotid-Exzisions-Reparatur beobachtet (Niedernhofer, 2008).

Ausgehend von Beobachtungen über die extrem hohe Sensitivität des hämatopoetischen Systems gegenüber DNA-reaktiven Zytostatika verglichen Buschfort-Papewalis *et al.*, (2002) die funktionelle DNA-Reparaturkapazität von primären humanen CD34<sup>+</sup> Stamm/Vorläuferzellen und ausdifferenzierten CD34<sup>-</sup>

Zellen. Demnach können differenzierte Lymphozyten DNA-Läsionen, die durch Alkylantien, Melphalan oder Cisplatin induziert wurden, wesentlich effizienter reparieren als die jeweilige Stammzellfraktion des gleichen Spenders. Überraschenderweise zeigten Expressionsanalysen in solchen Zellpaaren, dass die Mehrzahl der DNA-Reparaturgene in CD34<sup>+</sup>-Zellen eher hochreguliert als reprimiert sind (Bracker *et al.*, 2006; Casorelli *et al.*, 2007). Dazu gehören Hauptkomponenten der *Mismatch*-Reparatur (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2*), des BER-Weges (*AAG*, *APEX*), und der DSB-Reparatur. Demgegenüber wurde in diesen Untersuchungen eine kleine Gruppe von Genen identifiziert, die in Stamm-/Vorläuferzellen vergleichsweise niedrig exprimiert werden. Ein wichtiges Mitglied dieser Gengruppe ist die ATM-Kinase, welche eine zentrale Rolle bei der Weiterleitung und Koordinierung der Signaltransduktion nach DNA-Schädigung einnimmt (Li & Zou, 2005; McGowan & Russell, 2004).

### **1.5 MGMT-Gentherapie im hämatopoetischen System**

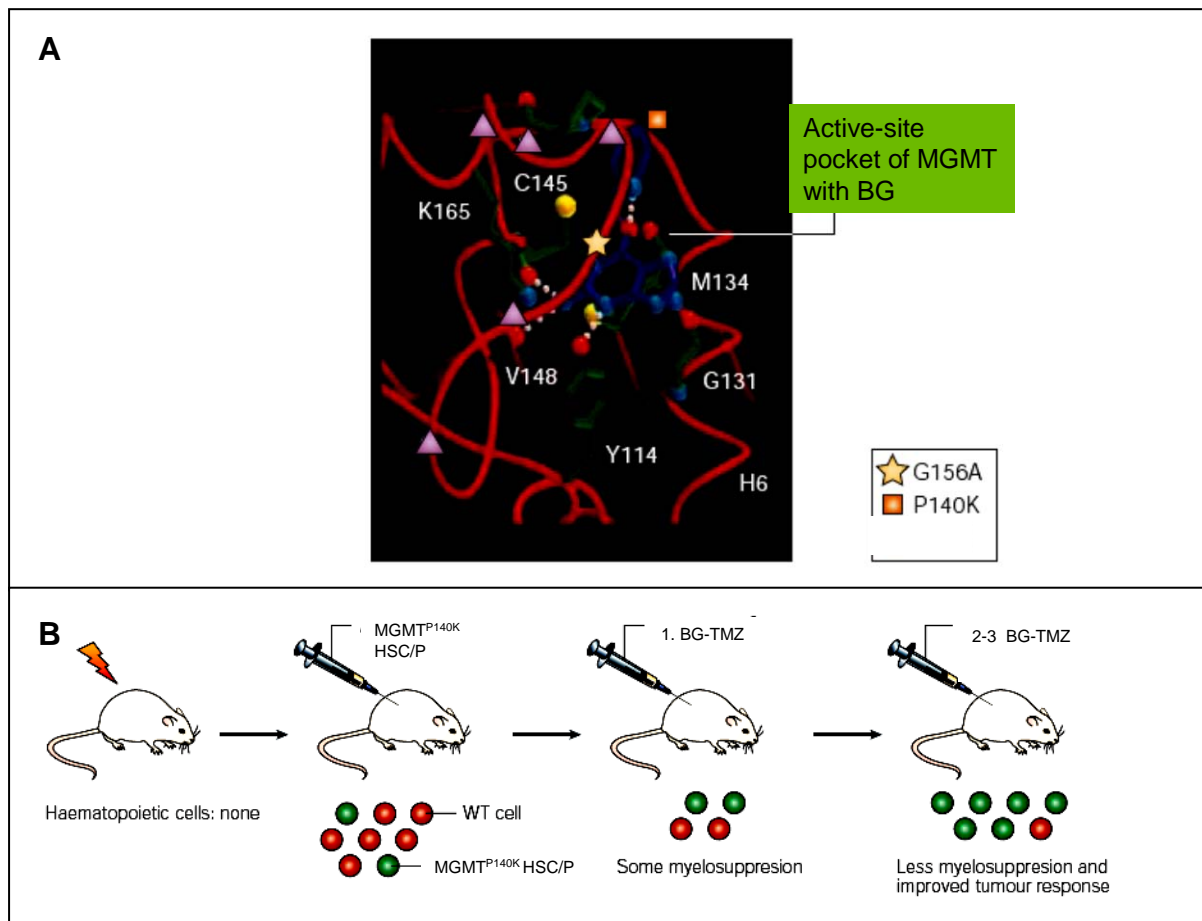
Als Gentherapie bezeichnet man die Einführung von fremdem genetischen Material in die Zellen eines Organismus zu therapeutischen Zwecken. Hämatopoetische Stammzellen stellen ein optimales Ziel für die somatische Gentherapie dar, weil sie mit etablierten Methoden aus Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut gewonnen werden und *ex vivo* transduziert werden können (Review: Milsom & Williams, 2007). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass das gesamte hämatopoetische System lebenslang von wenigen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen aufrechterhalten wird. Bei stabiler Integration des Gen-Vektors in die genomische DNA einer einzigen Stammzelle kann nach Transplantation *in vivo* theoretisch eine unbegrenzte Zahl reifer Zellen der unterschiedlichen Differenzierungstypen gebildet werden, die das Transgen dauerhaft exprimieren (Review: Milsom & Williams, 2007).

### **1.6 Transgen-vermittelte Chemoresistenz: MGMT-Gentherapie zum Schutz der Hämatopoese**

Ein stabiler Transfer von DNA-Reparaturgenen in hämatopoetische Stammzellen kann unter verschiedenen Aspekten sehr interessant sein (Review: Milsom & Williams, 2007). In experimentellen Mausmodellen lässt sich so die Bedeutung einzelner Reparaturproteine oder ganzer Reparaturwege für die Sensitivität/Resistenz der Hämatopoese gegenüber DNA-schädigenden Agenzien *in vivo* untersuchen. Des

weiteren ließe sich im klinischen Bereich das blutbildende System von Tumorpatienten vor der häufig lebensbedrohlichen myelosuppressiven Wirkung einer hochdosierten Chemotherapie schützen (Review: Milsom & Williams, 2007). Darüber hinaus kann eine solche Strategie prinzipiell dazu benutzt werden, um bei Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, die auf monogenen Defekten beruhen, genetisch korrigierte Stammzellen zu transplantieren und dann auf diese über ein zusätzliches DNA-Reparatur-Transgen *in vivo* zu selektionieren (Review: Milsom & Williams, 2007). Für die beiden letztgenannten Ansätze bietet sich insbesondere das *mgmt*-Gen an. Zum einem vermittelt seine Expression eine erhebliche Chemoprotektion sowie einen hohen Selektionsvorteil *in vitro* und *in vivo* gegenüber Alkylanzien, zum anderen ist die Schutzwirkung auf Grund des Ein-Schritt-Mechanismus nicht vom Vorhandensein weiterer Reparaturkomponenten abhängig (Gerson, 2004).

Die derzeit verfolgten Strategien zum Hämatopoese-Schutz bei Chemotherapie mit Alkylanzien kombinieren auf elegante Weise zwei unterschiedliche Ansätze: Einerseits soll die MGMT-Reparaturaktivität der Tumorzellen durch eine systemische Gabe des pharmakologischen Inhibitors O<sup>6</sup>-Benzylguanin (BG) depletiert werden, um sie gegenüber der Chemotherapie zu sensitiveren, andererseits wird für den *mgmt*-Gentransfer in die hämatopoetischen Stammzellen die Mutante MGMT<sup>P140K</sup> benutzt, die resistent gegen den Inhibitor BG ist (Gerson, 2004; Milsom & Williams, 2007; Abb. 7). Die prinzipielle Durchführbarkeit dieser Strategie konnte inzwischen sowohl *in vitro* (Jansen *et al.*, 2002) als auch *in vivo* durch retroviralvermittelte Überexpression von MGMT<sup>P140K</sup> in hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen bei Mäusen und Hunden demonstriert werden (Milsom & Williams, 2007; Sawai *et al.*, 2001; Jansen *et al.*, 2002; Neff *et al.*, 2005).



**Abb. 7: Entwicklung und Verwendung von BG-resistenten MGMT-Mutanten in der Genterapie.** A) Kristallstruktur des BG/MGMT Komplexes. Basensubstitution G156A und P140K in MGMT führen zu BG-Resistenz. B) Chemoprotektion von hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen wird durch retroviralen Gentransfer von MGMT<sup>P140K</sup> *ex vivo* erreicht. Die transgen MGMT<sup>P140K</sup> exprimierende Zellen werden in letal bestrahlte Mäusen transplantiert. Mittels *in vivo* Behandlung der Mäuse mit BG-TMZ lassen sich die MGMT<sup>P140K</sup> exprimierenden Stamm/Vorläuferzellen selektionieren. Das hämatopoetische System wird auf diese Weise bei kombinierter Behandlung mit BG und DNA-alkylierenden Reagenzien effizient geschützt (Modifiziert nach Gerson, 2004). WT: Wild Typ.

### 1.7 Akylierende Zytostatika: Anwendungsspektrum, Wirkungsweise und DNA-Reparatur

Viele der in der Tumorthherapie verwendeten Zytostatika, wie Temozolomid, Streptozotocin, Procarbazin und Dacarbazin, gehören funktionell zur Gruppe der monofunktionellen Alkylanzien. Diese Substanzen wirken als SN<sub>1</sub> Donatoren und können Methylgruppen auf nukleophile Zentren z. B. in der DNA übertragen (Gerson, 2004). Von diesen DNA-Methyl-Addukten geht sowohl die zytotoxische als auch die mutagene Wirkung der Alkylanzien aus. Mit 70 % und 20 % aller Methylierungen werden die Stickstoffatome N7 des Guanin und N3 des Adenin durch diese Medikamente weitaus am häufigsten alkyliert (Beranek, 1990). Entscheidend für die biologische Wirksamkeit ist jedoch der vergleichsweise kleine Anteil (7 %) von Addukten an der O<sup>6</sup>-Position des Guanins. Die hohe Mutagenität dieser Addukte

erklärt sich aus ihrer sterischen Lage in der Basenpaarungsregion und der damit verbundenen Störung der Wasserstoffbrückenbindung. Die DNA-Polymerase setzt bei der Replikation mit hoher Frequenz gegenüber einem O<sup>6</sup>-meG ein Thymin anstelle eines Cytosins in den neu synthetisierten Strang ein. Bei der nächsten Replikation ergibt sich daraus eine G:C – A:T Mutation (Gerson, 2004).

Weniger leicht verständlich ist die hohe zytotoxische Wirkung von O<sup>6</sup>-meG-Addukten, da sie weder die DNA- noch die RNA-Synthese erheblich behindern. Die derzeitigen Hypothesen gehen davon aus, dass ein post-replikatives O<sup>6</sup>-meG:T-Basenpaar (s. o.) vom *Mismatch*-Reparatursystem als fehlerhaft erkannt wird. Da die MMR aber immer am neu synthetisierten Strang erfolgt und somit das T, nicht aber das alkylierte G entfernt wird, die nachfolgende DNA-Polymerase beim Wiederauffüllen der Reparaturlücken aber erneut ein T einfügt, entsteht an solchen Positionen ein so genannter "*futile repair cycle*". Das führt zu häufigen und lang anhaltenden Einzelstrangbrüchen in der DNA, die u. a. Probleme bei der nächsten Replikation hervorrufen, oder zu Doppelstrangbrüchen führen können und dadurch Apoptoseprozesse einleiten (Mojas *et al.*, 2007; Stojic *et al.*, 2004; Roos *et al.*, 2009; Kaina *et al.*, 1997 und Abb. 8). Es gibt in der Literatur Hinweise, dass die O<sup>6</sup>-meG-induzierte Apoptose Zelltyp-abhängig sowohl über den intrinsischen (mitochondrialen) als auch den extrinsischen (FAS-Rezeptor-vermittelten) Weg eingeleitet werden kann (Ochs *et al.*, 2000; Roos *et al.*, 2004).

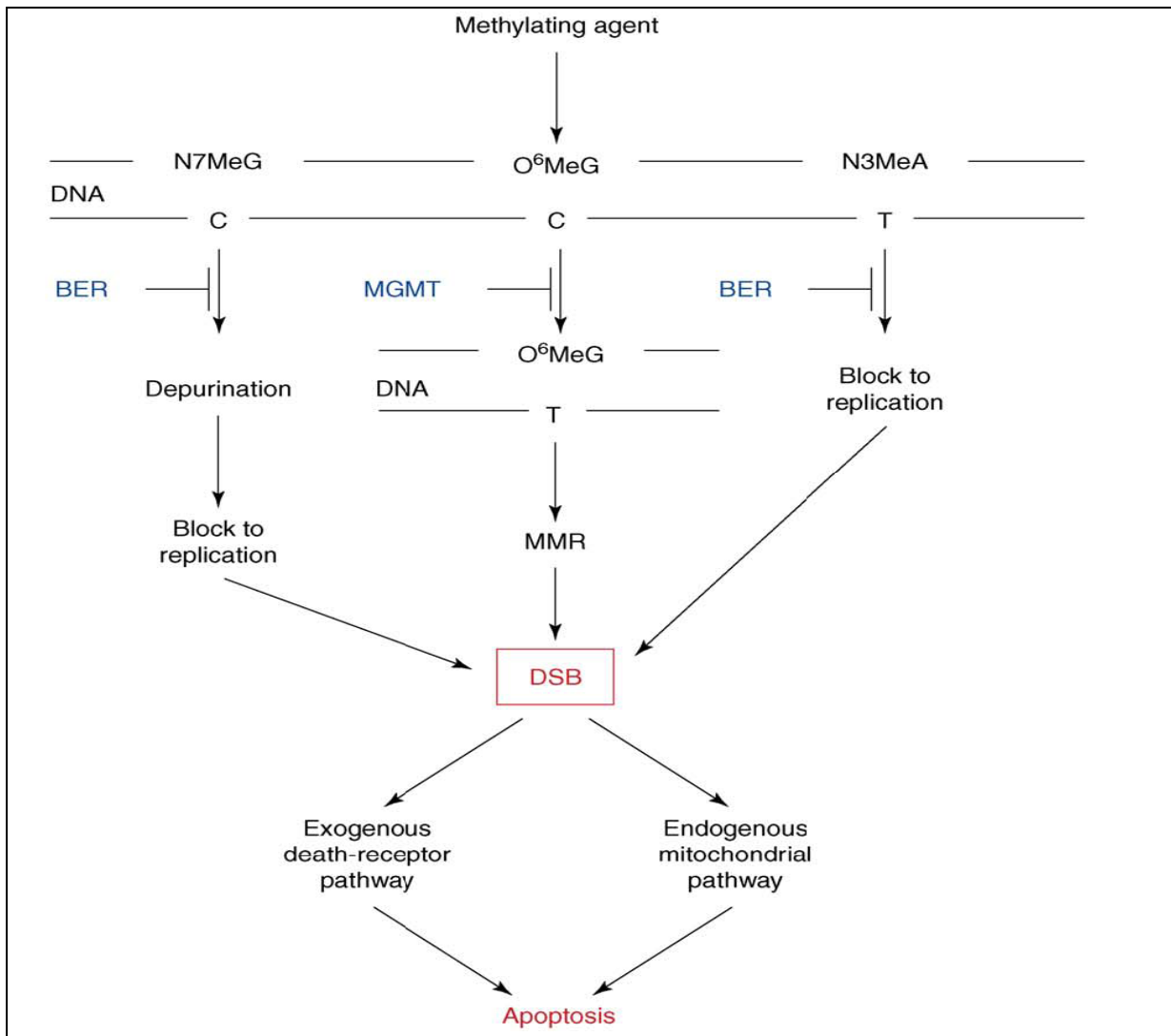


Abb. 8: DNA-Schäden, DNA-Reparatur und mögliche Wege der Apoptose-Induktion nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien (Roos & Kaina, 2006).



## 2. Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation soll untersucht werden, auf welchen zellulären Mechanismen die zytotoxische Wirkung von Alkylanzien, im hämatopoetischen System beruht. Ein besonderer Schwerpunkt liegt dabei auf der Rolle des DNA-Alkylierungsproduktes O<sup>6</sup>-meG in primären humanen und murinen Stamm/Vorläuferzellen.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit den biologischen Konsequenzen einer durch MGMT-Gentransfer vermittelten Veränderung der Reparaturkapazität für dieses Addukt in hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen von Mäusen. Geklärt werden soll dabei unter anderem, ob eine effizientere Eliminierung von O<sup>6</sup>-meG aus der genomischen DNA der transgenen Stammzellen diese nach Alkylierung einen *in vivo*-Selektionsvorteil im hämatopoetischen System besitzen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird analysiert, wie die mutagenen und zytotoxischen O<sup>6</sup>-meG-Läsionen in humanen proliferationsaktiven, hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>) prozessiert werden und welche Unterschiede im Vergleich zu differenzierten Lymphozyten auftreten. Dabei sollen die molekularen Mechanismen, die an der komplexen Zellantwort bei genotoxischem Stress beteiligt sind, in beiden Zellpopulationen identifiziert und weiter charakterisiert werden. Diese Untersuchungen sollen dazu beitragen, das besondere Verhalten von Stammzellen bei DNA-Schädigung und die hohe genomische Stabilität dieser Zellpopulation besser zu verstehen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Chloroquine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
EGTA (Ethylenglycoltetraacetic säure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Essigsäure	Fluka, Basel, CH
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Ficoll	Serva, Heidelberg, DE
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
L-Laurylsarkosinat	Serva, Heidelberg, DE
Low-Melting-Point (LMP)- Agarose	Cambrex, Oldendor f, DE
Magermilchpulver	Fluka, Basel, CH
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
PEG (Polyethylene glycol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Polybren	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Retronektin	TaKaRa, Otsu, JA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Sukrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
SyberGreen	Roche, Mannheim, DE
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Tris-HCl (Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Triton-x-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Tween-20	Fluka, Basel, CH

### 3.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

<b>Medien/Zusätze</b>	<b>Hersteller</b>
DMEM (High Glucose)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
FKS	PAA, Cölbe, DE
HEPES Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
IMDM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
RPMI-1640	PAA, Cölbe, DE

### 3.1.3 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren	Hersteller
PHA-P (Phytohämagglutinin)	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE
rh FLT3 (recombinant human FLT3-Ligand)	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
rh IL2 (recombinant human IL2)	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
rh TPO (recombinant human Thrombopoietin)	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
rhIL3 (recombinant human IL3)	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
rhSCF (recombinant human stem cell factor)	CellGenix, Freiburg, DE
rm TPO (recombinant murine Thrombopoietin)	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
rmSCF (recombinant murine stem cell factor)	CellGenix, Freiburg, DE

### 3.1.4 Antikörper

Primärantikörper	Hersteller
Kaninchen- $\alpha$ -ATR	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Kaninchen- $\alpha$ -Phospho-CDC2	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Kaninchen- $\alpha$ -Phospho-CHK1 (Ser317 )	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Kaninchen- $\alpha$ -Phospho-CHK1 (Ser345 )	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Kaninchen- $\alpha$ -Phospho-CHK2 (Tyr68)	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Kaninchen- $\alpha$ -Phospho-RAD17(Ser645)	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Kaninchen- $\alpha$ -RAD51	Santa cruz, Santa cruz, CA, USA
Maus- $\alpha$ -hMGMT	Millipore, Billerica, MA, USA
Maus- $\alpha$ -Histon 2A	Santa cruz, Santa cruz, CA, USA
Maus- $\alpha$ -O <sup>6</sup> meG (EM2-3)	Squarix, Marl, DE
Maus- $\alpha$ -Phospho-Histone H2A.X	Millipore, Billerica, MA, USA
Maus- $\alpha$ - $\beta$ -Actin	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE
Maus- $\alpha$ -Tubulin	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE
Fluoreszenz-konjugierte Primärantikörper	Hersteller
FITC-konjugierter Maus- $\alpha$ -hCD34	BD PharMingen, San Jose, CA, USA
FITC konjugierter Maus- $\alpha$ -hCD3e	BD PharMingen, San Jose, CA, USA
PE-konjugierter Maus- $\alpha$ -hCD34	BD PharMingen, San Jose, CA, USA

<b>Fluoreszenz-konjugierte Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa 488-konjugierter Ziege- $\alpha$ - Maus	Dianova, Hamburg, DE
Alexa 488-konjugierter Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	Dianova, Hamburg, DE
Cy3-konjugierter Ziege- $\alpha$ - Maus	Dianova, Hamburg, DE
Cy3 -konjugierter Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	Dianova, Hamburg, DE
Peroxidase-konjugierter Ziege- $\alpha$ -Maus	Dianova, Hamburg, DE
Peroxidase konjugierter Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	Dianova, Hamburg, DE

### 3.1.5 Kommerzielle „Kits“

<b>„Kits“</b>	<b>Hersteller</b>
Annexin-V: APC Apoptosis detection Kit	BD PharMingen, San Jose, CA, USA
APC-BrdU Flow Kit	BD PharMingen, San Jose, CA, USA
Becton Dickinson Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit	BD PharMingen, San Jose, CA, USA
Calciumphosphat Transfection Kit	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE
EasySep <sup>®</sup> Human CD34 Positive Selection Kit	STEMCELL Technologies, Köln, DE
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, DE
QIAprep spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, DE
QIAquick gel extraction Kit	Qiagen, Hilden, DE
Qiashrader	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
RosetteSep <sup>™</sup> Human Cord Blood Progenitor Enrichment Kit	STEMCELL Technologies, Köln, DE

### 3.1.6 Geräte und Zubehör

<b>Zubehör</b>	<b>Hersteller</b>
Agarosegelkammern	PEQLab, Erlangen, DE
Axioplan Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena, DE
BD FACS Canto Flow Cytometer	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator C200	Labo-Tec, Göttingen, DE
Consort Electrophoresis Power Supply, 800	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE
Durchflusszytometer EPICS XL	Coulter Electronics, Krefeld, DE
EasySep <sup>®</sup> Magnet	STEMCELL Technologies, Köln, DE
ECL Substrat	Pierce, Bonn, DE
Eindeckmittel "Vectrashield with DAPI"	AXXORA, Lörach, DE
Immunoselect Objektträger für Histochemie	Squarix, Marl, DE

Zubehör	Hersteller
LAS 3000 Gel Dokumentations System	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, DE
Mikroliterzentrifuge Mikro200R	Hettich Lab Technology, Tuttingen, DE
MiniProtean III System	Biorad, hercules, CA, USA
Nitrozellulose Membran Hybond	GE, Uppsala, SE
Phasenkontrastinversionsmikroskop CK2	Zeiss, Jena, DE
PH-Meter	Mettler-Toledo, Giessen, DE
Photometer Nanodrop	PEQLab, Erlangen, DE
Pipetus-akku, P 900 7001/0294	Hirschmann, Eberstadt, DE
Pipetus-standard, P990 30 01	Hirschmann, Eberstadt, DE
Präzisionswaage	Bosch, Jungingen, DE
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce, Bonn, DE
Sicherheitswerkbank	Nuaire, Plymouth, USA
Tischzentrifuge 5415D, Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, DE
Vortexer L46	GLW, Würzburg, DE
Vortexer	VWR, Darmstadt, DE
Wasserbad TWB 22	Julabo, Seelbach, DE
Zentrifuge Rotina 48	Hettich Lab Technology, Tuttingen, DE

### 3.1.7 Primäre Zellen, Zelllinien und Tiere

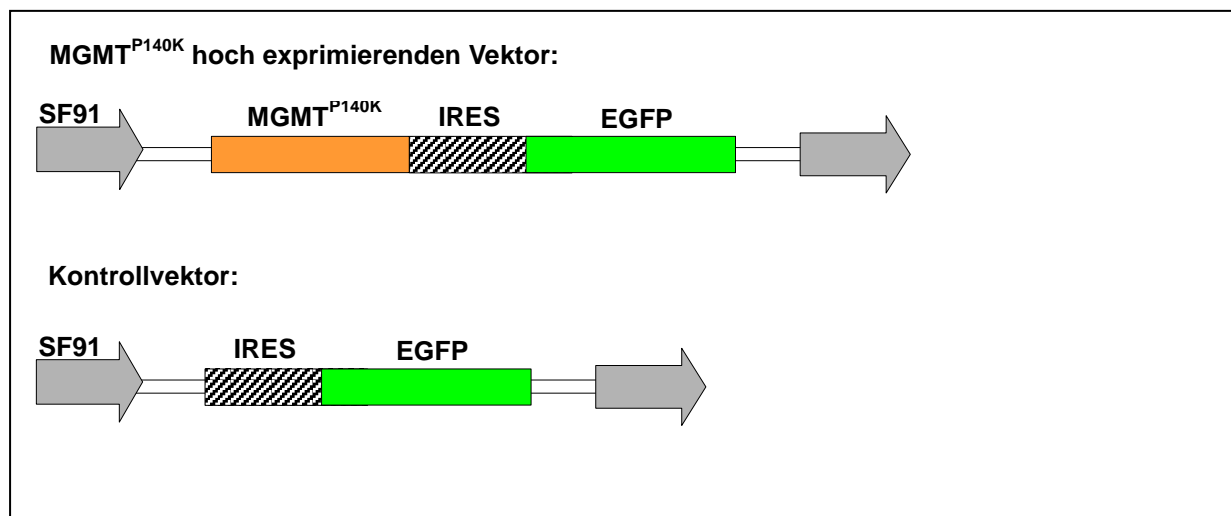
Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
L1210	murine lymphoblastoide leukämische Zellen	ATCC, Manassas, VA, USA
NIH-3T3	Fibroblasten aus Mausembryo	ATCC, Manassas, VA, USA
Jurkats	humane lymphoblastoide leukämische T-Zellen	ATCC, Manassas, VA, USA
293T-Zellen	humane embryonale Nierenzellen	ATCC, Manassas, VA, USA
32D-Zellen	murine myeloblastoide Zellen	CCHMC, Cincinnati, OH, USA
CD34+, CD34-	humane Nabelschnurblut	Universitätsklinikum, Frauenklinik, Essen
C57Bl/6-Mäuse		CCHMC, Cincinnati, OH, USA

Eine Beschreibung der Kulturbedingungen der verschiedenen Zellen ist Kap. 3.2.2.1 zu entnehmen.

### 3.1.8 Retro- und lentivirale Vektoren

#### 3.1.8.1 Retrovirale Vektoren für die MGMT<sup>P140K</sup> Expression in L1210-Zellen

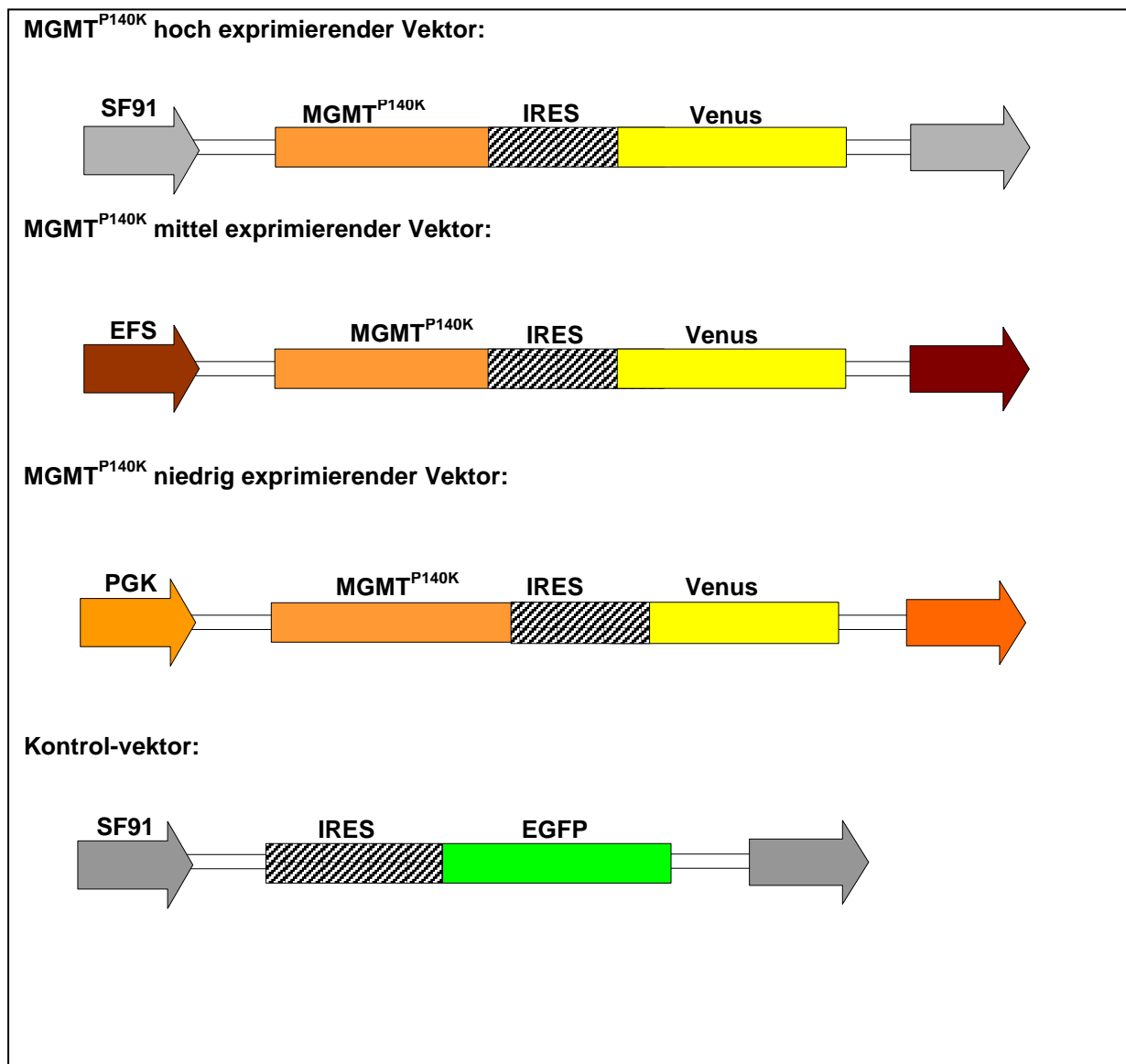
Für die Expression der O<sup>6</sup>-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT<sup>P140K</sup>) wurde der Vektor SF91-MGMT<sup>P140K</sup>-IRES-EGFP verwendet, welcher die cDNA der MGMT<sup>P140K</sup> enthält. In Kombination mit der MGMT wird das EGFP-Reportergen über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) ko-exprimiert. Als Kontrolle diente der Vektor SF91-EGFP, der ausschließlich EGFP exprimiert. Beide Vektoren (Abb. 10) basieren auf einem SFFV/MESV-Hybridvektor, der für die Expression in hämatopoetischen Zellen optimiert wurde (Baum *et al.*, 1995; Hildinger *et al.*, 1999).



**Abb. 10 Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren.** Die Expression der MGMT<sup>P140K</sup> und des „Enhanced Green Fluorescent Protein“ (EGFP) wird über die Promotor- und Enhancer-Elemente des Spleen Focus Forming Virus (SFFV) und des „Murine Embryonic Stem Cell Virus“ (MESV) reguliert. Der Kontrollvektor erlaubt ausschließlich die Expression von EGFP.

#### 3.1.8.2 Retrovirale Vektoren zur MGMT<sup>P140K</sup> Expression im murinen Knochenmark-,32D- und 3T3 Zellen

Um ein breite Expressions-Palette von O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT<sup>P140K</sup>) zu erreichen, wurden die in Abbildung 11 schematisch dargestellten Retroviralen Vektoren verwendet, welche die cDNA von MGMT<sup>P140K</sup> und EGFP bzw. Venus enthalten (Milsom *et al.*, 2008).



**Abb. 11: Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren.** Eine breite Palette an Expression der MGMT<sup>P140K</sup> und des „Enhanced Green Fluorescent Protein“ (EGFP) bzw. Venus wird über die Promotor- und Enhancer-Elemente des „Spleen Focus Forming“-Virus (sehr hohe Expression: SF91), oder über die trunktierte Form des Promotors und Enhancer-Elements des human Elongation 1alpha Gen (mittlere Expression: EFS) oder schließlich über die Promotor und Enhancer Elemente aus dem humanen Phosphoglucerasatkinase Gen (schwache Expression: PGK) erreicht.

### 3.1.8.3 Lentivirale shRNA-Vektoren zur Herunterregulation von ATM- und ATR-Kinasen

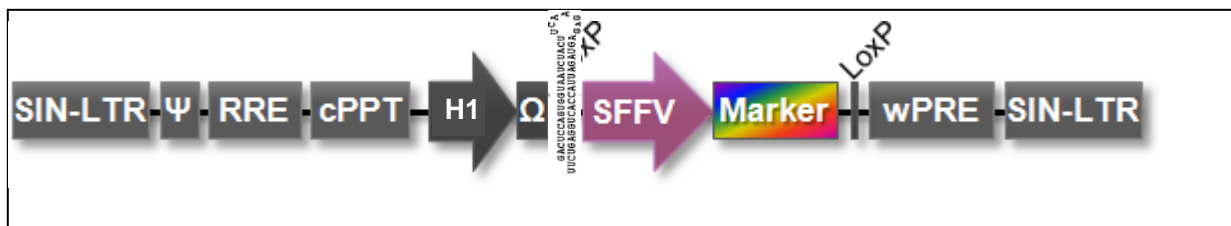
Um die Expression von ATM und ATR-Kinasen in Zellen zu unterdrücken, wurde shRNA („short hairpin RNA“)-Technik verwendet und lentivirale basierten shRNA Vektoren eingesetzt (LeGO).

Das LeGO (Lentiviral Gene Ontology Vector)-Vektorsystem erlaubt eine effiziente Expression von shRNA Sequenzen zusammen mit einem Fluoreszenzmarker (EGFP oder Venus; Abb. 12). Die Vorteile dieses Systems sind sowohl hohe



Transduktionsraten in Primärzellen, wie hämatopoetischen, neuronalen und Endothelialen Vorläuferzellen (Weber *et al.*, 2008), als auch die einfache Identifizierung von transduzierten Zellen mittels des Reportergens EGFP oder Venus (Weber *et al.*, 2008).

Für die Expression von spezifischen shRNA Sequenzen für ATM- und ATR- Kinasen wurden die shRNAs zusammen mit dem H1-Promotor in die LeGO-Lentiviralenvektoren LeGO-G und LeGO-V kloniert. Diese Vektoren wurden von Herr K. Weber aus Heinrich-Pette-Institut in Hamburg freigestellt. Eine genauere Beschreibung, wie die lentiviralen-shRNA-Konstrukte entworfen und hergestellt wurden, ist in Kap. 3.2.1.4 - 3.2.1.8 zu finden.



**Abb. 12: Schematische Darstellung der verwendeten lentiviralen LEGO-shRNA-Vektoren.** Die Expression der shRNA wird über dem H1-Promotor reguliert, während die Expression des Markergens über den Promotor des „Spleen Focus Forming“-Virus (SFFV) reguliert wird. Abbildung stammt aus <http://www.lentigo-vectors.de> und wurde modifiziert. SIN-LTR,  $\psi$ , RRE,cPPT und wPRE sind retrovirale genregulatorische Elemente (Weber *et al.*, 2008).

## 3.2 Methoden

Im Folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen, biochemischen und zellbiologischen Methoden kurz dargestellt.

### 3.2.1 Molekularbiologische und biochemische Methoden

#### 3.2.1.1 Plasmidpräparation aus Bakterien

Die präparative Aufreinigung von Plasmid-DNA wurde mit den Kits „QIAprep spin Miniprep Kit“ und „Plasmid Maxi-Preparation Kit“ der Firma Qiagen nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in Wasser gelöst und spektrophotometrisch quantifiziert. Aliquots der Plasmid-DNA wurden mittels eines analytischen Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese kontrolliert.

### 3.2.1.2 DNA Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde für die Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA durchgeführt. Die DNA wurde je nach erwarteter Fragmentgröße in 1,0 - 1,5 %igen Agarosegelen, die mit 1x TAE-Puffer hergestellt wurden, aufgetrennt. Es wurde jeweils 0,5-1 µg DNA auf das Gel geladen. Nach dem Lauf bei einer Spannung von 120 Volt für 1 h, wurden die Gele unter Transillumination mit UV-Licht dokumentiert.

### 10xTAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer

0,4 M Tris-Base  
11,4 % (v/v) Essigsäure  
10 mM EDTA  
pH 7,6

### 3.2.1.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine  $OD_{260}$  von 1,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Zusätzlich wurde die OD bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Aus dem Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  lässt sich die Proteinkontamination der Lösung ermitteln. Es wurde ausschließlich DNA mit einem  $OD_{260}/OD_{280}$  - Verhältnis zwischen 1,7 und 1,9 verwendet.

