

AUS DEM INSTITUT FÜR ZELLBIOLOGIE (TUMORFORSCHUNG) [IFZ]  
DER UNIVERSITÄT-GESAMTHOCHSCHULE ESSEN  
ARBEITSGRUPPE V (LEITER: PROF. DR. M.F. RAJEWSKY)

# Bedeutung von DNA Reparaturprozessen für die Zytostatika-Resistenz menschlicher Leukämie-Zellen

## INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DR. RER. NAT.

IM FACHBEREICH

BIO- UND GEOWISSENSCHAFTEN, LANDSCHAFTSARCHITEKTUR  
DER UNIVERSITÄT-GESAMTHOCHSCHULE ESSEN

vorgelegt von

CLAUDIA PAPEWALIS  
GEB. BUSCHFORT  
aus Dinslaken

Essen, im November 1999

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) [IFZ] der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. J. Thomale

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Obe

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. W. U. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2000

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>7</b>
2.1	DNA-Ethylierung und Reparaturprozesse: Untersuchungen <i>in vitro</i>	7
2.1.1	Heterolytischer Zerfall von N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (EtNU)	7
2.1.2	Die Mehrzahl der primären DNA-Ethyl-Addukte führt unter physiologischen Bedingungen nicht zu DNA-Strangbrüchen	8
2.1.3	Die Inkubation mit Kernextrakten überführt DNA-Ethyl-Addukte zeitabhängig in Strangbrüche	10
2.1.4	Die Kinetik der Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen ist für individuelle Lymphozytenproben unterschiedlich	10
2.1.5	Basen-Exzisions-Reparaturprozesse sind an der Induktion von Strangbrüchen durch Kern-Extrakte beteiligt	11
2.2	Messung von DNA Strangbrüchen bei normalen Lymphozyten: Etablierung des „Comet Assay“	12
2.2.1	O <sup>6</sup> -Ethylguanin wird in der genomischen DNA verschiedener Proben in gleichem Ausmaß gebildet	12
2.2.2	Die Induktion von DNA-Strangbrüchen zeigt individuelle Unterschiede	13
2.3	Messung von DNA-Reparaturprozessen bei normalen Lymphozyten	16
2.3.1	O <sup>6</sup> -Ethylguanin wird aus der DNA individueller Lymphozyten-Proben unterschiedlich schnell eliminiert	16
2.3.2	Bei der Prozessierung von DNA-Strangbrüchen zeigen sich individuelle Unterschiede	17
2.3.3	Zelluläre DNA-Reparaturfunktionen lassen sich durch kleine Moleküle modulieren	19
2.3.4	Induktion und Prozessierung von DNA-Strangbrüchen bei Lymphozyten nach Exposition gegenüber verschiedenen mono- und bifunktionellen Alkylantien	25
2.4	DNA-Reparatur bei CLL-Lymphozyten	31
2.4.1	Auch menschliche CLL-Lymphozyten weisen individuell unterschiedliche Reparaturkapazitäten auf	31
2.4.2	Die Bildung von DNA-Strangbrüchen nach EtNU-Exposition verläuft bei CLL-Lymphozyten anders als bei Lymphozyten gesunder Spender	32
2.4.3	DNA-Strangbrüche werden von CLL-Lymphozyten schneller prozessiert	33
2.4.4	DNA-Reparaturkapazität von CLL-Lymphozyten	35
2.4.5	Die Modulation der DNA-Strangbruchprozessierung führt bei CLL-Lymphozyten zu weiteren Effekten	36

<b>3</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>38</b>
	Funktionelle Messung der DNA-Reparatur	39
	DNA-Alkylierungsprodukte führen nur dann zu DNA-Strangbrüchen, wenn sie Substrat für Exzisions-Reparaturprozesse sind	40
	Der „Comet Assay“ zeigt die Entstehung und Reparatur von DNA-Strangbrüchen an	41
	Verschiedene DNA Addukte können Substrate unterschiedlicher Reparaturwege sein	42
	Bedeutung verschiedener Reparaturwege für die Prozessierung von DNA Ethyl-Addukten	43
	Gibt es Hinweise auf eine koordinierte Regulation von DNA-Reparaturprozessen?	53
	Die Blockierung von DNA-Reparaturprozessen kann zu einer veränderten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Chemotherapeutika führen	54
	Lymphozyten von CLL-Patienten und von gesunden Spendern weisen ein unterschiedliches Reparatur-Verhalten auf	56
	Gibt es eine kausale Beziehung zwischen der DNA-Reparaturkapazität und der Chemoresistenz bei CLL-Lymphozyten ?	57
	Welche Bedeutung könnte der Mismatch-Reparaturweg für die Resistenzentwicklung zukommen?	61
	Ausblick: Unter Berücksichtigung individueller DNA-Reparaturdaten könnte eine individuelle Therapie für einige CLL-Probanden geeigneter erscheinen	63
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>80</b>
6.1	Verwendete Materialien	80
6.2	Methoden	84
6.3	Danksagung	89
6.4	Erklärungen	90
6.4	Lebenslauf	91

# Abbildungen

Abb. 1: Mechanismen zellulärer Resisten.....	1
Abb. 2: Monofunktionelle und bifunktionelle Alkylantien.....	3
Abb. 3: DNA-Reparaturwege eukaryontischer Zellen.....	4
Abb. 4: Heterolytischer Zerfall von <i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -Nitrosoharnstoff (EtNU).....	8
Abb. 5: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch EtNU in Plasmid-DNA.....	9
Abb. 6: Induktion von DNA-Strangbrüchen in ethylierter Plasmid-DNA durch Kernproteine von Lymphozyten.....	10
Abb. 7: Einfluß von Methoxyamin auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Zell-freies Kernprotein.....	11
Abb. 8: Bildung von O <sup>6</sup> -Ethylguanin in der Kern-DNA normaler Lymphozyten als Funktion der EtNU-Konzentration.....	12
Abb. 9: Bildung von „Kometen“ in der DNA von Lymphozyten als Funktion der EtNU-Konzentration.....	13
Abb. 10: Analyse von „Kometen“ in der DNA von Lymphozyten nach EtNU-Exposition.....	14
Abb. 11: Konzentrationsabhängige Kometen-Bildung nach EtNU-Exposition individueller Proben normaler Lymphozyten.....	14
Abb. 12: Inter-zelluläre Variation der Kometen-Bildung bei Lymphozyten nach EtNU-Exposition.....	15
Abb. 13: Kinetiken der Elimination von O <sup>6</sup> -Ethylguanin aus der Kern-DNA normaler Lymphozyten individueller Spender.....	16
Abb. 14: Kinetiken der Prozessierung von DNA-Strangbrüchen bei normalen Lymphozyten nach EtNU-Expositon.....	17
Abb. 15: Einfluß von O <sup>6</sup> -Benzylguanin auf die Reparatur von O <sup>6</sup> -Ethylguanin.....	20
Abb. 16: Einfluß von O <sup>6</sup> -Benzylguanin auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen bei EtNU-exponierten Lymphozyten.....	21
Abb. 17: Einfluß einer MGMT-Depletion auf die Induktion und Prozessierung von DNA-Strangbrüchen bei EtNU-exponierten Lymphozyten.....	22
Abb. 18: Einfluß von Methoxyamin auf die Strangbruchinduktion in der DNA normaler Lymphozyten.....	23
Abb. 19: Einfluß von Aphidicolin auf die DNA-Strangbruchinduktion in normalen Lymphozyten.....	24
Abb. 20: Modulation der DNA-Strangbruchraten EtNU-exponierter Lymphozyten durch verschiedene DNA-Reparatur-Inhibitoren.....	25
Abb. 21: Kinetik der DNA-Strangbruchprozessierung bei normalen Lymphozyten nach MeNU-Exposition.....	27
Abb. 22: Einfluß verschiedener Modulatoren auf die DNA-Reparatur normaler Lymphozyten nach MeNU-Exposition.....	28
Abb. 23: Kinetik der DNA-Strangbruchprozessierung bei normalen Lymphozyten nach BCNU-Exposition.....	29
Abb. 24: Einfluß von O <sup>6</sup> -Benzylguanin auf die Induktion und Prozessierung von DNA-Strangbrüchen bei BCNU-exponierten Lymphozyten.....	30
Abb. 25: Elimination von O <sup>6</sup> -Ethylguanin aus der DNA EtNU-exponierter CLL-Lymphozyten.....	32
Abb. 26: Konzentrationsabhängige „Kometen“-Bildung nach EtNU-Exposition individueller CLL-Lymphozyten.....	33
Abb. 27: DNA-Strangbruchprozessierung in CLL-Lymphozyten.....	34
Abb. 28: Effekt von Methoxyamin auf die DNA-Strangbruchinduktion bei CLL-Lymphozyten.....	37
Abb. 29: Die O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA Methyltransferase.(MGMT).....	44
Abb. 30: Die Basen-Exzisions-Reparatur (BER).....	46
Abb. 31: Die DNA-Mismatch-Reparatur (MMR).....	47
Abb. 32: Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER).....	50
Abb. 33: Korrelation zwischen der DNA-Reparaturkapazität und der Chemosensibilität von CLL-Lymphozyten.....	57
Abb. 34: Einfluß von DNA-Reparatur-Modulatoren auf die Chemosensibilität individueller CLL Lymphozyten.....	58
Abb. 35: Korrelation der individuellen DNA-Reparaturkapazität zum klinischen Bild einzelner CLL-Probanden.....	60

# Tabellen

Tab. 1: Anteile verschiedener DNA-Addukte in einem 10 kB Plasmid nach EtNU-Exposition.....	9
Tab. 2: Klassifizierung der DNA-Reparaturkapazität normaler Lymphozyten, gemessen durch ICA und Comet Assay.....	18
Tab. 3: Klassifizierung der DNA-Reparaturkapazität von CLL-Lymphozyten, gemessen mit Hilfe des Comet Assay.....	35
Tab. 4: Für verschiedene funktionale DNA-Reparaturtests erforderliche Zellzahlen humaner Lymphozyten.....	39
Tab. 4: Bildung von DNA-Alkylierungsprodukten nach Exposition gegenüber <i>N</i> -Alkyl- <i>N</i> -Nitrosoharnstoffen.....	42
Tab. 6: Untersuchungen zur Ausbildung eines MI/RER+ Phänotyps bei verschiedenen Tumorerkrankungen.....	62

# Abkürzungen

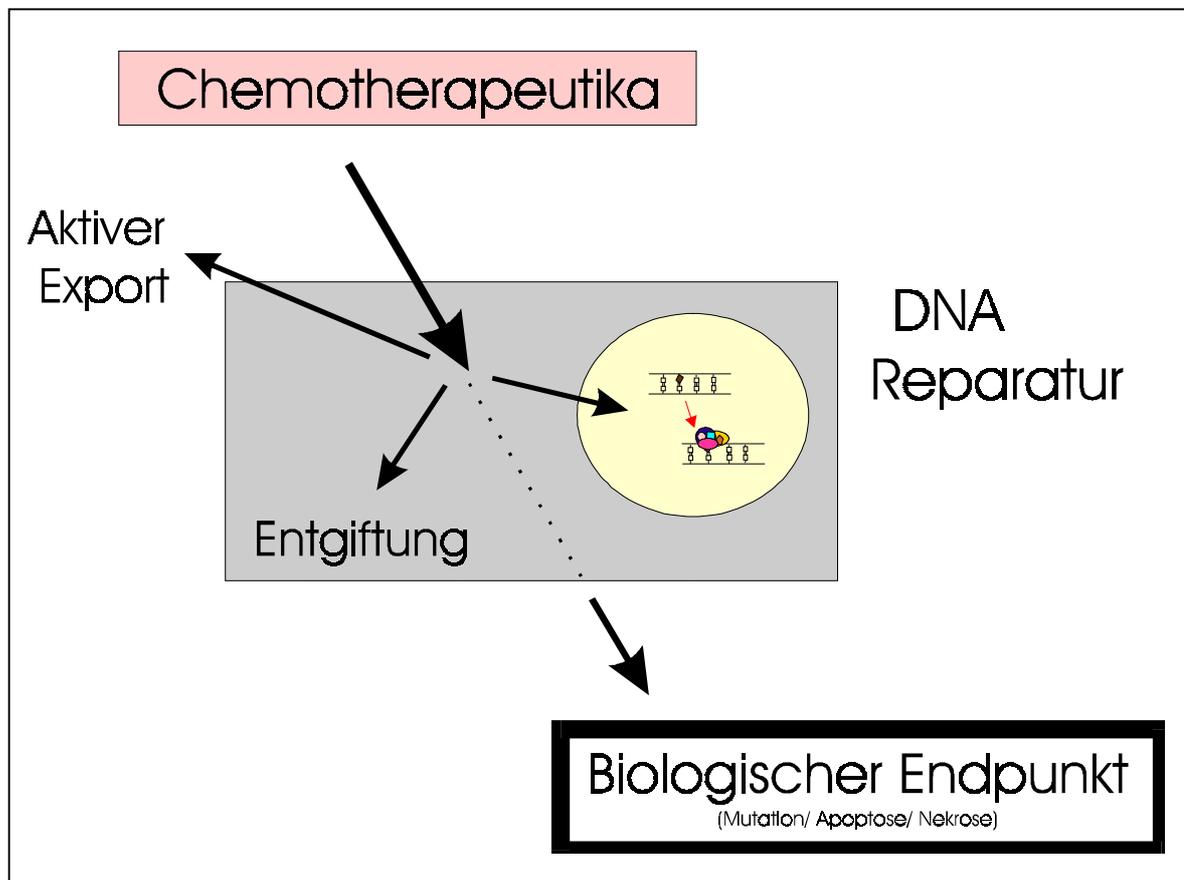
A bzw. Ade	Adenin	MI	„Microsatellite instability“ (Genomische Instabilität)
ALL	akut lymphatische Leukämie	min	Minute
AML	akut myeloische Leukämie	MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
APH	Aphidicolin	MTT	Farbstoff zur Messung der zellulären metabolischen Aktivität [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-bromid]
ATP	Adenosin-Triphosphat	MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA Methyltransferase
BER	Basen-Exzisions-Reparatur	MMR	Mismatch-Reparatur
BCNU	Carmustin [1,3-Bis(2-Chloroethyl)-1-Nitrosoharnstoff]	MW	Molekulargewicht
C bzw. Cyt	Cytosin	MX	Methoxyamin
CCD	„charge coupled device“ (Ladungsgekoppelte Vorrichtung der Video-Kamera, vgl. 5.2.11)	N3-EtAde	3-Ethyladenin
CLL	chronisch lymphatische Leukämie	N7-EtGua	7-Ethylguanin
CV	Variationskoeffizient	NER	Nucleotid-Excizionsreparatur
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DNA-Farbstoff)	NL	Lymphozyten normaler Probanden
DMSO	Dimethylsulfoxid	O <sup>2</sup> -EtThy	O <sup>2</sup> -Ethylthymin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	O <sup>4</sup> -EtThy	O <sup>4</sup> -Ethylthymin
DTE	1,4-Dithioerythritol	O <sup>6</sup> -AlkGua	O <sup>6</sup> -Alkylguanin
DTIC	Darcabacin [5-(3,3-dimethyl-1-triazenyl)imidazole-4-carboxamid]	O <sup>6</sup> -Benzgua	O <sup>6</sup> -Benzylguanin
EDTA	Ethylendinitrietetraessigsäure	O <sup>6</sup> -EtGua	O <sup>6</sup> -Ethylguanin
EtBr	Ethidiumbromid (DNA-Farbstoff)	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
EtNU	N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff	PCNA	„Proliferating Cell Nuclear Antigen“
G bzw. Gua	Guanin	RER+	„Replication error repair“ positiv (als Phänotyp nicht intakter MMR)
GSH	Glutathion	RPA	Replikationsprotein A
GSH-Px	Glutathion-Peroxidase	RPC	Replikationsfaktor C
GST	Glutathion-S-Transferase	RT	Raumtemperatur
h	Stunde	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
HNPCC	Hereditäres Nicht-Polypöses Kolon-Karzinom (Krankheitsbild mit fehlenden Proteinen der MMR)	SLS	Natrium-Laurylsarkosin
ICA	Immunzytologisches Analyse-Verfahren	SSB (s)	DNA Einzelstrangbruch (-brüche)
ID <sub>50</sub>	lethale Dosis für 50% der Zellen (im Zytotoxizitäts-Test)	TCR	Transkriptions-gekoppelte DNA-Reparatur
kB	Kilobasen	TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
mdr	„multi drug resistance“ (einer der Phänotypen zellulärer Resistenz)	T bzw. Thy	Thymin
MeNU	N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff	TRITC	Tetramethyl-Rhodamin Isothiozyanat (hier: Antikörper-gekoppelter Farbstoff)
MAK	Monoklonaler Antikörper	Vol	Volumen
MAG	3-Methyladenin-Glykosylase	XP	Xeroderma Pigmentosum (hereditäres Krankheitsbild mit veränderten, nicht funktionsfähigen Proteinen der NER)
MES	2-Morpholinoethan-Essigsäure		

# ***1 EINLEITUNG***

Die zytotoxische oder zytostatische Chemotherapie gehört zu den Standardverfahren bei der Behandlung maligner Tumoren. Deshalb stellt eine primäre oder erworbene Chemotherapieresistenz für die meisten fortgeschrittenen malignen Erkrankungen das größte klinische Problem dar (Colvin & Chabner, 1990). Grundsätzlich basiert die Entstehung einer solchen Resistenz auf der Selektion für Tumorzellen, die gegenüber zytotoxisch wirksamen Substanzen weniger empfindlich sind. Solche Zellen können entweder bei Behandlungsbeginn bereits im Tumor vorhanden sein oder über adaptive Mechanismen sekundär während der Therapie entstehen (Griswold *et al.*, 1981), begünstigt durch die genetische Instabilität von Tumorzellen und durch den mutagenen Charakter vieler Zytostatika. Das Bild der klinischen Resistenz ist multifaktoriell bedingt und mag auch pharmakokinetische oder Zell-kinetische Faktoren einschließen, jedoch wird die zelluläre Resistenz allgemein als Hauptursache für das Therapie-Versagen angesehen (Skovsgaard *et al.*, 1994).

An einer veränderten Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber zytostatisch wirksamen Agentien können eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen beteiligt sein (Judson, 1992; Skovsgaard, *et al.*, 1994; Oberbi-Schrämmli *et al.*, 1994 [Abb. 1]).