### 3.2.1.4 Design der shRNA Sequenzen

Im ersten Schritt wurden jeweils drei shRNA Moleküle gegen ATR-Kinase und ATM-Kinase, sowie ein shRNA Molekül gegen das bakterielle LacZ-gen (Kontrolle) bzw. „scrambled“ shRNA (Kontrolle: unspezifische ATR-Sequenz) designt. Die Oligonukleotidsequenzen stammten entweder aus publizierten Studien (Ariumi *et al.*, 2005), oder wurden bereits erfolgreich als siRNA von der Arbeitsgruppe von Dr. Paul Andreassen in *Cincinnati Children's Hospital Medical Center* (CCHMC, Cincinnati, USA) verwendet. Darüber hinaus wurden shRNA Sequenzen mit Hilfe des online Programms „siRNA selection at whitehead“ (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>) entworfen. Alle shRNA Moleküle wurden mit BglIII und HindIII überlappenden Enden synthetisiert, so dass sie direkt in den pSuper-Vektor (Oligoengine) kloniert werden konnten. Alle shRNA Sequenzen sind in Kap. 9.1 aufgelistet.

### 3.2.1.5 Hybridisierung der shRNA Oligonukleotide

Für die Hybridisierung wurden die Oligonukleotide mit einer Konzentration von 3 mg/ml in steriles ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. 1 µl von jedem Oligo (Vorwärts und Rückwärts) wurden zu 48 µl Hybridisierungspuffer gegeben und gut gemischt. Das Gemisch wurde für 4 Minuten auf 95 °C, anschließend für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Schließlich erfolgt ein langsames Abkühlen auf 10 °C. Die hybridisierten shRNAs werden dann bei -20 °C gelagert.

#### Hybridisierungspuffer

100 mM NaCl  
50 mM Hepes  
pH 7,4

### 3.2.1.6 Klonierung von shRNAs in den pSuper-Vektor

Im ersten Schritt wurde der pSuper-Vektor an BglII und HindIII Restriktionsstellen linearisiert. Dafür wurde 0,5 µg DNA mit 0,5 µl Restriktionsenzym (10 U) und 20 µl Restriktionspuffer gemischt. Die Linearisierungsreaktion wurde zuerst für eine Stunde mit BglII durchgeführt. Danach wurde 0,5 µl (10 U) HindIII hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 37 °C mit inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch eine 20-minütige Inkubation bei 60 °C gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz auf ein 1 % Agarose Gel aufgetragen, damit das linearisierte Fragment gewonnen werden konnte. Die gewonnene DNA wurde dann aus dem Agarosegel eluiert („QIAquick gel extraction Kit“) und mit dem hybridisierten shRNA Oligonukleotiden ligiert.

#### Linearisierung des pSuper-Plasmids:

ddH <sub>2</sub> O	(Auffüllen auf 20 µl)
10XPuffer (NEB2)	2 µl
DNA	1 µg
Enzym	0,5 µl (10 U)

Inkubation für eine Stunde bei 37 °C, Enzyminaktivierung 20 Minuten bei 60 °C.

#### Ligation des linearisierte pSuper Plasmids mit hybridisierter shRNA:

shRNA	2 µl
T4-Ligase Puffer	1 µl
pSuper-Plasmid	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	5 µl
T4-Ligase	1 µl

Inkubation bei 16°C für 12 Stunden.

### 3.2.1.7 Transformation des pSuper-Plasmids in Bakterien

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden E. coli-Zellen des Stammes DH5 $\alpha$  verwendet. 50  $\mu$ l Bakteriensuspension wurden zur Transformation mit 5 ng DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 45 s Hitzeschock bei 42 °C und anschließender Kühlung auf Eis wurden 950  $\mu$ l LB-Medium zu den Zellen gegeben, und der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C mit 225 U/min geschüttelt. Je 50  $\mu$ l und 100  $\mu$ l der Bakteriensuspension wurden danach auf LB-Agar-Platten mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden einzelne Kolonien isoliert und in 5 ml LB-Medium überführt, um Übernachtskulturen für „miniprep“ Plasmidpräparationen („QIAprep spin Miniprep Kit“) zu erhalten.

DNA aus mindestens 16 einzelnen Kolonien wurde auf das Vorhandensein von shRNA in pSuper-Vektor DNA untersucht. Dies erfolgte mittels BglIII und HindIII Restriktionsanalyse. Im Falle eines positiven Klons (pSuper + shRNA) wurde ein 287 bp großes Fragment, falls die pSuper DNA keine shRNA enthält, ein 227 bp großes Fragment erwartet.

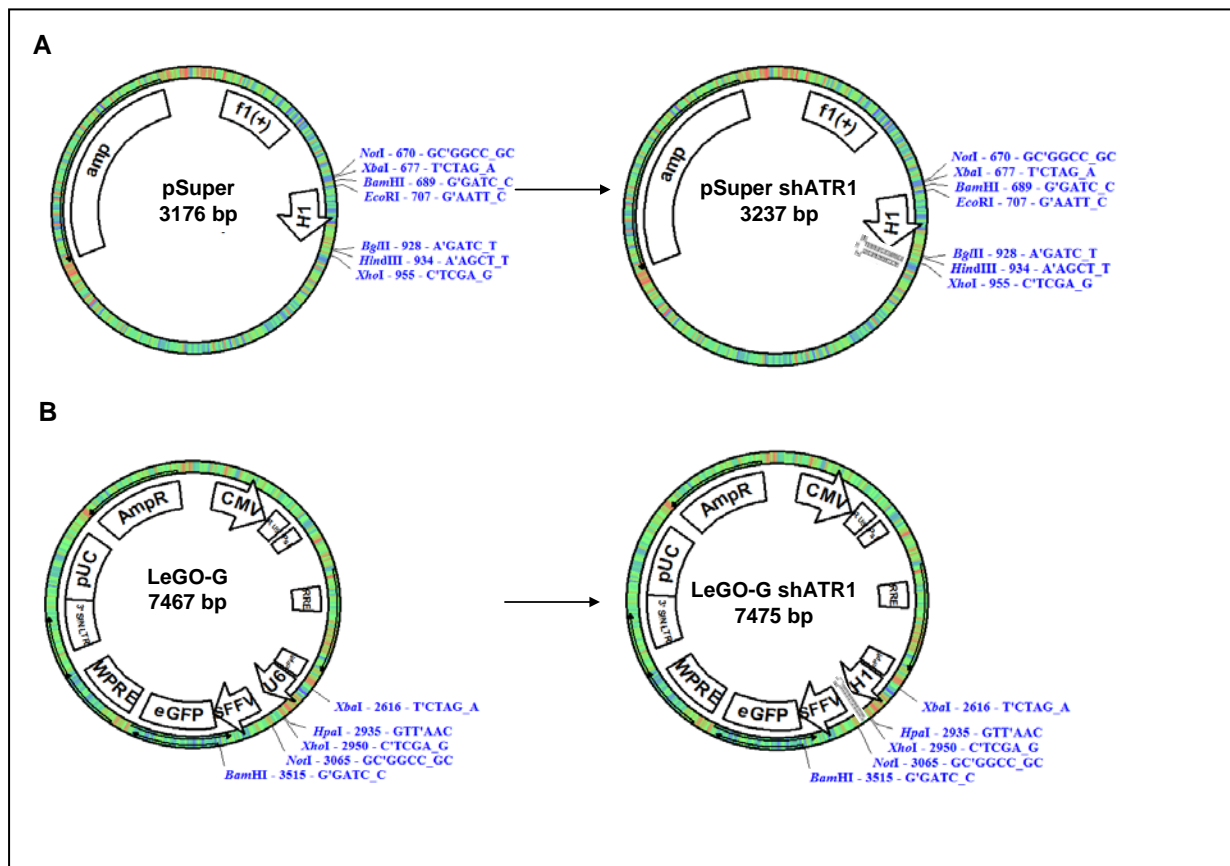
Positive Klone wurden dann in Glycerol bei -80°C eingefroren. 0,5 ml Bakteriensuspension wurde für die Impfung von 200 ml Bakteriensuspension verwendet, um größere Mengen DNA zu gewinnen („Maxiprep“).

### 3.2.1.8 Klonierung der shRNA-Kassette des rekombinierte pSuper Plasmids in lentivirale Vektoren

Die shRNA-Kassette (H1-Promotor und shRNA) wurde aus dem rekombinanten pSuper-Plasmid mit Hilfe von XbaI und XhoI in LeGO-G bzw. LeGO-V kloniert (Abb.13). Für diesen Zweck wurde sowohl das rekombinante pSuper-Plasmid als auch das LeGO-G oder das LeGO-V Plasmid mit den Restriktionsenzymen XhoI und XbaI geschnitten. Danach wurde die geschnittenen shRNA Kassette und LeGO Vektor aus dem Agarosengel eluiert, aufgereinigt, ligiert und in DH5 $\alpha$  E. coli Zellen transformiert. Die Gelelution, DNA-Ligation und Transformation wurde genau wie oben beschrieben durchgeführt. Je 50  $\mu$ l und 100  $\mu$ l der Bakteriensuspension wurden danach auf LB-Agar-Platten mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden einzelne Kolonien isoliert und in 5 ml LB-Medium überführt, um Übernachtskulturen für „miniprep“ Plasmidpräparationen („QIAprep spin Miniprep Kit“) zu erhalten.

Plasmid-DNA aus mindestens 16 einzelnen Kolonien wurde auf das Vorhandensein der shRNA-Kassette in der LeGO Vektor-DNA mittels Restriktionsanalyse untersucht.

Positive Klone wurden verwendet um große Mengen DNA („Maxiprep“) zu gewinnen, die für die Virusproduktion zu einem späterem Zeitpunkt eingesetzt wurden.



**Abb. 13: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des lentivirus-basierenden shRNA Vektors.** A) shRNA wird von gerichteter Klonierung über BglIII und HindIII Restriktionstellen in den pSuper-Vektor kloniert. B) Klonierung der shRNA-Kassette in LeGO-G oder LeGO-V lentivirus Vektor mithilfe von XbaI und XhoI Restriktionsschnittstellen.

### 3.2.1.9 Herstellung von Zellysaten

Um Zellysate für einen Immunoblot herzustellen, wurden die Zellen einmal in kaltem PBS gewaschen und zu einem Pellet zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 1x Lysepuffer resuspendiert. Es wurde ca. das 5-fache Volumen an Lysepuffer hinzugegeben und die Proben wurden für 30-Sekunden mit Hilfe eines Vortexers gemischt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Dann wurden die Proben für 5 Minuten bei 13,000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. 2 µl aus dem Überstand wurden verwendet um die Proteinkonzentration photometrisch zu ermitteln (Bradford, Kap. 3.4.1.11). Die Pellets wurden abschließend resuspendiert und 5x SDS-Ladungspuffer hinzugegeben. Nach 5 Minuten aufkochen (100 °C) wurden die Proben bis zur ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

### Lösungen für die Herstellung von Zelllysaten

1x Lysepuffer:	2x Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, Ph 7,4, 250 mM NaCl und 5 mM EGTA) wird mit ddH <sub>2</sub> O zu 1xLysepuffer verdünnt dann werden NP-40, PMSF und Aprotinin frisch hinzugegeben (0,1% NP-40, 0,5 mM PMSF und 5 µg/ml Aprotinin).
SDS-Ladepuffer	250 mM Tris/HCl, pH 8,0, 12% SDS, 40% (v/v) Glycerin, 0.6% Bromphenolblau, 5%, β-Mercaptoethanol
10X PBS	91,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 23,5 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O

#### **3.2.1.10 Herstellung von unlöslichem bzw. löslichem Zelllysat**

Um den Chromatingebundenen Anteil an MGMT-Protein im Immunoblot zu detektieren, wurden durch differentielle Wasch und Lyseschritte unterschiedliche Fraktionen, wie von Mendez und Stillman, (2000) beschrieben, isoliert.  $3 \times 10^6$  32D-Zellen wurden 2 Mal mit kaltem PBS gewaschen und pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 200 µl Lösung A resuspendiert (s. U). Triton-X-100 wurde dann zu einer Endkonzentration von 0,1% hinzugefügt und die Zellen wurden für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Zytoplasmatische Proteine (S1) wurden von Zellkernen (P2) durch 4 minütige Zentrifugation bei 1300g getrennt. Die isolierten Zellkerne wurden einmal mit Lösung A gewaschen und anschließend mit 200 µl Lösung B (s. U) lysiert. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wurden lösliche Nukleare Proteinen (S2) von Chromatin gebundenen Proteinen (P2) durch 4 Minuten zentrifugieren bei 1700g getrennt. Das so gewonnene Chromatin wurde einmal mit Lösung B (s. U) gewaschen und anschließend für 1 Minute bei 10,000g zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Chromatin in 100 µl Lösung B (s. U) resuspendiert und mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt. Dann wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Alle isolierten Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert, bis sie im Immunoblot eingesetzt wurden.

### Lösungen für Chromatinfractionierung

Lösung A: 10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,34 M Sucrose, 10 % Glycerol, 1 mM DTT, 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>, Proteaseinhibitoren.

Lösung B: 3 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 1 mM DTT

### 3.2.1.11 Photometrische Bestimmungen der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde spektrometrisch mit Hilfe der Bradford Methode bestimmt (Bradford *et al.*, 1976). Diese Methode basiert auf der Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250, welcher an Proteine binden kann. Diese Bindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von Rot (465 nm) nach Blau (595 nm). Die Erhöhung der Absorption wird bei 595 nm gemessen. Sie korreliert in einem bestimmten Konzentrationsbereich mit der Proteinmenge der Probe. Diese kann anhand einer Eichgerade, die zuvor mit bekannten BSA Proteinmengen erstellt wurde, ermittelt werden.

### 3.2.1.12 Detektion von Proteinen mittels Immunoblot

In dieser Arbeit wurde der Immunoblot durchgeführt um die Proteinmenge der untersuchten Proteine zu analysieren. Darüber hinaus wurde mit Hilfe von hochaffinen Antikörpern, die gegen spezifische Phosphorylierungsstellen gerichtet sind, die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden in den untersuchten Zellsystemen quantifiziert.

#### 3.2.1.12.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Für die Trennung der Proteine wurden 4-15 %ige Gradientengele („Precast polyacrylamid tris-HCl gels“, BioRad) verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C gekocht und jeweils 15-30 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei Spannung von 80-100 Volt für 1,5 h in 1x Laufpuffer durchgeführt. Die Proteingele wurden anschließend für einen Proteintransfer weiter verwendet oder mit Coomassie-Brilliantblue-Färbelösung gefärbt.

#### Lösungen für SDS-PAGE

10x SDS-Laufpuffer:	0,25 M TRIS-Base	30,3 g
	1,92 M Glycine	144,0 g
	1 % SDS	10 g
	<i>Aqua dest.</i> bis 1000 ml auffüllen; bei Raumtemperatur lagern	

### 3.2.1.12.2 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte elektrophoretisch nach der Methode von Towbin (Towbin *et al.* 1979). Der Proteintransfer aus den 0,5 mm dicken Gelen wurde in einer Trans-Blot-Cell (BioRad) in Blotpuffer für 2 h bei 60 Volt und 4 °C durchgeführt. Der Erfolg des Transfers konnte anhand des aufgetragenen gefärbten Markers oder einer Ponceau S Färbung beurteilt werden.

#### Lösungen für Proteintransfer

10x Transferpuffer:	0,25 M TRIS-Base	30,0 g
	1,92 M Glycin	144,1 g
	1 % SDS	30,0 g
	<i>Aqua dest.</i> ad 1000 ml	

1x Transferpuffer (1000 ml):	200 ml Methanol
	100 ml 10x Transferpuffer
	<i>Aqua dest.</i> ad 1000 ml

### 3.2.1.12.3 Antikörperinkubation und Detektion

Unspezifische Bindungsstellen der geblotteten Nitrozellulosemembran wurden durch 1 h Inkubation in 5 % Magermilch/TBST bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper, welche in der Regel 1:1000 in 5% Milch/TBST oder in 5% BSA/TBST verdünnt wurde, übernacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wird die Membran 3 Mal für je 5 Minuten mit TBST gewaschen. Im Folgenden Schritt wurde die Nitrozellulosemembran in 5 % Milch/TBST mit HRP-gekoppelten-Sekundärantikörpern für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die Membran erneut 3 Mal für 5 Minuten in TBST gewaschen.

Für die Detektion der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran mit 2 ml ECL-Reagenz bei Raumtemperatur für 1 Minute inkubiert. Mit Hilfe eines elektronischen Dokumentationsystems („Las3000“) wurde anschließend die Chemilumineszenz der Membran erfasst.

#### Lösungen für Blockierung der Membran und Inkubation mit Antikörpern:

10x TBS:	250 mM Tris
	1,5 M NaCl
	20 mM KCl
	<i>Aqua dest.</i> Ad. 1000 ml, pH 7,4



---

1x TBST:	100 ml 10x TBS 900 ml ddH <sub>2</sub> O 0,1 % Tween-20
5 % Milch	5 g Milch in 100 ml 1x TBST

#### **3.2.1.12.4 „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 Minuten mit Stripping-Puffer („Restore Western Blot Stripping Buffer“) bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurde die Membran 2 Mal in TBST für jeweils 5 Minuten gewaschen. Danach wurde die Membran mit 5 % Milch/TBST geblockt und erneut mit Primärem bzw. Sekundärem Antikörper inkubiert.

#### **3.2.1.13 Immunofluoreszenzfärbung**

Bei der Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden Antikörper mit gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffen verwendet, die bei Bestrahlung mit einer bestimmten Wellenlänge in einer anderen definierten Wellenlänge abstrahlen und so im Mikroskop sichtbar und voneinander unterscheidbar sind.

Auf diese Weise lässt sich ein Epitop (Protein oder DNA-Addukt) sichtbar machen und erlaubt somit eine Lokalisation des Moleküls auf mikroskopischer Ebene.

##### **3.2.1.13.1 MGMT Immunofluoreszenzfärbung**

Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser ausplattiert und für 24h kultiviert. Die intrazelluläre MGMT-Färbung wurde dann mit Hilfe von „Becton Dickinson Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution Kit“ durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen 2 Mal mit kaltem PBS gewaschen, dann erfolgte ein 20 minütiger Fixierung/Permeabilisierung Schritt. Die fixierten/permeabilisierten Zellen wurden dann mit 1x BD Waschpuffer für 5 Minuten gewaschen. Im Folgenden Schritt wurden die Zellen für eine Stunde mit dem MGMT-Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert (1:500 in BD-Wash-puffer verdünnt). Anschließend erfolgten drei jeweils 5 minütige Waschschrte mit BD-Waschpuffer. Um die gebundenen Primärantikörper zu visualisieren, wurden die Zellen dann mit Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper (Cy3-gekoppelte Ziege-anti-Maus, 1:200 in BD-Waschpuffer) für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um

unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurden die Proben für 5 Minuten mit BD-Waschpuffer gewaschen, bevor sie mit DAPI-haltigen Eindeckmittel (Vectrashield with DAPI) eingedeckelt wurden. Die Objektträger wurden mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 200M Mikroskops und einer Hamamatsu Kamera aufgenommen.

#### **Primär- und Sekundärantikörpern:**

Maus- $\alpha$ -MGMT	1:500
Cy3-konjugierter Ziege- $\alpha$ -Maus	1:200

#### **3.2.1.13.2 Detektion von DNA-Reparatur-Foci mittels Immunofluoreszenz**

Mit Hilfe dieser Methode lassen sich Zellkernareale im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen, an denen Proteine akkumulieren. Für diesen Zweck wurden  $1 \times 10^5$  Zellen mit kaltem PBS gewaschen, in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert und auf Adhesion-Objektträgern (Quarix) getropft. Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend noch einmal mit PBS gewaschen. Für die Permeabilisierung folgte eine 10 minütige Inkubation mit 0,3 % Triton-X-100 in PBS. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 3 % Milch/PBS-Lösung für eine Stunde geblockt, und mit dem Primärantikörper entweder für eine Stunde bei 37 °C ( $\gamma$ H2AX, RAD51), oder, im Fall von Phospho-CHK-1Ser317, Übernacht bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundener Antikörper oder unspezifische Bindungen wurden anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS reduziert. Weiter erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit dem entsprechenden, an den Farbstoffgekoppelten Sekundärantikörper. Schließlich wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen, bevor sie mit DAPI-haltigen Eindeckmedium eingedeckt wurden. Die Objektträger wurden mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 200M Mikroskops und einer Hamamatsu Kamera aufgenommen. Von jeder Färbung wurden drei unabhängige Auszählungen von jeweils mindestens 50-100 Zellkernen durchgeführt bei denen der Anteil an nukleären Foci mehr als 5 betrug.

#### **Lösungen für Immunofluoreszenzfärbung**

8% PFA	4 g PFA 50 ml PBS 1 tropfen Konz. NaOH, 1h 65°C. pH 7,4
IF-Puffer	3 % BSA 0,05 % Triton-X-100 0,05 % Natriumazid in PBS

## Primär- und Sekundärantikörper

Alle Antikörper würden wie folgenden dargestellt wird in IF-Puffer verdünnt

### Primärantikörper:

Maus- $\alpha$ - $\gamma$ H2AX	1:500
Kaninchen- $\alpha$ -Phospho-CHK1-Ser317	1:200
Kaninchen- $\alpha$ -RAD51	1:200

Sekundärantikörpern:

Alexa 488-konjugierter Ziege- $\alpha$ - Maus	1:200
Alexa 488-konjugierter Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	1:200
Cy3-konjugierter Ziege- $\alpha$ - Maus	1:200
Cy3-konjugierter Ziege- $\alpha$ - Kaninchen	1:200

### 3.2.1.13.3 Intrazelluläre Detektierung von phospho-CDC2-Protein

Die Färbung wurde genau wie im Kap. 3.2.1.13.2 dargestellt ist, durchgeführt.

### Primär- und Sekundär-Antikörper:

Maus- $\alpha$ -phospho-CDC2	1:500
Cy3-konjugierter Ziege- $\alpha$ - Maus	1:200

### 3.2.1.14 Immunzytologischer Assay (ICA)

Nach der *in vitro* Alkylierung mit Alkylanzien wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in PBS resuspendiert und auf speziell beschichtete „Immunoselect“ Objektträger aufgebracht. Nach Trocknung wurden die Proben bei -20 °C zur weiteren Bearbeitung gelagert. Für den Immunzytologischen Assay (Seiler *et al.*, 1993, Buschfort-Papewalis *et al.*, 2002) wurden die Proben für 30 Minuten bei -20 °C in Methanol fixiert und in PBS rehydriert. Die DNA wurde in Alkali-Lösung für 5 Minuten entspiralisiert und so für die Antikörper zugänglich gemacht. Nach Waschen in PBS erfolgte ein Pepsin-Verdau (60  $\mu$ g/ml in PBS/HCl, pH6; 10 Minuten; 37 °C) und nach wiederholtem Waschen ein Proteinase K-Verdau (40  $\mu$ g/ml in Proteinase K-Puffer; 10 Minuten; 37 °C). Danach wurden die Proben erneut in Glycin/PBS für 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 5 % Magermilchpulver in PBS blockiert (30 Minuten). Darauf erfolgte eine Inkubation mit den Primärantikörpern anti-O<sup>6</sup>-meG-Addukt-mAK (EM2-

3) für 16 h bei 4 °C in einer Feuchtkammer. Die Zellen wurden nun für 5 min in PBS und für weitere 5 min in PBS+ (PBS/0,25% Tween) gewaschen und erneut mit Magermilchpulver behandelt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Cy3-konjugierter Ziege- $\alpha$ -Maus) für 1 h bei 37 °C. Zum Schluss erfolgte die Anfärbung der DNA mit DAPI (1  $\mu$ g/ml in PBS) für 30 min und die Eindeckung der Präparate (Vectrashield).

10 x PBS	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,3 M NaCl pH 7,5
Alkali-Lösung	60 % (v/v) 70 mM NaOH 140 mM NaCl 40 % (v/v) Methanol
Proteinase K-Puffer	20 mM Tris 2 mM CaCl <sub>2</sub> pH 7,5
Glycin/PBS	0,2 % (w/v) Glycin in PBS
PBS+	0,25 % (v/v) Tween 20 in PBS

### 3.2.1.15 Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay)

DNA-Strangbrüche wurden mit Hilfe der Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) bestimmt (Tice *et al.*, 2000). Um die Analyse mit kleinen Zellzahlen durchführen zu können ( $2 \times 10^4$  Zellen), wurde der Assay nach McNamee *et al.*, (2000) modifiziert. Hierzu wurden 8-Loch Zellkulturkammern („*Culture slides*“) von ihren Objektträgern gelöst und auf GelBond Folien geklebt. Nach Exposition bzw. zu verschiedenen Reparaturzeitpunkten wurden Aliquots mit Zellen in 45  $\mu$ l LMP-Agarose (0,75 %) in PBS aufgenommen und in eine Kammer auf die Folie aufgetragen. Nach Erstarren der Agarose konnte die Kammer entfernt werden und die Gele wurden im Lyse-Puffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die DNA wurde danach für 15 min bei Raumtemperatur in Elektrophorese-Puffer denaturiert und unter den gleichen Bedingungen elektrophoretisch getrennt (20 min; 4 °C; 1,5 V/cm). Nach Neutralisation in Tris-Puffer (30 min; RT) wurden die Gele 20 min in Ethanol entwässert und über Nacht getrocknet. Die DNA wurde mit SYBRGreen (1:10000 in

TAE-Puffer) angefärbt.

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
TAE-Puffer	2 M Tris/Acetat pH 7,9 50 mM EDTA

### 3.2.1.16 Quantitative Bildanalyse und Statistik

Fluoreszenzsignale der Kern-DNA einzelner Zellen wurden mit Hilfe eines Zeiss Axioplan Fluoreszenzmikroskops gemessen, mit einer digitalen Kamera aufgenommen und einem Mehrparameter Bildanalyzesystem (ACAS) zugeführt. O<sup>6</sup>-meG-Addukte konnten auf Einzelzellebene durch Normalisierung der Fluoreszenzsignale für den DNA-Gehalt der gleichen Zelle gemessen werden. Zur Messung des relativen Gehalts an reparaturinduzierten DNA-Strangbrüchen mit dem Comet Assay wurde das Olive Tail Moment (OTM) eingesetzt, welches das Produkt aus dem DNA-Gehalt im Kometenschweif und der Länge des Schweifes beschreibt. (Olive *et al.*, 1990). Es wurden jeweils mindestens 100 Zellen ausgewertet.

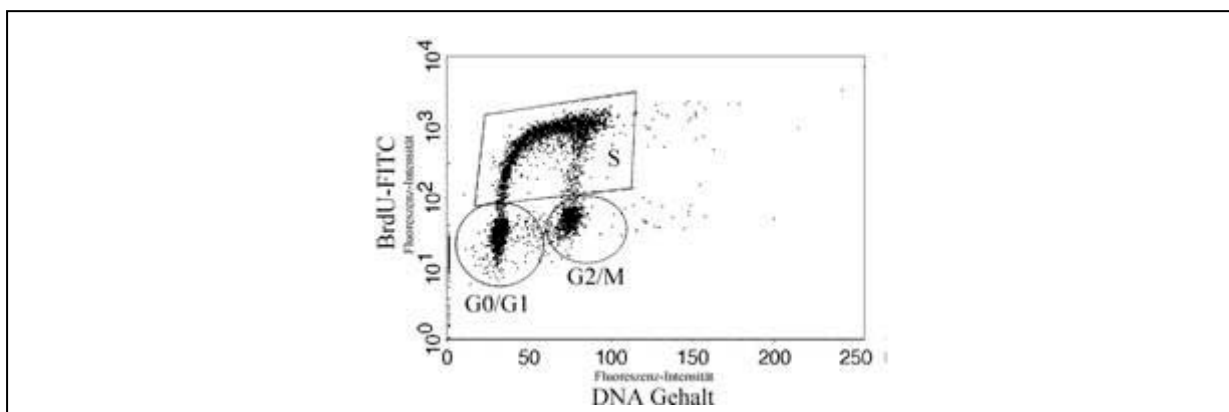
### 3.2.1.17 Bestimmungen der Apoptose mittels Annexin-V-Assay

Mit Hilfe dieser Methode lassen sich lebendige Zellen von apoptotischen- oder nekrotischen Zellen unterscheiden. Zellen die Annexin-V/7AAD negativ sind stellen die lebende Fraktion innerhalb der Probe dar. Im Gegensatz dazu stellen Zellen, die Annexin-V+ aber 7AAD- sind, die frühe apoptotische Fraktion dar. Diese Zellen haben Phosphatidylserin externalisiert, aber sie besitzen eine intakte Zellmembran, wodurch eine Färbung mit dem DNA-Farbstoff 7AAD verhindert wird. Nekrotische Zellen weisen zusätzlich zur Annexin-Positivität eine 7AAD Färbung auf. Die Färbung erfolgte nach Herstelleranweisungen mit dem „Annexin V-APC Apoptosis Detection Kit I“ (BD). Hierfür wurden die behandelten Zellen 2 Mal mit PBS gewaschen, in

100  $\mu$ l 1 x „Annexin-binding“-Puffer resuspendiert und anschließend mit 5  $\mu$ l Annexin V-APC-Antikörper und 5  $\mu$ l 7AAD für 15 min angefärbt. Abschließend wurden 400  $\mu$ l des 1x Annexin-binding“-Puffer hinzugefügt und die Proben innerhalb von einer Stunde am Durchflusszytometer analysiert.

### 3.2.1.18 Zellzyklusanalyse mittels BrdU/7AAD-Färbung

Diese Methode ermöglicht es durch Bestimmung des Anteils der Zellen, die sich in der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) befinden, Aussagen über die Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen zu treffen. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Zellen in einer Kultur mit Bromodeoxyuridin (BrdU) versetzt werden. BrdU wird dann anstelle von Thymidin während der DNA-Neusynthese in der S-Phase in die DNA eingebaut. Durch eine Färbung mit einem Antikörper gegen BrdU sowie mit dem DNA-Farbstoff 7AAD lassen sich die Zellzyklus-Phasen im Durchflußzytometer darstellen.



**Abb. 14: Zellzyklusanalyse mittels BrdU/DNA-Färbung.** Diese Art der durchflusszytometrischen Analyse erlaubt die  $G_0/G_1$ -, S- und  $G_2$ -Phase der Zellzyklus zu untersuchen. Zellen die sich in  $G_0/G_1$  befinden, zeigen einfachen DNA-Gehalt und sind BrdU negativ. Hingegen dazu sind S-Phase Zellen BrdU positiv.  $G_2$ -Zellen sind durch doppelte DNA-Gehalt und negative BrdU-Färbung gekennzeichnet.

Für die Färbungen wurde das „APC-BrdU Flow Kit“ der Firma BD verwendet und erfolgte nach Hersteller-Protokoll, welches hier kurz dargestellt wird.  $1 \times 10^5$  Zellen wurden in eine unbeschichtete 48-Vertiefung-platte ausgesät und für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  mit  $10 \mu\text{M}$  BrdU behandelt. Danach wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, und bei 1500 UPM für 5 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden mit 100  $\mu$ l kaltem Cytifix/Cytoperm Puffer resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 1 ml 1x BD Waschpuffer und anschließender Abzentrifugation gewaschen. Darauf folgte ein weiterer Permeabilisierungsschritt durch Zugabe von BD Cytoperm Plus Puffer für 5 Minuten auf Eis. Es folgte ein weiterer Waschschrift und eine 10 minütige Refixierung

mittels BD Cytotfix/Cytoperm Puffer. Abschließend wurden die Proben für eine Stunde bei 37 °C mit DNase behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen für 20 Minuten mit APC-gekoppelten- $\alpha$ -BrdU Antikörper (1:50) bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 1 ml 1x Waschpuffer hinzugegeben und die Zellen wurden abzentrifugiert um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Abschließend wurden die pelletierten Zellen in 20  $\mu$ l 7AAD-Lösung resuspendiert und mit 500  $\mu$ l BD-Waschpuffer aufgefüllt. Die Proben wurden direkt am Durchflusszytometer gemessen.

### **3.2.2 Zellbiologische Methoden**

#### **3.2.2.1 Kultivierung von Zellen**

Alle verwendeten Primärzellen und Zelllinien wurden in entsprechenden Zellkulturgefäßen mit Kulturmedium bei 37°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Adhärente Zellen wurden regelmäßig (alle 2 bis 3 Tage) oder spätestens beim Erreichen der Konfluenz in ein neues Kulturgefäß überführt. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit ca. 5 ml PBS gewaschen. Durch Zugabe einer den Zellrasen bedeckenden Menge einer Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung und einigen Minuten Inkubation bei RT wurden die Zellen vom Gefäßboden abgelöst. Der tryptische Verdau wurde durch die Zugabe von Medium mit 10 bis 20 % FKS abgestoppt. Ein Aliquot, typischerweise 1/3 bis 1/20 der Zellen, wurde nach Resuspendierung in ein neues mit Gelatine beschichtetes Kulturgefäß mit frischem Kulturmedium überführt. Zur Beschichtung mit Gelatine wurde der Boden des Kulturgefäßes mit 0,2 %iger Gelatine in PBS bedeckt, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend abgesaugt. Suspensionszellen (Jurkat-, 32D-Zellen) wurden hingegen in unbeschichteten Zellkulturgefäßen mit entsprechendem Kulturmedium behalten. 2-3 Mal pro Woche wurde 1/5 der Zellen in ein neues Zellkulturgefäß überführt und frisches Medium hinzugegeben.

Zelllinie und Primärzellen	Medium
293T	<p><b>DMEM high Glucose</b></p> <p>10% FKS 1% Penicilin/Streptomycin 2% Glutamin 20 mM Hepes</p>
32D-Zellen	<p><b>RPMI 1640</b></p> <p>10% FKS 1% Penicilin/Streptomycin 2% Glutamin 20 ng/ml IL3</p>
L1210, Jurkats	<p><b>RPMI 1640</b></p> <p>10% FKS 1% Penicilin/Streptomycin 2% Glutamin</p>
Primäre humane T-Zellen (CD34 <sup>-</sup> ) aus Nabelschnurblut	<p><b>RPMI 1640</b></p> <p>15% FKS 1% Penicilin/Streptomycin 2% Glutamin 20 ng/ml IL2 5 µg/ml PHA-P</p>
Primäre humane hämatopoetische Vorläufer-/Stamzellen (CD34 <sup>+</sup> ) aus Nabelschnurblut bzw. primäre murine hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Lin <sup>-</sup> )	<p><b>IMDM</b></p> <p>10% FKS 1% Penicilin/Streptomycin 2% Glutamin 100 ng/ml SCF 100 ng/ml FLT-3 100 ng/ml TPO</p>



### 3.2.2.2 Gewinnung von primären humanen hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>) bzw. Lymphozyten (CD34<sup>-</sup>)

Zunächst wurden mononukleäre Zellen mittels Ficoll Dichtegradientenzentrifugation aus gespendetem Nabelschnurblut isoliert. Eine Nabelschnurblutprobe umfasste in der Regel ein Volumen von ca. 50-80 ml und wurde 1:1 mit PBS verdünnt. Je 30 ml verdünntes Blut wurden vorsichtig auf 15 ml Ficoll geschichtet und für 25 min bei 1500 UPM zentrifugiert. Die Interphase, welche die mononukleären Zellen enthält, wurde entnommen und 2 Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml PBS aufgenommen und gezählt. Die hämatopoetischen Stamm/vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>) wurden hieraus mittels magnetischer Zellseparierung nach Angaben des Herstellers isoliert („EasySep“). Das Prinzip der magnetischen Zellseparierung beruht darauf, dass zunächst spezifisch auf den anzureichernden Zellen exprimierte Oberflächenmoleküle (CD34) mit Antikörpern markiert werden. Diese Antikörper werden in einem zweiten Schritt mit paramagnetischen Eisenkügelchen („microbeads“) konjugiert. Die so mit „Microbeads“-Antikörper markierten Zellen lassen sich über ein starkes Magnetfeld effizient und schonend anreichern. Die Reinheit der Proben wurde anschließend durchflusszytometrisch nach Markierung mit PE- bzw. FITC-gekoppeltem CD34-Antikörper bestimmt. In der Regel betrug die Reinheit der CD34<sup>+</sup> Zellen 85 - 95%. Die CD34 negative Zellfraktion (Durchfluss) wurde verwendet um T-Lymphozyten aus demselben Nabelschnurblut zu erhalten.

#### Lösungen für Isolation von CD34+ Zellen

Isolationspuffer	PBS
	2% FKS
	1 mM EDTA

### 3.2.2.3 Stimulation humaner hämatopoetischer Primärzellen mit Zytokinen

Immunomagnetisch aufgereinigte CD34<sup>+</sup> Zellen wurden in Stimulationsmedium mit den Wachstumsfaktoren SCF, FLT3 und TPO (je 100 ng/ml) für 72-96 h bei 37 °C in H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre und 5 % CO<sub>2</sub> stimuliert und kultiviert. Die Verwendung dieses Stimulationsprotokoll erlaubt die *ex vivo* Expansion von hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen. Die differenzierten Lymphozyten (CD34<sup>-</sup>) wurden in einem weiteren Stimulationsmedium mit den Wachstumsfaktoren IL2 (20 ng/ml) und PHA-P

(5 µg/ml) in 6-Vertiefung-Zellkulturplatten aufgenommen und für 72h bei 37 °C in H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre und 5 % CO<sub>2</sub> stimuliert. Die Stimulation von CD34<sup>+</sup> Zellen mittels IL2 und dem mitogenische Lektin Phytohemagglutinin (PHA-P) fördert eine starke Proliferation von T-Zellen. Der Erfolg der Stimulation wurde durch Ermittlung der Zellzahl und einer Zellzyklusanalyse (BrdU/7AAD) festgestellt.