Abb. 1: Mechanismen zellulärer Resistenz (nach Skovsgaard *et al.*, 1994)



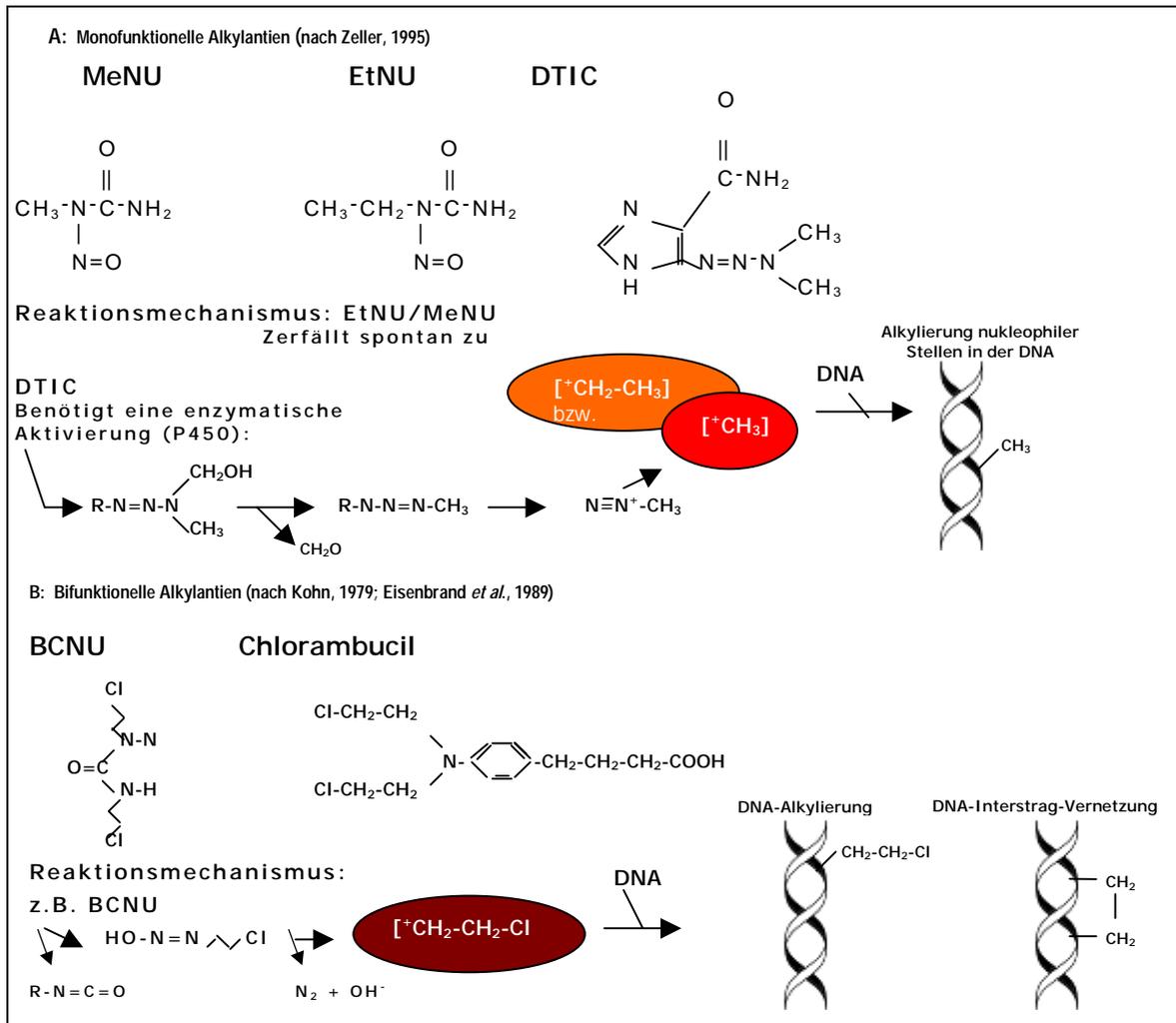
Grundsätzlich kommen hierfür Transportfunktionen (verzögerter zellulärer Import, gesteigerter Export von Zytostatika), intrazelluläre Aktivierungs- oder Entgiftungsschritte sowie die Reversion von Schäden an den Zielmolekülen durch Reparaturprozesse in Betracht. Darüber hinaus können auch Veränderungen in Signalkaskaden, die Apoptose- oder Nekroseprozesse einleiten, ursächlich für eine zelluläre Resistenz sein.

Bei Untersuchungen an Zytostatika-resistenten Zell-Linien wurde als erstes Protein einer ganzen Familie von Transmembran-Transportproteinen das P-Glykoprotein (pGP 170, mdr-1), entdeckt (Chen *et al.*, 1986). Es stellt die Hauptkomponente eines ATP-abhängigen Efflux-Systems der Zelle dar (Pastan & Gottesmann, 1988). Inzwischen sind eine Reihe strukturell und funktionell ähnlicher Transmembranproteine charakterisiert (Nooter & Herweijer, 1991; Skovsgaard *et al.*, 1994). Bei *in vitro* selektionierten resistenten Zellen findet sich häufig eine erhöhte Expression dieser Proteine. Gleichzeitig weisen diese Zellen Kreuz-Resistenzen gegenüber einer Reihe strukturell und funktionell unterschiedlicher Zytostatika auf. Diese Eigenschaft wird als „mdr“ (multi drug resistance)-Phänotyp bezeichnet. Nach zytostatischer Therapie konnte eine Ausbildung dieses Phänotyps auch bei primären Tumorzellen nachgewiesen werden (Noonan *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1990).

Einer zellulären Zytostatika-Resistenz kann aber auch ein veränderter Metabolismus von Xenobiotika zugrunde liegen. Bei Entgiftungs-Prozessen in der Zelle spielen die SH-Gruppen tragenden Proteine Metallothionein und Glutathion (GSH) eine große Rolle (Chao, 1996). Beide Proteine vermögen Xenobiotika zu reduzieren und dadurch zu inaktivieren. Während Metallothionein mit Hilfe einer Komplex-Bildung die toxischen Substanzen inaktiviert, benötigt das Glutathion zur Entgiftung dieser Stoffe GSH-Enzyme wie die Glutathion-S-Transferase (GST) oder die Glutathion-Peroxidase (GSH-Px). Wenn auch für unterschiedliche Xenobiotika kontrovers diskutiert, konnten bei einigen resistenten Tumoren erhöhte Aktivitäten von GST (Morrow & Cowan, 1990; Marie *et al.*, 1995) oder GSH-Px (Black & Wolf, 1991) gemessen werden.

Viele der zur Zeit eingesetzten Krebs-Chemotherapeutika entfalten ihre Wirkung über eine Interaktion mit der genomischen DNA, wie in **Abb. 2** am Beispiel von Alkylantien gezeigt. Einer Therapieresistenz kann dann sowohl eine effiziente Reparatur zytotoxischer DNA-Schäden, als auch eine zelluläre Toleranz diesen Schäden gegenüber zugrundeliegen (Brent *et al.*, 1985; Curt *et al.*, 1986; Harris & Hochhauser, 1992).

Abb. 2: Monofunktionelle und bifunktionelle Alkylantien



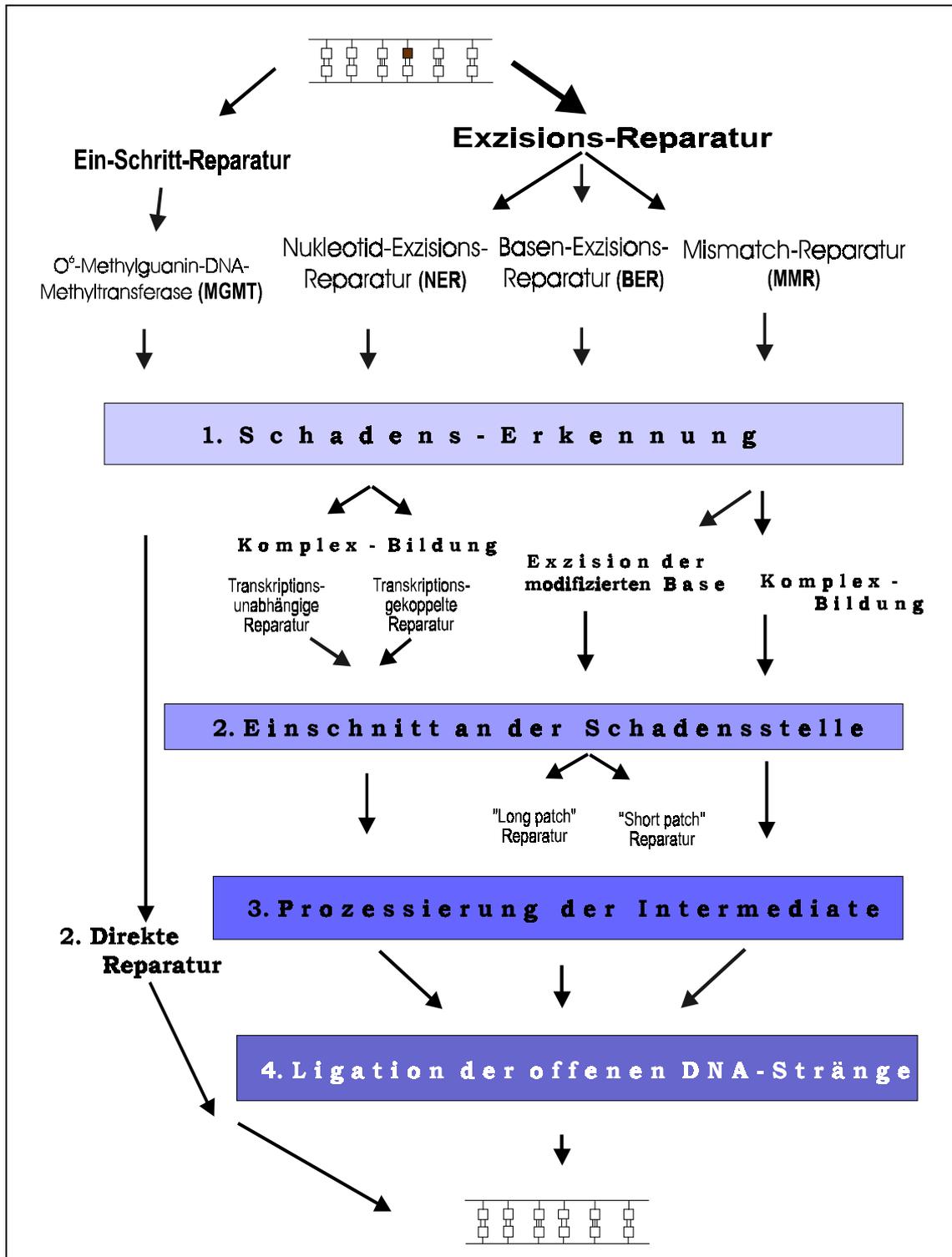
Insbesondere für die Gruppe alkylierender Agentien wurde der Zusammenhang zwischen DNA-Reparaturkompetenz der Zielzellen und Zytotoxizität genauer untersucht. So führte ein erhöhter zellulärer Spiegel des Reparatur-Proteins O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT; Pegg, 1990) bei verschiedenen Zell-Linien zu einer verringerten Zytotoxizität methylierender und chloroethylierender Agentien (Dolan *et al.*, 1989; Baer *et al.*, 1993; Lijinsky *et al.*, 1994). Umgekehrt führte eine Depletion der MGMT-Aktivität durch die Inhibitoren O<sup>6</sup>-Methylguanin oder O<sup>6</sup>-Benzylguanin zu einer Sensibilisierung gegenüber dem zytotoxischen Potential von Alkylantien, die eine kovalente Bindung von Alkylgruppen an das O<sup>6</sup>-Atom des Guanins bewirken (Dolan *et al.*, 1991; Pegg, 1993; Gerson *et al.*, 1993).

Zudem mehren sich Befunde, die zeigen, daß bestimmte DNA-Schäden parallel durch verschiedene Mechanismen eliminiert werden können. So kann O<sup>6</sup>-Alkylguanin aus der DNA durch das Reparaturprotein MGMT (Pegg, 1990), aber auch über alternative Reparaturwege (Boyle *et al.*, 1986; Bronstein *et al.*, 1992; Sibghat-Ullah & Day III, 1992

und 1993; Thomale *et al.*, 1994a) entfernt werden.

Die intensive Untersuchung von DNA-Reparaturprozessen bei Pro- und Eukaryonten hat in den letzten Jahren ein komplexes Netzwerk ineinandergreifender Reparaturmechanismen sichtbar werden lassen, deren einzelne Komponenten ihrerseits mit einer Vielzahl anderer biochemischer und genetischer Funktionen der Zelle interagieren (Abb. 3, Friedberg *et al.*, 1995; Barrett & Hill, 1998).

Abb. 3: DNA-Reparaturwege eukaryontischer Zellen (nach Friedberg *et al.*, 1995)



Weiter zeigte sich, daß die Reparatur von Läsionen innerhalb des Genoms „toposelektiv“ mit unterschiedlicher Effizienz ablaufen kann (z. B. Transkriptions-gekoppelt oder Nukleotid-spezifisch; Link *et al.*, 1992; May *et al.*, 1993; Thomale *et al.*, 1994b; Tornaletti & Pfeifer, 1994). Dies macht deutlich, daß sich die Analyse der DNA-Reparatureffizienz als einer Ursache der Chemotherapie-Resistenz nicht, wie häufig geschehen, auf die Messung einzelner Komponenten, beispielsweise der Expression bestimmter „DNA-Reparaturgene“, beschränken sollte. Vielmehr erscheint es notwendig, die Kinetik des Gesamtvorgangs im Zellkern von der Schadens-Erkennung bis hin zu dessen vollständiger Reversion zu verfolgen und mit dem zytotoxischen Potential DNA-reaktiver Substanzen zu korrelieren.

Ein Hauptgrund für die vielfach kontroversen Befunde und die oft widersprüchlichen Schlußfolgerungen zu diesem Fragenkomplex in der Literatur liegt neben der fehlenden Berücksichtigung der Komplexität der DNA-Reparaturprozesse auch im experimentellen Ansatz begründet. In den meisten Untersuchungen wurden nicht primäre Tumorzellen, sondern tumorabgeleitete murine oder humane Zell-Linien eingesetzt. Häufig wurden Zell-Linien unterschiedlichen Ursprungs miteinander verglichen oder „therapieempfindliche“ Parental-Zellen und „resistente“ Subklone, deren sonstige genetische und biochemische Unterschiede nicht bekannt waren. Besonders die bekannte genetische Instabilität von etablierten Zell-Linien, die sich häufig auch in einer ausgeprägten Aneuploidie zeigt, kann zu gravierenden Fehlschlüssen führen, wenn einzelne Komponenten so komplexer und hochgradig regulierter Mechanismen wie der Apoptose-Induktion und der DNA-Reparatur miteinander korreliert werden.

Deshalb war bei der Planung der vorliegenden Arbeit die Festlegung auf ein geeignetes Modell primärer Tumorzellen des Menschen eine der wichtigsten Voraussetzungen bei der Suche nach einer kausalen Verknüpfung von Therapie-Resistenz und DNA-Reparatur.

Als klinisches Modell zur Untersuchung dieser Zusammenhänge wurde die chronisch-lymphatische Leukämie (CLL) gewählt. Sie vereint mehrere Voraussetzungen für ein geeignetes Modell-System:

Die CLL wird mit DNA-reaktiven Alkylantien, in erster Linie mit Chlorambuzil (CLB), behandelt und spricht in der Regel auf diese Therapie zunächst gut an.

Homogene Populationen primärer CLL-Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Patienten sind relativ leicht zugänglich und anhand von Zelloberflächen-„Markern“ gut charakterisierbar.

Erst nach mehreren Behandlungs-Zyklen tritt häufig gegen diese Therapie eine klinische Resistenz ein, die mitursächlich für den späteren fatalen Krankheitsverlauf der CLL ist.

Bei dieser Form der Leukämie handelt es sich um ein Non-Hodgkin-Lymphom mit einer Überschwemmung von Knochenmark und Peripherie mit ausdifferenzierten, immuninkompetenten B-Lymphozyten (Brittinger et al., 1997). Nach heutigem Wissensstand beruht diese Erkrankung sehr wahrscheinlich nicht auf einer gesteigerten Stammzell-Proliferation, stattdessen wird sie verursacht durch eine verlängerte Lebensdauer der CLL-Lymphozyten aufgrund gestörter Apoptosemechanismen (Reed, 1998). Dementsprechend zielt die (chemo-) therapeutische Intervention nicht primär auf einen Proliferationsblock, sondern auf das Abtöten von Tumorzellen in der Übergangsphase von  $G_1$  zu  $G_0$  ( $G_1/G_0$ ) des Zellzyklus.

Ziel dieser Arbeit war es, die Kapazität von CLL-Zellen zur Reparatur zytotoxischer DNA-Läsionen zu bestimmen und mit ihrer Chemosensibilität *in vitro* sowie dem klinischen Status der Patienten zu korrelieren. Dazu war es notwendig, geeignete analytische Verfahren zu etablieren, die funktionelle Messungen möglichst auf dem Niveau von Einzel-Zellen ermöglichen. Längerfristig sollten diese Untersuchungen zur Definition molekularer Determinanten für die zelluläre Resistenz beitragen und neue Wege zu deren Überwindung aufzeigen.

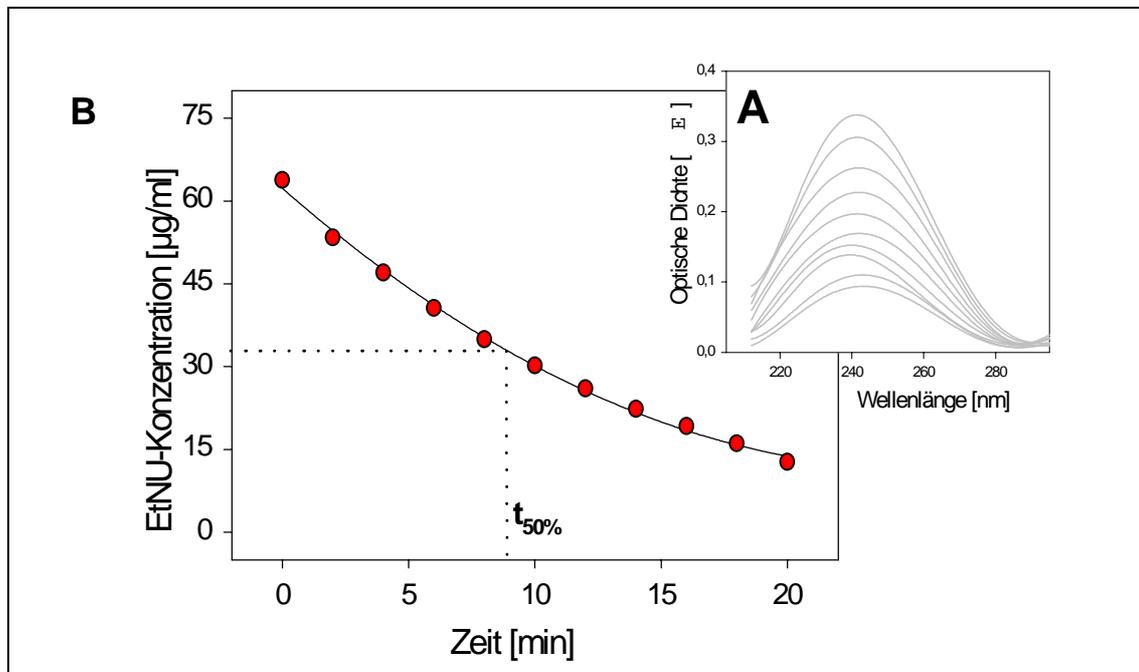
## **2 ERGEBNISSE**

### **2.1 DNA-Ethylierung und DNA-Reparaturprozesse: Untersuchungen *in vitro***

Zur Festlegung der experimentellen Rahmenbedingungen wurden zunächst die einzelnen Komponenten des Systems unter zellfreien Bedingungen *in vitro* untersucht. Als Standard-Agens zur DNA-Alkylierung wurde *N*-Ethyl-*N*-Nitrosoharnstoff (EtNU; Abb. 2) verwendet. EtNU zerfällt unter physiologischen Bedingungen heterolytisch sehr rasch in hochreaktive elektrophile Carb-Anionen (Goth & Rajewsky, 1972), die mit nukleophilen Zentren der DNA reagieren und so ein Dutzend unterschiedlicher DNA-Alkylierungsprodukte entstehen lassen. Der relative Anteil der einzelnen Modifikationen ist gut untersucht (Beranek, 1990): Neben dem Hauptprodukt, den chemisch und biologisch weitgehend stabilen Ethyl-Phosphotriestern (ca. 55 %), erfolgt mit geringerer Häufigkeit eine Alkylierung an N- und O-Atomen der Basen. So werden ~11 % *N*7-Ethyl-Guanin (*N*7-EtGua), ~8 % O<sup>6</sup>-Ethyl-Guanin (O<sup>6</sup>-EtGua), ~7,5 % O<sup>2</sup>-Ethyl-Thymin (O<sup>2</sup>-EtThy) und ~4 % *N*3-Ethyl-Adenin (*N*3-EtAde) gebildet. Während die Sauerstoffaddukte chemisch relativ inert sind, können die *N*-Alkylierungen zu Ringöffnungen oder, über eine Destabilisierung der *N*-glykosidischen Bindung, spontan zu abasischen Stellen in der DNA führen. Im ersten Teil dieses Abschnitts sind Experimente zur Untersuchung der Eigenschaften der eingesetzten Komponenten aufgeführt. Dazu gehören Messungen des EtNU-Zerfalls und der Bildung von DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB) in der DNA.

#### **2.1.1 Heterolytischer Zerfall von *N*-Ethyl-*N*-Nitrosoharnstoff (EtNU)**

Anhand seiner UV-Absorption ( $\lambda_{\max} = 238 \text{ nm}$ ) läßt sich das zur DNA-Alkylierung eingesetzte EtNU photometrisch gut quantifizieren (Goth & Rajewsky, 1972). Die Messung der Zerfalls-Kinetik ergab unter den experimentellen Bedingungen (pH 7.25; 37°C) für EtNU eine Halbwertszeit von etwa 9 Minuten (Abb. 4). Nach einer Expositionszeit von 20 Minuten sind demnach ~80% der möglichen Carb-Anionen entstanden und haben weiterreagiert.

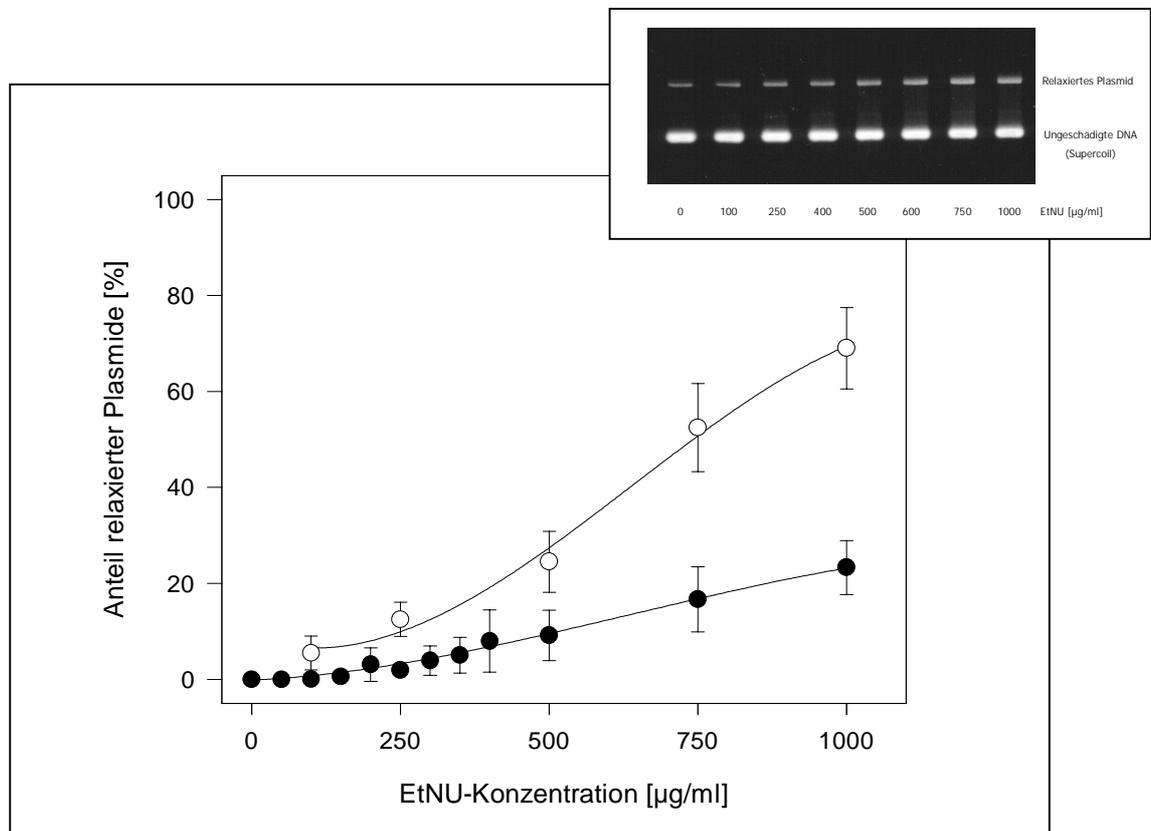


**Abb. 4: Heterolytischer Zerfall von *N*-Ethyl-*N*-Nitrosourea (EtNU)**

*N*-Ethyl-*N*-Nitrosourea (EtNU) wurde zur Messung aus der DMSO-Stammlösung 1: 10<sup>4</sup> in Alkylierungspuffer verdünnt (PBS/HEPES, pH 7.25, 37°C). (A) Spektrophotometrische Messung ( $\lambda=210-300$  nm) einer Zerfallskinetik von EtNU in Alkylierungspuffer; Intervall: 2 Minuten (vgl. Goth und Rajewsky, 1972). (B) Bestimmung der Halbwertszeit.

### 2.1.2 Die Mehrzahl der primären DNA-Ethyl-Addukte führt unter physiologischen Bedingungen nicht zu DNA-Strangbrüchen

An isolierten superhelikalen Plasmid-Molekülen (Grösse: 10 kB) wurde dann geprüft, ob die EtNU-induzierten DNA-Alkylierungsprodukte direkt zu Strangbrüchen führen. Die Integrität der Plasmid-DNA wurde vor und nach EtNU-Exposition mit Hilfe eines Relaxationstests bestimmt, der eine Unterscheidung zwischen ungebrochenen („supercoiled“), durch SSBs relaxierten oder durch Doppelstrangbruch linearisierten Molekülen anhand ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in der Gelelektrophorese erlaubt. Die Untersuchungen ergaben, daß bei neutralem pH-Wert die Mehrzahl der Ethyl-Addukte nicht spontan zu SSBs in der DNA führt (Abb. 5). Für EtNU-Konzentrationen unterhalb von 250 µg/ml wurde mit dieser Analyse-Methode keine signifikante Erhöhung der Strangbruchrate gefunden, zwischen 300 und 1500 µg/ml ergab sich eine dosisabhängige Zunahme bis auf 70 % aller Plasmide mit mindestens einem SSB. Wurde die ethylierte DNA vor der Auftrennung unter alkalischen Bedingungen (pH 12) inkubiert, stieg die Zahl der SSBs jeweils auf etwa den dreifachen Wert an. Unter diesen Bedingungen werden offenbar Alkali-labile Läsionen zunächst in abasische Stellen und dann in Strangbrüche überführt.



**Abb. 5: Induktion von DNA Strangbrüchen durch EtNU in Plasmid-DNA**

Die Induktion von DNA -Einzelstrangbrüchen durch Reaktion mit EtNU wurde an Plasmid-DNA gemessen. Die Inkubation erfolgte für 1h bei 37°C. (A) Foto: Ethylierte DNA (140 ng/Spur) wurde nach elektrophoretischer Auftrennung gefärbt. (B) Durch densitometrische Auswertung der einzelnen DNA Banden wurde der relative Anteil der Plasmid-Moleküle mit Einzelstrangbrüchen an der Gesamt-DNA bestimmt: Inkubation der DNA mit unterschiedlichen Konzentrationen von EtNU (●), bzw. nach zusätzlicher Alkali-Behandlung (15 min, pH 12; ○).

Zur quantitativen Bestimmung der nach EtNU-Exposition gebildeten DNA-Addukte wurden experimentelle Bedingungen von Engelbergs (1998) herangezogen, unter denen die Menge an O<sup>6</sup>-Ethylguanin in ethylierten Plasmiden bestimmt worden war. Damit und aus den relativen Bildungshäufigkeiten einzelner DNA-Addukte (Beranek, 1990; s.o.) lassen sich die Absolutmenge anderer Alkylierungsprodukte rechnerisch ermitteln (Tab. 1). So induziert eine Dosis von 100 µg EtNU/ml etwa 0,75 DNA-Addukte pro 10 kB-Plasmid. Diese Dosis führt bei neutralem pH 7.25 nicht zu einer meßbaren Frequenz von Strangbrüchen, in alkalischem Milieu wird jedoch ein Teil der DNA-Addukte über abasische Stellen in SSBs überführt. Unter den gewählten Bedingungen lassen sich erst mit einer 3-fach höheren EtNU-Konzentration meßbare SSB-Raten induzieren und erst bei 1250 µg/ml weisen 50% aller DNA-Moleküle mindestens einen Strangbruch auf (Abb. 5).

**Tab. 1: Anteil verschiedener DNA-Addukte in einem 10 kB Plasmid nach EtNU-Exposition**

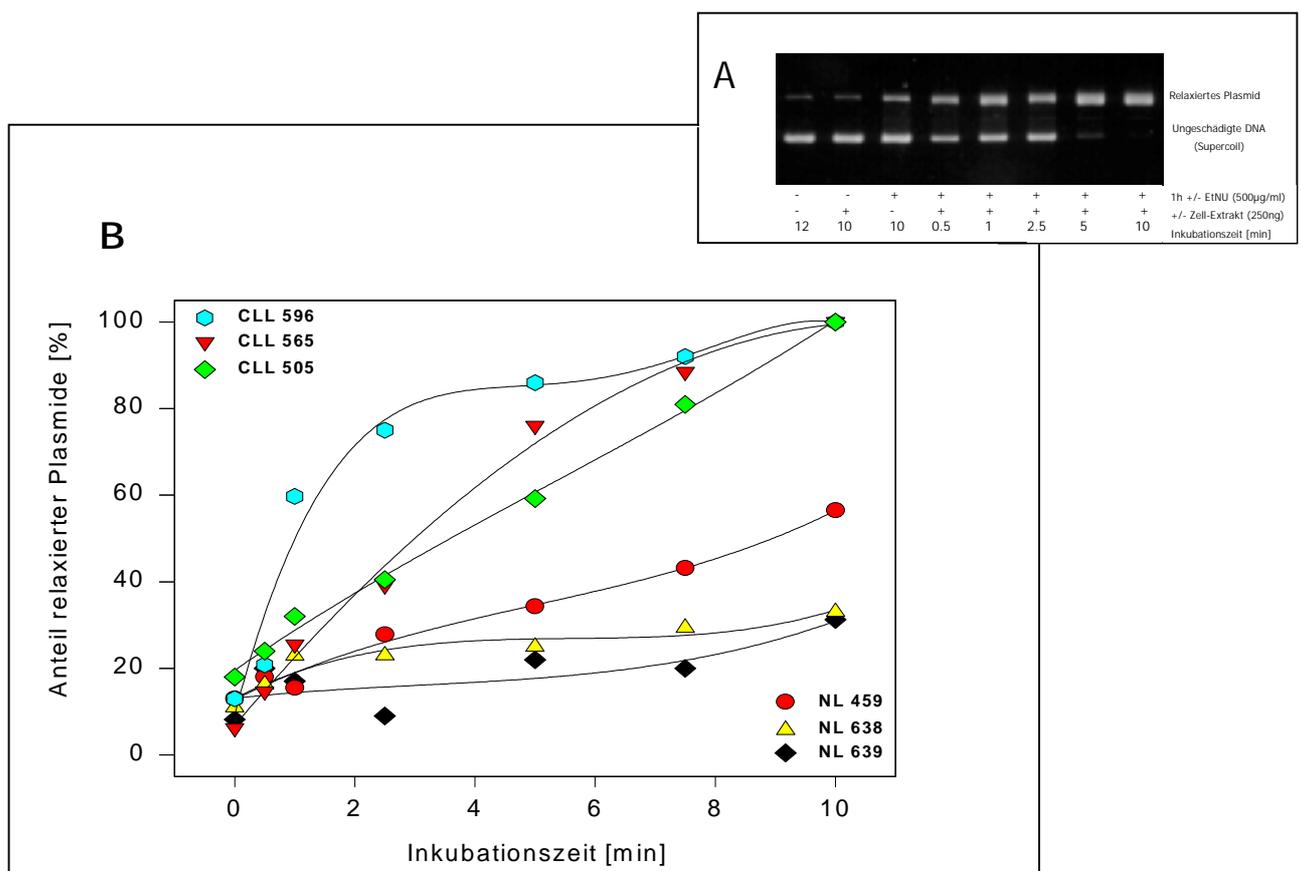
EtNU-Konzentration	O <sup>6</sup> -Ethylguanin	O <sup>2</sup> -Ethylthymidin	7-Ethylguanin	3-Ethyladenin	GESAMT-ANTEIL alkylierter Basen	Gesamt-Anteil von DNA-Addukten
100µg/ml	0.16	0.2	0.3	0.1	0.76	1.6
300µg/ml	0.48	0.6	0.9	0.3	2.38	4.8
500µg/ml	0.8	1	1.5	0.5	3.8	8

### 2.1.3 Die Inkubation mit Kernextrakten überführt DNA-Ethyl-Addukte zeitabhängig in Strangbrüche

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob eine Kernprotein-Fraktion aus humanen Lymphozyten in ethylierter DNA Strangbrüche zu induzieren vermag. Dazu wurde Plasmid-DNA zunächst mit EtNU (500 µg/ml) alkyliert und anschließend mit Kernextrakten aus individuellen Lymphozytenproben inkubiert. Ausgehend von einer basalen Strangbruchrate (10%) stieg die SSB-Häufigkeit bei allen eingesetzten Kernextrakten zeitabhängig an (Abb. 6). Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde lagen die Plasmide in allen Ansätzen zu 100 % in relaxierter Form vor (ohne Abb.).

### 2.1.4 Die Kinetik der Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen ist für individuelle Lymphozytenproben unterschiedlich

Kernextrakte aus Lymphozyten individueller Spender wiesen jedoch große Unterschiede bezüglich ihrer Inzisions-Kinetik bei ethylierter DNA auf (Abb. 6). Die Halbwertszeiten (50% der Plasmide mit mindestens einem Strangbruch) lagen bei diesen Proben zwischen < 1 Minute und >> 10 Minuten.



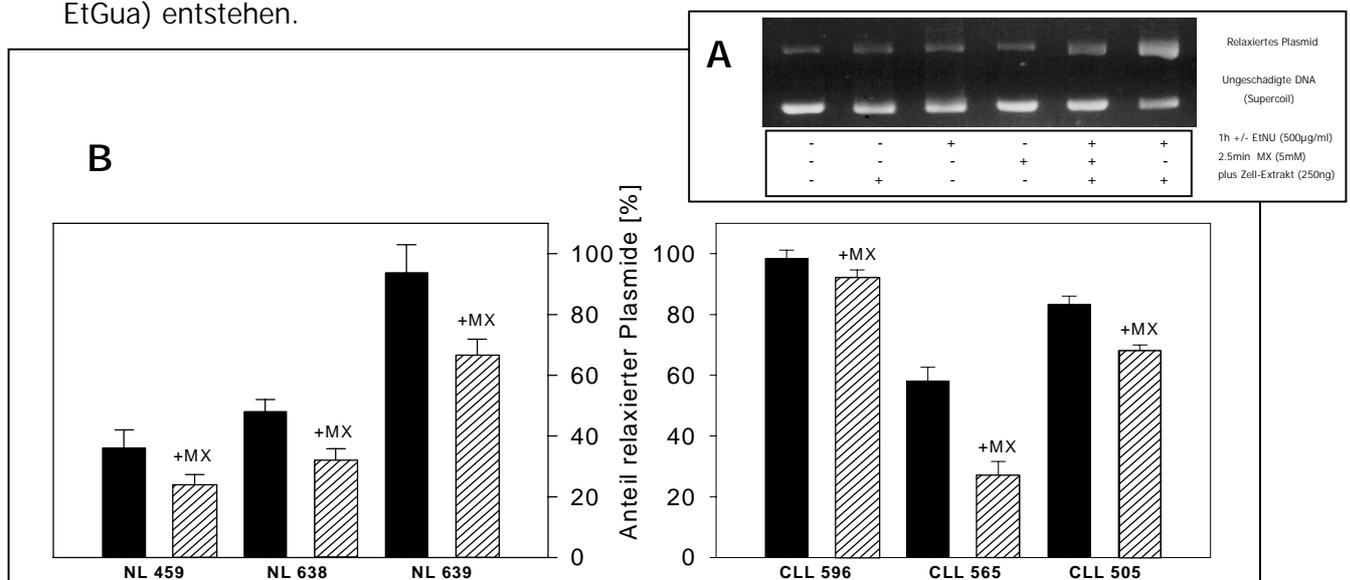
**Abb. 6: Induktion von DNA-Strangbrüchen an ethylierter Plasmid-DNA durch Kernproteine von Lymphozyten.**

Plasmid-DNA wurde für 1h mit EtNU (500 µg/ml; pH 7.25, 37°C) und anschließend mit je 250 ng Zell-freiem Kernprotein aus verschiedenen Proben normaler und CLL-Lymphozyten inkubiert. (A) Foto: Elektrophoretische Auftrennung und Färbung von Plasmid-DNA nach Inkubation mit Proteinextrakten von Zellen des Probanden CLL 596. (B) Nach densitometrischer Auswertung der einzelnen DNA-Banden wurde der relative Anteil der Plasmid-Moleküle mit Einzelstrangbrüchen an der Gesamt-DNA bestimmt und die zeitabhängige Strangbruch-Bildung durch Kernproteine individueller Zellproben ermittelt.

Es zeigte sich, daß Kern-Extrakte aus CLL-Lymphozyten (CLL) gegenüber solchen aus normalen peripheren Lymphozyten (NL) eine deutlich höhere Inzisions-Aktivität für Ethyl-Addukt-haltige DNA aufwiesen (vergl. 3.4.3). Diese Messungen belegen, daß neben den relativ seltenen „spontanen“ Strangbrüchen in Alkylantien-exponierter DNA vor allem durch Kernproteine katalysierte, enzymatische DNA-Reparaturprozesse an der Entstehung von SSBs beteiligt sind.

### 2.1.5 Basen-Exzisions-Reparaturprozesse sind an der Induktion von Strangbrüchen durch Kern-Extrakte beteiligt

Der Einsatz spezifischer Inhibitoren ermöglicht es, die Beteiligung verschiedener Mechanismen an der Inzision/Reparatur chemisch modifizierter DNA in Zellen oder komplexen Protein-Gemischen zu untersuchen. Einer der wichtigen DNA-Reparaturwege, die Basen-Exzisions-Reparatur (BER; vgl. **Abb. 3**) läßt sich auf einer frühen Stufe durch Methoxyamin (MX) blockieren (Liuzzi & Talpaert-Boyle, 1985). MX reagiert mit abasischen Stellen in der DNA und verhindert deren weitere Prozessierung durch die AP-Endonuklease (Rosa *et al.*, 1991). Wurde ethylierte Plasmid-DNA vor der Kernextrakt-Inkubation mit MX vorbehandelt, reduzierte sich die zugehörige Strangbruchrate um 10 bis 50 % (**Abb. 7**). Dieser Befund belegt, daß der BER-Weg bei den untersuchten Lymphozyten-Proben nennenswert, aber in individuell unterschiedlichem Ausmaß, an der SSB-Induktion beteiligt ist. Die blockierten abasischen Stellen in EtNU-exponierter DNA können u. a. durch spontanen Basenverlust (N3-EtAde) oder durch die Wirkung spezifischer Glykosylasen (z.B. durch die 3-Methyladenin-Glykosylase [MAG] an N7-EtGua) entstehen.



**Abb. 7: Einfluß von Methoxyamin auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Zell-freies Kernprotein**

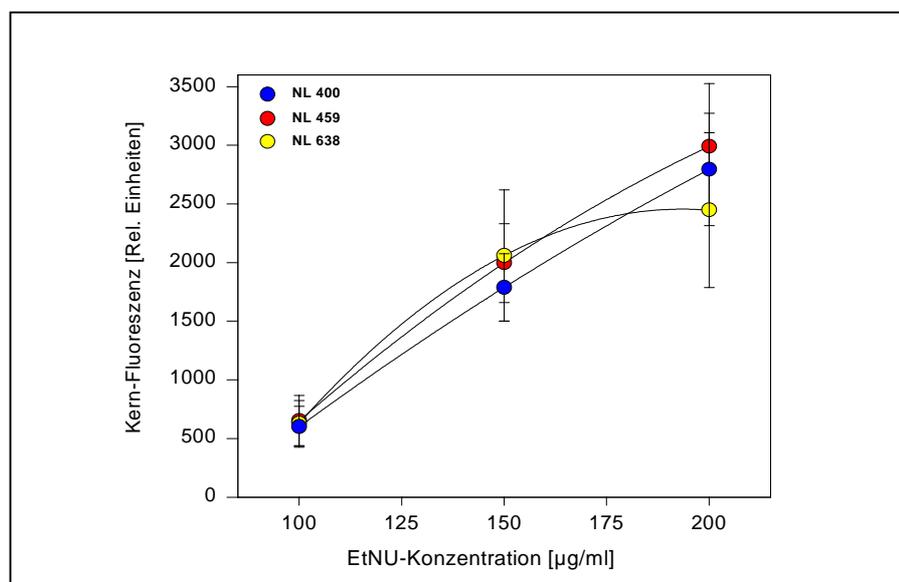
Die durch EtNU induzierte DNA-Strangbruchrate wurde durch Methoxyamin reduziert. Nach einstündiger Inkubation der Plasmid-DNA gegenüber EtNU (500 µg/ml) wurde dem Ansatz Methoxyamin (MX; 5 mM) zugefügt und danach mit verschiedenen Proben isolierter Kernproteine (250 ng) inkubiert. **A**) Foto: Plasmid-DNA nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung. **B**) Nach densitometrischer Auswertung der einzelnen DNA-Banden wurde die individuelle Strangbruch-Bildung durch Kernproteine ermittelt.