#### 3.2.2.4 *In vitro* Exposition gegenüber DNA-reaktiven Agenzien

Um die Chemosensitivität, DNA-Schäden, DNA-Reparatur und zelluläre Reaktionen auf die Exposition gegenüber DNA-reaktiven Substanzen zu testen, wurden die Zellen mit einer subtoxischen Dosis Temozolomide (25-300 µM), Methylnitroseharnstoff (150-300 µM) oder Hydroxyharnstoff (1 mM) in Wachstumsmedium, in H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben zur weiteren Analyse entnommen.

#### Lösungen für die *In vitro* Exposition gegenüber DNA-reaktiven Agenzien

Temozolomide (TMZ)	50 mg/ml Temozolomide in DMSO. Wurde immer frisch angesetzt.
Methylnitroseharnstoff (MNU)	100 mg/ml Methylnitroseharnstoff in DMSO (1M). Wurde bei -20°C gelagert.
Hydroxyharnstoff (HU)	0,2M Hydroxyharnstoff in IMDM-Medium. Wurde bei -20°C gelagert.

#### 3.2.2.5 Inhibition der MGMT-Aktivität durch O<sup>6</sup>-Benzylguanin (BG)

O<sup>6</sup>-Benzylguanin (BG) wurde 1990 als untoxische Inhibitor von MGMT mit IC<sub>50</sub> von 0,5 µM gegen humane MGMT und 4 µM gegen Maus MGMT identifiziert. BG inhibiert MGMT indem das Benzylmolekül an dem Cysteinrest im aktiven Zentrum des MGMT bindet. Mehrere *in vitro* und Xenograft Studien haben eine starke Sensitivierung von MGMT-exprimierenden Tumoren durch MGMT-Depletion mit BG gezeigt (Milsom & Williams, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Zellen für 90 Minuten mit 15 µM BG behandelt. Auf diese Weise konnte die Aktivität von MGMT unterdrückt und die Rolle von nicht-reparierten O<sup>6</sup>-meG-Addukten studiert werden.

O <sup>6</sup> -Benzylguanin	12.5 mM in PEG, welche bei -20°C gelagert wurde.
------------------------------	--

### 3.2.2.6 Produktion hochtitriger Lentiviraler Virusüberstände für shRNA-Experimente

Die Herstellung der lentiviralen Viruspartikel erfolgte nach der gängigen Methode der Ko-transfektion von geeigneten Produzentenzellen mit allen benötigten Plasmiden mittels Calciumphosphats (Pear *et al.*, 1993). Die Transfektionsreagenzien entstammten einem kommerziellen Kit der Firma Sigma-Aldrich. Im Einzelnen wurden 10 bis 16 h vor der Transfektion  $3 \text{ bis } 5 \times 10^6$  293T-Zellen in einer Zellkulturschale von 9 cm Durchmesser ausgesät. Eine Stunde vor der Transfektion wurde neues Medium mit  $25 \mu\text{M}$  Chloroquin auf die Zellen gegeben. Für die Transfektion wurden folgende vier Plasmide in einem Gesamtvolumen von  $500 \mu\text{l}$  Wasser ( $0,25 \text{ mM}$  Calciumchlorid) gelöst:  $10 \mu\text{g}$  Provirus-tragendes Plasmid (shRNA-Konstrukten),  $10 \mu\text{g}$  pMDLg/pRRE (*gag/pol*),  $5 \mu\text{g}$  pRSVRev (*rev*) und  $2 \mu\text{g}$  pHCMV-VSV-G (codiert VSV-Hüllprotein). Das Plasmid-Gemisch wurde tropfenweise in  $500 \mu\text{L}$  2x HEPES-Puffer gegeben, wobei zur optimalen Durchmischung mit einer Pasteurpipette Luft durch den Puffer geblasen wurde. Das Präzipitat wurde direkt in das Zellmedium getropft. Nach 6 bis 8 h wurde das Medium abgenommen und 6 ml DMEM mit  $20 \text{ mM}$  HEPES hinzugegeben. Von nun an wurde das Medium nach 24 h bzw. 48 h gewechselt und der abgenommene Kulturüberstand filtriert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Da für eine effiziente Transduktion von human Primärzellen hochtitrige virale Überstände notwendig sind, wurden die geerntete viralen Überstände mittels Ultrazentrifugation (Burns *et al.*, 1993; Costello *et al.*, 2000) 50 bis 100 fach konzentriert. Für diesem Zweck wurden die lentiviralen Überstände vorsichtig auf 5 ml 20% Sucrose Lösung geschichtet und für 90 min mit  $25,000 \text{ UPM}$  bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Dann wurde der Überstand entfernt und das Viruspellet in  $500 \mu\text{l}$  IMDM-Medium resuspendiert und aliquetiert. Die konzentrierten viralen Überstände wurden anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  eingelagert.

#### **Lösungen für Produktion hochtitriger lentivirale Virusüberstände**

25 mM Chloroquin	12, 8 mg/ 1 ml PBS
20 % Sucrose	10 g Sucrose/ 50 ml ddH <sub>2</sub> O

### 3.2.2.7 Titration lentiviraler Überstände

Der Virustiter ist ein Maß dafür wie viele Viruspartikel pro Volumeneinheit im Überstand enthalten sind. Die Titer der hergestellten Überstände wurde durch die Expression der Markergene EGFP oder Venus in transduzierten Zielzellen ermittelt. Als Zielzellen für die Titration wurden 293T-Zellen für VSV-G pseudotypisierte Überstände verwendet.

Es wurden  $5 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurde die Zellzahl pro Vertiefung bestimmt, und die Zellen wurden mit zunehmenden Verdünnungen (2  $\mu$ l, 0,2  $\mu$ l, 0,02  $\mu$ l, 0,002  $\mu$ l) der Überstände transduziert. Hierzu wurden die Zellen für 8 h mit je 500  $\mu$ l der verdünnten bzw. unverdünnten Überstände zusammen mit 8  $\mu$ g/ml Polybren inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 36 h in Kultur gehalten. Nachdem die Zellen geerntet wurden, wurden sie in PBS gewaschen und durchflusszytometrisch hinsichtlich des Anteils an EGFP<sup>+</sup>-Zellen bzw. Venus<sup>+</sup>-Zellen analysiert. Unter der Annahme einer gleichmäßigen Zellteilungsrate zwischen transduzierten und nicht transduzierten Zellen kann mit Hilfe der folgenden Formel auf die zum Zeitpunkt der Transduktion je ml Überstand enthaltenen transduzierenden Einheiten geschlossen werden:

**Titer des retroviralen Überstandes [IE/ml]=**

**Zellzahl zum Zeitpunkt der Transduktion X Anteil der EGFP+/Venus + Zellen X  
Verdünnungsfaktor**

### 3.2.2.8 Transduktion von Zelllinien mit Lentivirus-basierten shRNA Vektoren

Die Transduktion von Jurkat-Zellen mit LeGO-Lentiviralen-shRNA-Vektoren wurde auf die gleiche Weise durchgeführt wie im Kap. 2.6 beschrieben. Die Transduktion erfolgte mit  $5 \times 10^5$  ausgesäten Zellen pro Vertiefung einer 12-Lochplatte mit einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l mit 8  $\mu$ g/ml Polybren. Zur Infektion wurden, je nach erwartetem Titer 2 bis 10  $\mu$ l des konzentrierten virushaltigen Überstandes verwendet. Nach der Zugabe der Viren wurden die Zellkulturplatten eine Stunde bei Raumtemperatur und 1800 UPM zentrifugiert. 12 h später wurden die Zellen durch

5-minütige Zentrifugation mit PBS abgewaschen und in frischem Wachstumsmedium resuspendiert. Nach 48 h wurden die Transduktionsraten durchflusszytometrisch hinsichtlich des Anteils an EGFP<sup>+</sup>-Zellen bzw. Venus<sup>+</sup>-Zellen analysiert. Die Transduktionsraten lagen in der Regel zwischen 80-100%, sodass keine Isolierung von positiv transduzierten Zellen notwendig war. 72 h nach Transduktion wurden die Zellen für den experimentellen Einsatz verwendet.

### **3.2.2.9 Transduktion von primären humanen hämatopoetischen Zellen mit lentivirus-basierten shRNA-Vektoren (LeGO)**

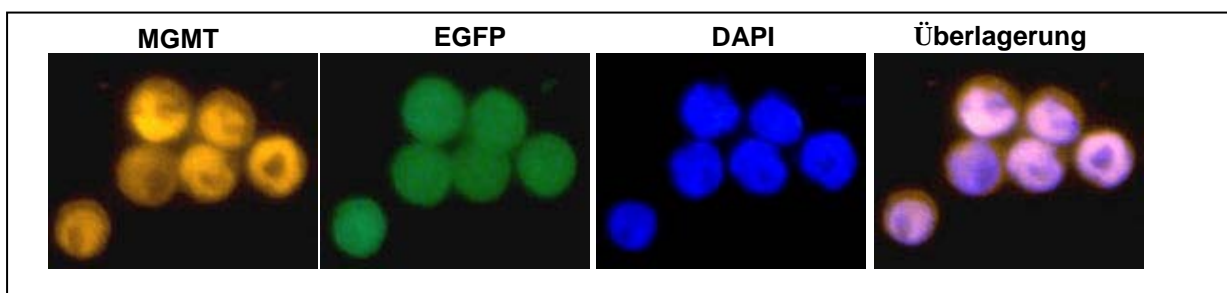
Nach der Aufreinigung wurden die CD34<sup>+</sup> Zellen auf eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und für 12 h mit Wachstumsmedium in 6-Loch Platten (2 ml pro Vertiefung) stimuliert. Zur Vorbereitung der Transduktion wurden nach den Herstellerangaben Retronektinlösung entweder für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einer Vertiefung einer 96-Lochplatte inkubiert. Die Retronektinlösung wurde abgenommen und freie Bindungsstellen der Platte wurden durch Inkubation mit BSA/PBS-Lösung für 30 min blockiert. Anschließend wurde die Vertiefung mit HBSS-Lösung gespült. Für die erste Transduktion wurden die CD34<sup>+</sup> Zellen pelletiert, in 100 µl frischen Expansionsmedium aufgenommen und auf eine Vertiefung der mit Retronektin- beschichteten 96-Vertiefung Platte überführt. Dann wurden 2-10 µl des Virusüberstands zusammen mit 1 µg/ml Protaminsulfat hinzugegeben. Nach der Zugabe der Viren wurden die Zellkulturplatten eine Stunde bei Raumtemperatur und 1800 UPM zentrifugiert. 12 h später wurde das Transduktionsmedium durch ein neues Medium, das sowohl viralen Überstand als auch Protaminsulfat enthielt, ersetzt. Nach weiteren 12 h wurden das Medium durch ein frisches Virusfreies Medium ersetzt. 48 h nach der ersten Transduktion wurden die Transduktionsraten durchflusszytometrisch analysiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Transgene Expression von MGMT<sup>P140K</sup> durch reteroviralen Gentransfer in murine L1210 Zellen

In den meisten Säugerzellen spielt das Reparaturprotein MGMT eine wichtige Rolle für die Entfernung der mutagenen und zytotoxischen O<sup>6</sup>-meG-Läsionen aus der genomischen DNA. Wie im Kapitel 1.5 dargestellt wurde, erlaubt eine transgene Expression von der BG-Resistente Mutant MGMT<sup>P140K</sup> sowohl eine erhebliche Chemoprotektion als auch einen hohen Selektionsvorteil gegenüber O<sup>6</sup>-methylierenden Medikamenten (Milsom et al., 2004).

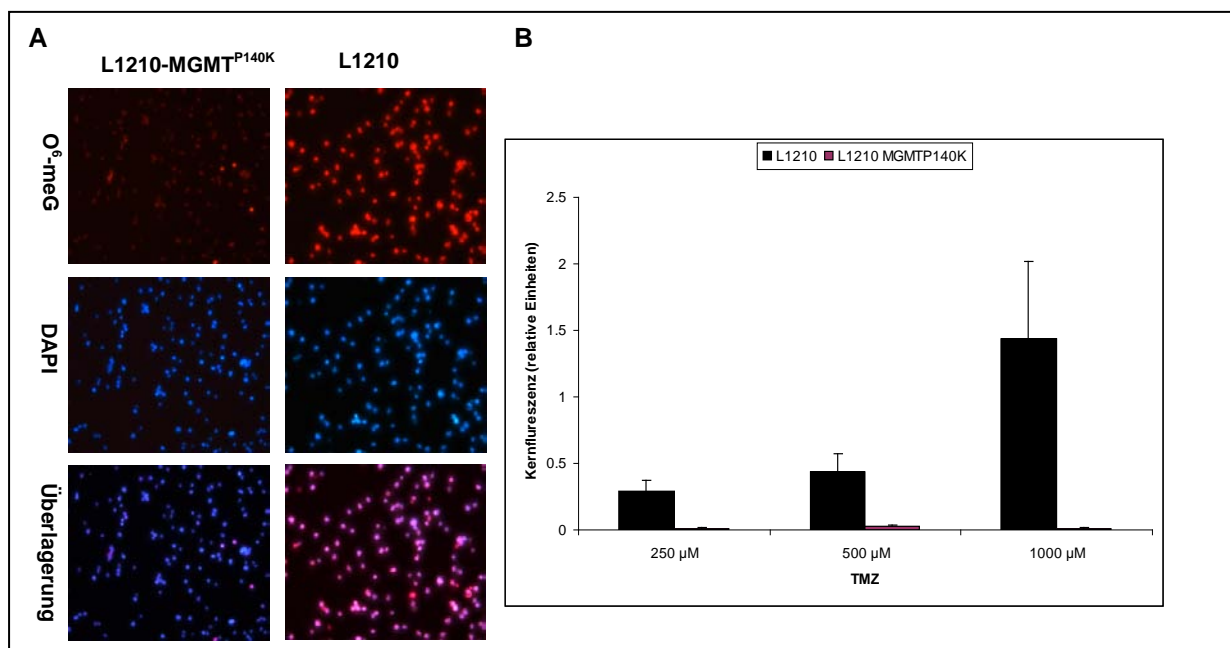
Um die MGMT-abhängige Reparatur der O<sup>6</sup>-meG Addukte in hämatopoetischen Zellen zu studieren, wurde das Protein zunächst in der murinen lymphoblastoiden Zelllinie L1210 überexprimiert. Diese Zellen weisen ähnlich wie primäre hämatopoetische Zellen eine sehr niedrige endogene Expression von MGMT auf und eignen sich deshalb gut als Modellsystem für diese Untersuchungen. Um eine stabile Expression von MGMT<sup>P140K</sup> zu erzielen, wurden die Zellen mit einem Retrovirus-basierten Vektor transduziert, der sowohl die cDNA für MGMT<sup>P140K</sup> als auch die für das "enhanced green fluorescence protein" (EGFP) enthielt (s. Material u. Methoden, Kap. 3.1.8.1). Aufgrund der relativ niedrigen Transduktionsraten von 5 %, wurden die positiv transduzierten Zellen anhand des EGFP-Signals mit Hilfe von durchflusszytometrischem Verfahren isoliert, sodass nur MGMT<sup>P140K</sup> exprimierende Zellen in spätern Analysen verwendet wurden. Dies konnte durch immunhistochemische Analysen für MGMT und EGFP gezeigt werden. Etwa 95 % der Zellen zeigten nach der EGFP-bezogenen Sortierung im FACS eine Ko-expression von MGMT<sup>P140K</sup> und EGFP (Abb. 15). Die subzelluläre Lokalisation des überexprimiertes MGMT-Proteins zeigte sich hauptsächlich im Zellkern (Abb. 15).



**Abb. 15: Nachweis des Transgen-exprimierten humanen MGMTs im Kern transduzierter L1210-Zellen.** Orange: Immunfärbung des humanen MGMT<sup>P140K</sup>; Grün: Ko-exprimiertes EGFP; Blau: DNA-Färbung mit DAPI; Die Abbildung zeigt eine repräsentative MGMT-Färbung. Nach FACS-Selektion der transduzierten Zellen konnte in ca. 95% der Zellen eine hohe MGMT<sup>P140K</sup>-Expression nachgewiesen werden.

## 4.2 Die Überexpression von MGMT in L1210-Zellen führt zu einer effizienten Chemoprotektion gegenüber O<sup>6</sup>-meG-DNA-Addukten

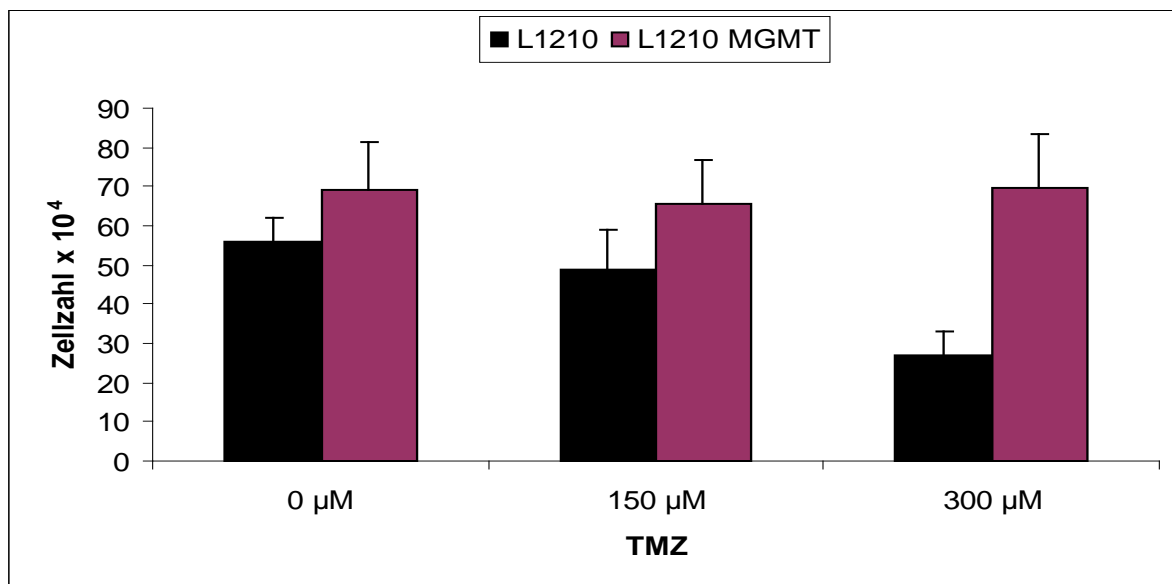
Um zu überprüfen, ob das vom Transgen exprimierte MGMT<sup>P140K</sup>-Protein seine Reparaturfunktion in den transduzierten L1210-Zellen wahrnehmen kann, wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen des alkylierenden Medikaments Temozolomide (TMZ) behandelt. Um die Aktivität der endogenen MGMT zu unterdrücken erfolgte eine Vorbehandlung mit dem pharmakologischen Inhibitor O<sup>6</sup>-Benzylguanin (BG), gegen den die transgene MGMT<sup>P140K</sup>-Mutante resistent ist (s. Kap. 1.6). Zwei Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen einer immunocytoologischen Analyse (ICA-Test; s. Material und Methoden, Kap. 3.2.1.14) für die Mengen an O<sup>6</sup>-meG in der Kern-DNA unterzogen. Dabei zeigte sich, dass der O<sup>6</sup>-meG-Adduktspiegel in Zellen die MGMT<sup>P140K</sup> exprimieren 29-fach (250 µM TMZ), 44-fach (500 µM TMZ) bzw. 144-fach (1.000 µM TMZ) niedriger waren als in nicht transduzierten Zellen (Abb. 16). Da der einzige Unterschied zwischen diesen Zellen die Überexpression von MGMT<sup>P140K</sup> war, konnte der niedrige O<sup>6</sup>-meG-Adduktspiegel durch eine effiziente Reparatur der O<sup>6</sup>-meG-Addukte mittels MGMT<sup>P140K</sup> aus der genomischen DNA erklärt werden.



**Abb. 16: Einfluss der MGMT<sup>P140K</sup>-Expression auf den O<sup>6</sup>-meG-Adduktspiegel in L1210-Zellen.** A: Repräsentative Aufnahme einer Antikörper-Färbung für O<sup>6</sup>-meG (rot) in transduzierten und nicht-transduzierten L1210-Zellen 2 h nach Behandlung mit TMZ und BG (blau: Gegenfärbung der Kern-DNA mit DAPI). B) Quantifizierung der relativen Menge an O<sup>6</sup>-meG durch ICA-Analyse in Zellen, 2 h nach Behandlung mit 15 µM BG und 250 µM, 500 µM oder 1000 µM TMZ.

Als nächste wurde untersucht, ob die durch den MGMT<sup>P140K</sup>-Gentransfer verbesserte Entfernung der O<sup>6</sup>-meG-Addukte zu einer erhöhten Chemoprotektion und somit zu einem besseren Überleben der Zellen nach Behandlung mit TMZ führte.

Zu diesem Zweck wurde der Prozentsatz der vitalen Zellen 48 h nach einer Behandlung mit 150 µM bzw. 300 µM TMZ mit einer Trypan Blau-Färbung ermittelt. Wie Abbildung 17 zeigt, war der Anteil vitaler Zellen ohne MGMT<sup>P140K</sup>-Transgen 48 h nach der Behandlung mit 300 µM TMZ um ca. 50 % reduziert während dieser Anteil bei MGMT<sup>P140K</sup>-Expression etwa konstant blieb. Das Ergebnis zeigt, dass ein MGMT<sup>P140K</sup>-Gentransfer zu einer effizienten Chemoprotektion der Zellen auch nach einer hohen TMZ-Dosis führt. Die verbesserte Chemoprotektion korreliert mit der effizienten Entfernung der zytotoxischen O<sup>6</sup>-meG-Addukte aus der genomischen DNA der lymphoblastoiden L1210-Zellen (Abb. 16).



**Abb. 17: Chemorsensitivität von parentalen und MGMT<sup>P140K</sup>-exprimierenden L1210-Zellen.** Bestimmung des Anteils vitaler Zellen durch Trypanblau-Färbung 48 h nach einer Behandlung mit BG und TMZ (0, 150 bzw 300 µM).



### 4.3 *In vivo* Chemoprotektion von murinen hämatopoetischen Stammzellen

#### 4.3.1 Inverse Korrelation zwischen MGMT<sup>P140K</sup>-Expression und *in vivo* Chemoprotektion

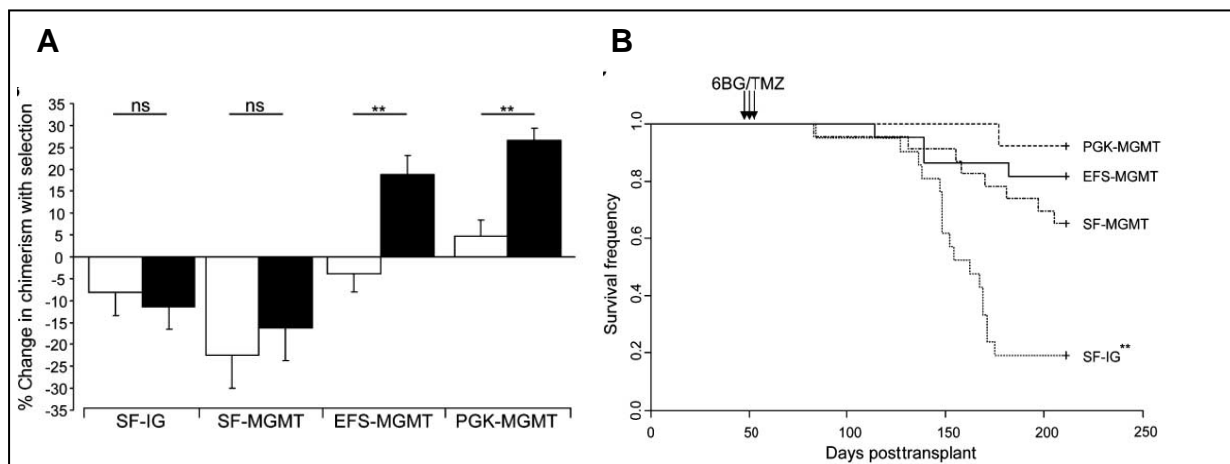
Der Retrovirus-vermittelte MGMT<sup>P140K</sup>-Gentransfer kann einerseits verwendet werden, um eine Chemoprotektion von hämatopoetischen Stammzellen gegenüber DNA-alkylierenden Substanzen, wie TMZ oder 1,3-Bis(2-Chloroethyl)-1-Nitroseharnstoff (BCNU), zu erzielen. Andererseits kann der Gentransfer auch eingesetzt werden, um genetisch korrigierte hämatopoetische Stammzellen *in vivo* zu selektionieren (Milsom *et al.*, 2008; Milsom & Williams, 2007).

Ein optimaler MGMT<sup>P140K</sup>-Expressionsspiegel spielt dabei für die *in vivo*-Situation eine wichtige Rolle, denn nur ein ausreichender Spiegel an MGMT<sup>P140K</sup> kann zu einer wirksamen Chemoprotektion der genetisch korrigierten Stammzellen führen. Um den entsprechenden Expressionsgrad zu ermitteln, der einerseits eine effiziente DNA-Reparatur bewirkt und andererseits nicht andere überlebensrelevanten Zellfunktionen negativ beeinflusst, wurden hämatopoetischen Stammzellen der Maus mit unterschiedlichen MGMT<sup>P140K</sup>-kodierenden retroviralen Vektoren transduziert.

Die drei eingesetzten Vektoren mit unterschiedlichen Promotoren (s. Material und Methoden, Kap. 3.1.8.2) erlauben eine breite Expressions-Palette sowohl für MGMT<sup>P140K</sup> als auch für das jeweilige Markergen (Venus oder EGFP); PGK-MGMT; 50-fache erhöhte MGMT-Aktivität, EFS-MGMT; 100-200-fach erhöhte MGMT-Aktivität und SF-MGMT: 1000-fach erhöhte MGMT-Aktivität in primären Knochenmarkzellen der Maus (Milsom *et al.*, 2008).

Um die Chemoprotektion gegenüber O<sup>6</sup>-alkylierenden-Medikamenten bzw. das *in vivo*-Selektionspotential für den jeweiligen Vektor in der Maus zu untersuchen, wurde ein so genannter „kompetitiver Engraftment-Test“ durchgeführt (Milsom *et al.*, 2008). Für diesen Zweck wurden murine Knochenmarkzellen mit dem jeweiligen retroviralen Konstrukt *ex vivo* transduziert. Jeweils  $4 \times 10^5$  der positiv transduzierten und durchflusszytometrisch isolierten Zellen wurden zusammen mit nicht-transduzierten (WT) Knochenmarkzellen in lethal-bestrahlte Rezipienten-Mäuse transplantiert. Sieben Wochen später wurden die Mäuse jeweils dreimal mit dem Inhibitor BG (30 mg/kg) und anschließend mit TMZ (80 mg/kg) an drei aufeinander folgenden Tagen behandelt. Schließlich wurde der Prozentsatz der GFP+ Zellen im peripheren Blut der Mäuse 15 Wochen nach der Behandlung versus 1 Woche vor der Behandlung durchflusszytometrisch ermittelt. Interessanterweise zeigten Mäuse die mit

MGMT<sup>P140K</sup> hoch-exprimierenden (SF-MGMT) Stammzellen transplantiert wurden, keine *in vivo* Chemoprotektion bzw. Selektion (Abb. 18A, Milsom *et al.*, 2008). Hingegen konnte eine stabile und eindeutige *in vivo* Chemoprotektion der Stammzellen gegenüber BG-TMZ-Behandlung in Mäusen gefunden werden, die entweder mit mittelstark- (EFS-MGMT) bzw. niedrig-MGMT<sup>P140K</sup>-(PGK-MGMT) exprimierenden Stammzellen transplantiert wurden (Abb. 18A: Milsom *et al.*, 2008). Parallel dazu zeigten Mäuse, die mit mittelstark bzw. niedrig MGMT<sup>P140K</sup>-exprimierenden Stammzellen transplantiert wurden, auch eine bessere Überlebensrate nach *in vivo* BG-TMZ-Behandlung im Vergleich zu Mäusen mit hochexprimierenden Stammzellen (Abb. 18B: Milsom *et al.*, 2008).



**Abb. 18: Chemoprotektion durch MGMT- Expression in Knochenmarkzellen der Maus nach Behandlung mit TMZ** A: Einfluss der unterschiedlichen MGMT-Vektoren, die für die Stammzell-Transduktion verwendet wurden, auf die prozentuale Änderung des Chimerismus (EGFP-Positivität) von Zellen nach Behandlung mit BG-TMZ *in vivo*. Die Prozentwerte entsprechen dem Verhältnis der EGFP+ Zellen im peripheren Blut der Mäuse 15 Wochen nach der Behandlung im Vergleich zu einer Woche vor die Behandlung (Mittelwerte von jeweils drei Mäusen); B: Der Kaplan-Meier-Graph stellt das Überleben von Mäusen dar, die mit transduzierten Knochenmarkzellen transplantiert wurden, nach einer dreimaligen BG-TMZ-Behandlung *in vivo* (Milsom *et al.*, 2008).

#### 4.3.2 Ein MGMT<sup>P140K</sup>-Gentransfer führt zur effizienten Entfernung von O<sup>6</sup>-meG aus der DNA primärer hämatopoetischer Vorläuferzellen

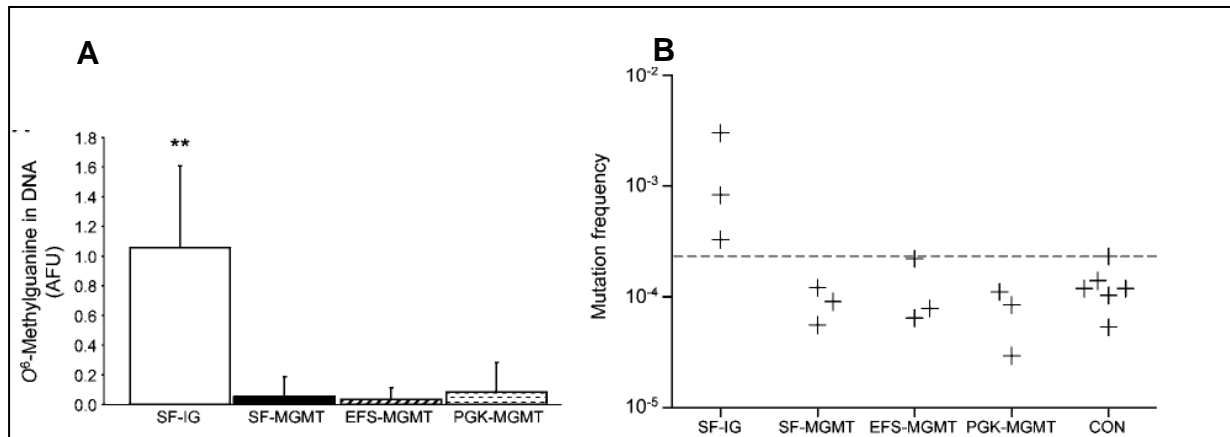
Um herauszufinden, warum eine hohe und stabile *in vivo* Chemoprotektion von murinen Stammzellen eher mit Hilfe von mittelstark bzw. schwach MGMT-exprimierenden Vektoren erreicht wurde, wurde die Menge der O<sup>6</sup>-meG-Addukte in Knochenmarkzellen transplantiert Mäuse nach akuter *in vivo* Behandlung mittels ICA-Analyse quantifiziert. Es sollte dabei untersucht werden, ob die oben gezeigte Chemoprotektion von murinen hämatopoetischen Stammzellen *in vivo* mit der Reparatur der O<sup>6</sup>-meG-DNA-Addukte in diesen Zellen korreliert. Des Weiteren sollte

die notwendige MGMT-Expression ermittelt werden, die eine ausreichende Entfernung der O<sup>6</sup>-meG-Addukte erlaubt.

Für diesen Zweck wurden Mäuse, die entweder mit MGMT<sup>P140K</sup>-exprimierenden oder mit EGFP-exprimierenden (MGMT-defizienten) Knochenmarkzellen transplantiert wurden, mit BG-TMZ 3 Tage konsekutiv behandelt. Zwei Stunden nach der letzten Behandlung wurden die Knochenmarkzellen aus diesen Mäusen entnommen und durchflusszytometrisch nach EGFP- (Kontrolle) oder Venus- (MGMT<sup>P140K</sup>) exprimierenden Vorläuferzellen (Lin<sup>-</sup>) sortiert. Dann wurde die Konzentration an O<sup>6</sup>-meG im Kern dieser Zellen mittels ICA bestimmt. Überraschenderweise waren die O<sup>6</sup>-meG-Adduktspiegel in allen MGMT<sup>P140K</sup> exprimierenden Zellen auf vergleichbarem Niveau sehr niedrig (Abb. 19; Milsom *et al.*, 2008). Es war kein Unterschied erkennbar zwischen Knochenmarkzellen, die MGMT<sup>P140K</sup> sehr hoch, mittelstark oder niedrig exprimieren. Dagegen konnte in der Kern-DNA von Zellen, die nur EGFP und kein MGMT<sup>P140K</sup> exprimieren (Kontrollvektor SF-IG), ein ca. 10-fach höherer O<sup>6</sup>-meG-Adduktspiegel festgestellt werden (Abb. 19; Milsom *et al.*, 2008).

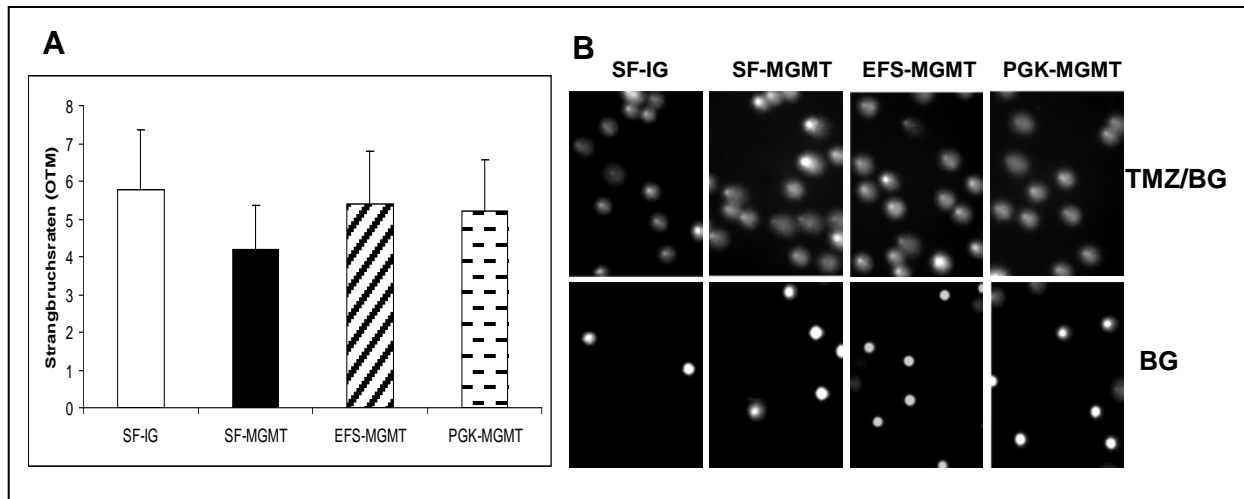
Um die potentiell mutagene Wirkung nicht-reparierter O<sup>6</sup>-meG-Addukten in hämatopoetischen Zellen zu bestimmen, wurden parallel dazu Experimente mit einem *in vivo*-Mutagenitätstest durchgeführt. Dazu wurde die Mutationsfrequenz in transduzierten Knochenmarkzellen von „Big Blue“-Mäusen bestimmt, die sechs Monate nach der letzten *in vivo*-Behandlung mit BG-TMZ isoliert wurden (Milsom *et al.*, 2008). Übereinstimmend mit dem niedrigen Adduktspiegel von O<sup>6</sup>-meG war die Mutationsfrequenz in allen Zellen, die MGMT<sup>P140K</sup> exprimierten, ähnlich niedrig, wie in Knochenmarkzellen unbehandelter Mäuse. Im Gegensatz dazu konnte eine wesentlich höhere Mutationsfrequenz in Zellen festgestellt werden, die nur EGFP und kein MGMT<sup>P140K</sup> exprimierten (Milsom *et al.*, 2008; Abb. 19).

Diese Daten weisen darauf hin, dass eine effiziente *in vivo* Selektion und Chemoprotektion der MGMT<sup>P140K</sup>-exprimierenden Knochenmarkzellen (Abb. 18) auf eine verbesserte Reparatur von O<sup>6</sup>-meG-Addukten in der DNA (Abb. 19) zurückgeführt werden kann. Weiter konnte gezeigt werden, dass das reduzierte Überleben von blutbildenden Stammzellen, die einem sehr hohen Spiegel an MGMT<sup>P140K</sup> haben, nicht an einer unvollständigeren Reparatur von O<sup>6</sup>-meG-Addukten liegt. Diese Daten deuten außerdem darauf hin, dass die Verwendung von relativ schwach exprimierenden Vektor wie PGK-MGMT ausreichend ist, um eine effiziente Chemoprotektion *in vivo* zu erzielen.