## 2.2 Messung von DNA-Strangbrüchen bei humanen Lymphozyten: Etablierung des „Comet Assay“

Im ersten Abschnitt wurde gezeigt, daß nach Exposition gegenüber EtNU-Konzentrationen  $< 300 \mu\text{g/ml}$  DNA-Einzelstrangbrüche nur mit geringer Häufigkeit auftreten. Sie sind sehr wahrscheinlich in erster Linie Produkte von DNA-Reparaturprozessen. EtNU ist aufgrund seiner chemischen Eigenschaften sehr gut Membran-gängig und führt in der Kern-DNA von Säugerzellen zum gleichen Addukt-Spektrum wie in isolierten Plasmiden (Beranek *et al.*, 1978; Beranek, 1990). Um zu überprüfen, ob diese Addukte bei humanen Zellen ebenfalls sekundär in DNA-Strangbrüche überführt werden, wurde als geeignetes Meßverfahren auf Einzelzell-Ebene der „Comet Assay“ (Singh *et al.*, 1988) eingesetzt. Die Etablierung der Methode erfolgte an Lymphozyten normaler Spender.

### 2.2.1 O<sup>6</sup>-Ethylguanin wird in der genomischen DNA verschiedener Proben in gleichem Ausmaß gebildet

Zunächst wurde der Gehalt eines spezifischen DNA-Alkylierungsproduktes (O<sup>6</sup>-EtGua) in einer Reihe von Lymphozyten-Proben nach *in vitro*-Exposition gegenüber EtNU gemessen. Zum Nachweis dieser Läsion diente ein immunhistologisches Verfahren auf der Basis Addukt-spezifischer monoklonaler Antikörper (ICA; Adamkiewicz *et al.*, 1985; Seiler *et al.*, 1993). Damit konnte gezeigt werden, daß sich die Menge von O<sup>6</sup>-EtGua in der Kern-DNA individueller Proben normaler Spender nicht signifikant voneinander unterscheidet (Abb. 8).

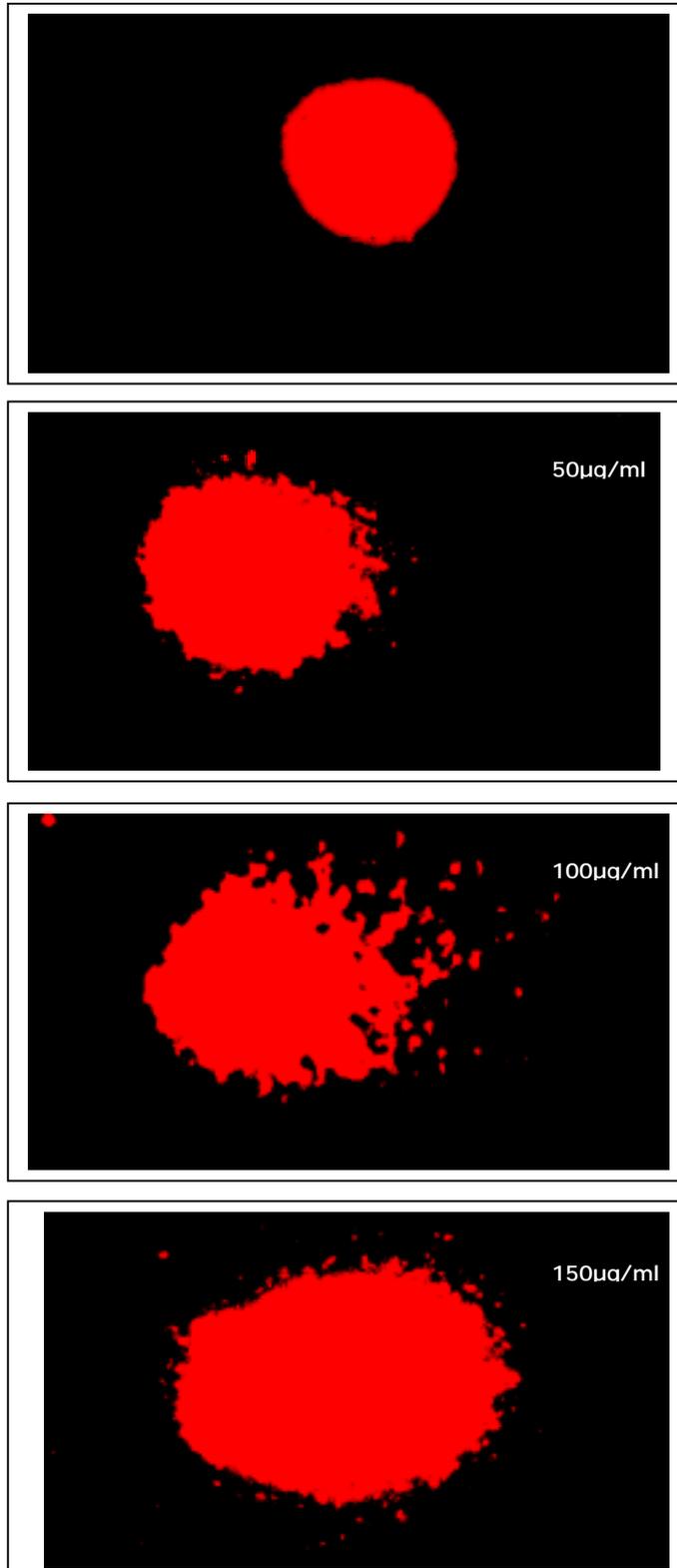


**Abb. 8: Bildung von O<sup>6</sup>-Ethylguanin in der Kern-DNA normaler Lymphozyten als Funktion der EtNU-Konzentration**

Proben isolierter normaler Lymphozyten verschiedener Spender wurden für 20 min gegenüber EtNU exponiert und danach sofort auf Objektträger aufgebracht und fixiert. Der Nachweis von O<sup>6</sup>-Ethylguanin in der genomischen DNA dieser Zellen erfolgte durch ICA-Analyse mit Hilfe des monoklonalen Anti-(O<sup>6</sup>-EtGua) Antikörpers EM-2-3 (vgl. 5.2.6.). Die so bestimmte Menge von O<sup>6</sup>-Ethylguanin wurden auf die parallel gemessene DNA-Menge pro Zellkern normiert und die Werte der unbehandelten Kontroll-Zellen im selben Experiment abgezogen (Mittelwert aus jeweils 150 Zellen). Die Fehlerbalken geben die Varianz von drei unabhängige Experimenten an.

## 2.2.2 Die Induktion von DNA-Strangbrüchen zeigt individuelle Unterschiede

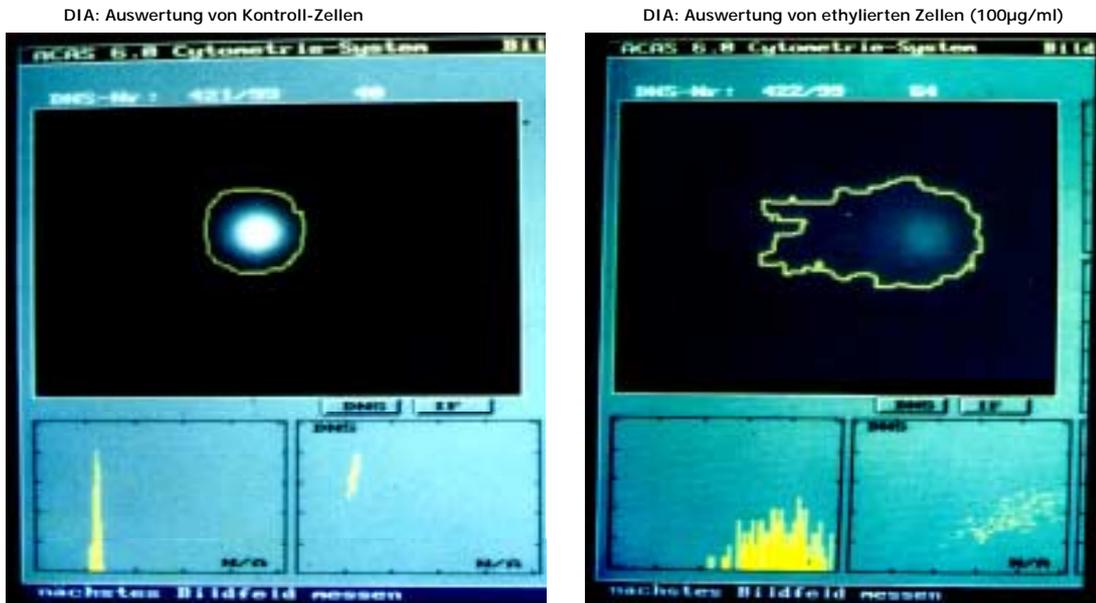
Zum Nachweis von SSBs in der DNA einzelner Zellen wurde der „Comet Assay“ verwendet. Dazu wurden Lymphozyten aus individuellen Blutproben isoliert, nach EtNU-Exposition in Agarose-Gele eingegossen, lysiert und die Fragmentierung der Kern-DNA nach elektrophoretischer Auftrennung analysiert (Abb. 9 und 10).



**Abb. 9:**  
Bildung von „Kometen“ in der DNA von Lymphozyten als Funktion der EtNU-Konzentration:

Isolierte Lymphozyten wurden nach EtNU-Behandlung in Agarose eingegossen, lysiert und die DNA elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 5.2.7.). Nach Ethidiumbromid-Färbung zeigte sich mit steigender EtNU-Konzentration eine zunehmende „Komet“-Bildung, welche auf eine erhöhte Zahl von DNA-Strangbrüchen hinwies.

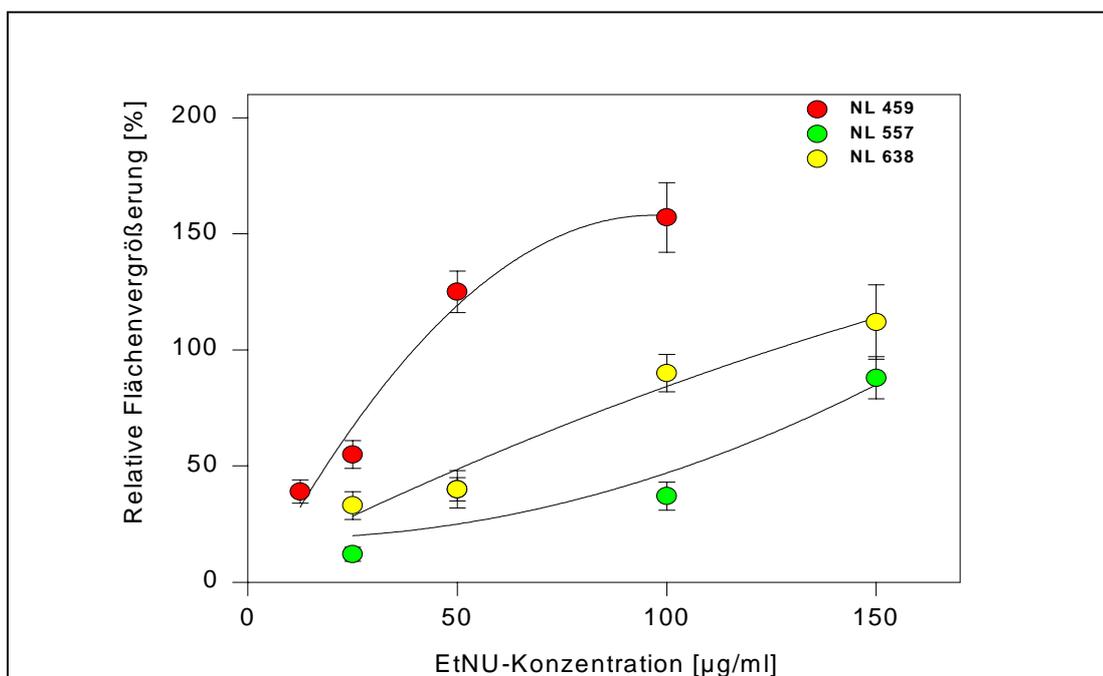
Die Fotos zeigen die „Komet“-Bildung von Lymphozyten der Zellprobe CLL 927, die mit verschiedenen Konzentrationen EtNU behandeltet wurden.



**Abb. 40: Analyse von „Kometen“ in der DNA von Lymphozyten nach EtNU-Exposition**

Nach EtNU-Exposition isolierter normaler Lymphozyten wurde die DNA der Zellen mit Hilfe des „Comet Assay“ aufgetrennt (s. Abb. 9). Unter Verwendung eines Mehr-Parameter Bildanalyse-Programms (ACAS) wurden die Flächenrößen der Kern-DNA einzelner Zellen vermessen (n = 150). Die Abbildungen zeigen die Auswertung der Lymphozyten-Probe CLL 915. Abgebildet sind die Diagramme für die jeweils zuletzt gemessenen Zellen (oben), sowie für die ermittelten Flächen aller Zelle (Histogramm, unten links, und die Beziehung Fläche/DNA-Fluoreszenz, unten rechts).

Obwohl die mittlere Anzahl der Primär-Addukte nach EtNU-Exposition für individuelle Zellproben gleich war (Abb. 8), wiesen diese Zellen zum gleichen Zeitpunkt jeweils unterschiedliche Komet-Größen auf. Dies deutet auf unterschiedliche Anteile induzierter DNA-SSBs bei den einzelnen EtNU-behandelten Lymphozyten-Proben hin (Abb. 11).

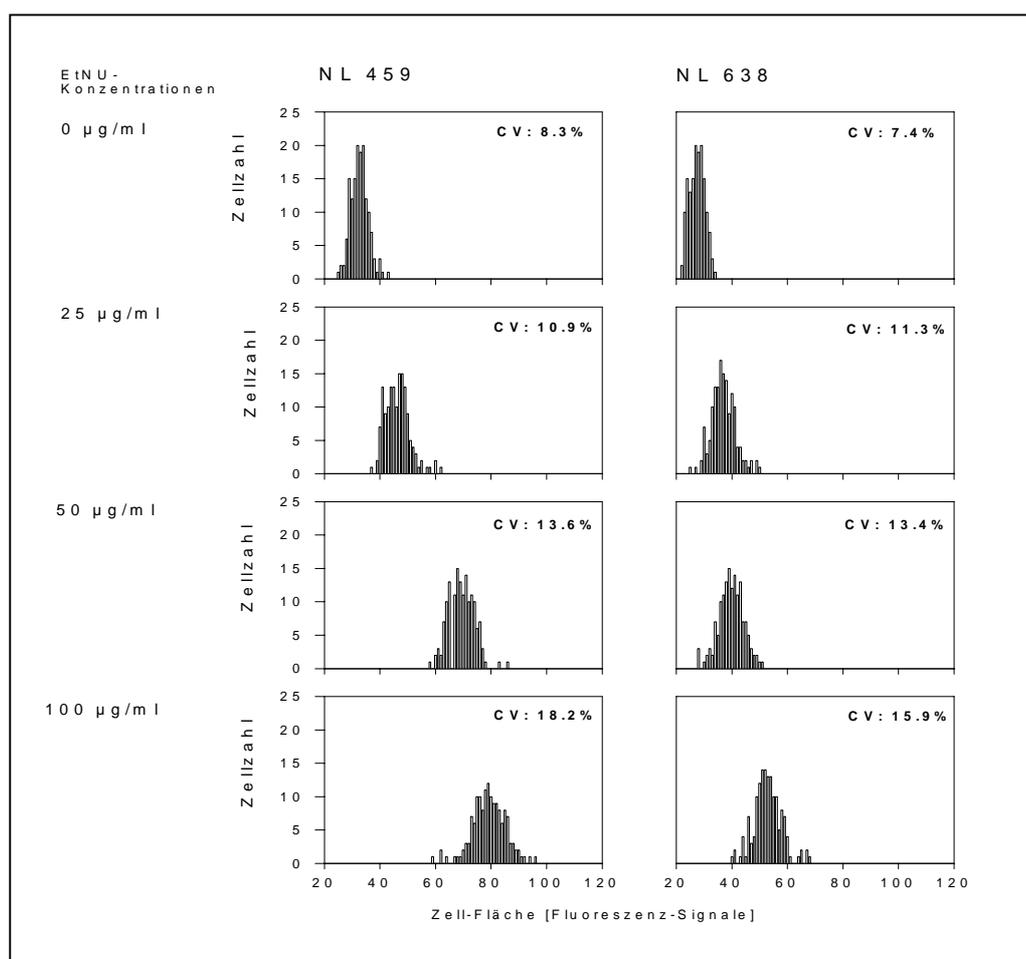


**Abb. 11: Konzentrationsabhängige Komet-Bildung nach EtNU-Exposition individueller Proben normaler Lymphozyten**

Drei Proben normaler Lymphozyten unterschiedlicher Spender wurde gegenüber EtNU in verschiedenen Konzentrationen exponiert und danach mit Hilfe des „Comet Assay“ ausgewertet (vgl. Abb. 10). Die Komet-Größe ist angegeben als relative Flächenvergrößerung (in %) gegenüber den jeweils unbehandelten Kontrollen im selben Experiment (Mittelwerte aus 150 ausgewerteten Zellen). Die Fehlerbalken stellen die inter-experimentelle Variation dar (n ≥ 4).

Wie es sich schon bei den Untersuchungen an ethylierten Plasmiden andeutete, beeinflussen offensichtlich erhebliche Unterschiede in der Inzisions-Aktivität individueller Zellproben die Induktionsrate von DNA-SSBs. Die Auswertung von Kurzzeit-Kinetiken zur Messung der DNA-Strangbrüche während der EtNU-Exposition (20 Minuten) zeigte, daß bereits wenige Minuten nach Expositionsbeginn Strangbrüche in der Kern-DNA auftreten, und daß auch hier große Unterschiede zwischen den Lymphozyten individueller Spender festzustellen sind (Abb. 11). Da die EtNU-Zerfallskinetik und die Menge der primär gebildeten DNA-Addukte für alle Proben gleich sind, müssen die individuellen Verläufe durch eine unterschiedliche Schadens-Prozessierung verursacht werden.

Um auszuschließen, daß große Zell-zu-Zell-Unterschiede die Mittelwerte für die einzelnen Proben stark beeinflussen, wurden für jeden Messpunkt relativ große Zellzahlen ausgewertet und statistisch analysiert (Abb. 12). Dabei zeigten sich nur relativ kleine interzelluläre Varianzen (Variationskoeffizienten [CV] zwischen 7.4 und 18.2%) und eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (vgl. Abb. 11).



**Abb. 5: Inter-zelluläre Variation der Kometen-Bildung bei Lymphozyten nach EtNU-Exposition**

Zwei Proben isolierter Lymphozyten von normalen Spendern (NL 459 und NL 638) wurden gegenüber EtNU in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und mit Hilfe des „Comet Assay“ analysiert. Die Flächen der Ethidiumbromid-gefärbten Kern-DNA einzelner Zellen wurden mit Hilfe des Mehr-Parameter Bildanalyse-Programms (ACAS, vgl. Abb. 10) bestimmt. Die Histogramme stellen die Auswertung von jeweils 150 Zellen dar.