**Abb. 19: Eine effiziente Reparatur von O<sup>6</sup>-meG durch transgene MGMT<sup>P140K</sup> reduziert die Mutationsfrequenzen in Knochenmarkszellen von Mäusen nach Behandlung mit BG-TMZ.** A: Die Konzentration der O<sup>6</sup>-meG-Addukte in hämatopoetischen Vorläuferzellen wurde 2 h nach der letzten *in vivo* Behandlung der Mäuse mit BG-TMZ mittels ICA-Analyse quantifiziert. Zellen aus dem Knochenmark von 3 Mäusen derselben experimentellen Gruppe wurden jeweils gepoolt und daraus die Vorläuferfraktion (Lin<sup>-</sup>) sowie anschließend die positiv-transduzierten Zellen durchflusszytometrisch isoliert. In dieser Fraktion wurde dann immunocytoologisch (ICA-Test) die Konzentration von O<sup>6</sup>-meG in der Kern-DNA gemessen. Die angegebenen AFU-Werte („arbitrary fluorescence units“) entsprechen den Mittelwerten der Kernfluoreszenz von mindestens 100 ausgemessenen Zellen. B: Absolute Mutationsfrequenzen (im Reporter-Gen *lacZ*) in den Knochenmarkszellen von transplantierten Mäusen (Wie im 19A dargestellt wurde) 6 Monate nach dem letzten *in vivo* Behandlung mit BG-TMZ (Milsom *et al.*, 2008).

Um sicher zu stellen, dass die Menge an DNA-Schäden in allen behandelten Mäusen vergleichbar ist, wurde das Auftreten von Reparatur-induzierten DNA-Strangbrüchen mittels alkalischem *Comet*-Assay (s. Material und Methoden, Kap 3.2.1.15) 2 h nach der letzten BG-TMZ *in vivo* Behandlung untersucht. Mittels dieser Methode konnte zusätzlich ermittelt werden, ob eine MGMT<sup>P140K</sup>-Expression andere Funktionen des DNA-Reparatursystems von hämatopoetischen Zellen beeinflusst. Wie erwartet waren die DNA-Strangsbruchraten in allen untersuchten BG-TMZ-behandelten Zellproben gleich, unabhängig davon, ob MGMT<sup>P140K</sup> exprimiert wurde oder nicht (Abb. 20).



**Abb. 20: Die Menge an Reparatur-induzierten DNA-Strangbrüchen im Kern hämatopoetischer Stamm/Vorläuferzellen der Maus nach Behandlung mit TMZ ist unabhängig von einer transgenen MGMT-Expression.** Die Isolierung der Zellen aus den behandelten Mäusen erfolgte wie in Abb. 19 angegeben. Die relative Menge an DNA-Einzelstrangbrüchen wurde mit der Methode der alkalischen Einzelzell-Gelelektrophorese („Comet Assay“) ermittelt und über ein quantitatives Imageanalysesystem im Fluoreszenzmikroskop gemessen. (Einheit OTM: „Olive tail moment“)

A: Gemessene Strangbruchraten in Lin<sup>-</sup>-Zellen mit unterschiedlicher MGMT-Transgen-Expression 2 h nach der letzten *in vivo* Behandlung mit BG-TMZ. B: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellkernen im „Comet Assay“ 2 h nach der letzten BG-TMZ Behandlung (oben); unten: Kontrollzellen aus Tieren, die nur mit dem Inhibitor BG behandelt wurden.

#### 4.4 Negative biologische Konsequenzen durch sehr hohe MGMT<sup>P140K</sup>-Expression: Mechanistische Studien an 32D- und 293T- Zellen

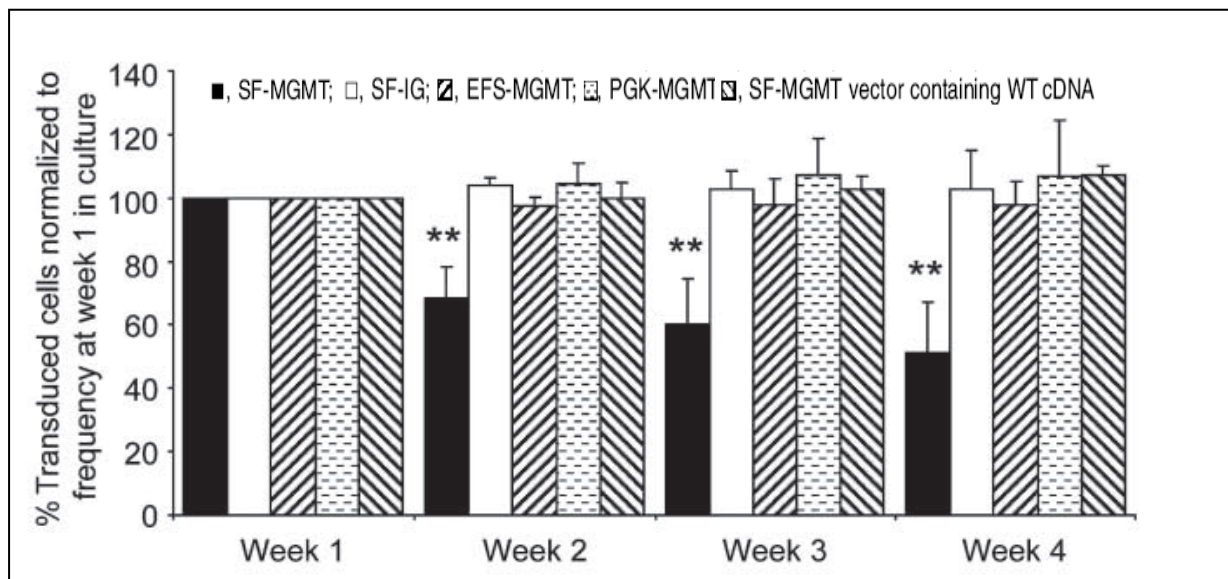
##### 4.4.1 Sehr hohe MGMT<sup>P140K</sup>-Expression in 32D Zellen führt zur Wachstumsstörung

Obwohl ein MGMT<sup>P140K</sup>-Gentransfer in hämatopoetischen Stammzellen zu einer sehr effizienten Reparatur von O<sup>6</sup>-meG aus der DNA führt, konnte in Zellen mit sehr hoher Expression des mutierten MGMT-Proteins (MGMT<sup>P140K</sup>) keine ausreichende Chemoprotektion gegenüber O<sup>6</sup>-methylierenden Substanzen beobachtet werden.

Deshalb wurde im nächsten Schritt untersucht, ob eine hohe intrazelluläre Konzentration dieses Proteins zu einer verminderten Funktionalität bei hämatopoetischen Zellen führt. Für diese Experimente wurde die murine Zelllinie 32D verwendet, weil sie Eigenschaften primärer hämatopoetischer Vorläuferzellen besitzt, einfach zu kultivieren ist und hohe Transduktionsraten aufweist.

Zunächst wurden 32D-Zellen mit Wildtyp-MGMT, den unterschiedlichen MGMT<sup>P140K</sup>-Vektoren (s.o.) oder mit einem EGFP-Vektor (ohne MGMT cDNA: SF-IG) transduziert. Untersucht werden sollte, ob eine hohe transgene Expression von MGMT<sup>P140K</sup> zu einem Wachstumsdefekt führt. Für diesen Zweck wurden der Anteil der Transgen-exprimierenden Zellen in der jeweiligen Zellkultur anhand der Fluoreszenzmarker-

Gene (EGFP oder Venus) über vier Wochen hinweg durchflusszytometrisch verfolgt. In Übereinstimmung mit der *in vivo* Situation bei hämatopoetischen Stammzellen konnten Wachstumsdefekte bei den Zellen festgestellt werden, die sehr hohe Spiegel von  $\text{MGMT}^{\text{P140K}}$  aufweisen (SF-MGMT) (Abb. 21, Milsom *et al.*, 2008). Hingegen zeigten Zellen, die das MGMT-Transgen moderat (EFS-MGMT), niedrig (PGK-MGMT) oder gar nicht exprimieren (SF-IG), keine Wachstumsdefekte im Vergleich zur Parental-Linie. Zellen, die mit einem Vektor für Wildtyp-MGMT (SF-MGMT WT cDNA) transduziert wurden und eine sehr hohe Expression der nicht-mutierten MGMT aufwiesen, zeigten ebenfalls keine Wachstumsstörung (Abb. 21). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Wachstumsinhibition spezifisch durch sehr hohe intrazelluläre Spiegel an mutiertem (BG-resistentem)  $\text{MGMT}^{\text{P140K}}$ -Protein verursacht wird.



**Abb. 21: Eine sehr hohe Expression von  $\text{MGMT}^{\text{P140K}}$  verursacht Wachstumsdefekte bei murinen hämatopoetischen 32D-Zellen.** 32D-Zellen wurden mit unterschiedlich stark exprimierenden  $\text{MGMT}^{\text{P140K}}$ -Vektoren transduziert (s. Text) und der Anteil der positiv-transduzierten Zellen (EGFP+ bzw. Venus+) in der Kultur wurde wöchentlich über vier Wochen durchflusszytometrisch bestimmt. Die einzelnen Messwerte wurden auf die Werte von Woche 1 normiert (Milsom *et al.*, 2008).

#### 4.4.2 Das $\text{MGMT}^{\text{P140K}}$ Protein zeigt eine Fehllokalisierung in transduzierten 3T3- und 32D-Zellen

Ein möglicher Grund für das reduzierte Proliferationspotential der (SF-MGMT)-transduzierten Zellen könnte in einer veränderten subzellulären Lokalisation des überexprimierten  $\text{MGMT}^{\text{P140K}}$ -Proteins im Vergleich zur Wildtyp-Form liegen. Daher wurde im nächsten Schritt die subzelluläre Lokalisation des transgen exprimierten Proteins in transduzierten 32D- und 3T3-Zellen mit Hilfe von

Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 22 u. 23) und durch Immunoblot-Analyse (Abb. 24) untersucht.

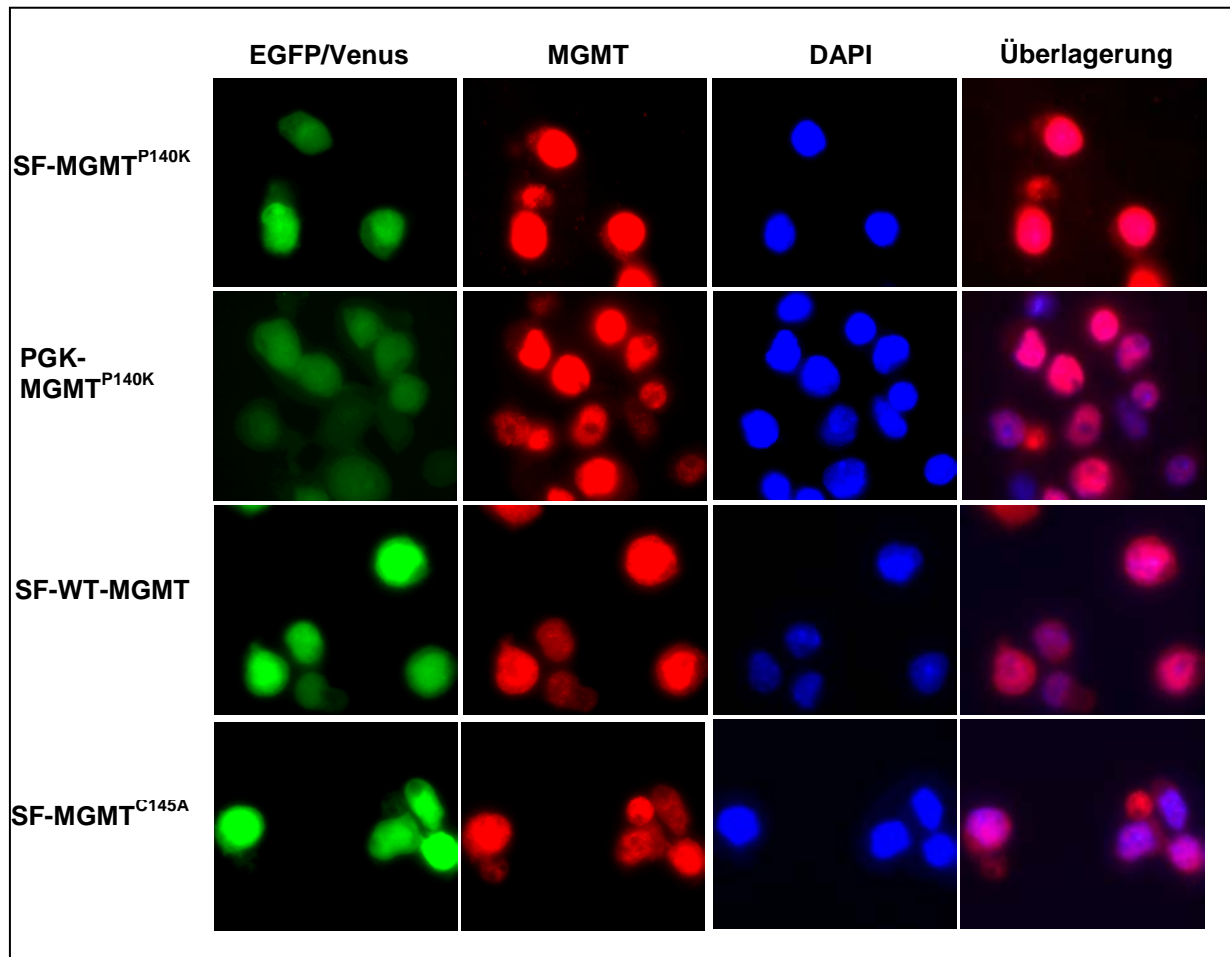
Da die Durchführung dieser Art von Immunfluoreszenz-Untersuchungen in der hämatopoetischen Zelllinie 32D (Abb. 22) wegen ihres sehr kleinen Zytoplasma-Anteils problematisch war, wurde die subzelluläre Lokalisationsstudien des transgen exprimierten MGMT-Proteins zusätzlich in der murinen Fibroblasten-Zellen 3T3 analysiert (Abb. 23). Für diese Untersuchungen wurden die Zellen sowohl mit den oben beschriebenen MGMT-Vektoren (SF-MGMT, PGK-MGMT und SF-WT-MGMT) als auch mit zwei zusätzlichen MGMT-Vektoren, SF-MGMT<sup>Y114E</sup> und SF-MGMT<sup>C145A</sup> transduziert. Die Mutation MGMT<sup>Y114E</sup> führt zu einem Protein, bei dem keine DNA Bindung zustande kommt (Kanugula *et al.*, 1995). Die Mutante MGMT<sup>C145A</sup> zeigt zwar DNA-Bindung, ist aber Reparatur-defizient (Edara *et al.*, 1999). Nach *in situ*-Färbung mit einem MGMT-spezifischen Antikörper wurde die subzelluläre Lokalisation des transgen-exprimierten MGMT am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Wie erwartet konnte das überexprimierte WT-MGMT-Protein bei beiden Zelllinien sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektiert werden (Abb. 22, 23). Demgegenüber war das MGMT<sup>P140K</sup>-Protein fast ausschließlich im Zellkern nachweisbar. Interessanterweise war die subzelluläre Lokalisation der MGMT-Mutante MGMT<sup>C145A</sup>, die zwar an DNA bindet aber nicht repariert, ähnlich der Wildtyp-MGMT sowohl nuklear als auch zytoplasmatisch. Erwartungsgemäß fand sich das MGMT<sup>Y114E</sup>-Protein mit fehlender DNA-Bindung weit überwiegend im Zytoplasma (Abb. 23).

Um die Ergebnisse der *in situ*-Färbung zu bestätigen, wurde die subzelluläre Verteilung der MGMT-Proteine in 32D-Zellen zusätzlich mit Hilfe der Immunoblot-Technik untersucht. Hierfür wurden zunächst positiv-transduzierte Zellen durchflusszytometrisch isoliert. Diese Zellen wurden dann aufgeschlossen und in unterschiedliche Zellfraktionen (lösliche zytoplasmatische Fraktion, lösliche nukleäre Fraktion, unlösliche Chromatin-gebundene Fraktion) aufgetrennt (s. Material und Methoden, Kap. 3.2.1.10).

Anschließend wurden diese Zellfraktionen in der Immunoblot-Analyse eingesetzt, um die Menge an MGMT-Protein in der jeweiligen Fraktion zu bestimmen (Abb. 24). Übereinstimmend mit den Immunfluoreszenz-Daten (Abb. 22, 23) konnte das mutierte MGMT<sup>P140K</sup>-Protein hauptsächlich in der Chromatin-gebundenen Fraktion detektiert werden. Anders war die Situation in Zellen mit hohen Expression von WT-

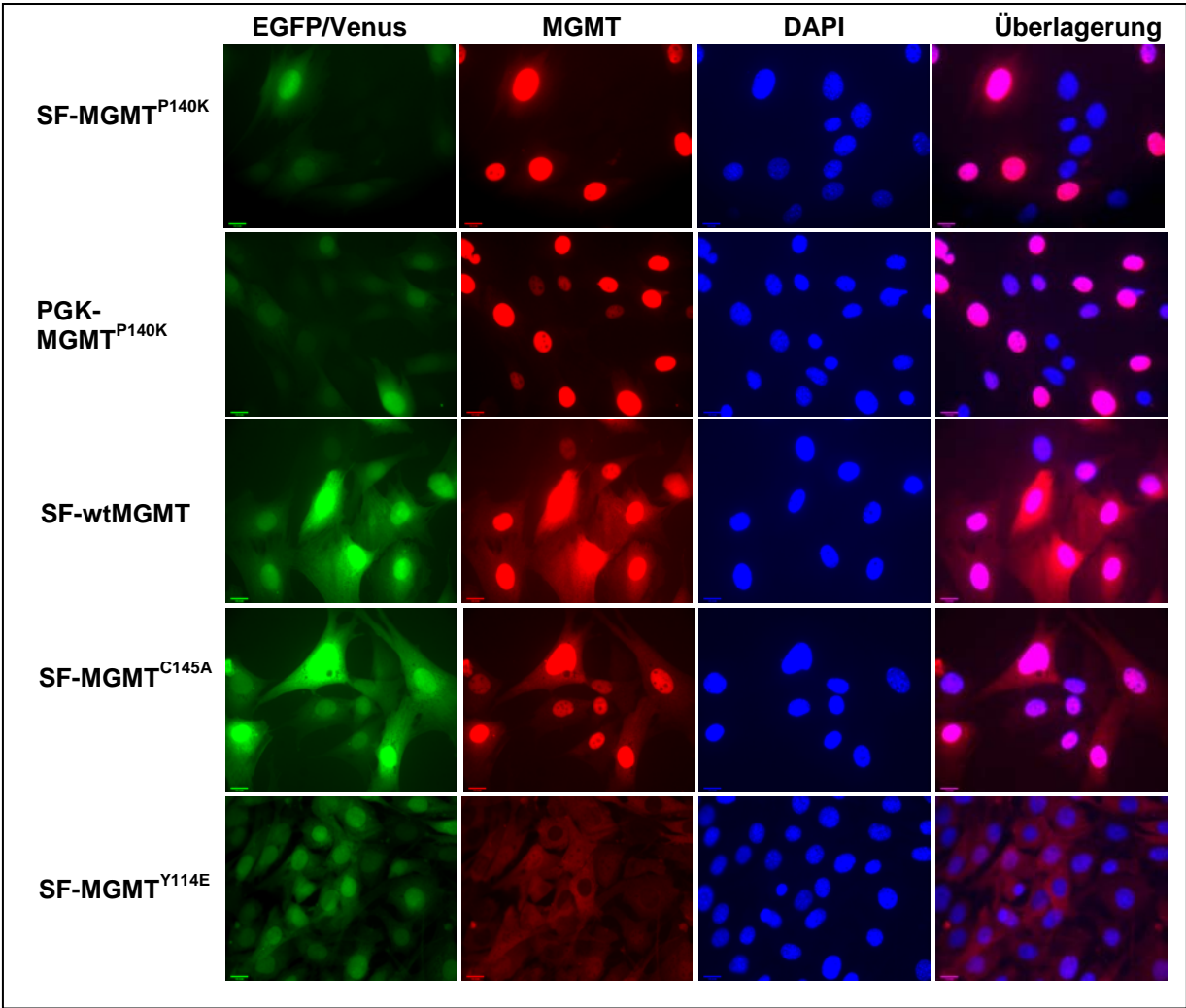
MGMT. Das Protein wurde hier zu etwa gleichen Teilen im Zytoplasma und in der Chromatin-Fraktion gefunden (Abb. 24).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass das mutierte MGMT<sup>P140K</sup>-Protein, vermutlich auf Grund verstärkter DNA-Bindung, eine veränderte subzelluläre Lokalisation aufweist und deshalb seine hohe Überexpression zur Wachstumsstörung bei 32D-Zellen (s. Kap. 4.4.1) und zu den *in vivo* beobachteten hämatopoetischen Stammzelldefekten (s. Kap. 4.3.1) führt.

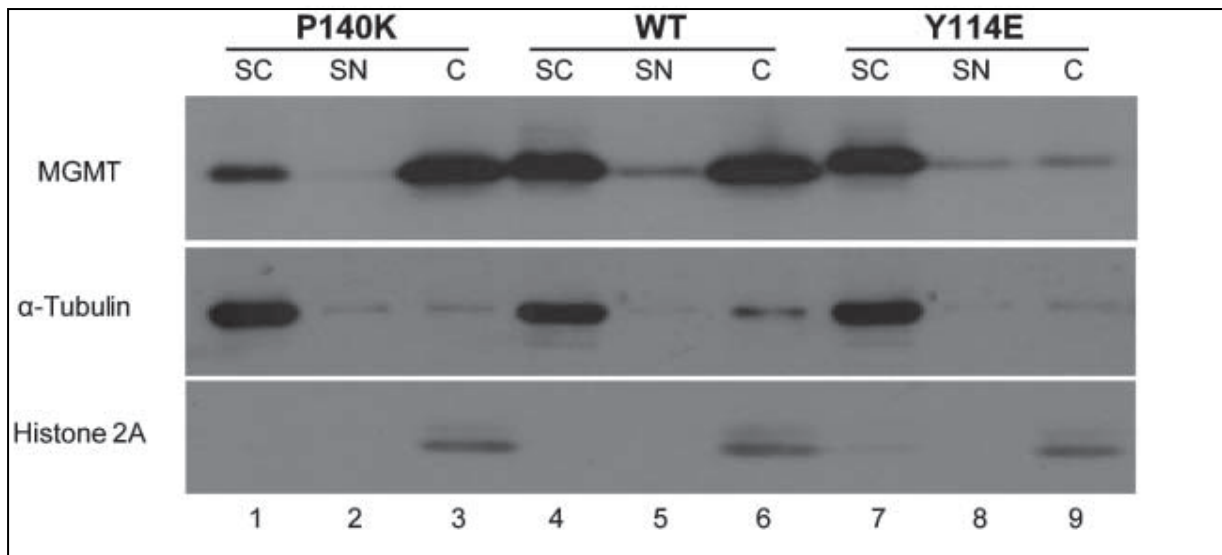


**Abb. 22: Analyse der subzellulären Lokalisation von transgen-exprimierter MGMT in Maus 32D Zellen.** Das humane MGMT-Protein (WT, MGMT<sup>P140K</sup> oder MGMT<sup>C145A</sup>) wurde mit einem spezifischen Antikörper visualisiert (Gegenfärbung: DAPI). SF-Vektor: hohe Expression; PGK-Vektor: niedrige Expression.





**Abb. 23: Subzelluläre Lokalisation von transgener MGMT in Maus 3T3 Fibroblasten.** Einzelheiten wie in Abb. 15 bzw. Text.



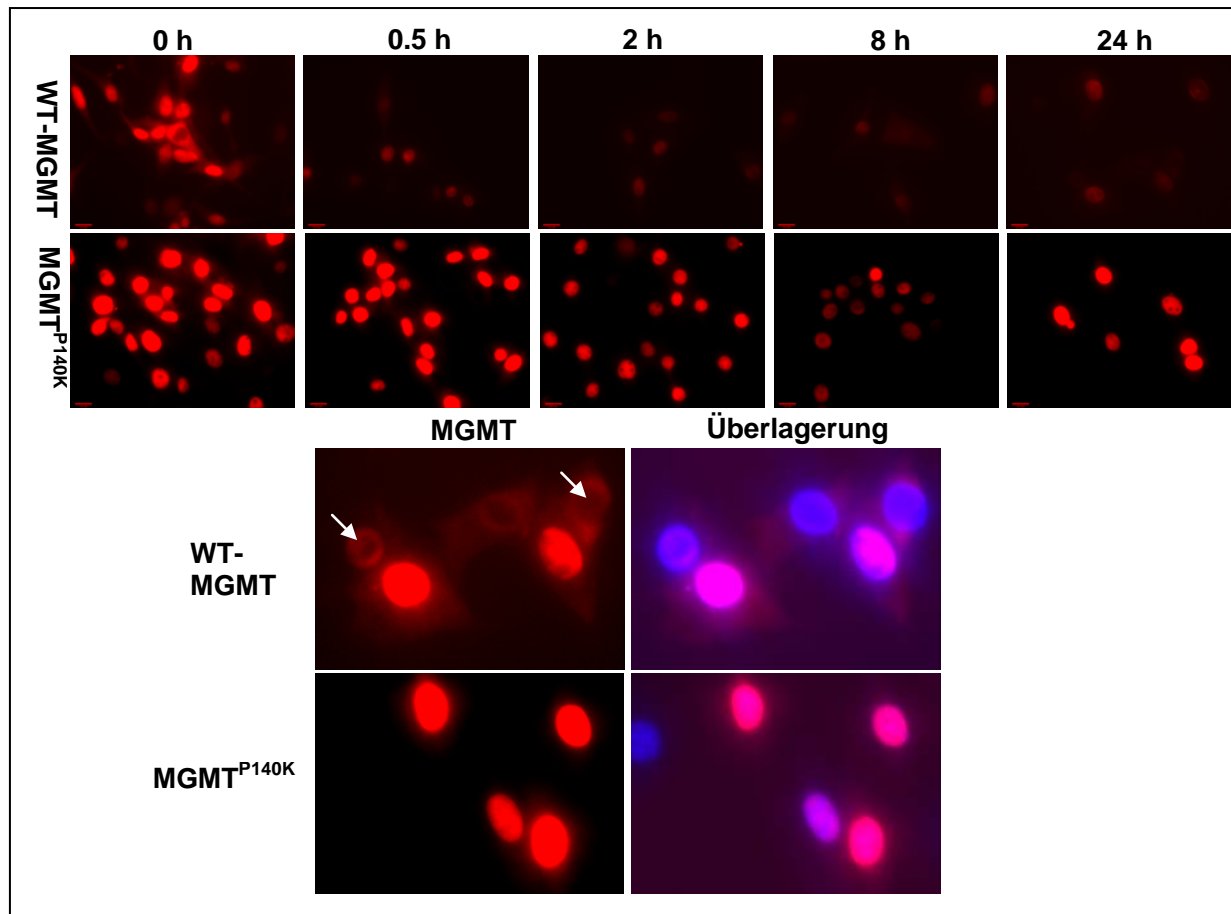
**Abb. 24: Bestimmung der subzellulären Verteilung von Transgen-exprimiertem MGMT mittels Immunoblot.** 32D Zellen wurden mit unterschiedlichen Varianten der humanen MGMT transduziert (s. Text). Positiv transduzierte Zellen wurden durchflusszytometrisch isoliert und daraus drei unterschiedliche Protein-Fractionen (zytoplasmatisch, Kern-löslich und Chromatin-gebunden) präpariert (s. Material u. Methoden). Diese Protein-Fractionen wurden im Western-blot auf die Menge an transgener humaner MGMT untersucht. Der Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin und Histone 2A diente als Reinheitskontrolle für die isolierten Zellfraktionen. SC: zytoplasmatische Fraktion, SN: lösliche Kernfraktion, C: Chromatin-gebundene Kernfraktion. 1 - 3: MGMT<sup>P140K</sup>, 4-6: Wildtyp-MGMT: 7 - 9 MGMT<sup>Y114E</sup> (Milsom *et al.*, 2008).

#### 4.4.3 Verlangsamter Proteinabbau von MGMT<sup>P140K</sup> nach DNA-Alkylierung mit TMZ

Die im letzten Abschnitt dargestellte veränderte subzelluläre Verteilung des P140K-mutierten MGMT-Proteins legt eine starke Bindung des Proteins an Chromatinstrukturen nahe. Wie aus früheren Arbeiten bekannt, repariert MGMT die O<sup>6</sup>-meG-Addukte durch Methylgruppenübertragung stöchiometrisch aus der DNA. Das abreagierte Protein wird anschließend ubiquitiniert und degradiert (Gerson, 2004). Eine verlangsamte bzw. veränderte Degradationskinetik von MGMT<sup>P140K</sup> kann weitere Hinweise darauf geben, wieso sich eine sehr hohe Expression negativ auf die Proliferation und damit auf das Überleben von 32D-Zellen und primäre hämatopoetischen Stammzellen auswirkt. Um dies weiter zu belegen, wurden 3T3-Zellen mit dem WT-MGMT- bzw. mit dem MGMT<sup>P140K</sup>-Vektor transduziert. Die Zellen wurden anschließend mit hohen TMZ-Konzentrationen behandelt und nach 0,5, 2, 8 und 24 Stunden Proben entnommen. Die Zellen wurden anschließend fixiert und für MGMT und DAPI gefärbt. Wie aus Abb. 25 hervorgeht, änderte sich die subzelluläre Lokalisation der WT-MGMT schon 30 Minuten nach der Behandlung mit TMZ. Im Gegensatz zu unbehandelten Zellen konnte die WT-MGMT zu diesem Zeitpunkt nur im Zellkern detektiert werden. Außerdem hatte das MGMT Fluoreszenzsignal schon

0,5 h nach Beginn der Behandlung stark abgenommen. Die Signalintensität nahm nach 2 und nach 8 Stunden weiter drastisch ab. Eine erneute Zunahme an MGMT durch Neusynthese konnte erst nach 24 Stunden festgestellt werden, jedoch lag die Proteinmenge zu diesem Zeitpunkt noch viel niedriger als in unbehandelten Zellen. Hingegen war MGMT<sup>P140K</sup> zu Anfang der Behandlung auf sehr hohem Niveau fast ausschließlich im Zellkern detektierbar. Auch 30 Minuten nach der Behandlung war keine Abnahme des MGMT<sup>P140K</sup>-Proteinspiegels feststellbar. Erst nach 2 Stunden konnte eine leichte Abnahme detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt waren bestimmte Areale im Zellkern sichtbar, an denen kein MGMT<sup>P140K</sup>-Protein gefunden wurde. Die Reduktion der MGMT<sup>P140K</sup> erreichte nach 8 Stunden ein Maximum und 24h Stunden nach der Behandlung konnte eine sehr hohe Proteinmenge, wieder ausschließlich im Zellkern, detektiert werden. Das Expressions-Niveau war nun mit dem unbehandelten Zellen vergleichbar.

Diese Daten weisen auf eine verlangsamte Degradation von MGMT<sup>P140K</sup> zum Zeitpunkt 0,5 bzw. 2 Stunden nach O<sup>6</sup>-meG-Alkylierung hin. Im Vergleich dazu zeigte die WT-MGMT eine deutlich schnellere Abnahme des Proteinspiegels zu diesen Zeitpunkten. Interessanterweise erfolgte die Wiederauffüllung des Protein-Pools für die Mutante MGMT<sup>P140K</sup> wesentlich effizienter als für WT-MGMT.



**Abb. 25: Kinetik des MGMT-“Turnovers“ in Maus 3T3-Zellen nach TMZ-Behandlung.**

Transduzierte 3T3-Zellen, die entweder MGMT<sup>P140K</sup> oder WT-MGMT exprimieren, wurden mit TMZ (500  $\mu$ M) behandelt und nach 0,5, 2, 8 und 24 Stunden mit einem MGMT-spezifischen Antikörper visualisiert (rot; Gegenfärbung: DAPI, blau). Oben: repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der untersuchten Zeitpunkte. Unten: Die vergrößerten Ausschnitte zeigen bei Zellen mit WT-Protein MGMT-freien Kernareale zum Zeitpunkt: 24 h nach TMZ, die so in Zellen mit MGMT<sup>P140K</sup> nicht detektiert wurden (s. Pfeil).

#### 4.5 „DNA damage response“ in humanen primären hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>) auf O<sup>6</sup>-methylierenden-Agenzien

Wie in Abschnitt 1 dargestellt ist die hohe Myelosuppression ein wichtiger Dosis-limitierender Faktor bei einer antineoplastischen Behandlung mit DNA-methylierenden-Agenzien, der vermutlich vorwiegend auf die besondere Stammzelltoxizität dieser Medikamente zurückzuführen ist (Tannock, 1986; Newland *et al.*, 1992). Außerdem stellen O<sup>6</sup>-meG-Läsionen in der DNA aufgrund ihres hohen mutagenen Potentials eine große Gefahr für die genomischen Integrität von Stammzellen dar (Gerson, 2004).

Es wurde daher im zweiten Teil dieser Arbeit näher untersucht, wie proliferierende hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen mit diesen DNA-Schäden umgehen. Dazu wurden primäre Stamm/Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>) und ausdifferenzierte

Lymphozyten (CD34<sup>+</sup>) aus dem Nabelschnurblut einzelner Spenderinnen isoliert. Die Zellen wurden dann *ex vivo* für 72 - 96 Stunden mit Wachstumsfaktoren stimuliert, um eine Proliferation der Zellen zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen mit dem Alkylanz Temozolomid (TMZ) behandelt. Um die Rolle des Reparaturproteins MGMT und der Persistenz von O<sup>6</sup>-meG-Addukten in den verschiedenen Zellpopulationen zu untersuchen, wurde ein Teil der Zellen zusätzlich mit dem MGMT-Inhibitor BG vorbehandelt. Schließlich wurden Zellproben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und folgenden Analysen wurden durchgeführt (s. Abb. 26):

- **Zytotoxizität:** Die Induktion von Apoptose wurde durchflusszytometrisch mittels Annexin-V/7AAD-Doppelfärbung bestimmt.
- **Zellzyklus:** Die Zellzyklusprogression wurde mittels BrdU/7AAD-Doppelfärbung durchflusszytometrisch ermittelt.
- **DNA Doppelstrangbrüche:** Die Entstehung wurde indirekt durch die quantitative Auswertung von nuklearen Foci der Proteine  $\gamma$ H2AX und RAD51 ermittelt.
- **Aktivierung von „DNA damage response“ –Signalwege:** Die Aktivierung von Signalwegen, die mit Apoptose, DNA-Reparatur und „*checkpoint-signaling*“ assoziieren.