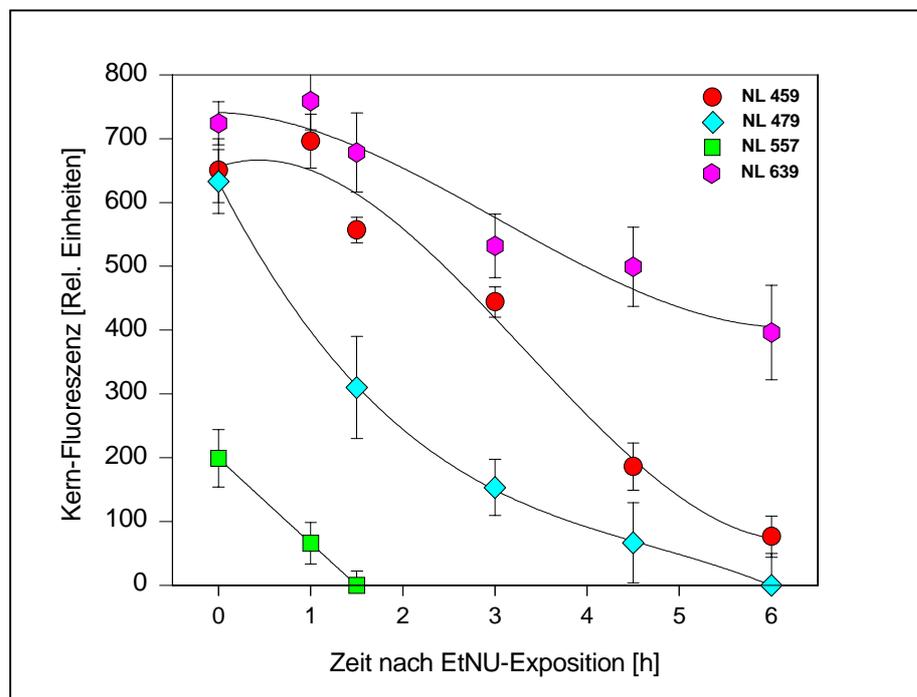
## 2.3 Messung von DNA-Reparaturprozessen bei normalen Lymphozyten

Mit den Einzelzell-Nachweisverfahren ICA für spezifische DNA-Addukte und „Comet Assay“ für DNA-Strangbrüche standen zwei empfindliche Methoden zur Verfügung, um DNA-Reparaturprozesse bei Lymphozyten zu messen. Beide Methoden erfassen dabei unterschiedliche Abschnitte der DNA-Reparaturprozesse in ihrem zeitlichen Verlauf.

### 2.3.1 O<sup>6</sup>-Ethylguanin wird aus der DNA individueller Lymphozyten-Proben unterschiedlich schnell eliminiert

Die Verweildauer (Persistenz) von O<sup>6</sup>-EtGua in der genomischen DNA von einzelnen Zellen oder von Zellpopulationen ist ein Maß für deren DNA-Reparaturkapazität. Um diese zu bestimmen, wurden Lymphozyten individueller Spender im Anschluß an die Kurzzeit-Exposition mit EtNU für eine mehrstündige Reparaturphase in normalem Medium inkubiert.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zell-Aliquots entnommen und der relative O<sup>6</sup>-EtGua-Gehalt in der Kern-DNA mit der ICA-Technik bestimmt. Die Eliminationskinetiken für dieses Addukt wiesen große individuelle Unterschiede auf (Abb. 13).



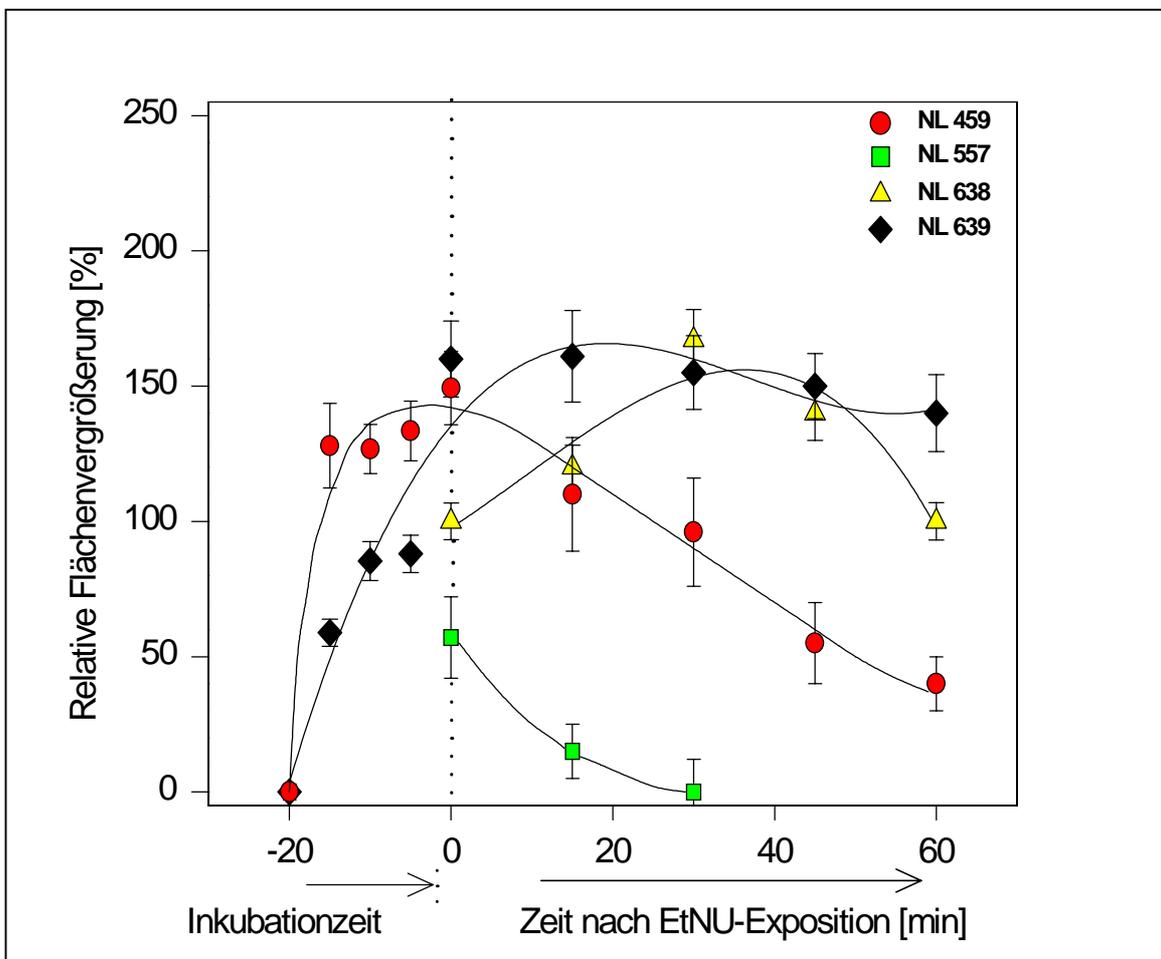
**Abb. 6:** Kinetiken der Elimination von O<sup>6</sup>-Ethylguanin aus der Kern-DNA normaler Lymphozyten individueller Spender

Normale Lymphozyten dreier unterschiedlicher Spender wurden 20 min lang mit EtNU (100 µg/ml) inkubiert, nach Waschschritten mit kalter PBS in Vollmedium resuspendiert und bei 37°C weiter inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Zell-Proben entnommen und mit Hilfe des ICA auf den O<sup>6</sup>-Ethylguanin-Gehalt der genomischen DNA untersucht (siehe Abb. 9). Die Fehlerbalken stellen die inter-experimentelle Variation dreier unabhängigen Messungen dar. Die DNA-Reparaturkinetiken wurden über 24 Stunden aufgenommen.

Die Halbwertszeiten ( $t_{50\%}$ ) für die Persistenz von  $O^6$ -EtGua in der DNA variierten bei den untersuchten Proben zwischen den langsamsten und schnellsten Reparaturkinetiken um den Faktor 7,5. Auffällig ist dabei der niedrige „Initialwert“ unmittelbar nach der DNA-Ethylierung bei der Probe NL 557 (vergl. hierzu 2.3.3.1 und Abb. 15).

### 2.3.2 Bei der Prozessierung von DNA-Strangbrüchen zeigen sich individuelle Unterschiede

Ähnlich den Eliminationskinetiken von  $O^6$ -EtGua aus der DNA fanden sich auch für die Prozessierung von DNA-SSBs nach EtNU-Exposition große individuelle Unterschiede. Nachdem sich bereits für die „initialen“ Bildungsraten (gemessen unmittelbar nach der 20-minütigen Expositionszeit) beträchtliche Varianzen gezeigt hatten, wiesen auch die Kinetiken der Strangbruch-Messungen mit Hilfe des „Comet Assay“ bei individuellen Proben unterschiedliche Verläufe auf (Abb. 14).



**Abb. 7: Kinetiken der Prozessierung von DNA-Strangbrüchen bei normalen Lymphozyten nach EtNU-Exposition**  
 Normale Lymphozyten von vier Spendern wurden *in vitro* mit EtNU (100 µg/ml; 20 min; 37°C) inkubiert, nach Waschrufen mit kalter PBS in Vollmedium resuspendiert und bei 37°C weiter inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zell-Aliquots entnommen und mit Hilfe des „Comet Assay“ auf DNA-Strangbrüche untersucht (vgl. Abb. 12). Die Fehlerbalken stellen die inter-experimentelle Variation dreier unabhängiger Untersuchungen dar. Die Reparaturkinetiken wurden über 6 Stunden aufgenommen.

Während mit Hilfe der ICA-Methode die Persistenz bzw. die Eliminationsrate eines spezifischen DNA-Alkyl-Addukts gemessen wurde, spiegelt der „Comet Assay“ einen dynamischen Prozess wider, bestehend aus mehreren parallel und nacheinander ablaufenden Reaktionen. Limitierend für die Darstellung der DNA-Intermediate sind die Initialreaktion (Inzision oder Exzision) und die finale Reaktion (Ligation). Da DNA-Strangbrüche schon während der EtNU-Expositionszeit induziert werden (**Abb. 14**) und alle folgenden Reaktionen im extremsten Fall mit nur kurzer Verzögerung stattfinden können, wäre es in diesem Fall nur schwer möglich, DNA-SSBs nachzuweisen. Mindestens in einer der untersuchten Proben normaler Lymphozyten wies eine derartige minimale Bildung von DNA-Reparatur-Intermediaten auf ein solches Phänomen schnellster Reparatur-Prozessierung hin. Diese Lymphozyten (NL 557) zeigten zu keinem Reparatur-Zeitpunkt eine mit den übrigen Meßergebnissen an Normal-Lymphozyten vergleichbare Kometen-Bildung.

Die für die übrigen Proben gemessenen DNA-SSBs zeigten, daß neben der Inzisions-Aktivität auch weitere (Restaurations-) Prozesse unterschiedlich verlaufen. Hier waren drei verschiedene Reparatur-Phänotypen zu beobachten (**Abb. 14**). Fand sich zur Zeit des Expositions-Stops bereits das Maximum an induzierten Schäden, so erfolgte die nachfolgende Reduzierung der DNA SSBs in der Regel zügig („mittlerer Phänotyp“) oder in einem Fall sehr langsam (NL 639; „langsamer Phänotyp“). Bei einem kleinen Teil der Normal-Probanden hatten die exponierten Zellen selbst nach 20-minütiger Expositionszeit das Maximum der Kometen-Bildung noch nicht erreicht. Hierzu wurden weitere 30-40 Minuten benötigt (NL 467 und NL 638). Dieser Reparatur-Typ wurde als „verzögerter Phänotyp“ bezeichnet. In **Tab. 2** sind die erfaßten Reparatur-Daten für Lymphozyten von neun Normal-Spendern exemplarisch zusammengestellt.

**Tab. 2: Klassifizierung der DNA-Reparaturkapazität normaler Lymphozyten, gemessen durch ICA und Comet Assay**

Proband	ICA $t_{50\%}$ [h]	ICA $t_{90\%}$ [h]	Initiale Comet- Bildung	Comet $t_{50\%}$ [min]	Comet $t_{90\%}$ [min]	Reparatur- Phänotyp im Comet Assay
NL 400	2.3	5.3	235 %	35	50	mittel
NL 459	2.9	6.2	148 %	40	230	mittel
NL 467	n.d.	n.d.	73 %	90	170	verzögert
NL479	1.5	3.9	242 %	15	32	mittel
NL557	0.7	1.8	52 %	12	~ 20	schnell
NL 638	2.8	12.6	69 %	110	160	verzögert
NL 639	5.3	8.0	160 %	240	>360	langsam
NL 731	n.d.	n.d.	135 %	25	50	mittel
NL 903	n.d.	n.d.	148 %	20	50	mittel

Die hier zusammengestellten Daten zeigen, daß die Elimination von Primär-Addukten sowie die Entstehung und das Verschwinden Reparatur-induzierter SSBs bei Lymphozyten verschiedener Spender mit signifikant unterschiedlichen Kinetiken ablaufen. Obwohl die untersuchte Stichprobe mit neun Spendern relativ klein ist, fällt auf, daß bei der ICA-Analyse und im „Comet Assay“ zur Messung der DNA-Reparaturkapazität individueller Zell-Proben in fast allen Fällen der gleiche "Reparatur-Phänotyp" beobachtet wurde. So zeigten die Lymphozyten der Proben NL 639, NL 400 und NL 557 in beiden Messverfahren jeweils sehr lange bzw. intermediäre oder sehr kurze Reparaturzeiten. Dies war zunächst unerwartet, da die Zelle zur Entfernung von O<sup>6</sup>-EtGua aus der DNA und für die SSB-Prozessierung unterschiedliche Komponenten des Reparatur-Systems verwendet (vgl. **Abb. 3**). Die Befunde deuten an, daß zumindest die Geschwindigkeits-bestimmenden Schritte im Reparatur-Netzwerk von Lymphozyten koordiniert exprimiert oder reguliert werden.

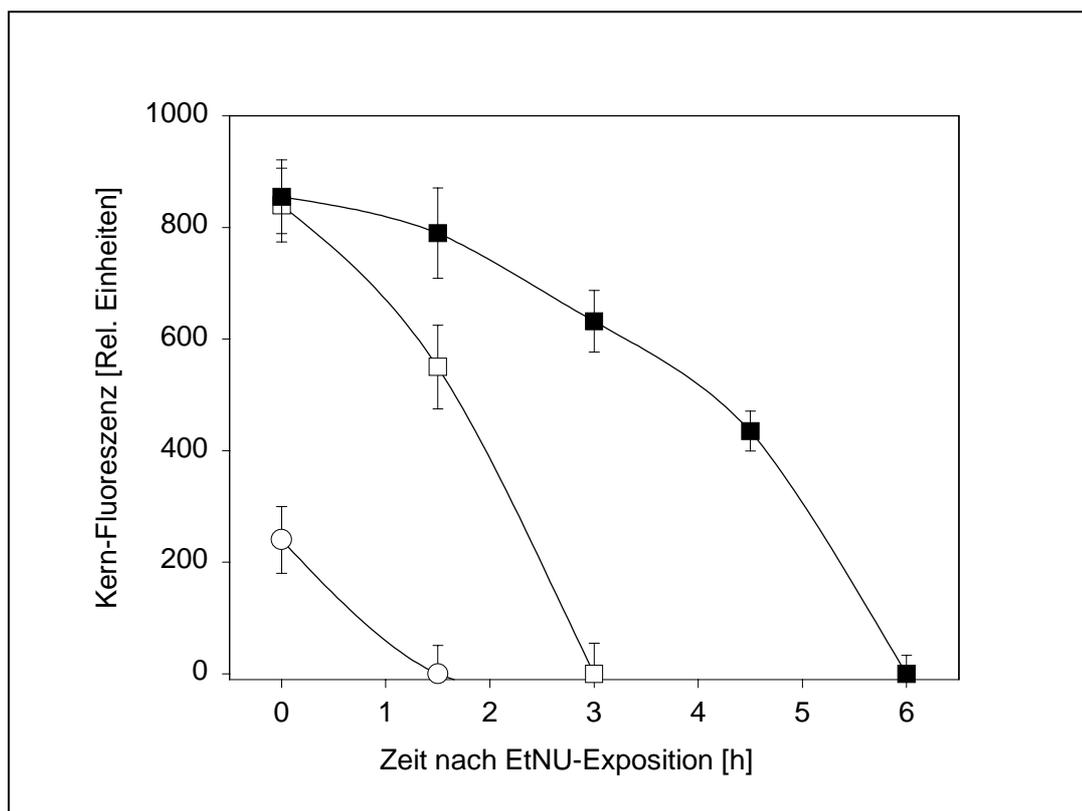
### **2.3.3 Zelluläre DNA-Reparaturfunktionen lassen sich durch kleine Moleküle modulieren**

Die beiden hier eingesetzten Meßmethoden zur Bestimmung der zellulären Reparaturkapazität, ICA und „Comet Assay“, treffen zwar die Kinetik der Schadensprozessierung in der Kern-DNA, geben aber keine Auskunft über die dabei benutzten Reparatur-Wege (vgl. **Abb. 3**). Gerade mit Blick auf die große individuelle Varianz bei humanen Lymphozyten wäre jedoch eine Zuordnung zu spezifischen Reparatur-Wegen bzw. -Mechanismen sehr wünschenswert. Die beste Möglichkeit hierzu besteht im Einsatz kleiner, zellgängiger Moleküle, die bestimmte Reparaturfunktionen blockieren.

#### **2.3.3.1 O<sup>6</sup>-Benzylguanin verlangsamt die O<sup>6</sup>-EtGua-Reparatur und verändert die Bildung von DNA-Strangbrüchen**

Die wichtige Rolle, die das MGMT-Protein bei der Reparatur von O<sup>6</sup>-Alkylguanin in der DNA spielt, ist vielfach belegt (Übersicht bei Pegg, 1990). Individuelle Unterschiede im zellulären Gehalt dieses Reparatur-Proteins wurden für eine ganze Reihe humaner Zell- und Gewebetypen mehrfach beschrieben (Kaina *et al.*, 1990; Gerson & Willson, 1995). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des spezifischen MGMT-Inhibitors O<sup>6</sup>-Benzylguanin (O<sup>6</sup>-Benzgua; Dolan *et al.*, 1990) gezeigt, daß die Blockierung dieses Ein-Schritt-Reparaturmechanismus bei normalen Lymphozyten nach EtNU-Exposition zu einer deutlich verlängerten Persistenz von O<sup>6</sup>-EtGua in der DNA führt (**Abb. 15**). Bei der Lymphozytenprobe NL 557, die eine sehr hohe Reparaturkapazität aufwies (vgl. **Tab. 2**),

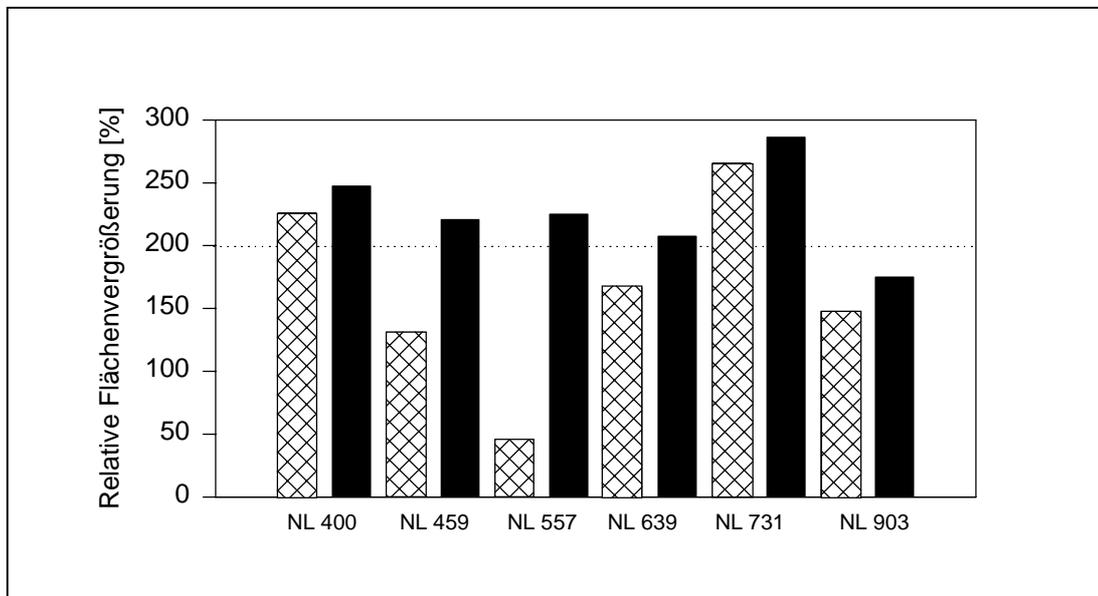
bewirkte eine Inkubation mit dem Inhibitor vor und während der EtNU-Exposition einen Anstieg des gemessenen "Initialwertes" ( $t_0$ ) für den  $[O^6\text{-EtGua}]$ -Gehalt der Kern-DNA um den Faktor 4. Ausserdem verlängerte sich die Halbwertszeit der Reparatur von 0,7 auf 2,3 Stunden. Hieraus kann geschlossen werden, daß die Messung einer auffällig niedrigen "initialen"  $[O^6\text{-EtGua}]$ -Konzentration in der DNA dieser Zellen (Abb. 15, zu sehen auch in Abb. 13) nicht auf einer verminderten Alkylierung der DNA, sondern auf einer sehr effizienten Reparatur dieses DNA-Addukts bereits während der Expositionsphase beruht. Durch kontinuierliche Anwesenheit des Inhibitors im Kultur-Medium während der gesamten Nachinkubation wurde die Halbwertszeit von  $O^6\text{-EtGua}$  in der DNA nochmals auf 5 Stunden verlängert (Abb. 15). Diese Beobachtung spricht dafür, daß die schnelle Reparatur-Kinetik dieser Zellen durch eine sehr hohe Syntheserate des MGMT-Proteins bedingt ist. Ferner zeigt dieses Experiment, daß bei ausgeschalteter MGMT-Aktivität die Entfernung des Addukts aus der DNA zwar deutlich verlangsamt ist, aber nicht vollständig inhibiert werden kann- ein Hinweis auf einen möglichen alternativen Reparaturweg für  $O^6\text{-EtGua}$ .