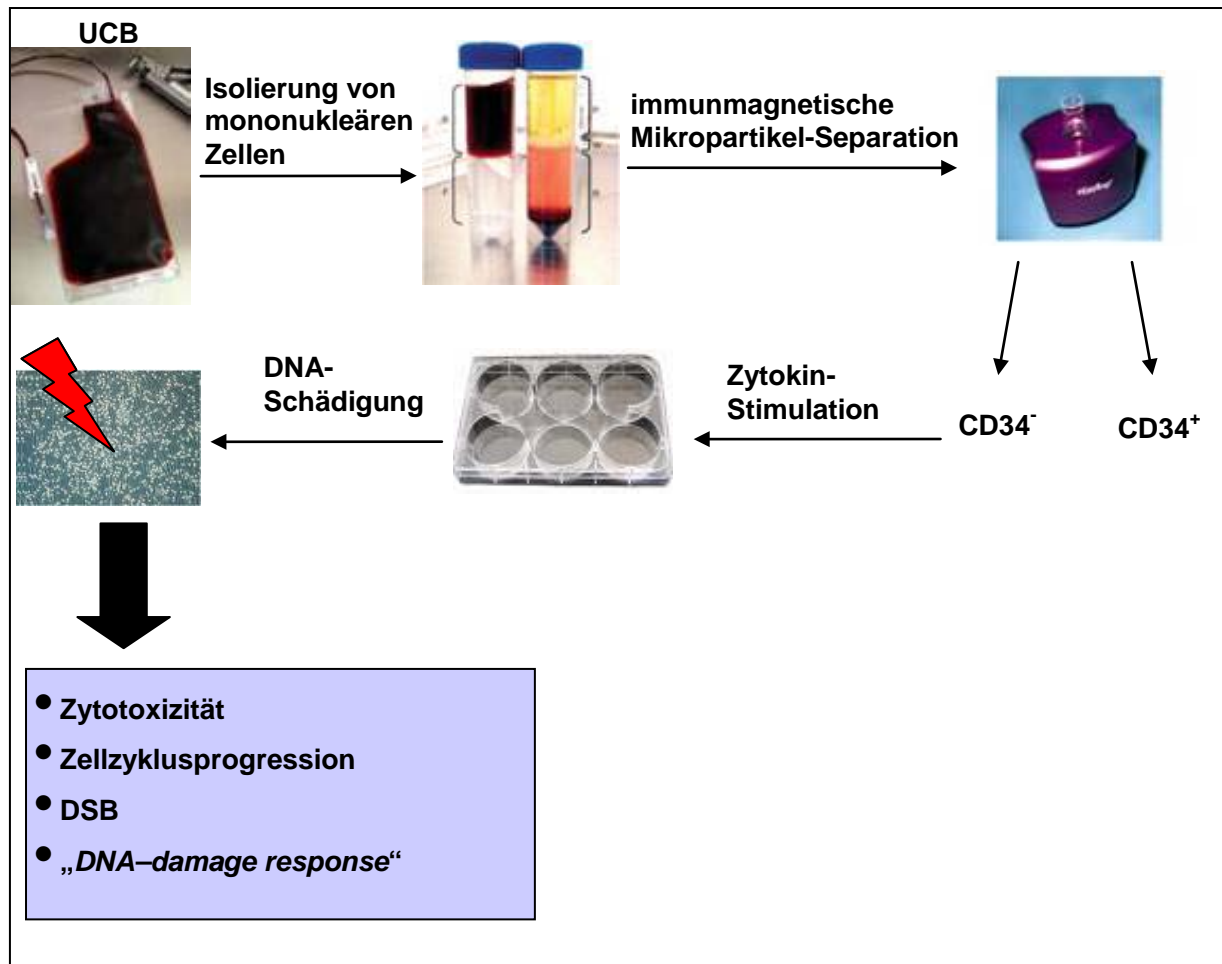


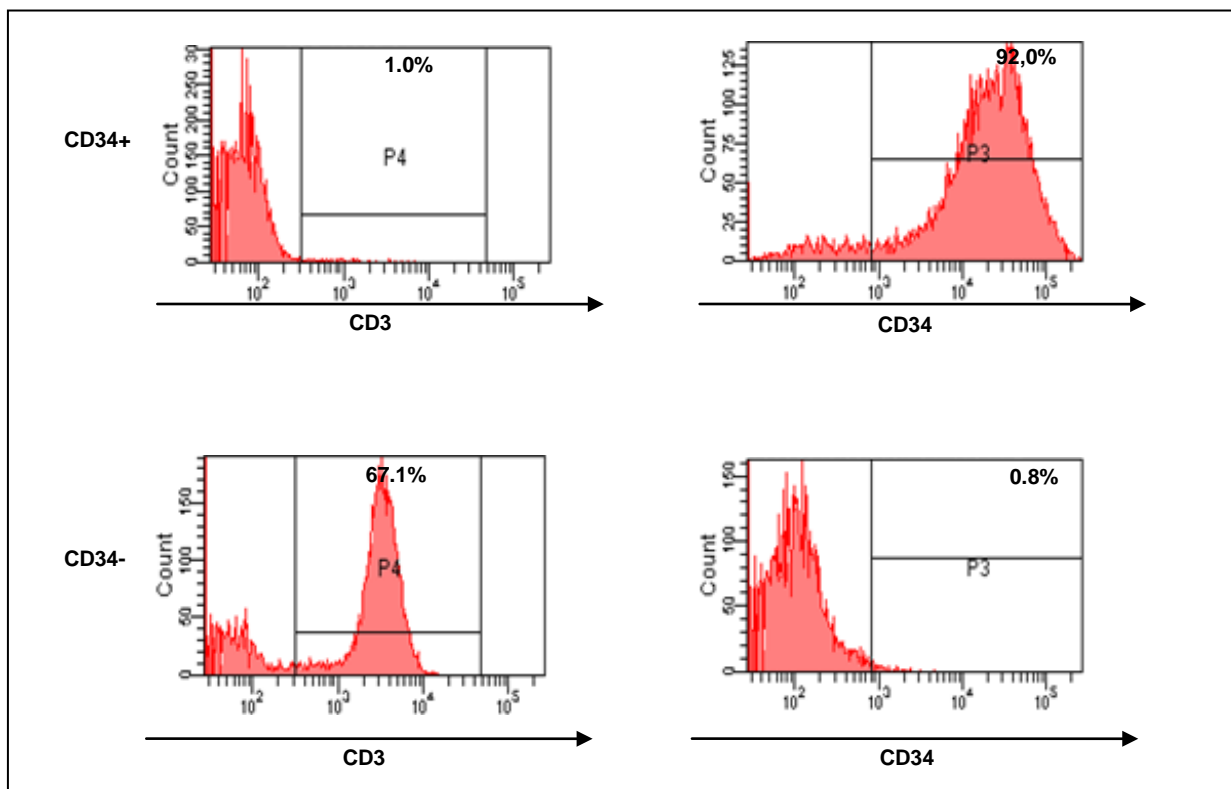
Abb. 26: Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens bei Verwendung von Nabelschnur-Blut (UCB).

#### 4.5.1 Isolierung und Kultivierung von primären hämatopoetischen Zellen: Unreife Stamm/Vorläuferzellen und ausdifferenzierte Lymphozyten

Derzeit können menschliche Vorläuferzellen aus drei Quellen gewonnen werden: (1) aus dem Knochenmark, (2) aus dem peripheren Blut nach Mobilisierung durch Zytokine (Leukapherese) oder (3) aus Nabelschnurblut (Fritsch *et al.*, 1995). Im Blut von Neugeborenen zirkulieren hämatopoetische Vorläuferzellen in größerer Zahl als bei Erwachsenen. Nabelschnurblut ist durch Punktion der Nabelschnur leicht zu gewinnen und bietet somit einen Vorteil gegenüber der komplizierten Isolierung aus dem adulten Knochenmark.

Aus der Nabelschnur lassen sich in der Regel 50 bis 80 ml Blut gewinnen, aus dem zunächst durch Gradientenzentrifugation (Ficoll) ca. 1 bis  $5 \times 10^8$  mononukleäre Zellen isoliert werden können. Von diesen Zellen trugen ca. 0,5 bis 1 % das CD34-Antigen, die mit Hilfe von immunmagnetischen Mikropartikeln separiert werden konnten (s. Material und Methoden, Kap. 3.2.2.2). Der Reinheitsgrad der isolierten

Vorläuferzellen wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit einem PE-gekoppeltem  $\alpha$ -hCD34-Antikörper bzw. einem FITC-gekoppelte- $\alpha$ -CD3-Antikörper (T-Zell-Marker) inkubiert und am FACS analysiert (Abb. 27). Die Reinheit der CD34<sup>+</sup>-Fraktion lag in der Regel bei 85-95%. Die so isolierten Zellen wurden anschließend durch Zugabe von Wachstumsfaktoren für 72–96 Stunden stimuliert (s. Material und Methoden, Kap. 3.2.2.3). Diese Zytokinstimulation induzierte eine starke Proliferation der Stamm/Vorläuferzellen. Die aus Nabelschnurblut isolierte CD34<sup>-</sup> Fraktion besteht aus einem heterogenen Gemisch unterschiedlich differenzierter mononukleärer Zellen. Durch eine zweistündige Inkubation in beschichteten Zellkulturplatten konnten die Lymphozyten isoliert werden, da sie nicht an die Oberfläche adhären. Zu diesem Zeitpunkt waren ca. 70% der Zellen in dieser Lymphozytenfraktion T-Zellen (Abb. 27). Die Zellen wurden dann mit Wachstumsfaktoren stimuliert, die zu einer starken Proliferation von T-Zellen führten (s. Material und Methoden, Kap. 3.2.2.3). Zweiundsiebzig Stunden nach Beginn der Stimulation enthielt die CD34<sup>-</sup> Fraktion fast ausschließlich aktivierte T-Zellen.



**Abb. 27: FACS-Analyse der mit Magnetobeads aus Nabelschnurblut isolierten CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>-</sup>-Zellfraktionen.** Die beiden frisch isolierten Zellefraktionen wurden mit anti-CD34-Antikörper (PE) als Marker für hämatopoetische Stamm/Vorläuferzellen und mit anti-CD3-Antikörpern (FITC) als T-Zellsmarker gefärbt und der Reinheitsgrad durchflusszytometrisch ermittelt.

#### 4.5.2 CD34<sup>+</sup> Zellen zeigen wesentlich höhere Apoptoseraten 12-24 h nach BG-TMZ Behandlung als CD34<sup>-</sup> Zellen

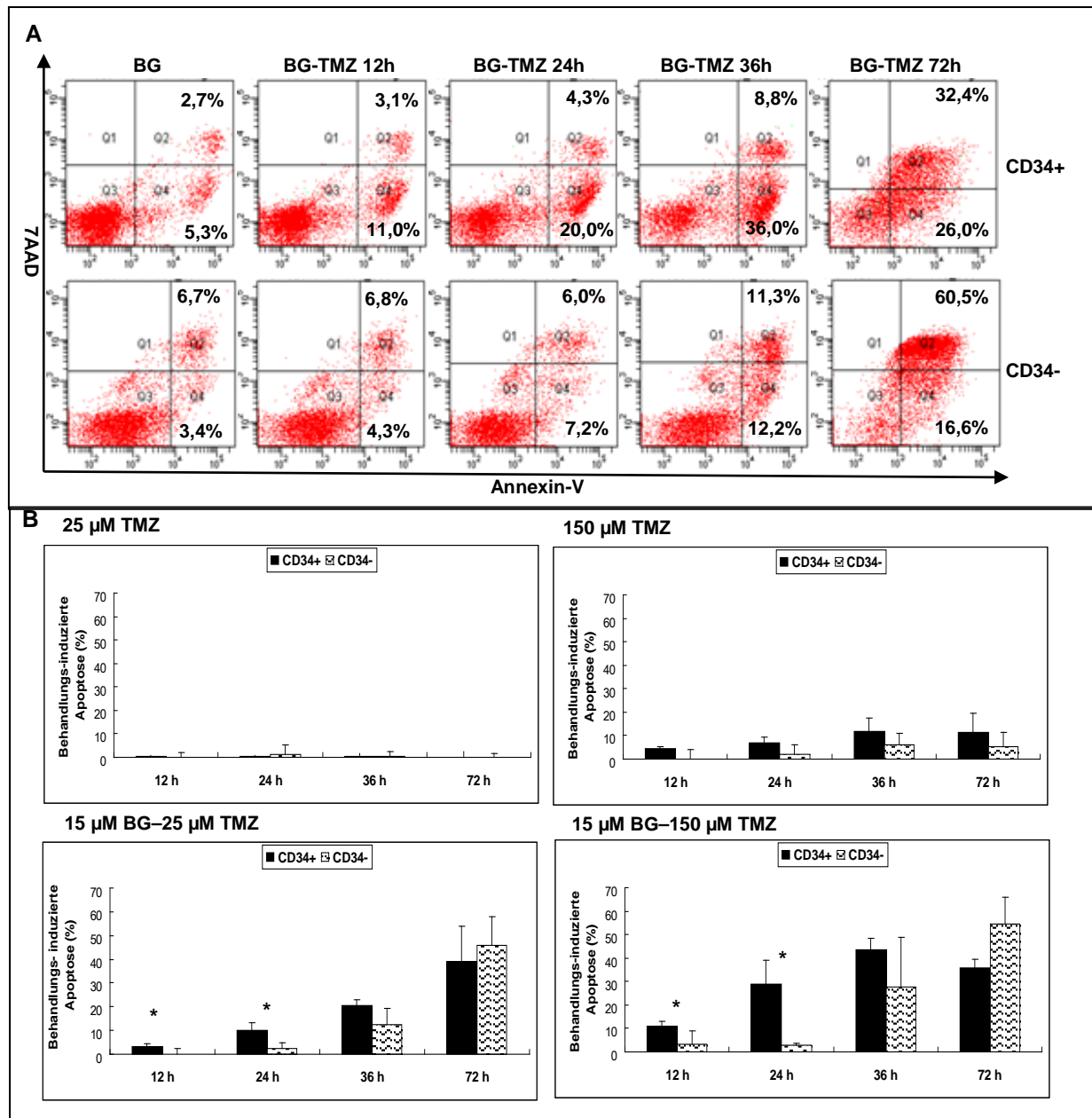
Wie bereits eingangs erwähnt, hängt die hohe zytotoxische Wirkung von O<sup>6</sup>-meG-Addukten in der DNA bei vielen Zellen vermutlich mit einer Fehlreparatur an dieser Schadensstelle durch das MMR-System ab (s. Einleitung, Kap. 1.7). Dieser „*futile repair*“ an postreplikativen O<sup>6</sup>-meG:T-Basenpaaren kann zum Zelltod in der nächsten S-Phase führen, 2 S-Phase nach der Behandlung (Stojic *et al.*, 2004; Karran & Stephenson, 1990; Kaina *et al.*, 1997). Ob dieser MMR-abhängige Mechanismus der Apoptoseinduktion auch für die hohe Empfindlichkeit hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen gegenüber Alkylanzien verantwortlich ist, war bisher ungeklärt.

Deshalb wurden Proliferations-stimulierte Zellen der CD34<sup>+</sup> und der CD34<sup>-</sup> Fraktion mit TMZ allein oder mit BG-TMZ behandelt, zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Behandlung Zellproben entnommen und die Apoptoserate mittels Annexin/7AAD-Doppelfärbung durchflusszytometrisch ermittelt. Alle Zellen, die nur mit dem Alkylator TMZ behandelt waren, zeigten zu allen untersuchten Zeitpunkten entweder keine (25 µM) oder nur sehr niedrige (150 µM) Apoptoseraten (Abb. 28).

Bei gleichzeitiger Inaktivierung des MGMT-Proteins durch BG waren ansteigende Apoptoseraten sowohl in CD34<sup>+</sup> Zellen als auch in CD34<sup>-</sup> Zellen detektierbar. Dieser Befund belegt klar, dass Auslöser der Apoptose in beiden Zellfraktionen die nicht reparierten O<sup>6</sup>-meG-Addukte sind und dass für das Überleben der Zellen andere DNA-Alkylierungsprodukte, wie O<sup>4</sup>-meT, N7-meG oder N3-meA keine entscheidende Rolle spielen.

Erstaunlicherweise zeigten die hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>) schon nach 12–24 Stunden BG-TMZ Behandlung erhöhte Apoptoseraten im Vergleich zu ausdifferenzierten T-Zellen (CD34<sup>-</sup>) (Abb. 28). Wie erwartet, stieg die Apoptoserate in ausdifferenzierten T-Zellen (CD34<sup>-</sup>) erst zu späteren Zeitpunkten (36 - 72 Stunden) an. Dieser Unterschied konnte sowohl nach niedriger (25 µM) als auch nach hoher (150 µM) TMZ Dosis detektiert werden.

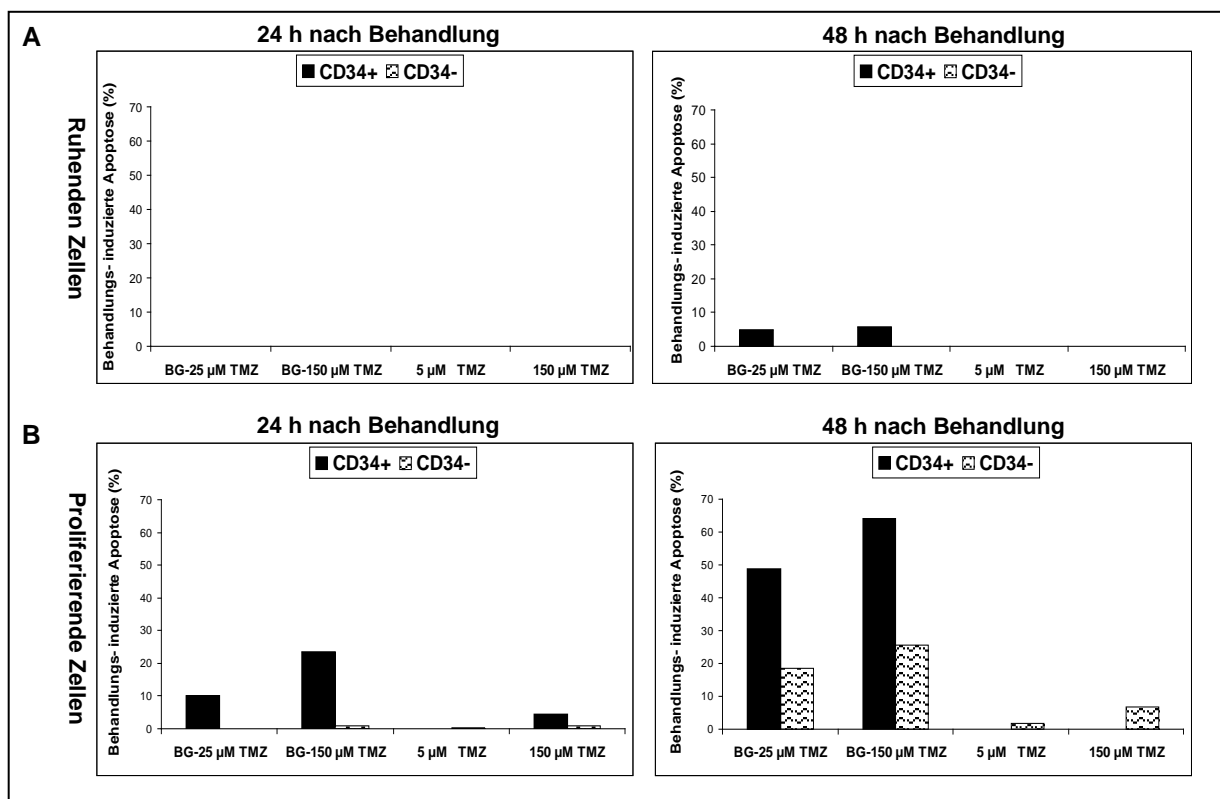




**Abb. 28: Frühe Induktion von Apoptose in proliferierenden CD34<sup>+</sup> Zellen nach BG-TMZ-Behandlung.** Zytokin-stimulierte CD34<sup>+</sup>- oder CD34<sup>-</sup>-Zellen wurden entweder nur mit TMZ (25 oder 150 µM) oder mit TMZ nach einer Vorinkubation mit BG (15 µM) behandelt. Nach 12, 24, 36 und 72 h wurden Zellproben entnommen und die Apoptoserate mittels Annexin/7AAD-Doppelfärbung ermittelt. A: FACS-Analyse der Zellen nach Exposition mit BG oder mit BG-TMZ (150 µM). Q3: vitale Zellen; Q4: früh-apoptotische Zellen; Q2: nekrotische Zellen. B: Quantifizierung des relativen Anteils apoptotischer Zellen (Q2 + Q4) zu verschiedenen Zeiten nach Behandlung. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden ermittelt aus Experimente mit Zellen aus drei individuellen Nabelschnur-Blutproben. Die Markierung \* bezeichnet signifikante Unterschiede der Apoptoseraten zwischen CD34<sup>+</sup> - und CD34<sup>-</sup> -Zellen (Student t-Test < 0,05).

Frühere Studien hatten gezeigt, dass eine Alkylanzien-induzierte Toxizität hauptsächlich in proliferierenden, nicht aber in ruhenden humanen T Zellen auftritt (Roos *et al.*, 2004). Ob die frühe Induktion von Apoptose durch O<sup>6</sup>-meG in CD34<sup>+</sup> Zellen ebenfalls nur in replizierenden Zellen auftritt, wurde anhand des folgenden Experiments untersucht: Aus Nabelschnurblut frisch isolierte, ruhende CD34<sup>+</sup> und

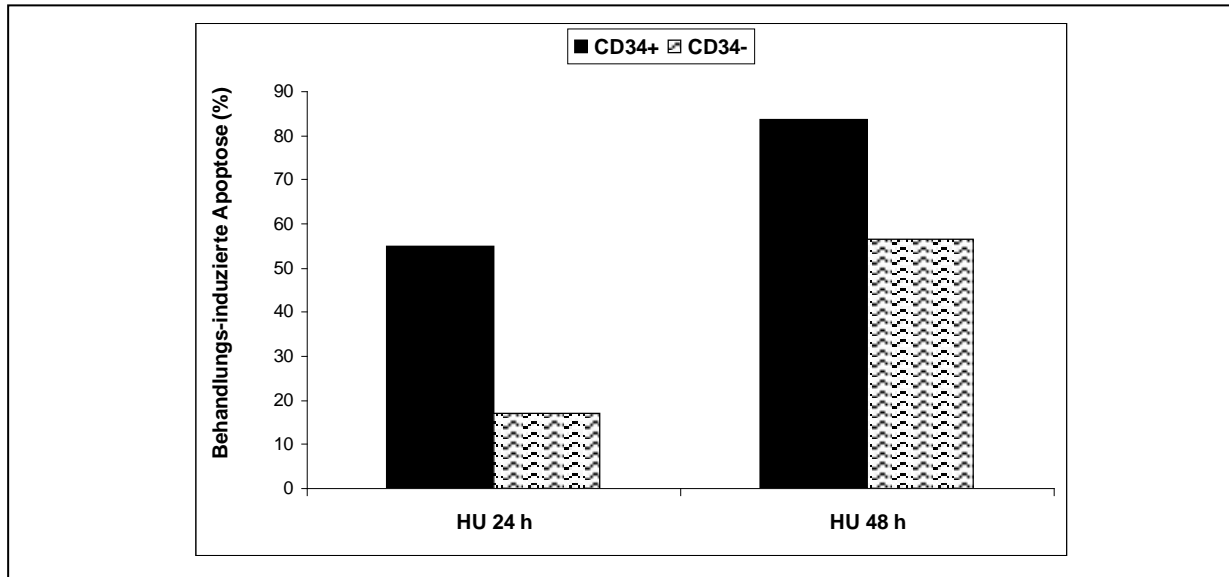
CD34<sup>-</sup> Zellen wurden mit TMZ allein oder in Kombination mit BG behandelt und 24 bzw. 48 Stunden danach die Apoptoseraten durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 29). Parallel dazu wurden Teile der beiden Zellfraktionen zunächst für 72 Stunden mit Wachstumsfaktoren behandelt. Die proliferierenden Zellen wurden dann ebenfalls mit TMZ oder BG-TMZ behandelt und die Apoptoseinduktion gemessen (Abb. 29). Die Induktion der Apoptose war in beiden untersuchten Zellfraktionen strikt von der DNA-Replikation abhängig. Sowohl ruhende Stamm/Vorläuferzellen als auch ruhende T-Lymphozyten waren, im Gegensatz zu den jeweils proliferierenden Zellen aus der gleichen Blutprobe hochresistent gegenüber einer BG-TMZ Behandlung. Auch hier konnte in CD34<sup>+</sup> Zellen eindeutig eine frühe Apoptoseinduktion bereits 24 Stunden nach Behandlung festgestellt werden (Abb. 29).



**Abb. 29: Die Induktion von Apoptose durch persistierende O<sup>6</sup>-meG-Addukte in primären hämatopoetischen Zellen ist strikt Replikations-abhängig.** Frisch isolierte, unstimulierte (A) oder mit Wachstumsfaktoren stimulierte (B) CD34<sup>-</sup> und CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden mit TMZ oder mit BG-TMZ behandelt. Nach 24 bzw. 48 h wurde der Anteil Apoptose-induzierter Zellen mittels Annexin-V/7AAD-Doppelfärbung durchflusszytometrisch ermittelt.

Aus diesem Befund ergab sich die Frage, ob die frühe Apoptoseinduktion durch O<sup>6</sup>-meG ein spezifisches Phänomen dieses DNA-Schadens darstellt, oder ob es sich möglicherweise um eine generelle Strategie handelt, um beschädigte Zellen aus dem Stammzellpool zu entfernen. Hierfür wurden proliferierende CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>-</sup> Zellen für 24 bzw. 48 Stunden mit Hydroxyharnstoff (HU; 1 mM) behandelt und die

jeweiligen Apoptoseraten ermittelt (Abb. 30). HU blockiert die DNA-Neusynthese und führt zu persistierenden Strangbrüchen in der S-Phase. Die Stamm/Vorläuferzellen zeigten mit >50 % Annexin-positiven Zellen bereits nach 24 Stunden auch hier eine hohe Empfindlichkeit, während die Fraktion der T-Zellen in ähnlicher Größenordnung erst nach 48 Stunden in die Apoptose gingen (Abb. 30).



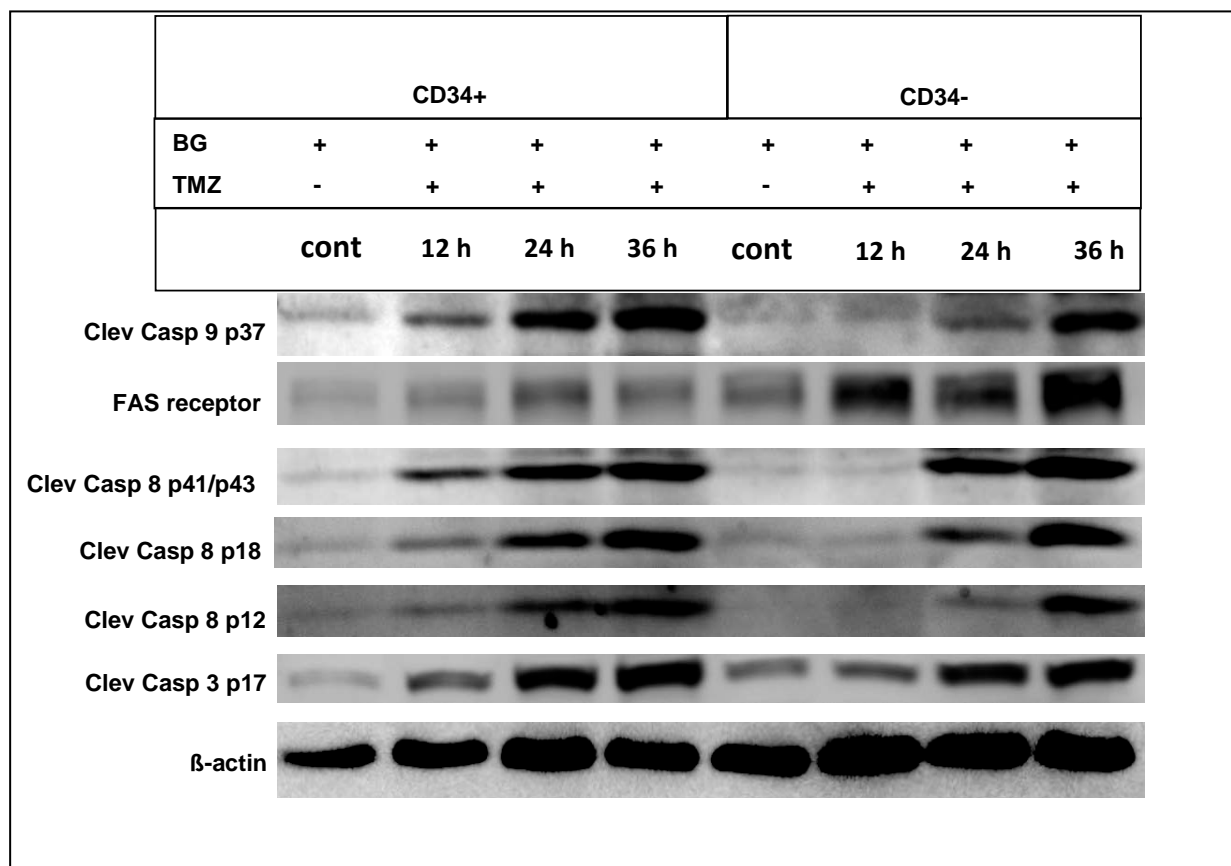
**Abb. 30: Induktion von Apoptose in replizierenden hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen und in T-Zellen durch Hydroxyharnstoff (HU).** Der Anteil apoptotischer Zellen wurde mittels Annexin-V/7AAD-Doppelfärbung durchflusszytometrisch 24 bzw. 48 h nach Behandlung mit HU (1 mM) ermittelt.

#### 4.5.3 Schnelle Caspase-Aktivierung in hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen als initialer Schritt in Richtung Apoptose

Eine „konventionelle“ Chemotherapie mit DNA-schädigenden Substanzen kann Zelltod sowohl über den extrinsischen als auch über den intrinsischen Signalweg einleiten (Fulda & Debatin, 2006). In früheren Untersuchungen führte eine Behandlung proliferationsaktiver humanen Lymphozyten mit O<sup>6</sup>-alkylierenden Substanzen zu einer p53-abhängigen Überexpression des FAS-Rezeptors und legt damit eine Beteiligung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs nahe (Roos *et al.*, 2004). Ob die im letzten Abschnitt dargestellte frühe Apoptoseinduktion in hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen nach Exposition zu BG-TMZ über den extrinsischen oder intrinsischen Apoptoseweg verläuft, wurde durch Bestimmung von daran beteiligten Proteinkomponenten mittels Immunoblot getestet.

Dafür wurden jeweils 12, 24 und 36 Stunden nach Behandlung der Zellen mit 15 µM BG und 150 µM TMZ Zelllysate hergestellt. Anschließend wurden diese mittels Immunoblot auf das Vorhandensein von Abspaltprodukten von Caspase 8

(extrinsischer Weg), Caspase 9 (intrinsischer Weg) und Caspase 3 (beide Signalwege) analysiert (Abb. 31). Weiter wurde die Expression des FAS-Rezeptors bestimmt. Übereinstimmend mit den Annexin-Daten (Abb. 28) konnte in CD34<sup>+</sup>-Zellen schon 12 Stunden nach Behandlung eine Aktivierung (Zunahme der Spaltprodukte) der Caspasen 3 und 9 festgestellt werden. Dagegen war eine Aktivierung dieser Caspasen in differenzierten T-Zellen erst 24 bzw. 36 Stunden nach der Behandlung zu beobachten. Die frühe Spaltung der Caspasen 9 und 3 in CD34<sup>+</sup> Zellen weist auf eine wesentliche Beteiligung des intrinsischen Signalweges bei der Einleitung des Zelltods durch O<sup>6</sup>-meG hin. Die starke Spaltung von Caspase 8 in CD34<sup>-</sup> Zellen, die schon 24 h nach der Behandlung auftritt, sowie die hohe Induktion des FAS-Rezeptorproteins nach BG-TMZ-Behandlung lässt auf eine präferentielle Aktivierung der extrinsischen Apoptose-Signalwege in T-Zellen schließen (Abb. 31).

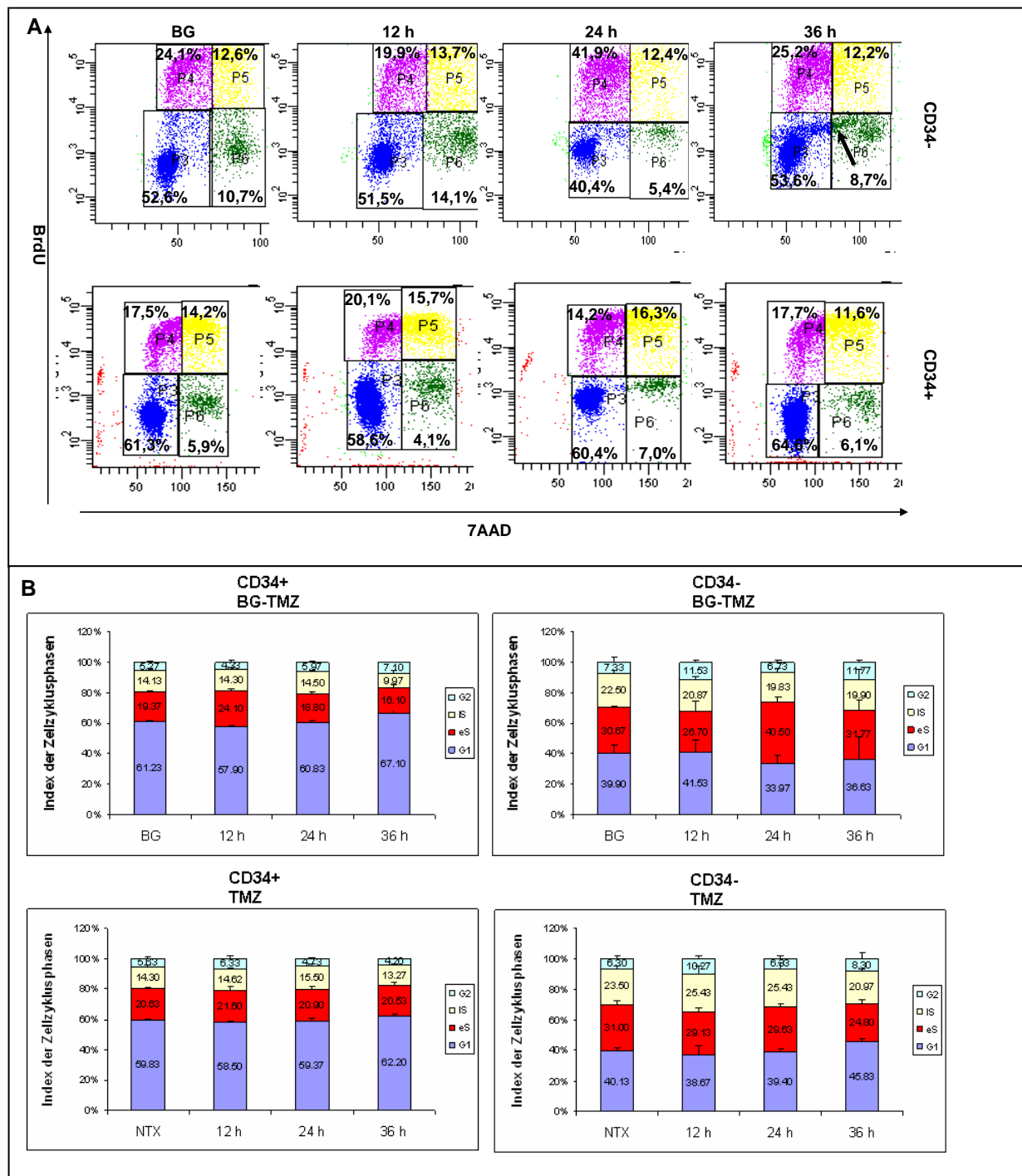


**Abb. 31: Die Aktivierung von Caspasen ist in hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen schon 12 h nach BG-TMZ-Behandlung nachweisbar.** Proliferierende CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>-</sup>-Zellen aus der gleichen Nabelschnur-Blutprobe wurden mit BG (15 µM) und TMZ (150 µM) behandelt (Kontrolle (cont): nur BG). Zu den Zeitpunkten 12, 24 und 36 h nach Behandlung wurden Proben genommen und Zelllysate hergestellt. Der Nachweis der verschiedenen Caspase-Spaltprodukte und des FAS-Rezeptors erfolgte mittels Immunoblot unter Verwendung spezifischer Antikörper. Die unterschiedlichen Spaltprodukte von den untersuchten Caspasen sind als „Clev Casp 9 p37 (37 kDa)“ bzw. „Clev Casp 8 p41/43 (41/43 kDa); Clev Casp 8 p18 (18 kDa); „Clev Casp 8 p12 (12kDa)“ oder „Clev Casp 3 p17 (17 kDa)“ dargestellt.

#### 4.5.4 Hämatopoetische Stamm/Vorläuferzellen zeigen keinen O<sup>6</sup>-meG-abhängigen Zellzyklusarrest

Im nächsten Schritt wurde nach möglichen Ursachen für das unterschiedliche Apoptose-Verhalten von undifferenzierten und ausdifferenzierten Zellen in der Hämatopoese gesucht. Wie oben erwähnt, führt eine Behandlung mit alkylierenden Medikamenten bei den meisten bisher untersuchten Zelllinien zu einer Arretierung in dem zweiten Zellzyklus, wenn die gebildeten O<sup>6</sup>-meG-Addukte nicht rechtzeitig entfernt werden können (Stojic *et al.*, 2004). Ob eine Behandlung mit TMZ bei proliferierenden CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>-</sup>-Zellen einen solchen Zellzyklusarrest auslöst, wurde mittels Zellzyklusanalyse untersucht. Dazu wurden die Zellen nach Stimulation entweder mit TMZ allein oder in Kombination mit BG behandelt und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Bromdesoxyuridin (BrdU) pulsmarkiert. BrdU wird als Basenanalogen in der S-Phase in die neu synthetisierte DNA eingebaut und lässt sich dort immunanalytisch nachweisen. Zu den Zeitpunkten 12, 24 und 36 Stunden nach TMZ wurden Proben entnommen, einer BrdU-/7AAD-Doppelfärbung unterzogen und im FACS analysiert (Abb. 32). Überraschenderweise konnte bei den Stamm/Vorläuferzellen nach Exposition mit 25 µM TMZ allein oder in Kombination mit 15 µM BG keine Zellzyklusarretierung nachgewiesen werden, obwohl diese Zellen bereits 24 Stunden nach BG-TMZ signifikante Apoptoseraten aufwiesen (s. Kap. 4.5.2). Diese Beobachtung legt nahe, dass in hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen die Apoptose durch nicht-reparierte O<sup>6</sup>-meG-Läsionen induziert wird ohne dass vorher ein Zellzyklusarrest stattfindet. Proliferierende T-Zellen wiesen demgegenüber 24 h nach BG-TMZ-Behandlung einen deutlichen Arrest in der frühen S-Phase auf (Abb. 32). Da zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Induktion von Apoptose detektierbar war, lässt sich hieraus schließen, dass bei differenzierten, anderes als bei Stamm/Vorläuferzellen, die Apoptose erst nach vorherigem S-Phasearrest (vermutlich in dem 2. S-Phase) induziert wird. Desweiteren konnte 36 h nach Behandlung der T-Zellen mit BG-TMZ eine zusätzliche S-Phase Population detektiert werden. Diese Population ist erstaunlicherweise BrdU negativ, aber in dem DNA-Histogramm ist zu sehen, dass es sich dabei um S-Phasezellen handelt, die vermutlich eine defekte DNA Synthese aufweisen und aus diesem Grund BrdU negativ sind (Abb. 32, schwarzer Pfeil). Da diese Zellfraktion zu früheren Zeitpunkten nicht zu sehen ist, lässt sich vermuten, dass aus dieser Fraktion die CD34<sup>-</sup> Zellen in Apoptose gehen. Bei T-Zellen, die nur mit TMZ behandelt waren, fand sich gegenüber der Kontrolle keine signifikante

Veränderung in der Zellzyklusprogression (Abb. 32). Dieser Befund unterstützt weiter die Annahme, dass persistierendes O<sup>6</sup>-meG in der DNA für den beobachteten Zellzyklusarrest in T-Zellen verantwortlich ist.