**Abb. 8: Einfluß von  $O^6$ -Benzylguanin auf die Reparatur von  $O^6$ -Ethylguanin**

Isolierte Lymphozyten eines normalen Spenders (NL 557) wurden mit EtNU (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) exponiert und zu verschiedenen Zeitpunkten danach im ICA analysiert (s. Abb. 12). Dem Kulturmedium der Zellen wurden entweder kein Inhibitor zugegeben (O), oder die Zugabe von  $O^6$ -Benzylguanin (25  $\mu\text{M}$ ) erfolgte für nur 1 Stunde vor der Ethylierung (□) oder zusätzlich auch für die gesamte Nachinkubation (■).

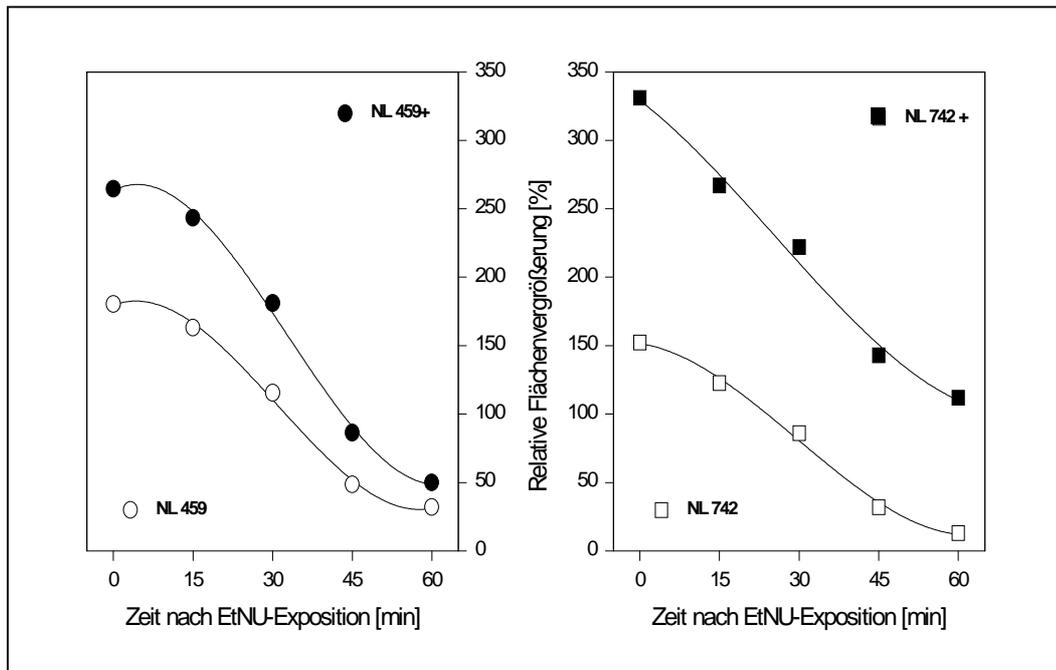
Parallel dazu wurde untersucht, welchen Einfluß eine MGMT-Blockade auf die Häufigkeit von DNA-Strangbrüchen nach EtNU-Exposition hat. Diese Messungen zeigten für alle untersuchten Zellproben, daß unmittelbar nach der Exposition in O<sup>6</sup>-Benzgua-vorbehandelten Zellen eine höhere Strangbruch-Häufigkeit auftrat, als in den Zellen des gleichen Spenders ohne MGMT-Inhibition (**Abb. 16**).



**Abb. 9:** Einfluß von O<sup>6</sup>-Benzylguanin auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen bei EtNU-exponierten Lymphozyten  
DNA-Strangbrüche wurden mit Hilfe des „Comet Assay“ bei isolierten Normal-Lymphozyten nach einer Exposition gegenüber EtNU (100 µg/ml; 20 min) bestimmt. Es handelte es sich dabei um unbehandelte (karierte Balken) oder um mit O<sup>6</sup>-Benzylguanin (25 µM; 1 h) vorinkubierte Proben (schwarze Balken).

Da die primäre DNA-Alkylierung durch den Inhibitor nicht beeinflusst wird, kann dieser Befund nur bedeuten, daß nach einem MGMT-Block persistierende [O<sup>6</sup>-EtGua]-Reste durch alternative (Exzisions-) Reparaturmechanismen prozessiert werden können. Der relative Anstieg der SSB-Raten war jedoch für individuelle Proben sehr unterschiedlich. Er lag bei den hier gemessenen Lymphozyten zwischen 10 % (NL 731) und 320 % (NL 557). Das Ausmaß der zusätzlichen DNA-Strangbruchbildung hängt dabei sehr wahrscheinlich sowohl von der zellulären MGMT-Konzentration (Gerson & Willson, 1995), als auch von der Aktivität alternativer Reparaturwege dieser Zellen ab.

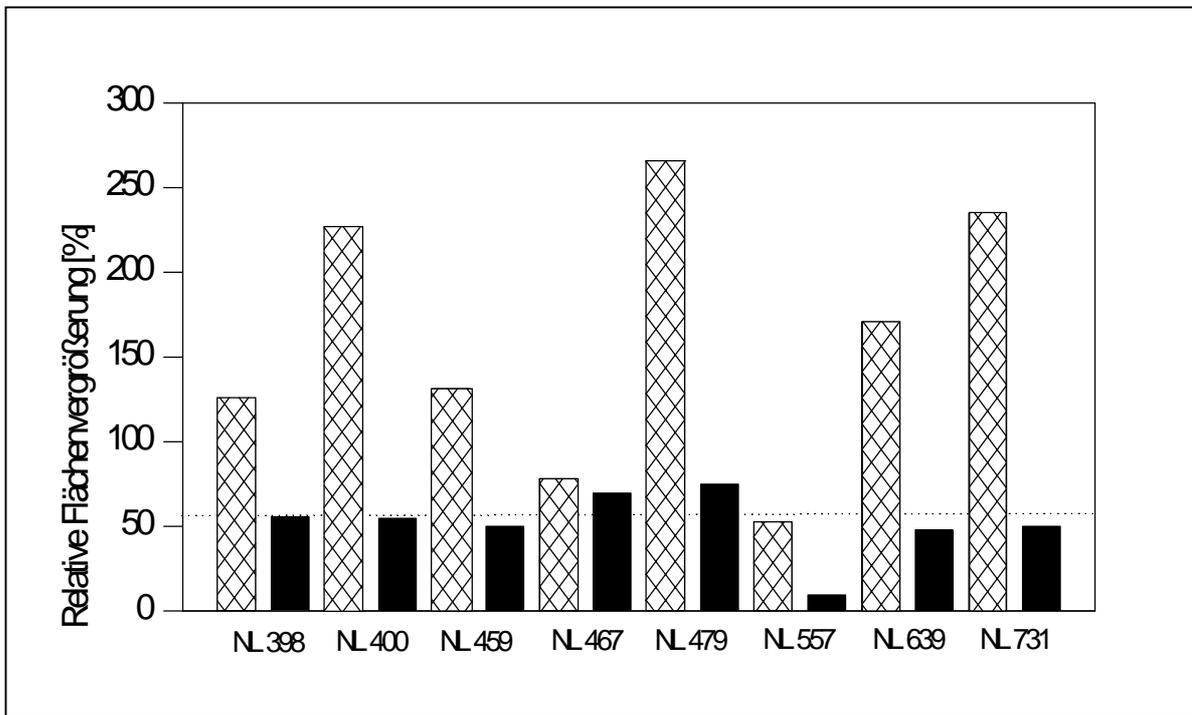
Verfolgt man die Reparatur-induzierten SSB über die Zeit nach der Ethylierung, so zeigen sich neben einer „initial“ erhöhten Rate auch eine unterschiedlich lange Persistenz dieser Läsionen (**Abb. 17**). Diese Beobachtung implizierte eine unterschiedliche Geschwindigkeit der alternativen Reparatur von O<sup>6</sup>-EtGua, hier reflektiert durch das Ausmaß und die Persistenz von DNA-Reparatur-Intermediaten.



**Abb. 10: Einfluß einer MGMT-Depletion auf die Induktion und Prozessierung von DNA-Strangbrüchen bei EtNU-exponierten Lymphozyten**  
 Isolierte Lymphozyten normaler Spender wurden mit EtNU (100 µg/ml; 20 min) inkubiert (○/□). Parallel wurden Zell-Proben der selben Spender vor, während und nach der EtNU-Exposition mit O<sup>6</sup>-Benzylguanin (25 µM) inkubiert (●/■). Die Kinetiken der DNA-Strangbruchprozessierung wurden mit Hilfe des „Comet Assay“ bestimmt (vgl. Abb. 14).

### 2.3.3.2 Methoxyamin reduziert die Bildung von DNA-Strangbrüchen

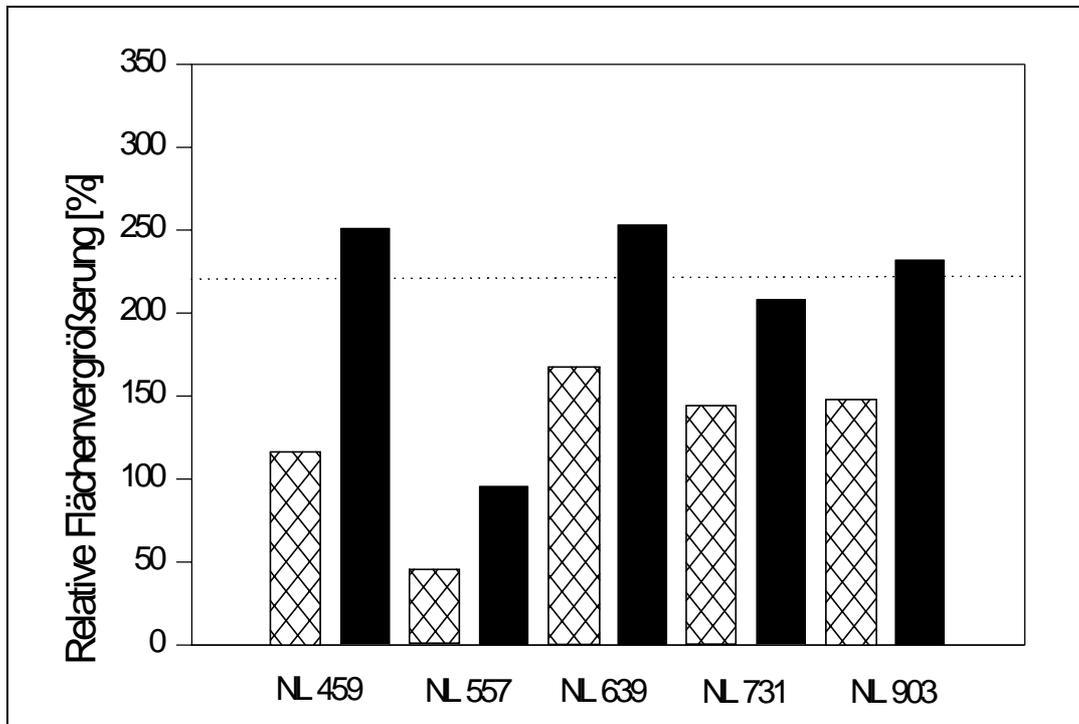
Die Beteiligung der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) an der Entfernung von Alkylierungs-Schäden aus der DNA wurde mit Hilfe von Methoxyamin (MX) untersucht. Nach dem Verlust einer modifizierten Base aus der DNA, beispielsweise durch Reparatur-Glykosylasen, bindet dieser Methylether (MW 47) an die entstandenen abasischen Stellen und verhindert so den nächsten Schritt entlang des BER-Weges, die Inzision des betroffenen DNA-Stranges durch eine AP-Endonuklease (vgl. **Abb. 3**). Bei der Analyse von Lymphozyten, die vor der EtNU-Behandlung mit MX inkubiert wurden, fand sich in allen untersuchten Fällen eine Reduktion der „initialen“ SSB-Rate (**Abb. 18**), jedoch zeigte das Ausmaß dieser Reduktion individuelle Unterschiede. Die nach MX-Vorinkubation verbleibende SSB-Rate war bei den meisten Proben der hier untersuchten Spender relativ einheitlich (Ausnahme NL 557). Dies deutet an, daß vor allem die Effizienz der Basenexzision bei normalen Lymphozyten große individuelle Unterschiede aufweist. Welche Ethylierungsprodukte über den BER-Weg aus Lymphozyten-DNA entfernt werden, läßt sich diesem Ansatz nicht entnehmen.



**Abb. 11: Einfluß von Methoxyamin auf die Strangbruchinduktion in der DNA normaler Lymphozyten**  
 Isolierte Lymphozyten normaler Spender wurden eine Stunde vor und während der EtNU-Exposition (100 µg/ml; 20 min) entweder ohne (karierte Balken) oder mit Methoxyamin (5 mM; schwarze Balken) im Kulturmedium inkubiert. Die induzierten Strangbrüche wurden nach der Exposition mit Hilfe des „Comet Assay“ gemessen.

### 2.3.3.3 Aphidicolin erhöht die Persistenz von Reparatur-Intermediaten nach EtNU-Exposition

Ein weiterer Inhibitor erlaubte die Untersuchung der Beteiligung von Nukleotid-Exzisions- (NER) und Mismatch-Reparatur (MMR) bei der Prozessierung von DNA-Ethyl-Addukten. Aphidicolin (APH), ein tetrazyklisches Diterpen (MW 368) inaktiviert die DNA-Polymerasen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ , die am Wiederauffüllen der DNA-Einzelstrang-Lücken nach dem Exzisions-Reparaturprozeß beteiligt sind (Übersicht bei Cleaver, 1990; vgl. **Abb. 3**). Für den Fall, daß DNA-Addukte nach Ethylierung durch NER und/oder MMR erkannt und prozessiert werden, war zu erwarten, daß nach APH-Behandlung der Zellen die SSB-Rate ansteigen würde. Dies wurde für Normal-Lymphozyten im Experiment bestätigt. Für alle Proben fand sich nach APH-Vorbehandlung eine Flächen-Zunahme im „Comet Assay“ gegenüber Zellen aus dem gleichen Isolat, die nur EtNU-exponiert waren (**Abb. 19**). Der Anteil der gemessenen SSB-Zunahme variierte um 50-100%, was auf eine individuell unterschiedliche Beteiligung DNA-Polymerasen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ -abhängiger Reparatur-Wegen hindeutet. Auch diese Experimente lassen zunächst unklar, welche der DNA-Ethyl-Addukte über NER oder MMR prozessiert werden.

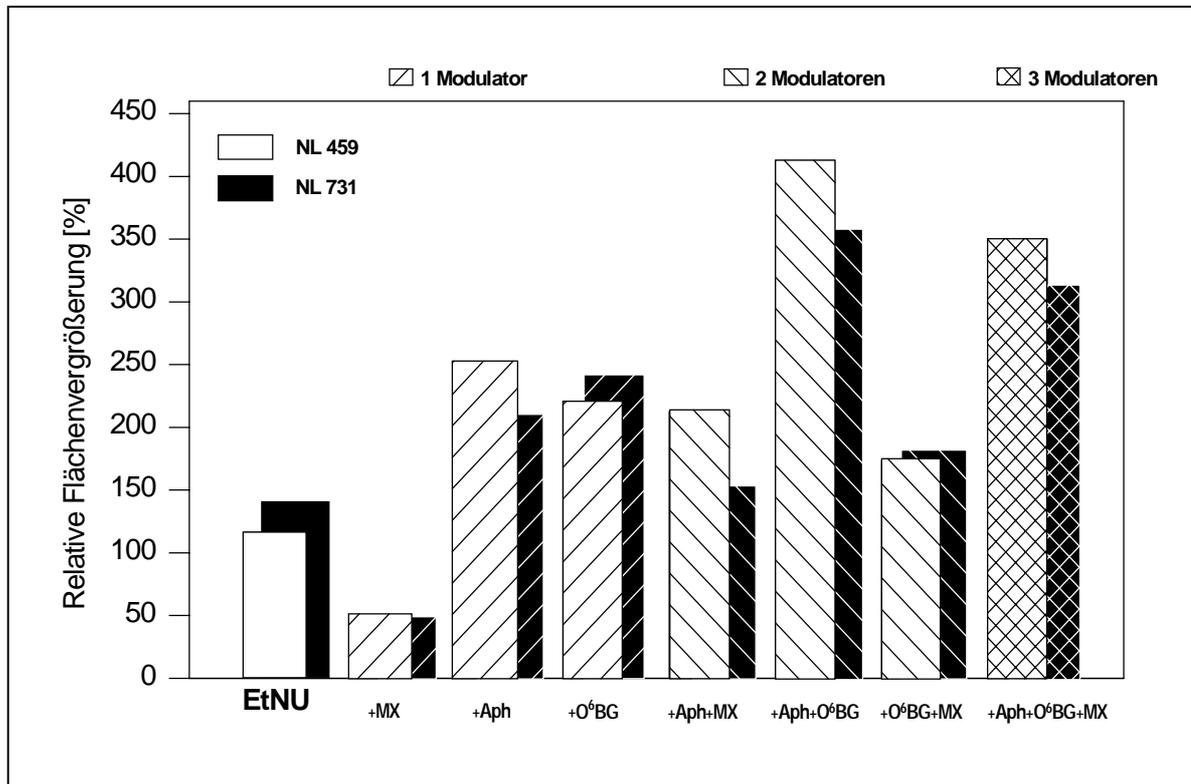


**Abb. 12: Einfluß von Aphidicolin auf die DNA-Strangbruchinduktion in normalen Lymphozyten**

Lymphozyten normaler Spender wurden eine Stunde vor und während der EtNU-Exposition (100 µg/ml; 20 min) entweder ohne (weiße Balken) oder mit Aphidicolin (1 mM; schwarze Balken) im Kulturmedium inkubiert. Die Rate der induzierten DNA-Strangbrüche wurde mit Hilfe des „Comet Assay“ bestimmt. Lymphozyten normaler Spender wurden eine Stunde vor und während der EtNU-Exposition (100 µg/ml; 20 min) entweder ohne (karierte Balken) oder mit Aphidicolin (1 mM; schwarze Balken) im Kulturmedium inkubiert. Die Rate der induzierten DNA-Strangbrüche wurde mit Hilfe des „Comet Assay“ bestimmt.

#### 2.3.3.4 Die Kombination verschiedener DNA-Reparatur-Modulatoren erbringt zusätzliche Informationen über beteiligte DNA-Reparaturwege

Bisher wurde gezeigt, daß die eingesetzten Inhibitoren den zeitlichen Ablauf der DNA-Reparatur bei Lymphozyten modulieren. Außerdem ermöglichten die beschriebenen Experimente Rückschlüsse auf die Aktivität spezifischer Reparatur-Wege. Die Kombination der verwendeten Inhibitoren ergab in allen Fällen additive Effekte (Abb. 20). Dies bestätigt die für die einzelnen Substanzen allein gemessene Wirkung. Ein verstärkender Effekt auf die Strangbruchrate wurde bei Applikation von O<sup>6</sup>-Benzgua und APH beobachtet, die Kombination der einzelnen Substanzen mit MX führte jeweils zu einer Reduktion der „initialen“ Kometen-Bildung. Aus der Beobachtung, daß nach Gabe von MX (blockierte Basenexzision) und O<sup>6</sup>-Benzgua die induzierten Strangbruchraten stets deutlich höher lagen als nach MX allein, ergibt sich, daß O<sup>6</sup>-EtGua bei Lymphozyten nicht (bzw. nur zu einen kleinen Teil) über den BER-Weg aus der DNA entfernt wird.



**Abb. 13: Modulation der DNA-Strangbruchraten EtNU-exponierter Lymphozyten durch verschiedene DNA-Reparatur-Inhibitoren**  
 Isolierte Lymphozyten von zwei normalen Spendern (NL 459 & NL 731) wurden für eine Stunde vor und während der EtNU-Exposition (100 µg/ml; 20 min) ohne oder mit verschiedenen Kombinationen von Aphidicolin (1 mM), O<sup>6</sup>-Benzylguanin (25 µM) und Methoxyamin (5 mM) inkubiert. Die Rate der induzierten DNA-Strangbrüche wurde nach der Exposition mit Hilfe des „Comet Assay“ bestimmt.

### 2.3.4 Induktion und Prozessierung von DNA-Strangbrüchen bei Lymphozyten nach Exposition gegenüber verschiedenen mono- und bifunktionellen Alkylantien

Bei der Etablierung des „Comet Assay“ zur funktionellen Messung von DNA-Reparaturprozessen diente aus den oben angegebenen Gründen EtNU als Standard-Alkylans (s. 2.1.). Im Gegensatz zu dieser *N*-Nitrosoharnstoff-Verbindung ist das Spektrum der induzierten DNA-Addukte für die meisten der in der Tumorthherapie eingesetzten Alkylantien noch nicht genau bekannt. Deshalb sind hier Rückschlüsse auf die beteiligten Reparatur-Prozesse erheblich schwieriger. Einige dieser Substanzen benötigen zudem eine (Zelltyp-spezifische) metabolische Aktivierung zu ihrer eigentlichen Wirkform und zeigen deshalb oft eine deutlich längere biologische Halbwertszeit (Haskell, 1990). Dadurch wird eine zeitliche Trennung von DNA-Schädigung und einsetzender Addukt-Prozessierung im Zellkern stark erschwert, wenn nicht sogar unmöglich.

Um zu prüfen, ob mit Hilfe des „Comet Assay“ trotzdem Informationen über diese Prozesse bei peripheren Lymphozyten gewonnen werden können, wurden vier unterschiedlich wirkende Alkylantien eingesetzt. Dies waren zum einen die

monofunktionellen methylierenden Verbindungen *N*-Methyl-*N*-Nitrosoharnstoff (MeNU) und Dacarbazin (DTIC; vgl. **Abb. 2A**) sowie zwei bifunktionelle Alkylantien, der Bis(chloroethyl)nitrosoharnstoff Carmustin (BCNU) und das *N*-Lost-Derivat Chlorambucil (CLB; vgl. **Abb. 2B**). Ähnlich wie EtNU zerfällt MeNU in der Zelle spontan, DTIC hingegen erst nach metabolischer Aktivierung, in reaktive Methylcarbenium-Ionen. Beide Substanzen induzieren, wenn auch unterschiedlich schnell, ähnliche Addukt-Spektren in der DNA (Zeller, 1995). DTIC wird vorwiegend zur Therapie des malignen Melanoms und in der Kombinations-Therapie von malignen Lymphomen, Sarkomen und Neuroblastomen eingesetzt (Übersicht bei Zeller, 1995).

BCNU hydrolysiert zu reaktiven Chloroethyl-Resten, die über verschiedene, überwiegend nicht charakterisierte Primäraddukte und intramolekulare Umlagerungen teilweise zu DNA-Inter- und Intra-Strangverknüpfungen führen. Einer dieser Reaktionswege führt über eine schnelle Chloroethylierung am O<sup>6</sup>-Atom des Guanins und eine langsame interne Ringbildung nach Stunden zu einer kovalenten G-C Verknüpfung zwischen beiden Strängen (Pegg & Byers 1992; Chen *et al.*, 1993). Für die Analyse mit Hilfe des „Comet Assay“ ergibt sich daraus die Schwierigkeit, daß in der Kern-DNA neben Mono-Addukten und Reparaturlücken (erhöhte Mobilität), eine zeitabhängig variable Menge von Mobilitäts-hemmenden Strangverknüpfungen entsteht, die ihrerseits wieder Angriffspunkte für Reparaturprozesse sein können. BCNU wird insbesondere zur Therapie von Hirn-Tumoren, aber auch von Melanomen, Myelo-Dysplasien und Kolon-Karzinomen eingesetzt (Übersicht bei Zeller, 1995; Haskell, 1990).

Für den klassischen "Crosslinker" CLB, einem der Standard-Medikamente bei der CLL-Behandlung, gilt prinzipiell das gleiche. Hier werden neben Reaktionen mit dem N<sup>7</sup>-Atom des Guanins vorwiegend Adenin-Addukte gebildet, die sekundär zur Verknüpfung beider DNA-Stränge über G-A- oder A-A-Brücken führen können (Hartley, 1993).

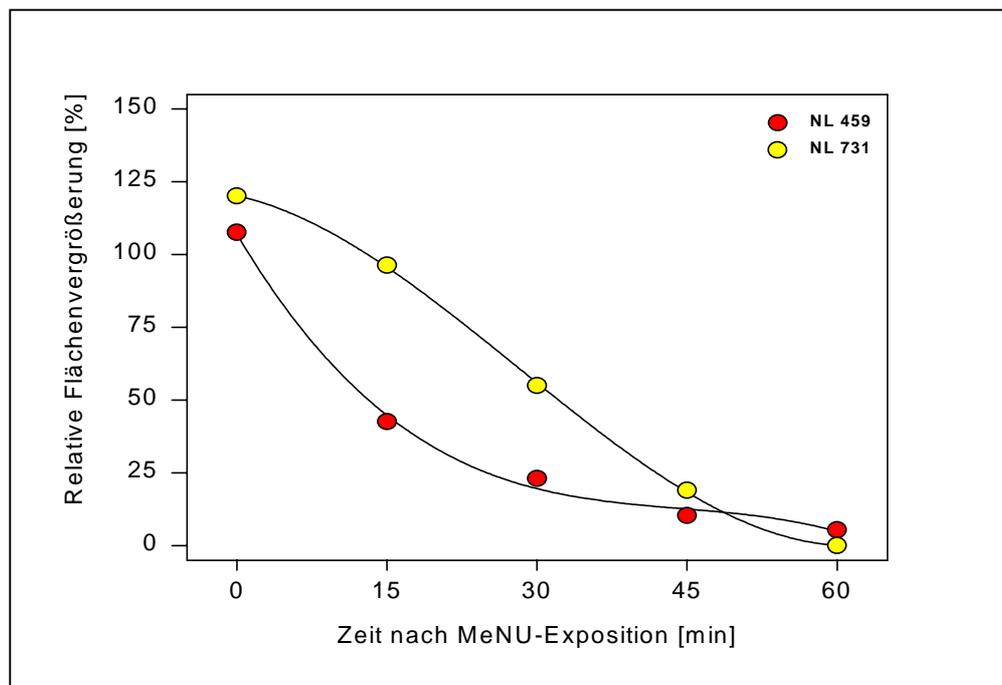
CLB führte in keiner der eingesetzten Konzentrationen (1 µM bis 100 mM) und zu keiner gemessenen Expositions- und Postexpositionszeiten (bis zu jeweils 24 Stunden) zu im „Comet Assay“ meßbaren DNA-Strangbrüchen. Diese Beobachtung bedeutet nicht, daß DNA-Strangbrüche nicht gebildet würden. Sie könnte jedoch ein Hinweis auf sehr schnell einsetzende Strangverknüpfungen sein, die zu einer Mobilitäts-Hemmung der DNA im elektrischen Feld führen.

Nach DTIC-Exposition waren DNA-Strangbrüche nur nachweisbar, wenn die Zellen für mindestens 12 Stunden mit der Substanz inkubiert wurden. Dies zeigt, daß

Lymphozyten zwar über die notwendige Enzym-Ausstattung zur metabolischen Aktivierung von DTIC verfügen, diese jedoch relativ langsam verläuft.

#### 2.3.4.1 MeNU zeigt hinsichtlich der DNA-Strangbruchprozessierung ähnliche Effekte wie EtNU

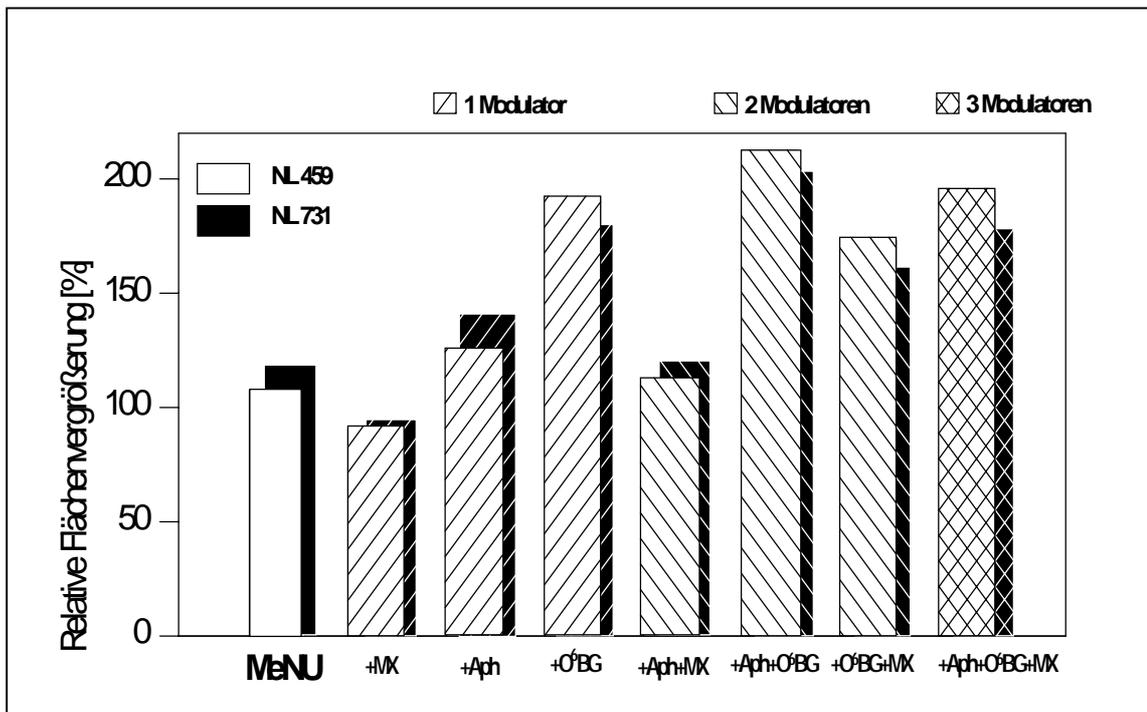
MeNU führt zu einem sehr ähnlichen Adduktpektrum an den Sauerstoff- und Stickstoff-Atomen der DNA wie sein Ethyl-Homolog EtNU, die relativen Anteile der einzelnen DNA-Addukte sind jedoch unterschiedlich (Beranek 1990). Am auffälligsten ist dabei die starke Verschiebung von den Alkyl-Phosphotriestern zu den *N*-Methylpurinen *N*3-Adenin und *N*7-Guanin, die zusammen mehr als 75% der MeNU-induzierten DNA-Läsionen ausmachen. Lymphozyten zeigten nach einer MeNU-Exposition ebenfalls eine Reparatur-bedingte Induktion von DNA-Strangbrüchen, deren Kinetik bei individuellen Proben unterschiedlich verlief (Abb. 21).



**Abb. 14: Kinetik der DNA-Strangbruchprozessierung normaler Lymphozyten nach MeNU-Exposition**

Isolierte Lymphozyten normaler Spender (NL 459 & NL 731) wurden mit MeNU (35 µg/ml, 20 min) inkubiert, nach Waschschritten mit kalter PBS in Vollmedium resuspendiert und bei 37°C weiter inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zell-Aliquots entnommen und mit Hilfe des „Comet Assay“ auf DNA-Strangbrüche untersucht. (vgl. Abb. 10). Gezeigt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Messungen. Die Reparaturkinetiken wurden über 2 Stunden gemessen.

Mit Hilfe der DNA-Reparaturmodulatoren MX, O<sup>6</sup>-Benzgua und APH wurde die Beteiligung verschiedener Reparaturwege an der Prozessierung der DNA-Methyl-Addukte überprüft (Abb. 22).



**Abb. 15: Einfluß verschiedener Modulatoren auf die DNA-Reparatur normaler Lymphozyten nach MeNU-Exposition**  
 Isolierte Lymphozyten normaler Spender (NL 459 & NL 731) wurden nur mit MeNU exponiert (35 µg/ml; 20 min) oder zusätzlich für 1 h vor und während der Exposition mit Aphidicolin (1 mM), O<sup>6</sup>-Benzylguanin (25 µM), Methoxyamin (5 mM) oder Kombinationen dieser Verbindungen inkubiert. Die Messung der DNA-Strangbruchrate nach der Exposition erfolgte mit Hilfe des „Comet Assay“.

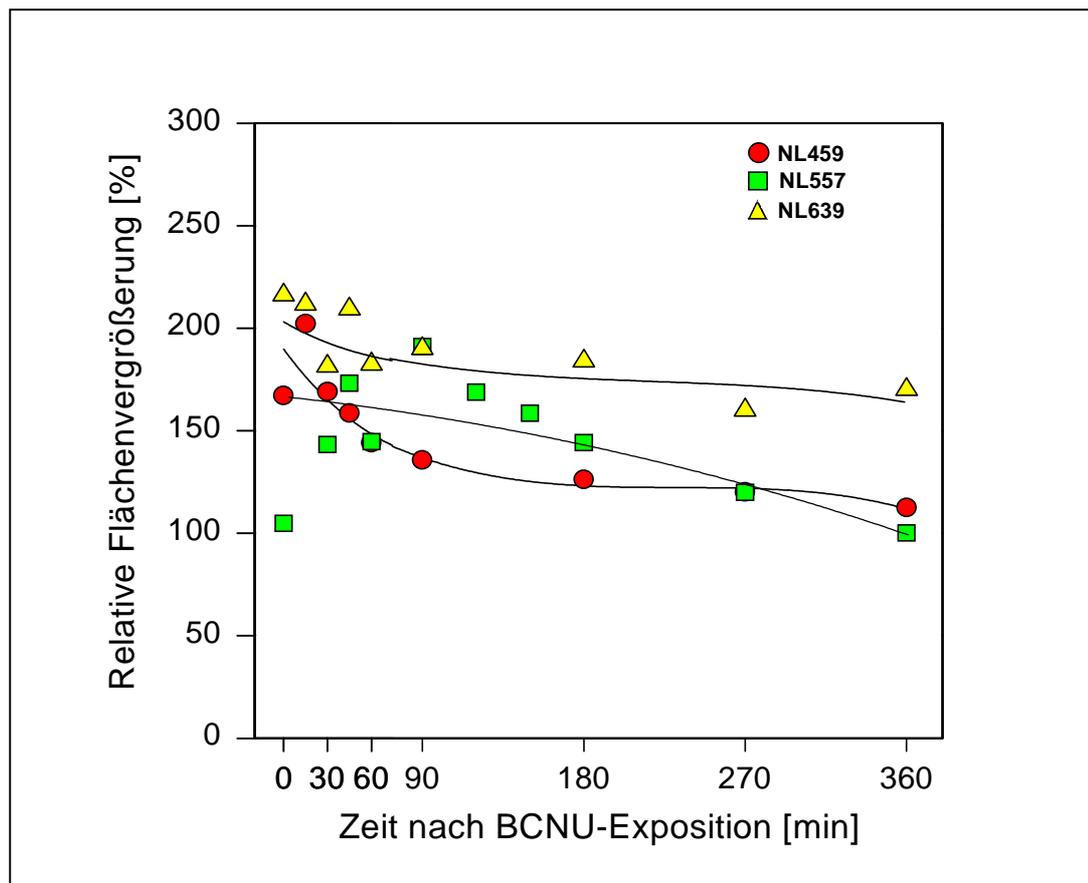
Auffällig ist dabei der relativ kleine Beitrag des BER-Weges (geringe Reduktion der DNA-Strangbruchrate durch MX) bei diesen Zellen, obwohl der relative Anteil der potentiellen BER-Substrate (*N*-Alkylpurine) dreifach höher liegt, als nach EtNU-Exposition (75% versus 25%). Ein weiterer wichtiger Befund ist die deutliche Zunahme von DNA-Strangbrüchen nach MGMT-Inaktivierung durch O<sup>6</sup>-Benzgua. Dies bedeutet, daß auch [O<sup>6</sup>-MeG-C]-Basenpaare in der DNA über Exzisions-Reparaturmechanismen prozessiert werden können, und daß dabei der BER-Weg nicht beteiligt ist.

### 2.3.3.2 BCNU induziert bei Lymphozyten lang persistierende DNA-Strangbrüche

Carmustin (BCNU) wird wegen seiner günstigen Pharmakokinetik insbesondere bei Hirn-Tumoren, aber auch bei Melanomen, multiplen Myelom, Morbus Hodgkin und Kolon-Karzinomen therapeutisch eingesetzt (Haskell 1990).

Da BCNU unter physiologischen Bedingungen deutlich langsamer in seine reaktiven Derivate zerfällt als EtNU und MeNU wurde für diese Substanz zunächst geprüft, nach welchen Expositionszeiten mit Hilfe des „Comet Assay“ meßbare Strangbruchraten feststellbar waren. Dabei war bereits nach einer einstündigen

Exposition eine deutliche Mobilitätszunahme der Lymphozyten-DNA festzustellen. Die DNA-Strangbruchinduktion und -prozessierung nach BCNU wurde daraufhin an individuellen Proben normaler Spender analysiert (Abb. 23). Die einzelnen Zell-Proben wiesen „initial“ (nach 60 Minuten Exposition) unterschiedliche Strangbruchfrequenzen auf. Besonders auffällig war bei den Reparatur-Kinetiken jedoch die sehr lange Persistenz der Reparatur-Intermediate. Auch noch 6 Stunden nach der BCNU-Exposition hatte die Anzahl der DNA-Strangbrüche nur geringfügig abgenommen.