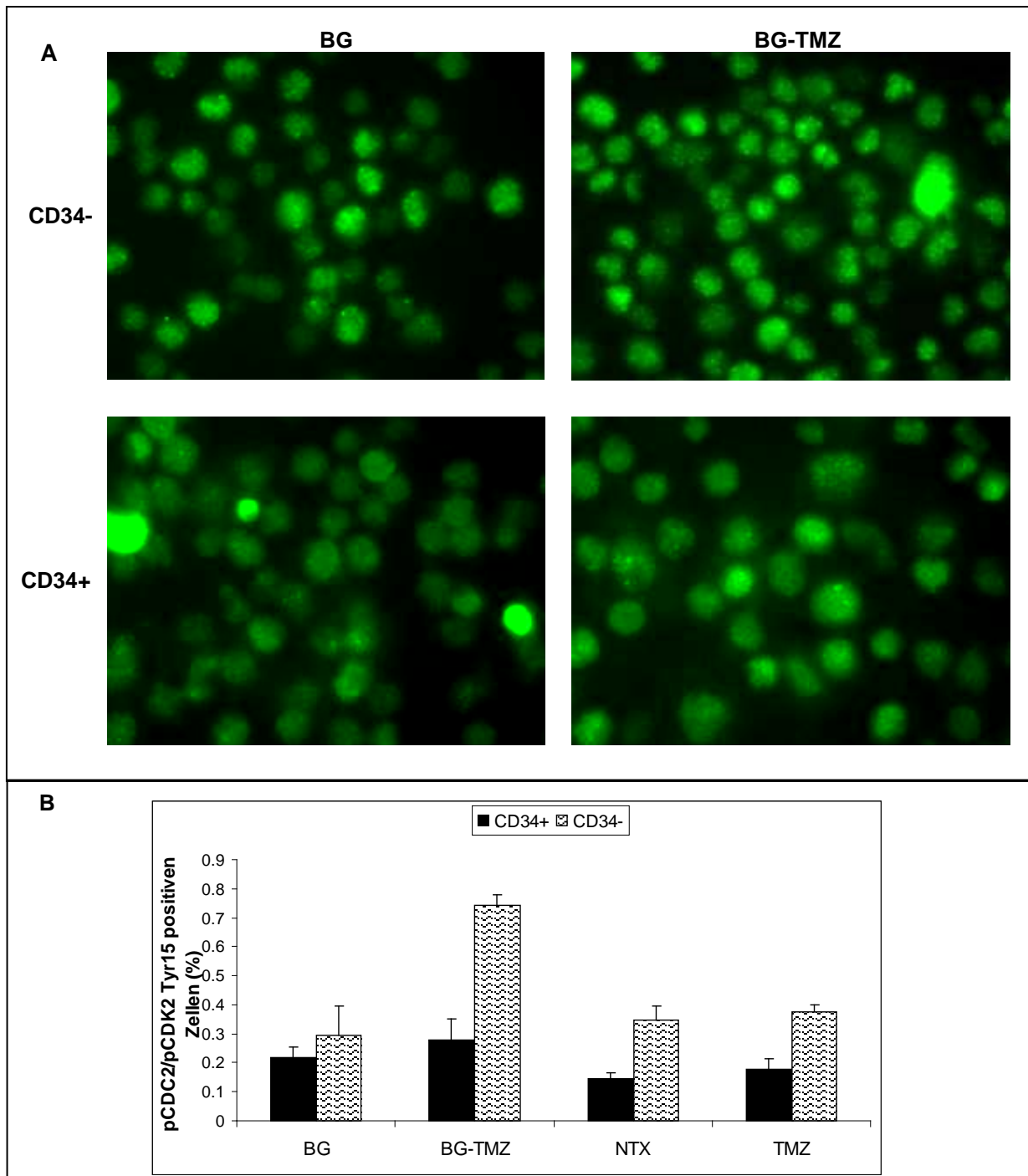
**Abb. 32: Persistierende O<sup>6</sup>-meG-Addukte induzieren einen S-Phasearrest in T-Zellen - aber nicht in Stamm/Vorläuferzellen.** A: Die Zellzyklusprogression von CD34<sup>-</sup>- und von CD34<sup>+</sup>-Zellen nach BG (15 µM) oder BG-TMZ (25 µM) wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels BrdU/TAAD-Doppelfärbung am FACS analysiert (P3: G<sub>1</sub>-Phase; P4: frühe S-Phase; P5: späte S-Phase; P6: G<sub>2</sub>-Phase). Schwarzer Pfeil: BrdU-negative S-Phase-Zellen (s. Text). B: Quantitative Auswertung von drei unabhängigen BrdU/TAAD-Experimenten (Mittelwerte). Die Index-Werte für die frühe (eS: Rot) und die späte (IS: Hellbraun) S-Phase sowie für die G<sub>1</sub> (Blau)- und G<sub>2</sub> (Cyanblau)-Phase entsprechen dem prozentuellen Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase.

#### **4.5.5 Die Zellzyklus-Regulatoren CDC2 und CDK2 werden nach BG-TMZ-Exposition nur in ausdifferenzierten hämatopoetischen Zellen phosphoryliert**

Die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus werden in der Regel durch spezifische Cyclin-CDK-Komplexe kontrolliert (s. Einleitung, Kap. 1.2). Eine Phosphorylierung von CDC2 bzw. CDK2 an der Position Tyr15 führt oft zur Arretierung der Zellzyklusprogression entweder in der S- oder in der G<sub>2</sub>-Phase. Ob der im vorigen Abschnitt gezeigte O<sup>6</sup>-meG-induzierte S-Phase-Arrest bei primären T-Zellen ebenfalls mit einer vermehrten Phosphorylierung von CDC2/CDK2-Kinasen an Tyr15 einhergeht, wurde mittels Immunfluoreszenz-Färbung untersucht. Dazu wurden proliferierende CD34<sup>-</sup>- und CD34<sup>+</sup>-Zellen jeweils entweder mit TMZ oder mit BG-TMZ behandelt. Nach 24 Stunden in Kultur wurde das Vorhandensein von Tyr15-phosphoryliertem CDC2 und CDK2 auf zellulärer Ebene bestimmt (Abb. 33).

Übereinstimmend mit dem fehlenden Zellzyklus-Arrest konnte bei den Stamm/Vorläuferzellen keine Zunahme an phosphoryliertem CDC2 bzw. CDK2-Protein 24 Stunden nach Behandlung detektiert werden (Abb. 33). In differenzierten T-Zellen fand sich hingegen, passend zu den Zellzyklusdaten, ein starker Anstieg des Phosphorylierungs-spezifischen Fluoreszenzsignals nach BG-TMZ nicht aber nach TMZ alleine.

Diese Befunde belegen, dass die Phosphorylierung von CDK2 und/oder CDC2 in T-Zellen vorwiegend durch persistierende O<sup>6</sup>-meG-Addukte stimuliert wird, und dass die nicht eintretende Phosphorylierung dieser Kinasen sehr wahrscheinlich für den fehlenden Zellzyklusarrest bei den Stamm/Vorläuferzellen verantwortlich ist.



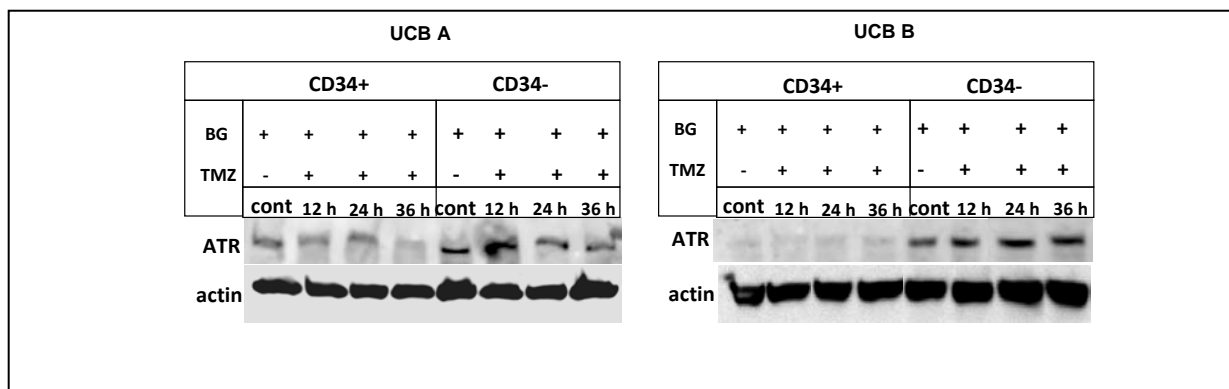
**Abb. 33: Phosphorylierung von CDK2 bzw. CDC2 in T-Zellen, aber nicht in Stamm/Vorläuferzellen.** Proliferierende CD34<sup>-</sup>- oder CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden jeweils mit TMZ (25  $\mu$ M) alleine oder in Kombination mit BG (15  $\mu$ M) behandelt und 24 h später durch *in situ*-Färbung die an Tyr15 phosphorylierten Proteine CDK2 und CDC2 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert. A: Repräsentative fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von immungefärbten Zellen. B: Quantitative Auswertung: Die prozentualen Anteile der pCDC2-/pCDK2-positiven Zellen wurde durch Auszählung von ca. 100 Zellen/Probe ermittelt. Kontrollen: BG und NTX (unbehandelt). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Auszählungen.



#### 4.5.6 Reduzierte Aktivierung des ATR-CHK1-Signalwegs in hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen nach BG-TMZ-Behandlung

Frühere Arbeiten an Zelllinien (Yoshioka *et al.*, 2006) deuteten auf eine wichtige Rolle des ATR-Proteins für die Aktivierung der CHK1-Kinase in Anwesenheit von postreplikativen O<sup>6</sup>-meG:T-Basenpaaren in der DNA hin. Die O<sup>6</sup>-meG-abhängige Aktivierung dieses „*checkpoint*“-Signalweges führte zu einem Zellzyklusarrest in den zweiter S-Phase nach der Behandlung mit Alkylanzien.

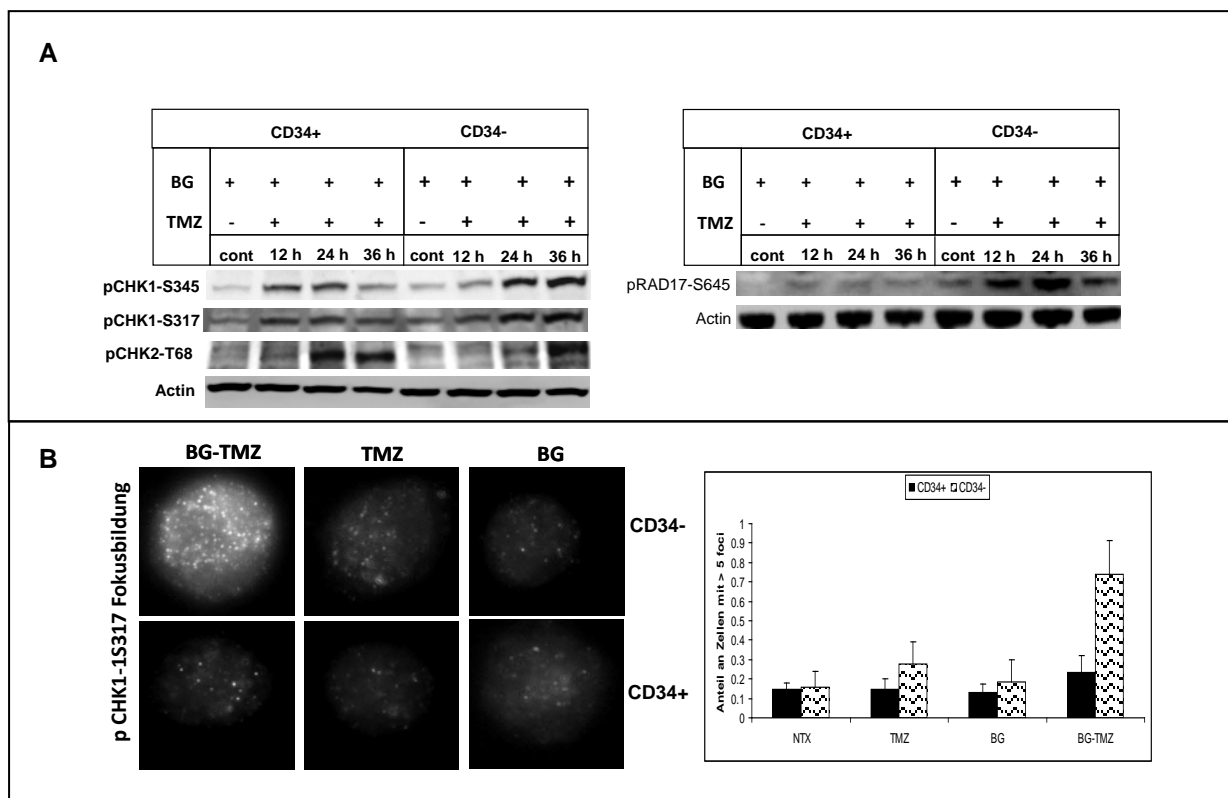
Deshalb wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob eine Deregulierung des ATR-CHK1-Signalwegs für den fehlenden Zellzyklusarrest und die frühe Apoptoseinduktion in hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen nach O<sup>6</sup>-meG-Alkylierung verantwortlich ist. Im ersten Schritt wurde die Expression der ATR-Kinase in CD34<sup>+</sup> und CD34<sup>-</sup> Zellen mittels Immunoblot bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Konzentration von ATR in Proliferations-aktiven CD34<sup>+</sup>- deutlich niedriger ist, als in der CD34<sup>-</sup> -Fraktion aus derselben Nabelschnurblutprobe (Abb. 34). Bei großer inter-individueller Varianz für diesen Expressionsunterschied fand sich kein Hinweis auf eine Beeinflussung der Proteinmenge nach DNA-Alkylierung.



**Abb. 34: Expression von ATR in proliferierenden CD34<sup>+</sup>- und CD34<sup>-</sup>-Zellen.** Zytokin-stimulierte Zellen wurden mit BG (15 µM) oder mit BG-TMZ (150 µM) behandelt, zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und in Zelllysaten die Menge an ATR-Protein im Immunoblot bestimmt. UCB A und UCB B repräsentieren Analysen aus zwei unterschiedliche Nabelschnurblutproben.

Als nächstes wurde untersucht, ob sich die beiden Zellfraktionen auch in der Aktivierung von Kinasen wie CHK1 und CHK2 unterscheiden, die in Signalwegen „*down stream*“ von ATM- und ATR-Kinasen liegen. Sowohl in CD34<sup>+</sup> - als auch in CD34<sup>-</sup> -Zellen war 24 Stunden nach BG-TMZ eine starke Zunahme der phosphorylierten Form (Tyr-68) von CHK2 nachweisbar (Abb. 35). Diese Position wird vorwiegend durch ATM-Kinase phosphoryliert.

Übereinstimmend mit der niedrigen ATR-Expression in CD34<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 34) fiel hier auch die ATR-abhängige Aktivierung der „checkpoint“-Kinase CHK1 wesentlich schwächer aus als in differenzierten T-Zellen (Abb. 35). Parallel dazu zeigten die T-Zellen nach *in situ*-Färbung eine deutlich stärkere nukleäre Clusterbildung (Foci) von pCHK1-Proteinen nach BG-TMZ Behandlung (Abb. 35). Eines der frühen Ereignisse bei der Aktivierung des ATR-CHK1-„checkpoints“ ist die Phosphorylierung von RAD17 (an Ser645) durch ATR. Wie erwartet, induziert BG-TMZ-Behandlung eine starke Phosphorylierung von RAD17-Protein nur in CD34<sup>-</sup>-Zellen und nicht in CD34<sup>+</sup>-Zellen. Diese Befunde, weisen auf eine reduzierte Funktionalität bzw. Aktivierbarkeit der ATR-Chk1-„checkpoint“ in proliferationsaktiven hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>) hin. Möglicherweise spielt dies eine wichtige Rolle für den abwesenden S-Phasearrest und die frühe Induktion von Apoptose in CD34<sup>+</sup> Zellen nach BG-TMZ-Behandlung.



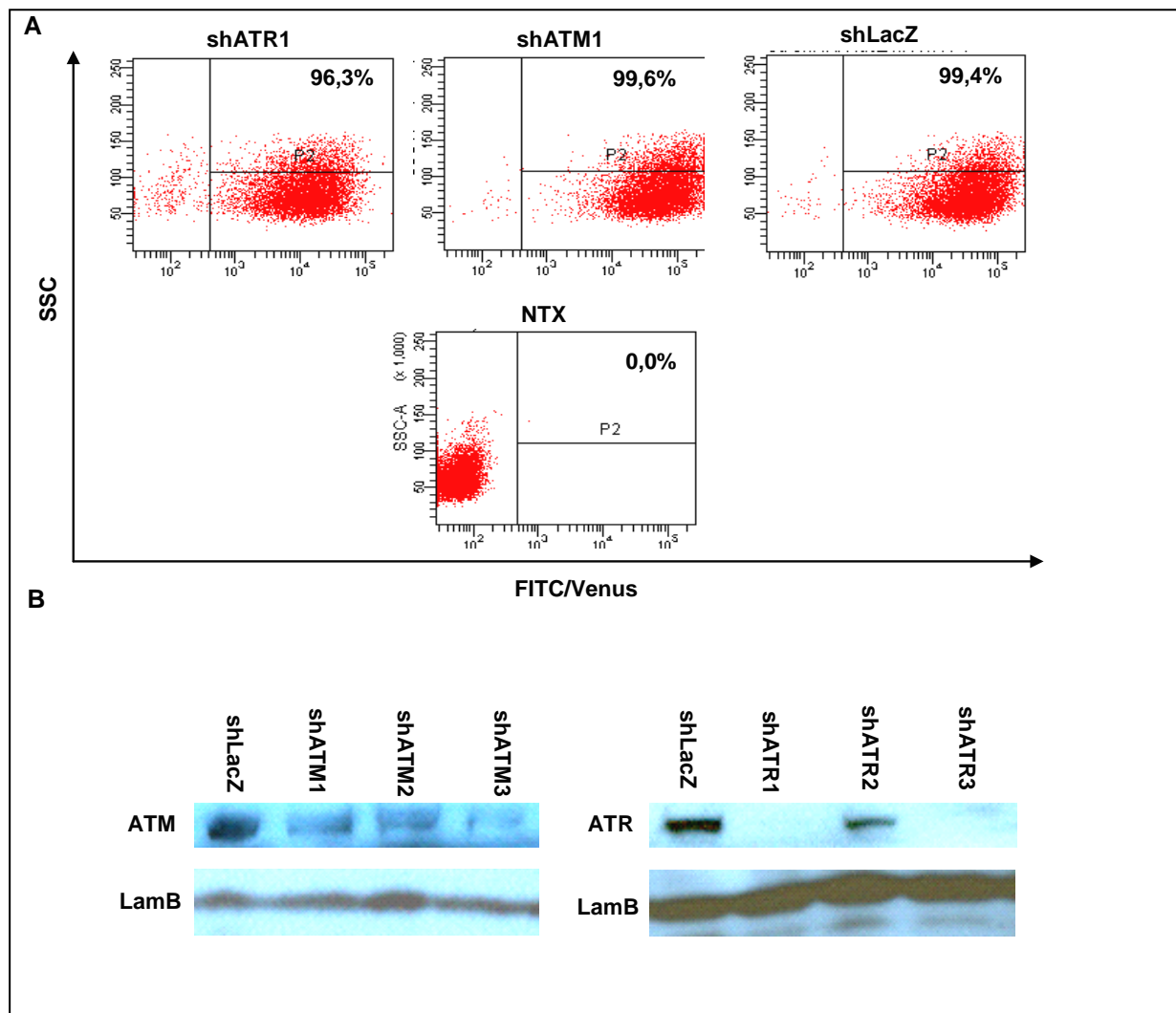
**Abb. 35: Reduzierte Aktivierung des ATR-CHK1-Signalwegs in Stamm/Vorläuferzellen durch O<sup>6</sup>-meG.** A: Proliferierende CD34<sup>+</sup> - oder CD34<sup>-</sup>-Zellen wurden mit BG (15 µM), mit TMZ (150 µM) oder mit beiden Substanzen behandelt, nach 12, 24 und 36 h Proben genommen und in Zelllysaten die Menge an phosphoryliertem CHK1-, CHK2- und RAD17-Protein mit spezifischen Antikörpern im Immunoblot bestimmt. B: Zur Visualisierung der Focusbildung von phosphoryliertem CHK1-Protein im Kern wurden Zellen wie unter A behandelt (TMZ: 25 µM), und nach 24 h mit pCHK1 (Ser317)-spezifischen Antikörpern gefärbt. Für die quantitative Auswertung wurde der prozentuelle Anteil an Zellen, die mehr als 5 nukleäre Foci zeigten, am Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten und 200 ausgezählten Kernen / Zellprobe.

#### 4.5.7 Eine reduzierte Expression von ATR sensitiviert Jurkat-Zellen gegenüber O<sup>6</sup>-meG

Die im vorherigen Abschnitt dargestellte schwächere Aktivierung des ATR-CHK1-Signalweges in hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen deutet auf eine zentrale Rolle der ATR-Kinase für die zelluläre Antwort proliferierender hämatopoetischer Zellen auf TMZ-Alkylierungsschäden.

Um die Bedeutung der ATM- und der ATR-Kinase für die Chemosensitivität von hämatopoetischen Zellen weiter zu untersuchen, wurden entsprechende lentivirale shRNA-Konstrukte erstellt (s. Material u. Methoden, Kap. 3.2.2.6 – 3.2.2.8), mit denen sich der intrazelluläre Proteinspiegel für diese Kinasen vermindern lässt. Die Wirkung von „*small hairpin*“ (sh)-RNA-Expression beruht auf der Degradierung spezifischer (sequenz-homologer) Transkripte (Stanislawska & Olszewski, 2005).

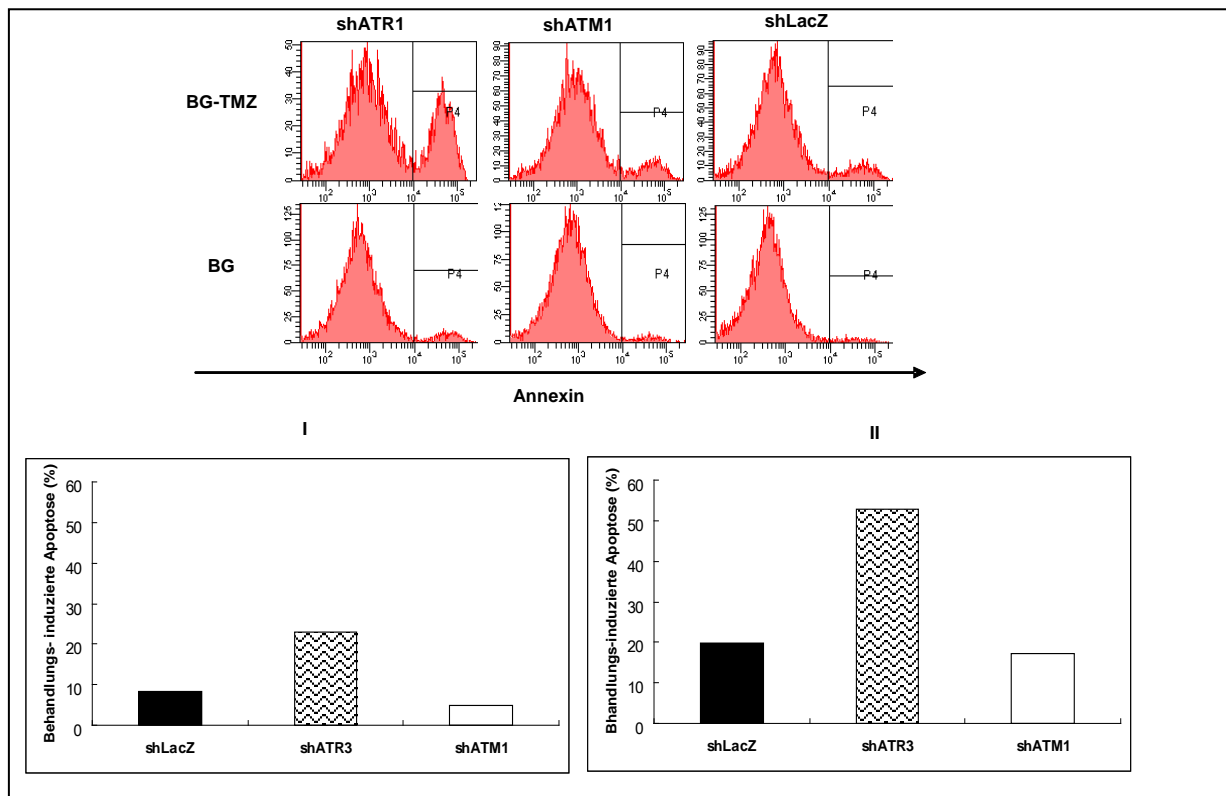
Als Zellkulturmodell für differenzierte T-Lymphozyten wurden humane Jurkat-Zellen verwendet, da sie für beide Kinasen, ATR und ATM, eine vergleichsweise hohe Expression aufweisen. Als erstes wurden Jurkat-Zellen mit den Konstrukten shATR1 (EGFP), shATM1 (Venus) und shLacZ (EGFP) als Kontrolle transduziert und die Transduktionsraten 48 Stunden später mittels FACS-Analyse ermittelt. Für alle verwendeten Vektoren konnten sehr hohe Transduktionsraten (95 – 100 %) erzielt werden (Abb. 36). Die Immunoblot-Analyse zeigte, dass 72 Stunden nach der Transduktion die Spiegel des ATR-Proteins um 90 % und die des ATM-Proteins um 70% reduziert waren (Abb. 36).



**Abb. 36: shRNA-vermittelte Reduktion der Proteinspiegel von ATM und ATR in Jurkat Zellen.** A: Zellen der humanen T-Zell-Linie Jurkat wurden mit lentiviralen Vektoren transduziert, die shRNA-Sequenzen entweder für ATR oder für ATM enthielten (Negativkontrolle: LacZ-spezifisch). Die Transduktionseffizienz wurde 48 h danach anhand der ko-exprimierten Marker EGFP (ATR und LacZ) und Venus (ATM) durchflusszytometrisch bestimmt. NTX: nicht-transduzierte Parentalzellen. B: Bestimmung der zellulären Konzentration von ATM bzw. ATR in Lysaten der einzelnen Zellproben 72 h nach Transduktion mittels Immunoblot (LamB: Ladungskontrolle).

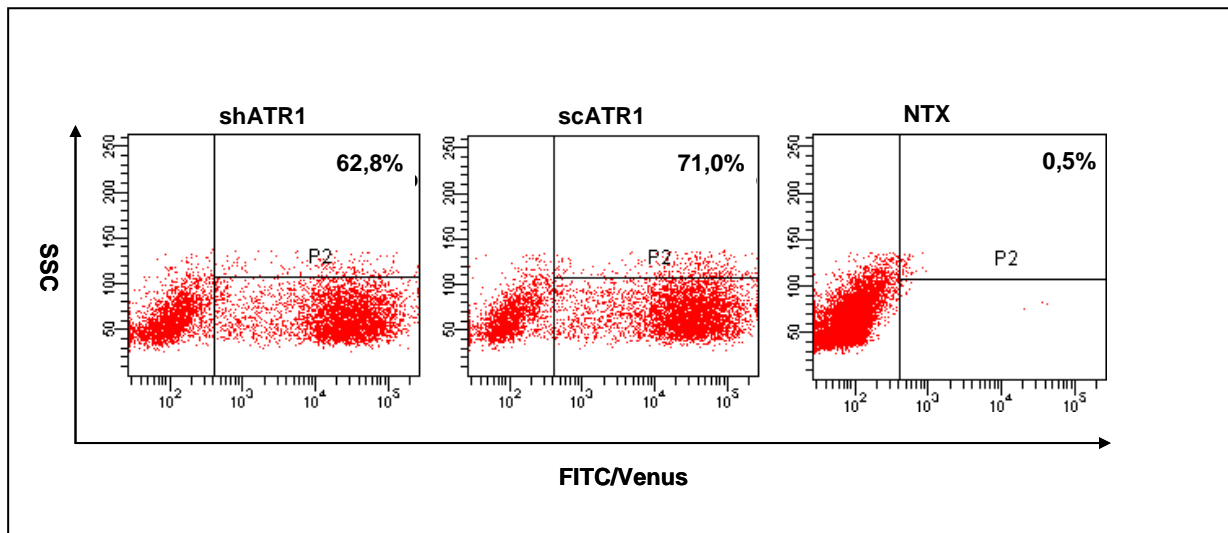
Um zu testen, ob reduzierte zelluläre Spiegel von ATR- oder ATM-Kinase die Zytotoxizität von TMZ verändern, wurden shRNA-transduzierten Jurkat-Zellen (72 Stunden nach Transduktion) mit BG (15  $\mu$ M) und TMZ (300  $\mu$ M) behandelt und 48 Stunden später die Apoptosinduktion am FACS bestimmt (Abb. 37). Nur die Verminderung von ATR, nicht aber von ATM führte zu einer deutlich gesteigerten Empfindlichkeit der Jurkat-Zellen gegenüber BG-TMZ (Abb. 37). Diese Daten weisen auf eine zentrale Rolle der ATR-Kinase für eine effiziente zelluläre Antwort auf DNA-Methylierungsschäden hin. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die verminderte ATR-Expression und die dadurch reduzierte CHK1-Aktivierung in proliferierenden primären hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>) für das

Fehlen des Zellzyklusarrest und die frühe Apoptose-Induktion nach Methylierung an der O<sup>6</sup>-Position des Guanin verantwortlich sind.



**Abb. 37: Bestimmung der Apoptoserate bei shRNA-transduzierten Jurkat-Zellen 48 h nach Behandlung mit BG (15  $\mu$ M) und TMZ (300  $\mu$ M).** Oben: Exemplarische Beispiele der durchflusszytometrische Messung nach Annexin-V/7AAD-Doppelfärbung. Unten: Quantitative Auswertungen von zwei unabhängigen Transduktionsexperimenten. Die Apoptoserate entspricht dem prozentuellen Anteil an Annexin-positiven Zellen in der gemessenen Probe.

Basierend auf diesen Befunden wurde schließlich versucht, frisch aus Nabelschnurblut isolierte CD34<sup>+</sup>-Zellen mit shATR1 und scATR1 (Kontrollvektor: enthält eine nicht-funktionelle shRNA-Sequenz von ATR) zu transduzieren. Mit diesen Vektoren konnten 50-75 % der primären Zellen erfolgreich transduziert werden (Abb. 38). Leider konnte Aufgrund der niedrigen verfügbaren Anzahl transduzierter Zellen nach der durchflusszytometrischen Sortierung keine weiteren Analysen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden.



**Abb. 38: Erfolgreiche Transduktion von hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen mit Lentivirus-basierten shRNA-Konstrukten.** Für die Transduktion wurden die Zellen entweder mit shATR1- oder scATR1-Vektoren behandelt. Nach 48 h wurde die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt. shATR1: lentiviraler Vektor mit shRNA gegen ATR und EGFP als Reporter, scATR1: lentiviraler Vektor mit unspezifischer Sequenz von ATR und EGFP als Reporter

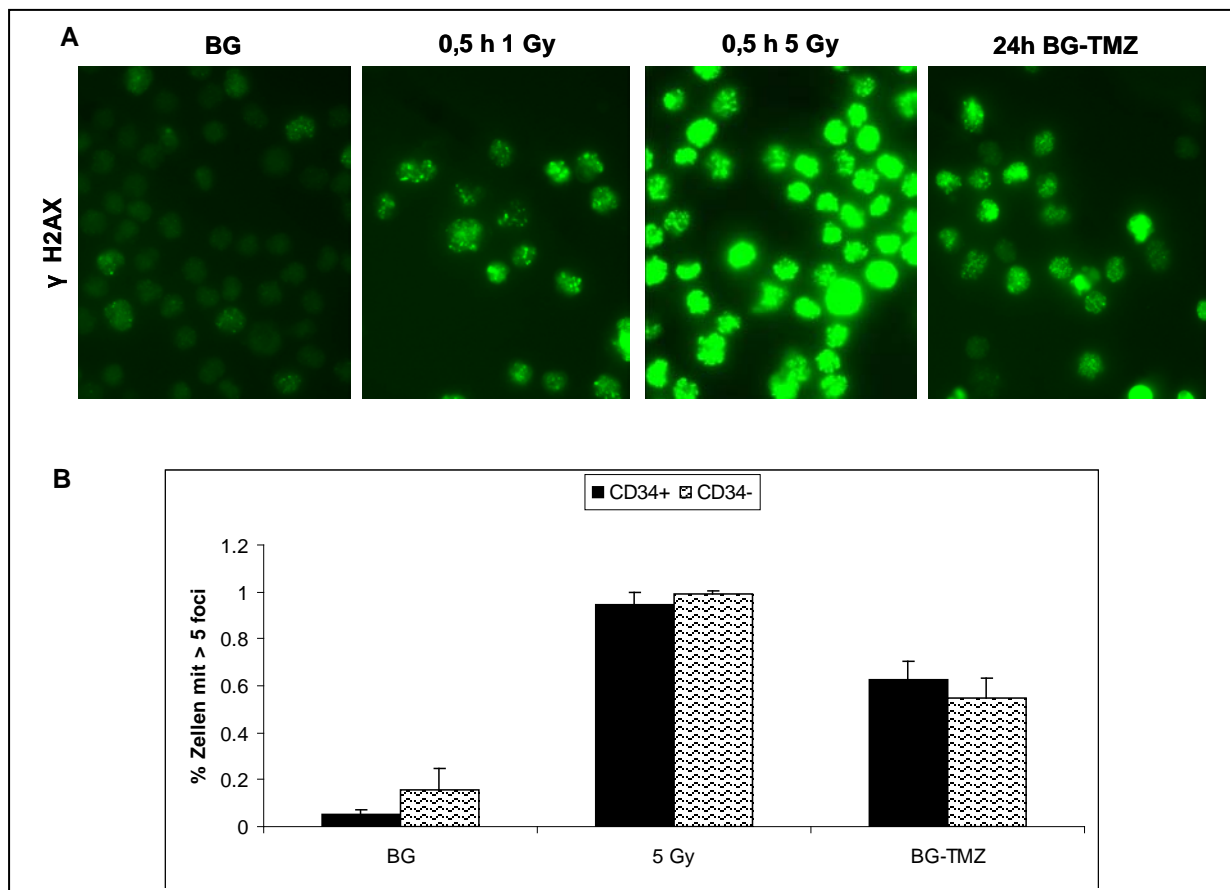
#### 4.5.8 Frühe Entstehung von $\gamma$ H2AX- und RAD51-Foci im Kern BG-TMZ-behandelter hämatopoetischer Stamm/Vorläuferzellen

Um die Art der DNA-Schäden näher zu charakterisieren, die zum Zelltod bei proliferierenden primären hämatopoetischen Zellen nach BG-TMZ führen, wurde die Entstehung nuklearer Foci von  $\gamma$ H2AX und RAD51 fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die phosphorylierte Form des Histons H2AX ( $\gamma$ H2AX) akkumuliert an DNA-Doppelstrangbrüchen (Rogakou *et al.*, 1999) und spielt eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung weiterer DNA-Reparatur-Proteine an diese Stellen (Paull *et al.*, 2000). RAD51 hingegen ist ein essentielles Protein des HR-Reparaturweges (s. Einleitung, Kap. 1.1.5). Die Entstehung von RAD51-Foci weist auf eine Aktivierung der Homologen Rekombination hin (Raderschall *et al.*, 1999). Daher kann aus einer lokalen Akkumulation von  $\gamma$ H2AX und von RAD51 im Zellkern auf die Entstehung bzw. auf einen Reparatursversuch von DNA-Doppelstrangbrüchen geschlossen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob eine Behandlung mit ionisierender Strahlung oder mit BG-TMZ bei proliferationsaktiven primären hämatopoetischen Zellen zur Bildung solcher  $\gamma$ H2AX-Foci führt.

Für diesen Zweck wurden CD34<sup>+</sup> - und CD34<sup>-</sup> -Zellen entweder bestrahlt und für 30 Minuten bei 37°C nachinkubiert oder einer für 24 Stunden einer Behandlung mit BG-TMZ unterzogen. Anschließend wurden die Zellen auf Objektträgern getropft, mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit  $\gamma$ H2AX-spezifischen Antikörpern gefärbt. Der

relative Anteil an Zellen, die mindestens fünf nukleare Foci aufwiesen, wurde am Floureszenzmikroskop bestimmt (Abb. 39). Wie erwartet, fanden sich bei fast allen bestrahlten Primärzellen  $\gamma$ H2AX-Foci und die Anzahl der Foci pro Zellkern war proportional zur Strahlendosis. Aber auch die Zellen, die mit BG-TMZ behandelt waren, zeigten eindeutig eine  $\gamma$ H2AX-Fokusbildung (Abb. 39). Im Gegensatz zur Bestrahlung waren 24 Stunden nach BG-TMZ jedoch nur etwa die Hälfte der Zellen  $\gamma$ H2AX-positiv (Abb. 39), Dieser Befund weist auf eine mögliche Rolle der Zellzyklusphasen für die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach einer Guanin-O<sup>6</sup>-Methylierung hin.



**Abb.39: Bildung von  $\gamma$ H2AX-Foci in proliferierenden primären hämatopoetischen Zellen nach Bestrahlung oder nach BG-TMZ Behandlung.** A: Cytokin-stimulierte CD34<sup>-</sup>-Zellen wurden entweder mit Röntgenstrahlung behandelt (1 bzw. 5 Gy, Nachinkubation: 30 Minuten bei 37°C) oder mit BG (15  $\mu$ M) und TMZ (150  $\mu$ M) für 24 h behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit BG behandelt wurden. Die Zellen wurden anschließend fixiert, mittels spezifischer Antikörper für  $\gamma$ H2AX gefärbt und am Floureszenzmikroskop untersucht. B: Quantitative Auswertung: Anteil der Zellen mit mehr als fünf  $\gamma$ H2AX-Foci/Zellkern (Auszählung von 200 Zellen). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Zählungen.

Wie oben beschrieben, können nicht rechtzeitig reparierte O<sup>6</sup>-meG-Addukte in der DNA replizierender Zellen zur Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen in der zweiten S-Phase führen (Roos *et al.*, 2009; Mojas *et al.*, 2007; Kaina *et al.*, 1997). Ob

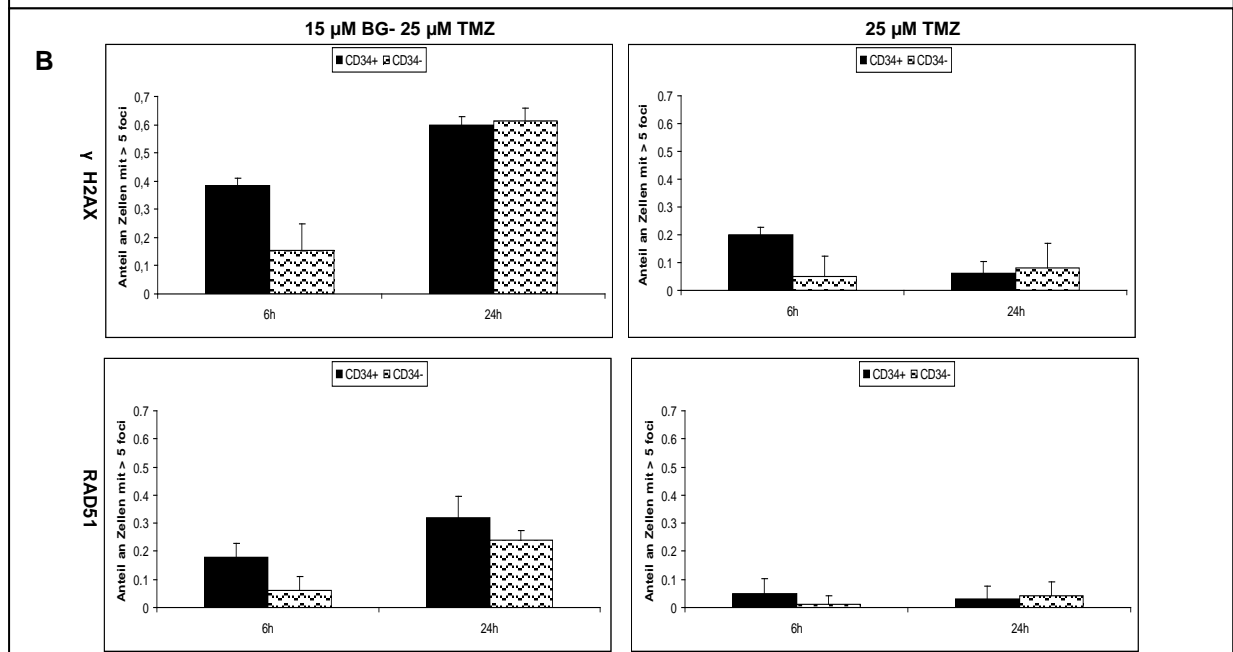
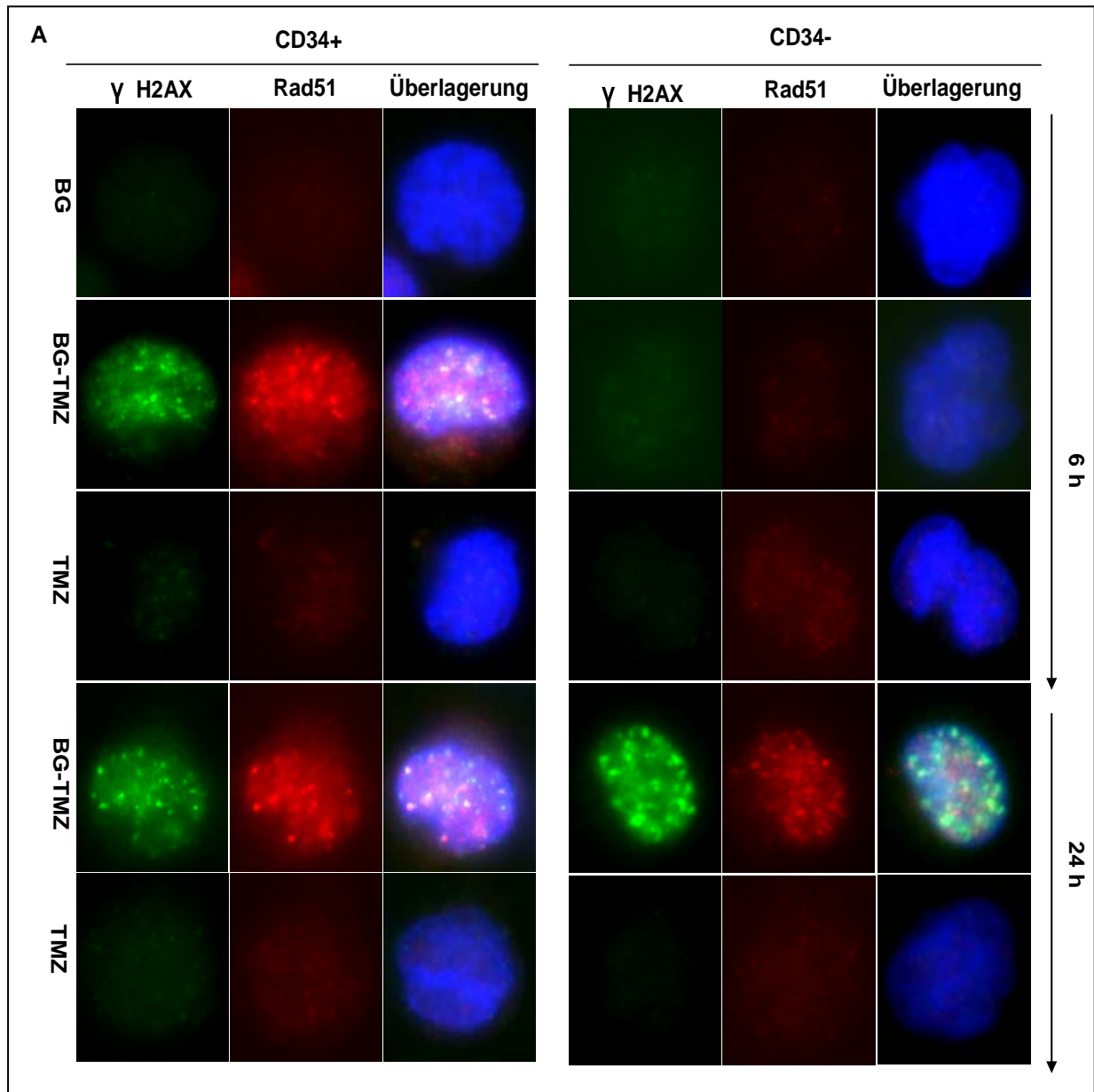
gegebenenfalls fehlerhaft prozessierte  $O^6$ -meG-Addukte in Stamm/Vorläuferzellen schon während der erste S-Phase nach Alkylierung in DNA-Doppelstrangsbrüche konvertiert werden, wurde im nächsten Schritt untersucht. Dazu wurden proliferierende  $CD34^+$  - und  $CD34^-$  -Zellen mit TMZ oder BG-TMZ behandelt, nach 6 bzw. 24 Stunden Proben genommen und diese für  $\gamma$ H2AX- und RAD51-Foci analysiert. Dabei zeigte sich eine Focusbildung für beide Proteine im Kern vieler Stamm-/Vorläuferzellen bereits 6 Stunden nach BG-TMZ, nicht aber nach TMZ allein (Abb. 40). Die Foci waren partiell kolokalisiert.

Im Gegensatz dazu war in BG-TMZ-behandelten T-Zellen zu diesem Zeitpunkt nur eine minimale Zunahme der Focusbildung gegenüber den Kontrollen feststellbar. Vierundzwanzig Stunden nach der Behandlung waren jedoch auch hier ( $CD34^-$  - Zellen) eindeutige  $\gamma$ H2AX- und RAD51-Foci zu sehen. Zellen mit  $\gamma$ H2AX-Foci waren in den meisten Fällen auch positiv für RAD51.

Diese Daten deuten auf eine frühe Konvertierung von  $O^6$ -meG-Läsionen in DNA-Doppelstrangbrüche in  $CD34^+$  -Zellen schon während der ersten S-Phase nach der BG-TMZ-Behandlung hin. Die vergleichsweise späte Fokusbildung (24 Stunden nach Behandlung) in  $CD34^-$  -Zellen steht im Einklang mit der Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüche nach dem „klassischen“ Modell in der zweiten Replikationsrunde. Die Tatsache, dass die  $\gamma$ H2AX - Foci partiell mit dem HR-Protein RAD51 kolokalisiert waren, weist auf eine wichtige Rolle dieses Reparaturmechanismus für die Prozessierung  $O^6$ -meG-T -Basenpaaren in beiden Zellpopulationen hin.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit BG-TMZ war fast keine Alkylanzien-induzierten Fokusbildung nach Behandlung beider Zellpopulationen mit TMZ allein detektierbar. Diese Beobachtung unterstreicht die essentielle Rolle der  $O^6$ -meG-Addukte für die Entstehung der sekundären DNA-Doppelstrangbrüche.





**Abb. 40: Frühe Bildung von  $\gamma$ H2AX- und RAD51-Foci im Kern hämatopoetischer Stamm/Vorläuferzellen durch persistierende O<sup>6</sup>-meG-Addukte.** Proliferierende CD34<sup>+</sup> - bzw. CD34<sup>-</sup>-Zellen wurden mit BG (15  $\mu$ M) alleine oder in Kombination mit TMZ (25  $\mu$ M) behandelt, nach 6 und 24 h Proben genommen und für  $\gamma$ H2AX und RAD51 mit Antikörpern gefärbt. A: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Zellproben: grün:  $\gamma$ H2AX; rot: RAD51; blau: DAPI-DNA. B: Quantitative Auswertung: Relativer Anteil an Zellen mit mehr als fünf Foci/Zellkern (Auszählung von 200 Zellen / Probe). Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten

## 5. Diskussion

Die in dieser Arbeit untersuchte O<sup>6</sup>-MeG-Geno- und Zytotoxizität umfasst einen sehr breiten Bereich an spannenden Wissenschaftlichen Fragestellungen, die sowohl für die klinische Anwendung als auch für die Grundlagenforschung von enormer Bedeutung sind. Während im ersten Teil dieser Arbeit die O<sup>6</sup>-MeG-Toxizität und Retrovirus vermittelte Chemoprotektion gegenüber O<sup>6</sup>-methylierende Agenzien von hämatopoetischen Stammzellen im murinen System untersucht wurde, stand im zweiten Teil dieser Arbeit die besondere „DNA damage response“ von humanen hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>) im Vordergrund.

### 5.1 Rolle der MGMT-abhängigen Reparatur von O<sup>6</sup>-meG-Addukten für die murine Hämatopoese nach DNA-Alkylierung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Selektion und Chemoprotektion von murinen hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen nach Retrovirus vermitteltem MGMT<sup>P140K</sup>-Gentransfer untersucht. Wie in Kapitel 1.1.1 dargestellt wurde, spielt das DNA-Reparatur Protein MGMT eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität, indem es die cytotoxischen und hochmutagenen O<sup>6</sup>-meG-Läsionen aus der DNA entfernt. Während MGMT-defizienz mit erhöhter Karzinogenese und Chemosensitivität gegenüber alkylierende Agenzien assoziiert wird, führt MGMT-Überexpression zur verminderten Karzinogenese und zur Chemoprotektion gegenüber O<sup>6</sup>-methylierenden Agenzien.

Im Rahmen dieser Studie wurden folgende Fragenstellungen erforscht: I) Wie viel MGMT<sup>P140K</sup> ist notwendig, um eine *in vivo* bzw. *in vitro* Selektion und Chemoprotektion hämatopoetische Stammzellen erzielen zu können. II) Korreliert die MGMT<sup>P140K</sup>-Expressionslevel mit dem O<sup>6</sup>-MeG-Reparaturphenotyp und mit der Chemoprotektionseffizienz nach *in vivo* Exposition zu O<sup>6</sup>-methylierenden Agenzien. III) Welchen Einfluss üben unterschiedliche Expressionslevel von MGMT<sup>P140K</sup> auf Stammzellfunktion *per se* aus.

### **5.1.1 Gentransfer des mutierten MGMT<sup>P140K</sup>-Proteins in L1210-Zellen führt zu einer effizienten Reparatur von O<sup>6</sup>-meG-Adukten und vermittelt Chemoresistenz gegenüber Alkylanzien**

Ob eine transgene Expression des BG-resistenten MGMT<sup>P140K</sup>-Proteins hämatopoetische Zellen vor der zytotoxischen Wirkung O<sup>6</sup>-methylierende Agenzien schützt, wurde an retroviral transduzierten murinen L1210-Zellen untersucht (Kap. 4.1-4.2). Wie erwartet, zeigten MGMT<sup>P140K</sup>-exprimierende L1210-Zellen eine hocheffiziente DNA-Reparaturaktivität für O<sup>6</sup>-meG. Schon zwei Stunden nach einer Exposition der Zellen mit einer sehr hohen TMZ-Dosis konnten keine Behandlungs-induzierten O<sup>6</sup>-MeG-Läsionen mehr in der DNA gemessen werden, wogegen nicht-transduzierte Zellen zu diesem Zeitpunkt eine eindeutige Dosis-abhängige Zunahme der Addukte zeigten (Kap. 4.1.2). Die transduzierten Zellen wiesen außerdem eine erheblich gesteigerte Resistenz gegenüber einer TMZ-Behandlung auf. In Übereinstimmung mit Daten, die an hämatopoetischen Vorläuferzellen mit der BG-Resistenten-Mutant-MGMT<sup>P140K</sup> erhoben wurden (Ragg *et al.*, 2000; Jansen *et al.*, 2002), belegen diese Befunde, dass, ein Gentransfer von MGMT<sup>P140K</sup> bei hämatopoetischen Zellen zu einer verbesserte DNA-Reparatur und zu einer effizienten Chemoprotektion gegenüber O<sup>6</sup>-alkylierende Agenzien führt.

### **5.1.2 MGMT<sup>P140K</sup> Gentransfer vermittelt eine effiziente Chemoprotektion von hämatopoetischen Stammzellen *in vivo***

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der optimalen MGMT<sup>P140K</sup>-Expression für eine effiziente und sichere Chemoprotektion hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark der Maus (Kap. 4.3). Dabei wurden zwei antagonistische Faktoren berücksichtigt: Einerseits erlaubt eine hohe transgene MGMT<sup>P140K</sup>-Expression eine effiziente Entfernung von O<sup>6</sup>-meG aus der DNA. Andererseits wird eine hohe Expression des Proteins nur durch die Verwendung starker Promotor-„*Enhancer*“-Elementen erreicht, die zu einer Hochregulation von Proliferations-relevanten Genen in der Nähe der proviralen Insertionsstelle (Insertionsmutagenese) führen können (Review in Baum C, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch relativ schwache zelluläre Promotoren wie PGK und EFS zu einer ausreichend hohen MGMT<sup>P140K</sup> Expression führen, um eine effiziente Entfernung von O<sup>6</sup>-meG aus der DNA bereits

zwei Stunden nach der *in vivo* BG-TMZ Behandlung zu gewährleisten (Kap. 4.3.2). Eine sehr wichtige Frage für die zukünftige klinische Anwendung solcher Protektionstrategien war, ob die Transgen-vermittelte Reparaturleistung dieser Zellen ausreicht, um das Auftreten von TMZ-induzierten genotoxischen Schäden im hämatopoetischen System zu unterdrücken, Belegt wurde dies durch Mutationsanalysen im Reportergen *lacZ* an primären Knochenmarkzellen der Maus (Kap. 4.3.2; Milsom *et al.*, 2008). Transplantierte MGMT<sup>P140K</sup>-transgene Zellen wiesen nach einer *in vivo*-Exposition mit BG-TMZ ähnlich niedrige Mutationsraten auf, wie die hämatopoetischen Zellen unbehandelter Mäuse. Bei Tieren mit Transplantierten Stammzellen, die nur mit dem EGFP-Kontrolvektor (ohne MGMT<sup>P140K</sup>) transduziert waren, lag die Frequenz der TMZ-induzierten Mutationen um den Faktor 10 höher (Kap. 4.3.2; Milsom *et al.*, 2008). Die effiziente Reparatur der O<sup>6</sup>-meG-Addukte bei Verwendung relativ schwacher Promotor-„*Enhancer*“-Elemente korreliert demnach gut mit einer verbesserten *in vivo* Chemoprotektion und Selektion hämatopoetischer Stammzellen sowie mit der vollständigen Unterdrückung des mutagenen Potentials dieser Läsionen. Dies sind wichtige Erkenntnisse, die beim Vektordesign für mögliche klinische Anwendungen berücksichtigt werden müssen (Milsom *et al.*, 2008).

#### **5.1.2.1 Eine sehr hohe Expression von mutantem MGMT<sup>P140K</sup>-Protein führt zu einer reduzierten *in vivo* Chemoprotektion hämatopoetischer Stammzellen**

Unerwarteter Weise wirkte sich die sehr hohe Expression von MGMT<sup>P140K</sup> negativ auf die *in vivo*-Chemoprotektion bzw. Selektion der SF-MGMT-transduzierten hämatopoetischen Stammzellen aus (Kap. 4.3.1). Da auch hier die O<sup>6</sup>-meG-Addukte sehr effizient aus der alkylierten DNA entfernt wurden, liegt die reduzierte Chemoprotektion nicht an einer ungenügenden Reparaturleistung dieser Zellen (Kap. 4.3.2). „*Engraftment*“-Studien bei transplantierten Mäuse zeigten, dass Stammzellen mit sehr hoher MGMT<sup>P140K</sup>-Transgen-Expression nach BG-TMZ-Behandlung in weit geringerem Maße im Knochenmark angereichert wurden, als solche mit lediglich moderater Transgen-Expression (Kap. 4.3.1 & Milsom *et al.*, 2008). Diese Daten weisen auf einen Proliferations-defekt von Stammzellen hin, die sehr hohe Spiegel des mutierten MGMT<sup>P140K</sup>-Proteins enthalten.

Um den Befund näher zu charakterisieren, wurden transduzierte 32D-Zellen untersucht, die unterschiedliche Mengen des MGMT<sup>P140K</sup>-Proteins enthielten. Erwartungsgemäß und übereinstimmend mit den *in vivo*-Daten konnte ein Proliferationsdefekt nur in 32D Zellen gefunden werden die mit dem SF-MGMT-Vektor transduziert waren und in denen das BG-resistente mutierte Protein (MGMT<sup>P140K</sup>) in sehr hohen Konzentrationen vorlag (Kap. 4.4.1).

### **5.1.2.2 Die Mutation P140K führt zu einer veränderten subzellulären Lokalisation des MGMT-Proteins**

Bei der Analyse der subzellulären Verteilung verschiedener Transgen-exprimierten MGMT-Mutanten zeigten sich deutlich unterschiedliche Lokalisationsmuster in 32D- und 3T3-Zellen.

Während die Wildtyp (WT)-MGMT und die Mutante MGMT<sup>C145A</sup> sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachweisbar waren, fand sich das MGMT<sup>P140K</sup> Protein fast ausschließlich in der Kernfraktion (Kap. 4.4.2). Vermutlich beruht diese Fehlverteilung auf einer verstärkten Bindung an Chromatinstrukturen oder direkt an die DNA und ist möglicherweise die Ursache für den beobachteten Proliferationsdefekt.

Da dieser nur bei Zellen mit einem sehr hohen Expressionsniveau an mutiertem MGMT<sup>P140K</sup>-Protein beobachtet wurde, lässt sich vermuten, dass ein bestimmter Schwellenwert erreicht sein muss, um diese Defekte zu induzieren. Ein Überschuss an Chromatin-assoziiertem MGMT<sup>P140K</sup>-Protein kann möglicherweise zur sterischen Behinderung wichtiger zellulären Vorgänge wie DNA- oder RNA-Synthese führen. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, dass MGMT in unbehandelten Zellen an DNA-Sequenzen mit aktiver Transkription lokalisiert ist (Ali *et al.*, 1998). Der hier beobachtete verlangsamte Abbau der P140K-Variante im Vergleich zur WT-MGMT in 3T3-Zellen nach Behandlung mit BG-TMZ (Kap. 4.4.3) weist ebenfalls auf eine stärkere Chromatinassoziation des mutierten Proteins hin, die ihrerseits zu einer verlangsamten Ubiquitin-vermittelten Degradation nach Reparatur eines O<sup>6</sup>-meG-Adduktes führen kann.

Zusammengenommen sprechen diese Daten für die Verwendung von vergleichsweise schwachen Promotorelementen bei der Konstruktion zukünftiger MGMT<sup>P140K</sup>-Vektoren für den gentherapeutischen Einsatz in der Klinik. Solche Vektoren vermitteln einerseits eine ausreichend starke Expression des Inhibitor-

resistenten DNA-Reparaturproteins für eine effiziente Entfernung der Therapie-induzierten zytotoxischen und mutagenen O<sup>6</sup>-meG-Addukte, vermeiden andererseits aber die Störung überlebensnotwendiger Prozesse in den Zielzellen durch überlagernde Sekundäreffekte.

## **5.2 „DNA damage response“ bei humanen hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen auf persistierende O<sup>6</sup>-meG-Schäden**

In den letzten Jahren hat unser Wissensstand über die Mechanismen, die der O<sup>6</sup>-meG-induzierte Toxizität in Säugerzellen zugrunde liegen, erheblich zugenommen. Die überwiegende Zahl dieser Ergebnisse beruht jedoch auf Untersuchungen an transformierten Zellsystemen. Demgegenüber gibt es nur relativ wenige Beobachtungen an primären Zellen oder gar an speziellen Populationen des hämatopoetischen Systems. Da das zytotoxische Potential von O<sup>6</sup>-meG in der DNA proliferationsaktiver hematopoëtischer Stamm/Vorläuferzellen vermutlich die Hauptursache für die häufig schwerwiegende Myelosuppression bei einer Tumorthherapie mit DNA-methylierenden Medikamenten darstellt, ist ein eingehendes Verständnis der ausgelösten „DNA damage response“ –Vorgänge in diesen Zellen von großem Interesse.

Darüber hinaus können Erkenntnisse über die Abläufe der „DNA damage response“ in Zellen des blutbildenden Systems auch helfen, sehr grundlegende Fragen zum Verhalten von adulten Stammzellen zu beantworten: (I) Wie reagiert eine Stammzelle auf genotoxischen und zytotoxischen Stress? (II) Sind Stammzellen resistenter oder empfindlicher als weiter differenzierte Zellen gegenüber Schäden in der genomischen DNA? (III) Halten Stammzellen nach struktureller Beschädigung der DNA die Zellzyklusprogression an, um diese zu reparieren, und wenn ja, zu welchem Zeitpunkt? (IV) Welcher Schadenstyp ist für die Apoptoseinduktion in Stammzellen relevant? (V) Welche Rolle spielen zentrale Masterregulatoren der DNA Reparatur wie ATM und ATR für die Koordination der „DNA damage response“, die Signalweiterleitung und letztlich für das Überleben von Stamm/Vorläuferzellen sowie die Erhaltung eines funktionellen Stammzellpools?

### 5.2.1 Proliferationsaktive hämatopoetischer Stamm/Vorläuferzellen zeigen eine sehr frühe Apoptose-Induktion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht rechtzeitig reparierte O<sup>6</sup>-meG-Addukte in der DNA von Stamm/Vorläuferzellen aber auch bei differenzierten T-Zellen ein sehr hohes zytotoxisches Potential besitzen, wenn diese aktiv proliferieren (s. Kap. 4.5.2). Die übrigen durch methylierende Agenzien induzierten DNA-Schäden, die beispielsweise bei TMZ über 90 % der Addukte ausmachen, spielen demgegenüber nur eine untergeordnete Rolle. Das konnte für beide untersuchten Zelltypen durch den Einsatz des pharmakologischen MGMT-Inhibitors BG, der spezifisch die Reparatur von O<sup>6</sup>-meG verhindert, eindeutig belegt werden (Kap. 4.5.2). Nach dem derzeit favorisierten Modell erfolgt die Apoptose-Induktion durch persistierende O<sup>6</sup>-meG-Addukte in indirekter Weise durch ein komplexes Zusammenwirken verschiedener Prozesse an der DNA (s Kap. 1.7). Dieses Modell umfasst eine Basenfehlpaarung während der ersten Replikation, nachfolgend lang anhaltende Reparaturversuche an dem entstandenen "mismatch" durch das *DNA-Mismatch-Reparatur-System* (MMR) und schließlich die Entstehung von Doppelstrangbrüchen an solchen Stellen während der zweiten S-Phase (Karran, 2001; Mojas *et al.*, 2007). Wie in Abschnitt 4.5.2 gezeigt, gehen jedoch hämatopoetische Stamm/Vorläuferzellen, anders als differenzierte T-Zellen bereits 12 bis 24 Stunden nach einer BG-TMZ-Behandlung in die Apoptose. Da diese Zellen unter den gewählten experimentellen Bedingungen eine Verdopplungszeit von 24 Stunden aufweisen, können sie zu diesem Zeitpunkt die zweite S-Phase noch nicht erreicht haben. Das legt nahe, dass bei Stamm/Vorläuferzellen ein alternativer Mechanismus zur Apoptose-Induktion durch O<sup>6</sup>-meG vorliegt, der bereits in der ersten S-Phase zum Tragen kommt. Diese Reaktion verhindert möglicherweise das Überleben teilungsaktiver Stammzellen mit beschädigter DNA und so die Weitergabe von Mutationen an eine der beiden Tochterzellen (Stammzelle und determinierte Vorläuferzelle).

Bei proliferierenden T-Zellen hingegen, die unter den gegebenen Bedingungen eine wesentlich kürzere Verdopplungszeit von 16 Stunden aufweisen, lässt sich eine nennenswerte Apoptose-Induktion erst 36 bis 72 Stunden nach der Alkylierung beobachten. Damit verhalten sich diese Zellen analog dem oben beschriebenen MMR-abhängigen-Modell. Des Weiteren bestätigten die Untersuchungen zur Aktivierung spezifischer Caspasen nach Behandlung der Zellen mit BG-TMZ (Kap.



4.5.3) die frühe Apoptoseinduktion durch  $O^6$ -mG in  $CD34^+$  Zellen, die offensichtlich teilweise über den intrinsischen Signalweg (Caspase 9) verläuft. Bei T-Zellen deuten die starke Induktion des FAS-Rezeptors und die Spaltung von Caspase 8 demgegenüber auf eine späte Signalaktivierung vorwiegend über den extrinsischen Weg hin (Kap. 4.5.3). Die Tatsache, dass die frühe  $O^6$ -meG-induzierte Apoptose ausschließlich in teilungsaktiven, nicht aber in ruhenden Stamm/Vorläuferzellen nachweisbar war, kann auf einen schadensbedingten Zusammenbruch der Replikationsgabel in diesen Zellen hinweisen. Die im Kap. 4.5.2 beschriebene hohe Empfindlichkeit proliferierender  $CD34^+$ -Zellen gegenüber Hydroxyharnstoff unterstützt diese Hypothese und zeigt, dass es sich hier nicht um ein  $O^6$ -meG-spezifisches Phänomen handelt, sondern möglicherweise um einen generellen Mechanismus, durch den adulte Stammzellen vor der Akkumulation genetischer Schäden geschützt werden.

Diese Hypothese wird durch Studien an embryonalen Stammzellen (ES) weiter unterstützt. Dementsprechend spielt die erhöhte Sensitivität von ES-Zellen gegenüber unterschiedlichen DNA-Schäden eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität. Durch Einleiten von Apoptose oder Differenzierungsvorgängen werden beschädigte Zellen aus dem pluripotenten Stammzell-Pool entfernt (Van Sloun *et al.*, 1999; Waard *et al.*, 2003).

Ein möglicher Mechanismus stellt dabei die Deregulation von dem  $G_1$ -Checkpoint in ES-Zellen dar. Beim Ausfall von  $G_1$ -Zellzyklusarrest erreichen beschädigte Zellen die S-Phase, was eine Apoptoseinduktion aufgrund erschwerter Replikation der DNA resultiert (Prost *et al.* 1998; Hong & Stambrook, 2004). Für das Fehlen eines  $G_1$ -Arrest spielt wahrscheinlich die erhöhte zytoplasmatische Rekrutierung von p53-Protein eine wichtige Rolle (Aladjem *et al.*, 1998).

### **5.2.2 Der ausbleibende Zellzyklusarrest in hämatopoetische Stamm/Vorläuferzellen nach BG-TMZ-Behandlung beruht wahrscheinlich auf einer mangelhaften Aktivierung des ATR-CHK1-„checkpoints“**

Die fehlende Schadens-induzierte Arretierung des Zyklus vor Eintritt in die S-Phase in ES-Zellen und die dadurch aktivierte Apoptose könnten dafür verantwortlich sein, dass (überlebende) ES-Zellen eine 100-fach niedrigere Mutationsfrequenz aufweisen, als primäre embryonale Mausfibroblasten (Hong *et al.*, 2004; Tichy & Stambrook, 2008). Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnte ein Zellzyklusarrest in

der S-Phase nach Behandlung mit BG-TMZ ebenfalls nur bei differenzierten T-Zellen, nicht aber bei Stamm/Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>) detektiert werden (Kap. 4.5.4). Auch bei diesen Zellen war das fehlende Arretierungssignal mit einer signifikant erhöhten Apoptoserate schon kurze Zeit nach der Behandlung gekoppelt. Dieser Befund weist darauf hin, dass CD34<sup>+</sup>-Zellen, ähnlich wie embryonalen Stammzellen, bei Beschädigung ihres Genoms bevorzugt Zelltod-Mechanismen induzieren, anstatt nach Zellzyklusarrest den (möglicherweise vergeblichen) Versuch unternehmen, diese Läsionen zu reparieren.

Die Tatsache, dass ein S-Phase-Arrest bei T-Zellen frühestens 24 bis 36 Stunden nach DNA-Schädigung feststellbar war, lässt vermuten, dass das Arretierungssignal in diesen Zellen erst bei Erreichen der zweiten S-Phase ausgelöst wird (s. Kap. 4.5.4). Da bei TMZ-behandelten Zellen mit aktivem MGMT-Reparaturprotein keine Veränderungen in der Verteilung der Zellzyklusphasen detektierbar war, kann geschlossen werden, dass die Aktivierung des "checkpoints" und der Zellzyklusarrest offenbar von der vergleichsweise kleinen Fraktion persistierender O<sup>6</sup>-meG-Addukte ausgeht und die große Mehrheit (> 90 %) der anderen DNA-Alkylierungsprodukte dafür keine Rolle spielt (Kap. 4.5.4). Bei genauer Auswertung der FACS-Diagramme von T-Zellen nach BrdU/7AAD-Färbung tauchte 36 Stunden nach BG-TMZ Behandlung eine spezielle Zellpopulation auf, die zu frühere Zeitpunkten nicht detektierbar war (Kap. 4.5.4, Abb. 32A). Es handelte sich dabei um S-Phase-Zellen, die in der BrdU-Färbung negativ waren und offenbar außer Stande waren, eine replikative DNA-Synthese durchzuführen. In Analogie zu anderen Befunden (Mojas et al., 2007) kann vermutet werden, dass es bei diesen Zellen zu einem Zusammenbruch von Replikationsgabeln und als Folge zu Doppelstrangbrüche und der Einleitung von Apoptose kommt.

Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben wird die Zellzyklus-Progression in der S-Phase und die G<sub>2</sub>/M-Transition durch die Serin-Threonin-Kinasen CDK2 und CDC2 reguliert. Die Phosphorylierung von CDK2 und CDC2 an Tyr15 koinzidiert in der Regel mit S- bzw. G<sub>2</sub>-Arrest. Die hier gemachte Beobachtung, dass 24 Stunden nach BG-TMZ eine starke Zunahme der CDC2- und CDK2-Phosphorylierung an Tyr15 nur bei proliferierenden T-Zellen, nicht aber bei Stamm/Vorläuferzellen feststellbar war (Kap. 4.5.5), unterstützt die Annahme, dass persistierende O<sup>6</sup>-meG-Addukte in der DNA nur bei der differenzierten Zellpopulation zum Anhalten der Zellzyklusprogression führen.

Die Protein-Kinasen ATM und ATR sind Masterregulatoren der "DNA damage response", die über die Aktivierung von "checkpoint"-Signalwegen den Ablauf wichtiger zellulärer Prozesse wie DNA-Replikation, DNA-Reparatur und Apoptose steuern (Shechter *et al.*, 2004; Shilo, 2006; Shiotani & Zou, 2009). Während ATM vor allem durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert wird, reagiert ATR auf ein breites Spektrum an DNA-Schäden, die mit Replikation oder Transkription interferieren (Shiotani & Zou, 2009). Die Verfügbarkeit von funktionellem ATR-Protein ist essentiell für die Erhaltung der chromosomalen Stabilität von Zellen. Eine wichtige Rolle spielt dabei wahrscheinlich die Stabilisierung der Replikationsgabel (Trenz *et al.*, 2006). Frühere Arbeiten belegten die Funktion von ATR bei der Phosphorylierung von CHK1 in Anwesenheit postreplikativer O<sup>6</sup>-meG-T-Basenpaare in der DNA (Yoshioka *et al.*, 2006). Die Aktivierung des „checkpoint“-Signalweges führte dabei zum Zellzyklusarrest in der zweiten S-Phase nach der Methylierung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der ATR- und ATM-Kinasen für die Antwort proliferationsaktiver hämatopoetischer Zellen auf O<sup>6</sup>-meG-Addukte an der humanen T-Zelllinie Jurkat näher analysiert. Dazu wurde der Proteinspiegel von ATR bzw. von ATM durch lentivirale Transduktion der Zellen mit jeweils spezifischen shRNA-Sequenzen reduziert. Während der ATR-"knockdown" (- 90-95 %) zu einer deutlichen Sensitivierung der Zellen gegenüber BG-TMZ führte, bewirkte die Verminderung des ATM-Spiegels (- 70 %) keine nennenswerte Änderung der Apoptose-Induktion (Kap. 4.5.7). Dieser Befund legt nahe, dass Zellen mit mutagenen DNA-Läsionen wie O<sup>6</sup>-meG bei zu geringem ATR-Gehalt nicht in der Lage sind, die Zellzyklusprogression anzuhalten, sondern die replikative DNA-Synthese ungebremst fortsetzen. Dies kann dann zum Zusammenbrechen der Replikationsgabel mit anschließender Apoptose-Induktion führen.

Interessanterweise lag die basale ATR-Expression bei proliferierenden Stamm/Vorläuferzellen generell wesentlich niedriger als bei differenzierten T-Zellen des gleichen Individuums (Kap. 4.5.6). Demnach könnte die niedrige Expression der ATR-Kinase in CD34<sup>+</sup>-Zellen die molekulare Ursache darstellen für den fehlenden Zellzyklusarrest durch Guanin-O<sup>6</sup>-Alkylierung und die frühe Apoptoseinduktion. Parallel dazu wurde eine im Vergleich zu T-Zellen reduzierte Aktivierung von phospho-CHK1 und phospho-RAD17 nach BG-TMZ-Exposition bei Stamm/Vorläuferzellen gefunden (Kap. 4.5.6). Diese Kinasen werden häufig nach Beschädigung der DNA (z. B. durch UV-Licht, ionisierende Strahlung,

Hydroxyharnstoff oder DNA-reaktive Zytostatika) phosphoryliert und führen zur Aktivierung des ATR-CHK1-„checkpoints“, zum S-Phase- oder G<sub>2</sub>-Zellzyklusarrest und zur Einleitung von DNA-Reparaturprozessen (Abraham, 2001).

### **5.2.3 Die frühe Bildung von $\gamma$ H2AX- und RAD51- Foci durch O<sup>6</sup>-meG-Addukte im Kern von Stamm/Vorläuferzellen weist auf einen Zusammenbruch der Replikationsgabel und die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüche hin**

Die derzeitige Hypothese, wie O<sup>6</sup>-meG-Schäden in der DNA Apoptose-Prozesse induzieren, geht davon aus, dass die fehlerhafte Prozessierung von post-replikativen O<sup>6</sup>-meG-T-Basenpaaren durch das Mismatch-Reparatursystem (MMR) zu lang anhaltenden Einzelstrangbrüchen hinter der Replikationsgabel führen (Mojas *et al.*, 2007). In der zweiten S-Phase verursachen diese Schäden dann Probleme bei der DNA-Replikation (Zusammenbruch der Replikationsgabel) und führen im Endeffekt zu Doppelstrangbrüche (Mojas *et al.*, 2007). Hier wurde das Auftreten solcher Doppelstrangbrüche indirekt durch die Bildung von  $\gamma$ H2AX- und RAD51-Foci im Kern behandelter primärer hämatopoetischer Zellen untersucht. Die Befunde bei differenzierten T-Zellen stimmten mit der Vorhersage aus dem o. a. Modell überein: Eine Focusbildung war für beide Proteine erst 24 Stunden nach einer BG-TMZ-Behandlung nachweisbar (Kap. 4.5.8). Interessanterweise konnte eine O<sup>6</sup>-meG-abhängige Akkumulation dieser Proteine jedoch bei proliferierenden Stamm/Vorläuferzellen bereits 6 Stunden nach der Alkylierung detektiert werden. Der Befund ist in guter Übereinstimmung mit der frühen Apoptose-Induktion in diesen Zellen (s. o.). Es kann deshalb angenommen werden, dass die rasche Entstehung von DNA-Doppelstrang-brüchen in der ersten S-Phase nach Behandlung als Auslöser für die frühe Apoptose in Stamm/Vorläuferzellen in Frage kommt.

Der zu Grunde liegende Mechanismus für die Entstehung dieser Doppelstrangbrüche ist jedoch mit derzeitig akzeptierten Hypothesen nicht erklärbar, da stimulierte CD34<sup>+</sup>-Zellen bei einer Verdopplungszeit von 24 Stunden zu diesem frühen Zeitpunkt die zweite S-Phase bei Weitem noch nicht erreicht haben. Es muss sich dabei vielmehr um Zellen in der ersten S-Phase nach der DNA-Schädigung handeln. Eine Destabilisierung der Replikationsgabel schon während die ersten S-Phase könnte durch den niedrigen ATR-Spiegel und dem damit verbundenen Funktionsverlust des ATR-CHK1-„checkpoint“ (S-Phase-„checkpoint“) in den Stamm/Vorläuferzellen

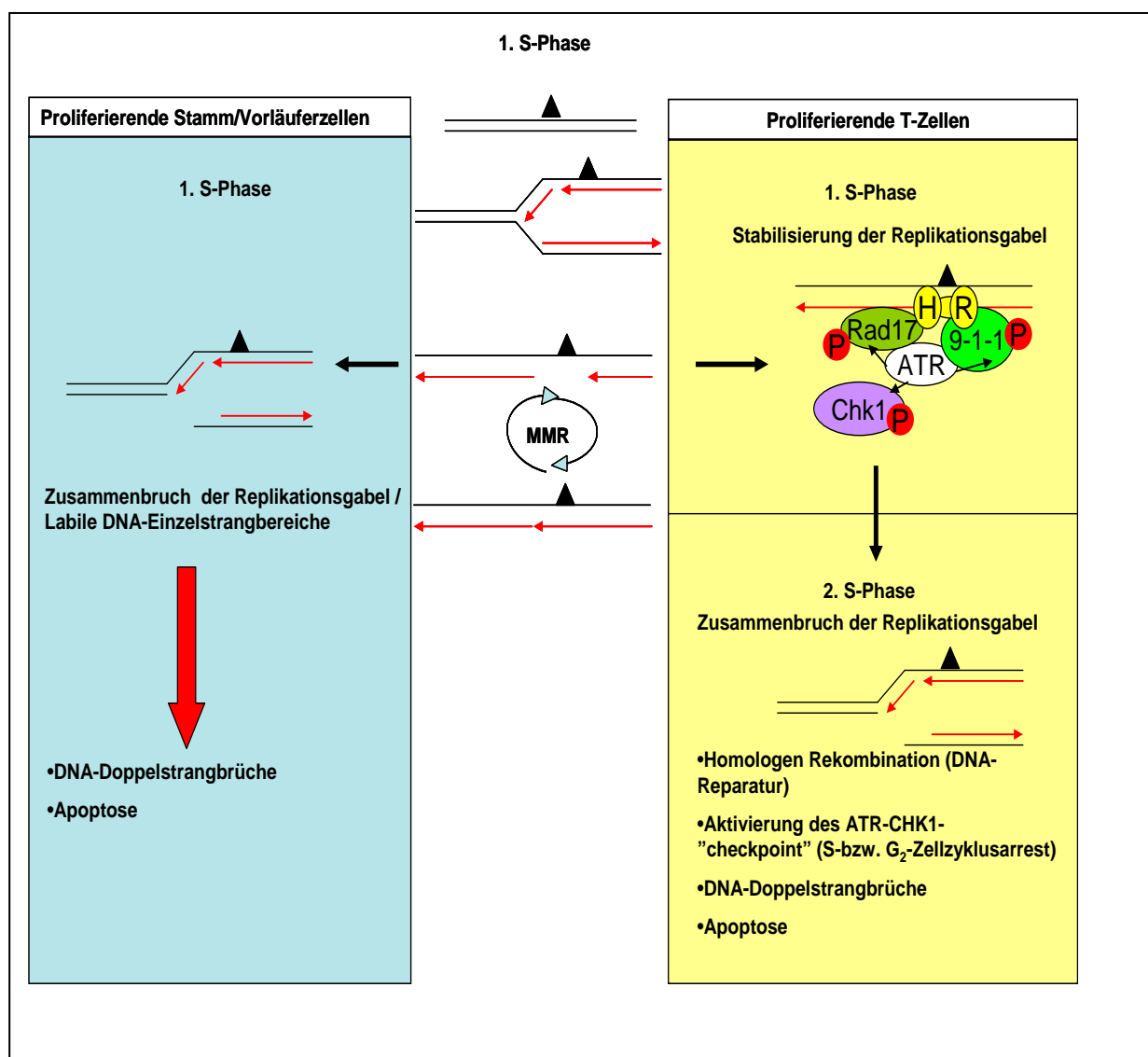
bedingt sein. Andere Studien haben bereits gezeigt, dass ATR für die Aufrechterhaltung der Stabilität von Replikationsgabeln von essenzieller Bedeutung ist (Shechter *et al.*, 2004; Shiotani & Zou, 2009). Ob eine solche Destabilisierung durch das O<sup>6</sup>-meG-Addukt selbst oder durch die Störung der Helixstruktur an O<sup>6</sup>-meG–C Basenpaaren oder durch weitere prä- oder post-replikative Reparaturvorgänge an solchen Schadstellen initiiert wird, konnte bisher experimentell nicht geklärt werden.

#### **5.2.4 Die spezifische Antwort unterschiedlich differenzierter proliferationsaktiver hämatopoetischer Zellen auf O<sup>6</sup>-meG wird wahrscheinlich durch den jeweiligen ATR-Gehalt determiniert**

Eine der Ausgangsfragen bei dieser Studie war: Wie reagieren blutbildenden Stamm/Vorläuferzellen auf DNA-Alkylierungsschäden, insbesondere auf die hochmutagenen und cytotoxischen O<sup>6</sup>-meG-Lesionen? Im Folgenden wird ein Model vorgestellt, das versucht, die hier erhobenen experimentellen Ergebnisse in wichtige Daten anderer Arbeitsgruppen zu integrieren (Abb. 41):

Werden O<sup>6</sup>-meG-Addukte nicht vor Eintritt in die S-Phase aus der DNA entfernt, wird während der DNA-Replikation aufgrund der blockierten dritten Wasserstoff-Brückenbindung im naszierenden Strang ein T gegenüber dem Addukt eingefügt. Das entstandene O<sup>6</sup>-meG–T-Basenpaar wird durch das der Replikationsgabel folgenden Mismatch-Reparatursystem (MMR) als fehlerhaft erkannt und der neue synthetisierte Strang vom fehlgepaarten T ausgehend in 3'- und 5'-Richtung degradiert. Dabei entstehen bis zu 1000 Nukleotide lange Einzelstrang-Bereiche, die anschließend durch Reparatursynthese und Ligation verschlossen werden. Dieser Vorgang wiederholt sich jedoch permanent, da bei der Auffüllreaktion wieder präferentiell T gegenüber dem methylierten G eingefügt wird (*“futile mismatch repair“*). In differenzierten T-Zellen werden diese repetitiv auftretenden Lücken unter Mitwirkung von ATR und Einzelstrang-bindenden Proteine der homologen Rekombination wie RPA, oder RAD51 stabilisiert und geschützt (Mojas *et al.*, 2007; Roos *et al.*, 2009). Deshalb kann die Zellzyklusprogression bis zur nächsten S-Phase fortschreiten, ohne dass an diesen fragilen Stellen zuvor Doppelstrangbrüche entstehen. Erst in der zweiten Replikationsrunde findet eine partielle Konversion der persistierenden Einzelstrang-Areale in Doppelstrangbrüche statt, die ihrerseits Apoptose-Prozesse induzieren können (Mojas *et al.*, 2007; Roos *et al.*, 2009). Die

vergleichsweise hohen ATR-Spiegel in T-Zellen ermöglichen vermutlich sowohl eine Aktivierung des ATR-CHK1-Signalweges als auch eine Stabilisierung der Replikationsgabel im Umfeld MMR-induzierter Strangbrüche. Demgegenüber finden sich bei Stamm/Vorläuferzellen auf Grund des wesentlich geringeren Gehalts an ATR neben einer stark reduzierten Aktivierung des ATR-CHK1-Weges schon sehr früh (während oder direkt nach der ersten Replikation) Anzeichen für DNA-Doppelstrangbrüche ( $\gamma$ H2AX- und RAD51-Foci). Es findet deshalb keine Progression in die zweite S-Phase statt, sondern eine schnelle Induktion der Apoptose.



**Abb. 41: Model zur "DNA damage response" von proliferations-aktiven hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen (Links) und differenzierten T-Zellen (rechts) auf O<sup>6</sup>-meG-Addukten.** Das vorgeschlagene Model basiert auf derzeitigem akzeptiertem Model (modifiziert nach Mojas et al., 2007) und an experimenteller Daten dieser Studie (s. Text). ▲ : O<sup>6</sup>-meG-Addukt.

## 6. Zusammenfassung

Ausgangspunkt für diese Arbeit war die Frage, ob und gegebenenfalls wie sich Stamm- und Vorläuferzellen in ihrer Antwort auf genotoxische Stress von weiter differenzierten Zellen der gleichen Entwicklungslinie unterscheiden. Experimentell untersucht wurde dies am Modell der murinen und der humanen Hämatopoese, weil hier Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstufen bereits relativ gut charakterisiert sind, sich mit etablierten Methoden beispielsweise aus Knochenmark oder Nabelschnurblut isolieren lassen und *ex vivo* kultiviert werden können. Als DNA-reaktive Substanz wurde aus der Gruppe monoalkylierenden Verbindungen das Zytostatikum Temozolomid (TMZ) ausgewählt, dessen Stammzell-toxisches Potential und seine ausgeprägte Knochenmark-schädigende Wirkung ein erhebliches Problem in der onkologischen Klinik darstellen. Aus Untersuchungen an Zelllinien war bekannt, dass (I) die zytotoxische Wirkung fast ausschließlich von dem Alkylierungsprodukt O<sup>6</sup>-Methylguanin (O<sup>6</sup>-meG) ausgeht, obwohl es nur einen geringen Teil (6 %) aller TMZ-induzierten DNA-Schäden darstellt, und dass dieses Addukt (II) in den meisten Säugerzellen effizient durch die Methyltransferase MGMT aus der genomischen DNA eliminiert wird. Deshalb wurde im ersten Teil dieser Arbeit untersucht, welche biologischen Konsequenzen eine durch MGMT-Gentransfer erhöhte Reparaturkapazität für dieses Addukt in primären Stamm/Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems der Maus und in murinen hämatopoetischen Zelllinien haben. Im Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz zur Myeloprotektion bei einer Chemotherapie wurde dafür die Mutante MGMT<sup>P140K</sup> verwendet, die resistent gegen den pharmakologischen MGMT-Inhibitor BG ist. Eingesetzt wurden für den Gentransfer verschiedene Retrovirale Vektorkonstrukte, die ein breites Spektrum transgener MGMT<sup>P140K</sup>-Expression erlaubten. Als wichtigste Befunde ergab sich aus diesen Experimenten:

- Der MGMT<sup>P140K</sup>-Gentransfer führt zu einer erheblich verbesserten Reparaturkapazität für O<sup>6</sup>-meG bei hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen im Knochenmark TMZ-behandelter Mäuse.
- Die drei eingesetzten Vektorkonstrukte vermittelten eine 50-, 200- bzw 1000-fache Überexpression von MGMT in primären hämatopoetischen Zellen, die in allen Fällen ausreichte, die *in vivo* durch TMZ induzierten O<sup>6</sup>-meG-Addukte vollständig aus der DNA zu entfernen.

- Es besteht eine inverse Korrelation zwischen der transgenen MGMT<sup>P140K</sup>-Expression und der *in vivo* Chemoprotektion/Selektion hämatopoetischer Stamm/Vorläuferzellen im Knochenmark BG-TMZ-behandelter Mäuse.
- Hämatopoetische Maus 32D-Zellen zeigen bei sehr hoher transgener MGMT<sup>P140K</sup>-Expression Wachstumsstörungen, die vermutlich auf der veränderten subzellulären Lokalisation und der verstärkten DNA-Bindung des mutierten Proteins beruhen.

Diese Erkenntnisse sollten bei dem geplanten gentherapeutischen Einsatz dieser Protektionsstrategie in der Klinik berücksichtigt werden, da eine Verschiebung des physiologischen Gleichgewichts durch transgene Expression von MGMT<sup>P140K</sup> die Schutzfunktion für die Zielzellen entgegenwirken kann.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die durch persistierende O<sup>6</sup>-meG-Addukte ausgelöste „DNA damage response“ bei primären humanen hämatopoetischen Stamm/Vorläuferzellen im Vergleich zu differenzierten T-Lymphozyten untersucht. Da Gen-Veränderungen nach struktureller DNA-Modifikation in Stamm- und Vorläuferzellen ein besonderes Risiko für das Überleben vielzelliger Organismen darstellen, reagieren Stamm/Vorläuferzellen möglicherweise anderes als differenzierten Zellen auf dieser Art von Schäden. An aus Nabelschnurblut isolierten TMZ-behandelten CD34<sup>+</sup>- bzw. CD34<sup>-</sup>-Zellen wurden folgende Befunde erhoben:

- Auslöser der Apoptose sind in beiden Zellpopulationen nicht-reparierte O<sup>6</sup>-meG-Addukte.
- Der TMZ-induzierte Zelltod ist strikt an die DNA-Replikation gekoppelt.
- Stamm/Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>) weisen 12-24 Stunden nach der Behandlung wesentlich höhere Apoptoseraten im Vergleich zu ausdifferenzierten T-Lymphozyten (CD34<sup>-</sup>) auf.
- Im Gegensatz zu differenzierten T-Lymphozyten zeigen Stamm/Vorläuferzellen keinen BG-TMZ-induzierten Zellzyklusarrest in der S-Phase.
- CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimieren die Protein-Kinase ATR nur in geringem Maße und zeigen nach TMZ-Exposition eine vergleichsweise niedrige Phosphorylierung der „checkpoint“-Regulatoren CHK1 und RAD17.
- Bei Stamm/Vorläuferzellen ist bereits sehr früh (6 Stunden) nach BG-TMZ-Exposition die Bildung von  $\gamma$ H2AX- und RAD51-Foci (als Indikatoren für DNA-Doppelstrangbrüche) im Kern nachweisbar, während bei differenzierten T-Lymphozyten solche Foci erst im zweiten Zellzyklus nach Behandlung auftreten.



Diese Befunde deuten darauf hin, dass hämatopoetische Stamm/Vorläuferzellen prinzipiell anders auf (potenziell mutagenen) genotoxischen Stress reagieren als Zellen späterer Differenzierungsstadien. Für den fehlenden Zellzyklusarrest sowie die rasche Induktion von Apoptose in der Stammzellfraktion könnten die reduzierte Aktivierung des ATR-CHK1-„*checkpoint*“ bzw. die frühe Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüche durch persistierende O<sup>6</sup>-meG-Addukte verantwortlich sein. Die biologische Bedeutung dieses ungewöhnlichen Verhaltens könnte darin liegen, dass durch eine effiziente Elimination von Stammzellen mit DNA-Schädigungen der Akkumulation von Mutationen in dieser wichtigen Zellpopulation konterkarieren. Ob es sich dabei um einen Hämatopoese-spezifischen Mechanismus handelt oder um eine generelle Schutzstrategie für somatische Stammzellen muss zukünftig abgeklärt werden.

## 7. Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
7AAD	7-Amino-Actinomycin D
A	Adenin
APC	Allophycocyanin
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad3-related
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
BG	O <sup>6</sup> -Benzylguanin
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin
BSA	eng. "Bovine Serum Albumin"
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
cm	Centimeter
cPPT	eng. "central polypurin tract"
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	Doppeldestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	elongation factor-1
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylenglycoltetraacetic säure
ES	embryonale Stammzellen
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
FKS	Fötales Kälberserum
FLT3-Ligand	FMS-like tyrosine kinase 3-Ligand
g	Gram
G	Guanin
gag	kodierende Sequenz für retrovirale Strukturprotein
Gy	Grey
h	Stunde(n)
HBSS	Name einer Salzlösung, Hanks Balanced Salt Solution
HEPES	2-(N-Hydroxyethylpiperazin)-2-ethansulfonsäure
HR	homologe Rekombination
HU	Hydroxyharnstoff
ICA	Immunzytologischer Assay
IE	Infektiöse Einheit
IL2	Interleukin-2
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IRES	Interne Ribosomen Eintrittsstelle einer mRNA
l	Liter
LacZ	β-Galactosidase

LB	Luria-Bertani
LeGO-G	Lentiviral Gene Ontology-EGFP
LeGO-V	Lentiviral Gene Ontology-Venus
Lin <sup>-</sup>	Eng. Lineage negative Zellen. Darstellen hämatopoetischen Vorläuferzellen
LMP-Agarose	(low melting point)-Agarose
m	Mili
M	Molar
mAK	monoklonalen Antikörper
MESV	(eng. Murine Embryonic Stem Cell Virus)
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA Methyltransferase
MGMT <sup>C145A</sup>	Cystein zu Alanin-Substitution an der Position 145
MGMTG156A	Glycin zu Alanin-Substitution an der Position 156
MGMTTP140K	Prolin zu Lysin-Substitution an der Position 140
MMR	Mismatch-Reparatur
MNU	Methylnitroseharnstoff
mRNA	messenger RNA
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
NaCl	Natriumchlorid
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	nicht-homologes Endjoining
NP-40	Nonidet-P-40
O6-meG	O <sup>6</sup> -Methylguanin
OD	Optische Dichte
OTM	Eng. <i>olive tail moment</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (eng. phosphate buffered saline )
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PGK	phosphoglycerate kinase 1
pH	pH-Wert (lat. <i>potentia Hydrogenii</i> )
PHA	Phytohämagglutinin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pol	codierende Sequenz für retrovirale Enzyme (Polymerase, Integrase, RNase
rev	codierende Sequenz des posttranskriptionellen Transaktivator von HIV1
rh	rekombinant human
rm	rekombinant maus
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Medium
RRE	Rev-responsible Element
s	Sekunden
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SF91	SFFV/MESV-Hybridpromotor
SFFV	(eng. spleen focus-forming virus)
shRNA	Kleine RNA mit Haarnadelstruktur (eng. small hairpin RNA)
SIN-LTR	selbst-inaktivierende Sequenzwiederholung an den Enden Retroviraler DNA (des Provirus) (eng. long terminal repeat)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>

---

TMZ	Temozolomid
TPO	Thrombopoietin
Tyr	Tyrosin
U	Standardisierte Einheit (eng. <i>Unit</i> )
UPM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
VSV-G	Hüllprotein des Vesicular-Stomatitis Virus
w/v	Masse pro Volumen
WPRE	Murmeltier-Hepatitisvirus posttranskriptionell regulatorisches Element

## 8. Literaturverzeichnis

- Abraham, R.T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**, 2177-2196 (2001).
- Adkins, S. & Burmeister, M. Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal Biochem* **240**, 17-23 (1996).
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I.L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197 (2000).
- Aladjem, M.I., *et al.* ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr Biol* **8**, 145-155 (1998).
- Ali, R.B., *et al.* Implication of localization of human DNA repair enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase at active transcription sites in transcription-repair coupling of the mutagenic O6-methylguanine lesion. *Mol Cell Biol* **18**, 1660-1669 (1998).
- Ariumi, Y., Turelli, P., Masutani, M. & Trono, D. DNA damage sensors ATM, ATR, DNA-PKcs, and PARP-1 are dispensable for human immunodeficiency virus type 1 integration. *J Virol* **79**, 2973-2978 (2005).
- Ashkenazi, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* **2**, 420-430 (2002).
- Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506 (2003).
- Bardenheuer, W., *et al.* Resistance to cytarabine and gemcitabine and in vitro selection of transduced cells after retroviral expression of cytidine deaminase in human hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* **19**, 2281-2288 (2005).
- Baum, C. Insertional mutagenesis in gene therapy and stem cell biology. *Curr Opin Hematol* **14**, 337-342 (2007).
- Baum, C., Hegewisch-Becker, S., Eckert, H.G., Stocking, C. & Ostertag, W. Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *J Virol* **69**, 7541-7547 (1995).
- Beranek, D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* **231**, 11-30 (1990).
- Bracker, T.U., *et al.* Stringent regulation of DNA repair during human hematopoietic differentiation: a gene expression and functional analysis. *Stem Cells* **24**, 722-730 (2006).

- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
- Brown, E.J. & Baltimore, D. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev* **17**, 615-628 (2003).
- Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J.K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8033-8037 (1993).
- 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., *et al.* Methylation damage response in hematopoietic progenitor cells. *DNA Repair (Amst)* **6**, 1170-1178 (2007).
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V.M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512 (1995).
- Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P. & Kaina, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193**, 3-34 (2003).
- Cimprich, K.A. & Cortez, D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 616-627 (2008).
- Costello, E., *et al.* Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Ther* **7**, 596-604 (2000).
- de Waard, H., *et al.* Cell type-specific hypersensitivity to oxidative damage in CSB and XPA mice. *DNA Repair (Amst)* **2**, 13-25 (2003).
- Debatin, K.M. & Krammer, P.H. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* **23**, 2950-2966 (2004).
- Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., Brammer, I., Martensen, R. & Kaina, B. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol* **73**, 269-278 (1998).
- Edara, S., Kanugula, S. & Pegg, A.E. Expression of the inactive C145A mutant human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in E.coli increases cell killing and mutations by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* **20**, 103-108 (1999).
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D. & Hunt, T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-396 (1983).

- Friedberg, E.C. & Meira, L.B. Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7. *DNA Repair (Amst)* **5**, 189-209 (2006).
- Friedberg, E.C. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 22-33 (2001).
- Friedberg, E.C., *et al.* DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)* **5**, 986-996 (2006).
- Fritsch, G., *et al.* Characterization of hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* **770**, 42-52 (1995).
- Fulda, S. & Debatin, K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798-4811 (2006).
- Gerson, S.L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* **4**, 296-307 (2004).
- Haber, J.E. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* **16**, 259-264 (2000).
- Hanawalt, P.C. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* **21**, 8949-8956 (2002).
- Hanawalt, P.C., Ford, J.M. & Lloyd, D.R. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. *Mutat Res* **544**, 107-114 (2003).
- Hildinger, M., Abel, K.L., Ostertag, W. & Baum, C. Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol* **73**, 4083-4089 (1999).
- Hoeijmakers, J.H., Eker, A.P., Wood, R.D. & Robins, P. Use of in vivo and in vitro assays for the characterization of mammalian excision repair and isolation of repair proteins. *Mutat Res* **236**, 223-238 (1990).
- Hong, Y. & Stambrook, P.J. Restoration of an absent G1 arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14443-14448 (2004).
- Jansen, M., *et al.* Hematoprotection and enrichment of transduced cells in vivo after gene transfer of MGMT(P140K) into hematopoietic stem cells. *Cancer Gene Ther* **9**, 737-746 (2002).
- Jiricny, J. Mismatch repair: the praying hands of fidelity. *Curr Biol* **10**, R788-790 (2000).
- Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K. & Coquerelle, T. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat Res* **381**, 227-241 (1997).

- Kanugula, S., Goodtzova, K., Edara, S. & Pegg, A.E. Alteration of arginine-128 to alanine abolishes the ability of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase to repair methylated DNA but has no effect on its reaction with O6-benzylguanine. *Biochemistry* **34**, 7113-7119 (1995).
- Karran, P. & Stephenson, C. Mismatch binding proteins and tolerance to alkylating agents in human cells. *Mutat Res* **236**, 269-275 (1990).
- Karran, P. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* **22**, 1931-1937 (2001).
- Kastan, M.B. & Bartek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316-323 (2004).
- Kekarainen, T., Mannelin, S., Laine, J. & Jaatinen, T. Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. *BMC Cell Biol* **7**, 30 (2006).
- Kischkel, F.C., *et al.* Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**, 5579-5588 (1995).
- Kondo, M., Weissman, I.L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672 (1997).
- Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I. & May, W.S. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* **87**, 1-13 (1996).
- Kurz, E.U. & Lees-Miller, S.P. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* **3**, 889-900 (2004).
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- Li, L. & Zou, L. Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells. *J Cell Biochem* **94**, 298-306 (2005).
- Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K. The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)* **3**, 817-826 (2004).
- McGowan, C.H. & Russell, P. The DNA damage response: sensing and signaling. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 629-633 (2004).
- 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).



- Mendez, J. & Stillman, B. Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* **20**, 8602-8612 (2000).
- Milsom, M.D. & Williams, D.A. Live and let die: in vivo selection of gene-modified hematopoietic stem cells via MGMT-mediated chemoprotection. *DNA Repair (Amst)* **6**, 1210-1221 (2007).
- Milsom, M.D., *et al.* Reciprocal relationship between O6-methylguanine-DNA methyltransferase P140K expression level and chemoprotection of hematopoietic stem cells. *Cancer Res* **68**, 6171-6180 (2008).
- Milsom, M.D., Woolford, L.B., Margison, G.P., Humphries, R.K. & Fairbairn, L.J. Enhanced in vivo selection of bone marrow cells by retroviral-mediated coexpression of mutant O6-methylguanine-DNA-methyltransferase and HOXB4. *Mol Ther* **10**, 862-873 (2004).
- Mojas, N., Lopes, M. & Jiricny, J. Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes Dev* **21**, 3342-3355 (2007).
- Morrison, C. & Takeda, S. Genetic analysis of homologous DNA recombination in vertebrate somatic cells. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 817-831 (2000).
- Neff, T., *et al.* Polyclonal chemoprotection against temozolomide in a large-animal model of drug resistance gene therapy. *Blood* **105**, 997-1002 (2005).
- Newlands, E.S., *et al.* Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *Br J Cancer* **65**, 287-291 (1992).
- Niedernhofer, L.J. DNA repair is crucial for maintaining hematopoietic stem cell function. *DNA Repair (Amst)* **7**, 523-529 (2008).
- Nigg, E.A. Cell cycle regulation by protein kinases and phosphatases. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 19-46 (2001).
- Nijnik, A., *et al.* DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* **447**, 686-690 (2007).
- Nurse, P. Regulation of the eukaryotic cell cycle. *Eur J Cancer* **33**, 1002-1004 (1997).
- Ochs, K. & Kaina, B. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res* **60**, 5815-5824 (2000).
- Ohi, R. & Gould, K.L. Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 267-273 (1999).
- Park, Y. & Gerson, S.L. DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annu Rev Med* **56**, 495-508 (2005).

- Pastoriza Gallego, M. & Sarasin, A. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine in human cells and its deficiency in some DNA repair diseases. *Biochimie* **85**, 1073-1082 (2003).
- Paull, T.T., *et al.* A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* **10**, 886-895 (2000).
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L. & Baltimore, D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8392-8396 (1993).
- Pfeiffer, P., Goedecke, W., Kuhfittig-Kulle, S. & Obe, G. Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res* **104**, 7-13 (2004).
- Placzek, M.R., *et al.* Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. *J R Soc Interface* **6**, 209-232 (2009).
- Prost, S., Bellamy, C.O., Clarke, A.R., Wyllie, A.H. & Harrison, D.J. p53-independent DNA repair and cell cycle arrest in embryonic stem cells. *FEBS Lett* **425**, 499-504 (1998).
- Raderschall, E., Golub, E.I. & Haaf, T. Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1921-1926 (1999).
- Ragg, S., *et al.* Direct reversal of DNA damage by mutant methyltransferase protein protects mice against dose-intensified chemotherapy and leads to in vivo selection of hematopoietic stem cells. *Cancer Res* **60**, 5187-5195 (2000).
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111 (2001).
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W.M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**, 905-916 (1999).
- 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).
- Roos, W.P. & Kaina, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* **12**, 440-450 (2006).
- Roos, W.P., *et al.* Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair (Amst)* **8**, 72-86 (2009).
- 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).

- Sandstrom, C.E., Bender, J.G., Papoutsakis, E.T. & Miller, W.M. Effects of CD34+ cell selection and perfusion on ex vivo expansion of peripheral blood mononuclear cells. *Blood* **86**, 958-970 (1995).
- Sawai, N., *et al.* Protection and in vivo selection of hematopoietic stem cells using temozolomide, O6-benzylguanine, and an alkyltransferase-expressing retroviral vector. *Mol Ther* **3**, 78-87 (2001).
- 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).
- Shechter, D., Costanzo, V. & Gautier, J. ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat Cell Biol* **6**, 648-655 (2004).
- Shiloh, Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* **31**, 402-410 (2006).
- Shiotani, B. & Zou, L. Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Mol Cell* **33**, 547-558 (2009).
- Stanislawska, J. & Olszewski, W.L. RNA interference--significance and applications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**, 39-46 (2005).
- Stojic, L., *et al.* Mismatch repair-dependent G2 checkpoint induced by low doses of SN1 type methylating agents requires the ATR kinase. *Genes Dev* **18**, 1331-1344 (2004).
- Suzuki, K., Kodama, S. & Watanabe, M. Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionizing radiation. *J Biol Chem* **274**, 25571-25575 (1999).
- Takata, M., *et al.* Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* **17**, 5497-5508 (1998).
- Takizawa, C.G. & Morgan, D.O. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 658-665 (2000).
- Tannock, I.F. Experimental chemotherapy and concepts related to the cell cycle. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **49**, 335-355 (1986).
- Thompson, C.L., *et al.* Effect of vitamin A depletion on nonvisual phototransduction pathways in cryptochromeless mice. *J Biol Rhythms* **19**, 504-517 (2004).
- Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316 (1998).
- Tice, R.R., *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* **35**, 206-221 (2000).

- Tichy, E.D. & Stambrook, P.J. DNA repair in murine embryonic stem cells and differentiated cells. *Exp Cell Res* **314**, 1929-1936 (2008).
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354 (1979).
- Trenz, K., Smith, E., Smith, S. & Costanzo, V. ATM and ATR promote Mre11 dependent restart of collapsed replication forks and prevent accumulation of DNA breaks. *EMBO J* **25**, 1764-1774 (2006).
- Valerie, K. & Povirk, L.F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **22**, 5792-5812 (2003).
- Van Sloun, P.P., *et al.* The role of nucleotide excision repair in protecting embryonic stem cells from genotoxic effects of UV-induced DNA damage. *Nucleic Acids Res* **27**, 3276-3282 (1999).
- Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C. & Fehse, B. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther* **16**, 698-706 (2008).
- Wibley, J.E., Pegg, A.E. & Moody, P.C. Crystal structure of the human O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Nucleic Acids Res* **28**, 393-401 (2000).
- Wyman, C. & Kanaar, R. Homologous recombination: down to the wire. *Curr Biol* **14**, R629-631 (2004).
- Yoshioka, K., Yoshioka, Y. & Hsieh, P. ATR kinase activation mediated by MutSalpha and MutLalpha in response to cytotoxic O6-methylguanine adducts. *Mol Cell* **22**, 501-510 (2006).

## 9. Anhang

### 9.1 Sequenzen der eingesetzten shRNAs

#### shATR01

Sense

5\_-GATCCCCGGCGTCGTCTCAGCTCGTCTTCAAGAGAGACGAGCTGAGACGACGCCTTTTGGAAA-3'

Antisense

5\_-AGCTTTTCCAAAAAGGCGTCGTCTCAGCTCGTCTCTCTTGAAGACGAGCTGAGACGACGCCGGG-3'

#### shATR02

Sense

5'-GATCCCCCTCCGTGATGTTGCTTGATTCAAGAGATCAAGCAACATCACGGAGGTTTTGGAAA-3'

Antisense

5'-AGCTTTTCCAAAACTCCGTGATGTTGCTTGATCTCTTGAATCAAGCAACATCACGGAGGGGG-3'

#### shATR03

Sense

5'-GATCCCCAGCAGTTCCTGGAACTTTATTCAAGAGATAAAGTTCCAAGAAGTCTTTTTGGAAA-3'

Antisense

5'-AGCTTTTCCAAAAAGCAGTTCCTGGAACTTTATCTCTTGAATAAAGTTCCAAGAAGTCTGGG-3'

#### shATM01:

Sense

5\_-GATCCCCGGATTTGCGTATTACTCAGTTCAAGAGACTGAGTAATACGCAAATCCTTTTGGAAA-3'

Antisense

5\_-AGCTTTTCCAAAAAGGATTTGCGTATTACTCAGTCTCTTGAAGTACTGAGTAATACGCAAATCCGGG-3'

#### shATM02

Sense

5'-GATCCCCCATACTACTCAAAGACATTTTCAAGAGAAATGTCTTTGAGTAGTATGTTTTGGAAA-3'

Antisense

5'-AGCTTTTCCAAAACATACTACTCAAAGACATTTCTCTTGAATGTCTTTGAGTAGTATGGGG-3'

#### shATM03

Sense

5'-GATCCCCGCAGCTGAAACAAATAATGTTCAAGAGACATTATTTGTTTCAGCTGCTTTTTGGAAA-3'

Antisense

5'-AGCTTTTCCAAAAAGCAGCTGAAACAAATAATGTCTCTTGAACATTATTTGTTTCAGCTGCGGG-3'

#### shLacZ

Sense

5'-GATCCCCGTACGCGGAATACTTCGATTTCAAGAGATCGAAGTATTCCGCGTACGTTTTGGAAA-3'

Antisense

5'-AGCTTTTCCAAAAAGTACGCGGAATACTTCGATCTCTTGAATCGAAGTATTCCGCGTACGGGG-3'

## 9.2 Danksagung

Ich danke all jenen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- PD Dr. J. Thomale (IFZ, UK-Essen) danke ich für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, sowie die vielen kreativen Anregungen und wissenschaftlichen Diskussionen.
- Dr. P. Andreassen (Labor für experimentelle Hämatologie, „Cincinnati Children’s Hospital Medical Center“, Cincinnati, USA) danke ich für die Betreuung, die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und das fortwährend große Interesse am Fortschritt dieses Projektes und die vielen kreativen Anregungen.
- Dr. D.A. Williams (Labor für experimentelle Hämatologie, „Cincinnati Children’s Hospital Medical Center“, Cincinnati, USA) danke ich für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, sowie die vielen kreativen Anregungen und wissenschaftlichen Diskussionen. Darüber hinaus bin ich Dr. Williams für die Möglichkeit als Austauschstudent in seinem Labor tätig gewesen sein zu können, wo ich mir viele neue Arbeitsmethoden aneignen konnte, sehr dankbar.
- PD Dr. T. Moritz (ehemliges Labor für experimentelle Hämatologie, Innere Klinik, Tumorforschung, UK-Essen) danke ich für die Betreuung und für die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.
- Ich danke der Arbeitsgruppe DNA-Reparaturlabor (IFZ) für das angenehme Forschungsklima und die hilfreichen Diskussionen und praktischen Unterstützungen bei der Arbeit. Besonderer Dank gilt Dipl. Biologin AC. Nickel.
- Dr. M. Schmidt (Frauenklinik, UK-Essen) danke ich sehr für seine Kooperationsbereitschaft und die Bereitstellung von Nabelschnurblut-Proben.

- Dipl. Biochemiker K. Weber (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) danke ich sehr für die Bereitstellung der LeGO-Vektoren und für seine Unterstützung bei der Generierung der Lentiviralen shRNA-Vektoren.
- Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, meinen Freunden und meiner Frau Sabine, für ihre Geduld, Unterstützung und Aufmunterungen während dieser Promotion.

## **Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-  
Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das  
Thema „Bildung, Reparatur und Signaltransduktion von DNA-Alkylierungsschäden in  
Zellen des murinen und humanen hämatopoetischen Systems“ zuzuordnen ist, in  
Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von (Herr Moran Jerabek-Willemsen)  
befürworte.

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

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

## **Erklärung:**

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

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

Unterschrift des/r Doktoranden

## **Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-  
Fachbereiche 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 Doktoranden