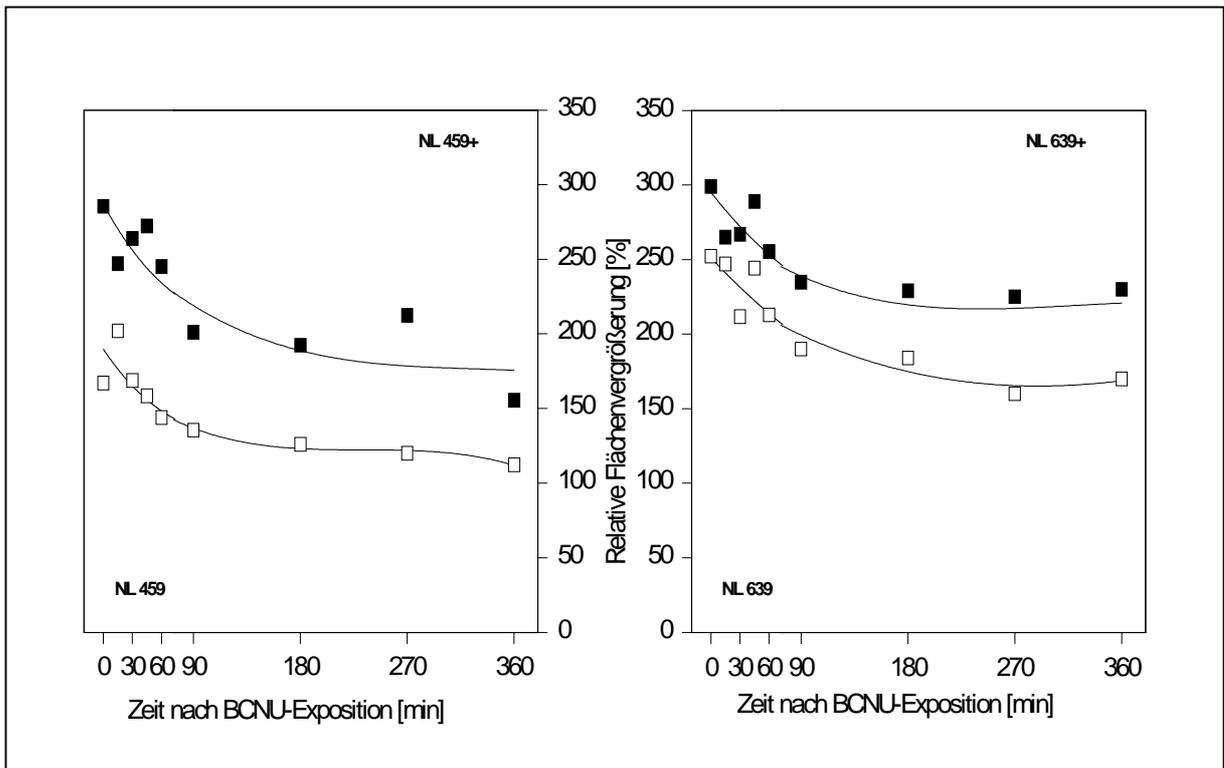


**Abb. 16: Kinetik der DNA-Strangbruchprozessierung bei normalen Lymphozyten nach BCNU-Exposition**

Isolierte Lymphozyten normaler Spender wurden mit BCNU (1 µg/ml; 1 h) exponiert, nach Waschschrinen mit kalter PBS in Vollmedium resuspendiert und bei 37°C weiter inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zell-Aliquots entnommen und mit Hilfe des „Comet Assay“ auf DNA-Strangbrüche untersucht. Gezeigt sind die Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Diese Beobachtung kann sowohl mit einer anhaltenden Neubildung von Primär-Addukten in Zusammenhang stehen (aus dem zellulären Reservoir auch nach Entzug des Alkylans aus dem Kulturmedium), aber auch damit, daß erst sekundär entstehende Produkte (z. B. das Guanin-Ethano-Addukt, vgl. Abb. 2B) zu Reparaturschnitten führen. Außerdem kann ein vergleichsweise langsamer Ablauf späterer Reparaturschritte, wie der Auffüll-Synthese und Ligation, zu einer langen Strangbruchpersistenz beitragen.

Bei zwei der in **Abb. 23** gezeigten Proben wurde zusätzlich der Einfluß des DNA-Reparaturmodulators O<sup>6</sup>-Benzgua auf die Strangbruchprozessierung untersucht. Angenommen wurde bisher, daß nicht durch MGMT reparierte persistierende Chloroethyl-Reste am O<sup>6</sup>-Atom des Guanins nach Umlagerung zu G-C-Strangverknüpfungen führen und so die zytostatische / zytotoxische Wirkung von BCNU vermitteln können (Chen *et al.*, 1993; Dolan, 1996). Das überraschende Ergebnis der vorliegenden Experimente war, daß nach Inhibition der MGMT nicht die Strangverknüpfungen, sondern die Rate der DNA-Strangbrüche deutlich zunahm und diese auch sehr viel länger persistierten als bei nicht mit O<sup>6</sup>-Benzgua behandelten Zellen (**Abb. 24**). Dieser Befund legt eine Exzisions-Reparatur des primären O<sup>6</sup>-Adduktes oder eines der nachfolgenden Umlagerungsprodukte nahe. Unter diesem Aspekt erscheint es notwendig, das toxische Prinzip der Chloroethyl-Zytostatika neu zu überdenken.



**Abb. 17: Einfluß von O<sup>6</sup>-Benzylguanin auf die Induktion und Prozessierung von DNA-Strangbrüchen bei BCNU-exponierten Lymphozyten**

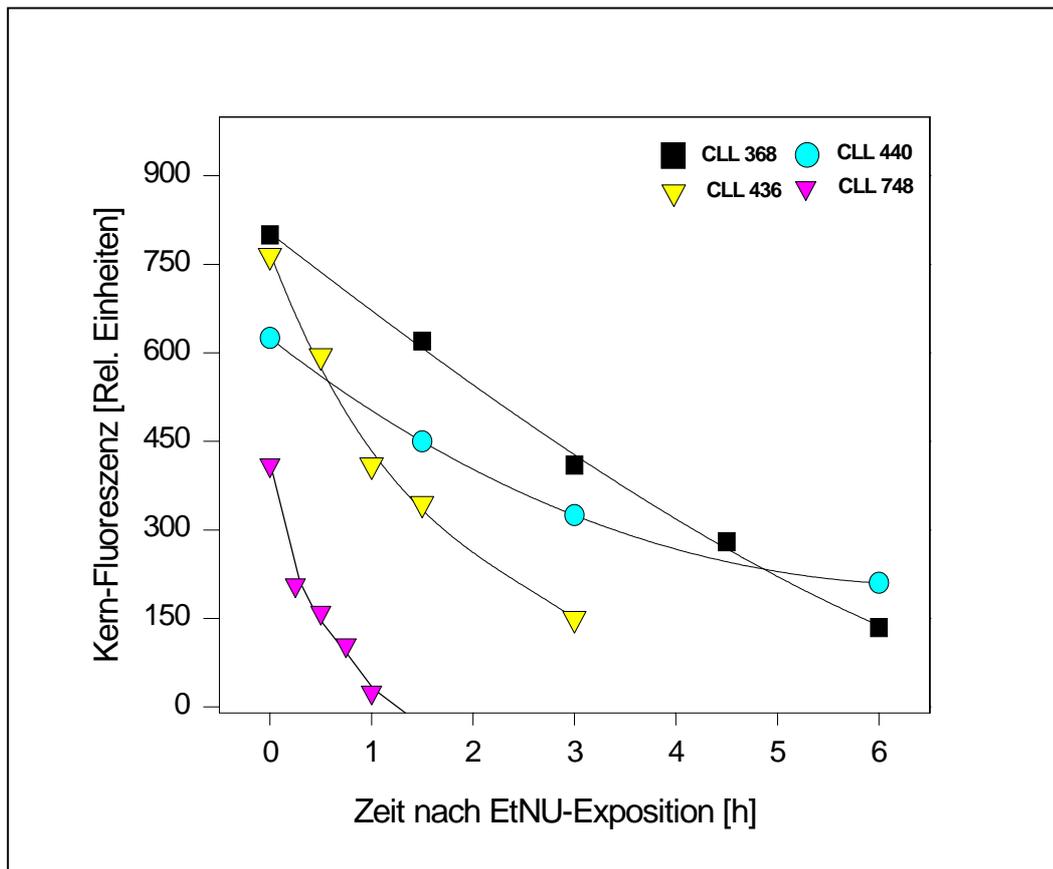
Isolierte Lymphozyten zweier normaler Spender (NL 459 & NL 639) wurden nur mit BCNU (1 µg/ml; 1 h; weiße Symbole) oder zusätzlich für 1 h vor der BCNU Exposition und während des gesamten Untersuchungszeitraums mit O<sup>6</sup>-Benzylguanin (25 µM; schwarze Symbole) inkubiert. Die induzierte DNA-Strangbruchrate wurde mit Hilfe des „Comet Assay“ bestimmt.

## 2.4 DNA-Reparatur bei CLL-Lymphozyten

Bisher wurde gezeigt, daß DNA-Alkylierungsschäden und deren Prozessierung im Kern primärer humaner Zellen mit den hier eingesetzten Methoden gut analysierbar sind. Bei normalen Lymphozyten führte eine DNA-Schädigung durch verschiedene Alkylantien zur Einleitung von DNA-Reparaturprozessen über verschiedene Wege. Bei gleichem Schädigungsgrad sind dabei die Gesamt-Aktivität, der zeitliche Verlauf und der relative Anteil einzelner DNA-Reparaturwege individuell unterschiedlich ausgeprägt. Ziel dieser Arbeit war es, die Beteiligung von Reparatur-Prozessen an der Chemoresistenz menschlicher Tumorzellen zu prüfen. Dazu wurden im zweiten Teil Lymphozyten von Patienten mit CLL *in vitro* mit EtNU exponiert und ihre DNA-Reparaturkapazität bestimmt.

### 2.4.1 Auch menschliche CLL-Lymphozyten weisen individuell unterschiedliche Reparaturkapazitäten auf

Die Kinetiken der Entfernung von O<sup>6</sup>-EtGua aus der DNA EtNU-exponierter CLL-Lymphozyten wurden analog zu den ICA-Analysen an normalen Lymphozyten gemessen. Dabei wurde gezeigt, daß sich das Ausmaß der „initialen“ Bildung von O<sup>6</sup>-EtGua in der DNA dieser Zellen bei individuellen Proben nicht unterscheidet. Allerdings war es zur genauen Bestimmung der initialen Addukt-Bildung bei einigen Zellproben notwendig, die MGMT-Reparatur während der Expositionszeit durch O<sup>6</sup>-Benzylguanin zu unterdrücken (vgl. **Abb. 15**). Der zeitliche Verlauf der Elimination von O<sup>6</sup>-EtGua aus der DNA wies bei den malignen Zellen der CLL-Patienten ebenfalls große individuelle Unterschiede auf, die Reparatur-Halbwertszeiten lagen bei den aufgeführten Proben zwischen 0,5 und 4,5 Stunden (**Abb. 25**), und damit im Bereich der Normal-Lymphozyten.

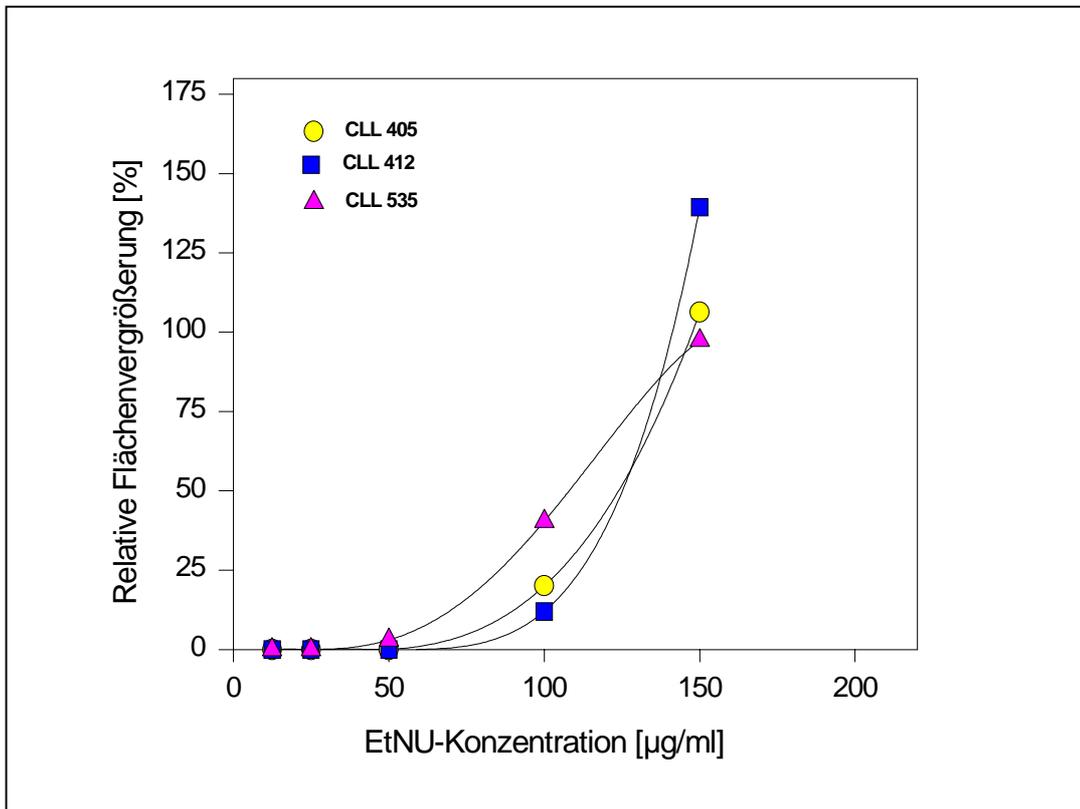


**Abb. 18: Elimination von O<sup>6</sup>-Ethylguanin aus der DNA EtNU-exponierter CLL-Lymphozyten**

Isolierte Lymphozyten von vier zur Zeit der Experimente nicht therapierten CLL-Patienten wurden *in vitro* mit EtNU (100 µg/ml; 20 min) inkubiert und in Vollmedium bei 37°C weiter kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zell-Aliquots entnommen und mit Hilfe des ICA der Gehalt von O<sup>6</sup>-Ethylguanin in der DNA bestimmt (analog zu Abb. 13). Die Fehlerbalken stellen die inter-experimentelle Variation aus drei unabhängigen Messungen dar..

#### 2.4.2 Die Bildung von DNA-Strangbrüchen nach EtNU-Exposition verläuft bei CLL-Lymphozyten anders als bei Lymphozyten gesunder Spender

Die Analyse von DNA-Strangbrüchen nach EtNU-Exposition von CLL-Lymphozyten ergab eine gegenüber den Normal-Lymphozyten unterschiedliche Rate der Bildung von DNA-Reparatur-Intermediaten. Zwar war nach der Exposition ebenfalls eine individuelle Varianz in der „initialen“ Bildung von DNA-Strangbrüchen zu beobachten. Im Gegensatz zu Normal-Lymphozyten (vgl. Abb. 11) war bei den CLL-Zellen der meisten Proben jedoch erst im Bereich von >100 µg EtNU/ml eine mit Hilfe des „Comet Assay“ meßbare Induktion von Einzelstrangbrüchen nachzuweisen (Abb. 26). Ein geringerer „steady state“-Spiegel von DNA-Strangbrüchen bei den CLL-Zellen kann eine veränderte Inzisionsaktivität, aber auch beschleunigte "spätere" Schritte in den DNA-Reparaturwegen widerspiegeln. Bereits im Plasmid-Relaxations-Assay hatten Extrakte aus normalen und CLL-Lymphozyten deutlich unterschiedliche Inzisions-Kinetiken für ethylierte DNA gezeigt (vgl. Abb. 6).

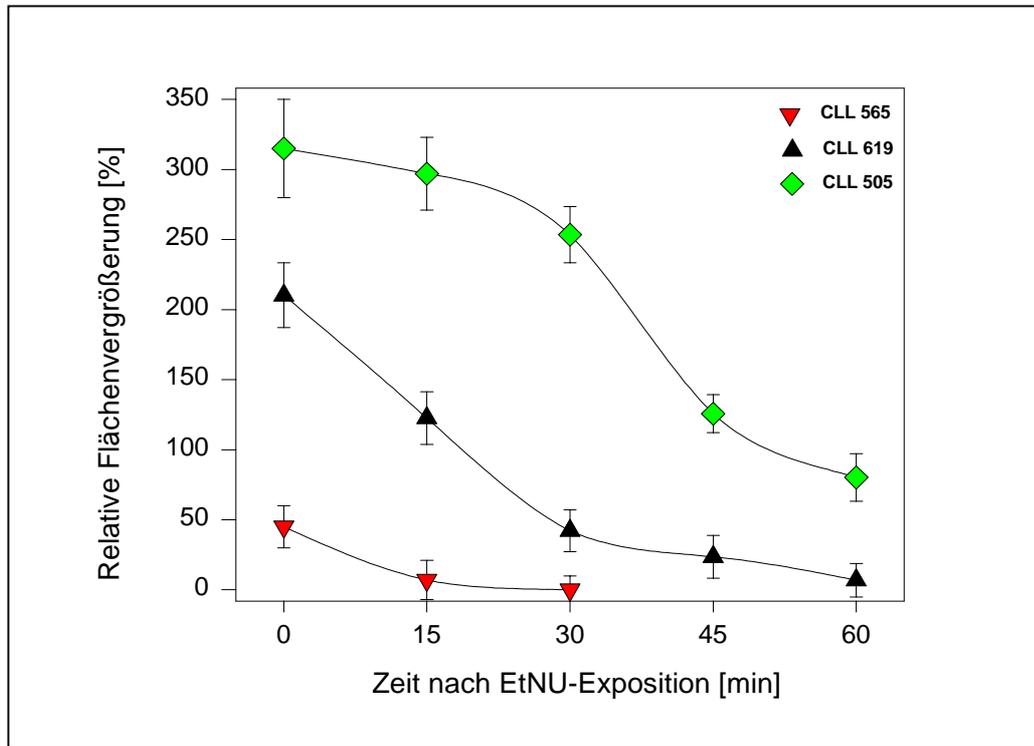


**Abb. 19: Konzentrationsabhängige „Kometen“-Bildung nach EtNU-Exposition individueller CLL-Lymphozyten**  
 Isolierte CLL-Lymphozyten von Patienten (n=6) wurden mit EtNU in verschiedenen Konzentrationen inkubiert (20 min; 37°C) und danach mit Hilfe des „Comet Assay“ analysiert (vgl. Abb. 11). Die Kometen-Größe ist angegeben als relative Flächenvergrößerung (%) gegenüber den unbehandelten Kontrollen (Mittelwerte aus 150 ausgewerteten Zellen).

### 2.4.3 DNA-Strangbrüche werden von CLL-Lymphozyten schneller prozessiert

Die Prozessierung sekundärer DNA-Schäden bei CLL-Lymphozyten wurde ebenfalls mit Hilfe des „Comet Assay“ analysiert. Wegen der geringen Kometen-Größe bei der Standard-Alkylierung mit 100 µg EtNU/ml, wurden die Zellen bei diesen Experimenten mit 150 µg EtNU/ml inkubiert. Insgesamt wurden 34 Proben von CLL-Patienten untersucht. Die Kinetiken der Strangbruchprozessierung lassen auch bei CLL-Lymphozyten ein breites Spektrum zellulärer Reparaturkapazitäten erkennen (Abb. 27 und Tab. 3). Die „initialen“ Kometen-Größen zeigten für individuelle Proben Flächenzunahmen zwischen 40% und 376%. Die Halbwertszeiten für die Wiederherstellung intakter DNA-Strukturen waren für CLL-Lymphozyten einheitlich kurz; sie lagen zwischen 9 und 65 Minuten.

Trotz der Unterschiede zur DNA-Strangbruchprozessierung normaler Lymphozyten wurde auch bei CLL-Lymphozyten das Auftreten verschiedener „Reparatur-Phänotypen“ beobachtet. In Abb. 27 sind exemplarisch CLL-Proben der drei Grundtypen dargestellt (vgl. auch Tab. 3).



**Abb. 20: DNA-Strangbruchprozessierung in CLL-Lymphozyten**

CLL-Lymphozyten unterschiedlicher Spender wurden 20 Minuten lang mit EtNU (150 µg/ml) inkubiert, nach Waschschriffen mit kalter PBS in Vollmedium resuspendiert und bei 37°C weiter inkubiert. Parallel hierzu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zell-Aliquots entnommen und mit Hilfe des „Comet Assay“ auf DNA-Strangbrüche untersucht (vgl. Abb. 15).

Die Mehrzahl der Proben zeigte nach EtNU-Exposition für die "initiale" Komet-Bildung eine relative Flächen-Vergrößerung zwischen 50 % und 150 % und eine rasche Abnahme der DNA-Strangbruchrate innerhalb der ersten 30 Minuten (z. B. CLL 619 in **Abb. 27**).

Bei einigen Zell-Proben (n=5; z.B. CLL 565) wurden nur sehr kleine „initiale“ Kometen und eine sehr schnelle Prozessierung der DNA-Reparatur-Intermediate innerhalb von 15 bis 30 Minuten beobachtet.

Ein dritter Phänotyp (n = 6) wird repräsentiert durch die Probe CLL 505. Die Zellen dieser Gruppe wiesen unmittelbar nach EtNU-Exposition hohe DNA-Strangbruchraten auf (relative Flächen-Vergrößerungen >200%), die innerhalb der ersten 30 Minuten nur geringfügig abnahmen.

Bei knapp einem Drittel der Patienten wurden im Abstand von mehreren Monaten Wiederholungs-Messungen durchgeführt. Sie belegen, wie schon bei den Normal-Lymphozyten, eine gute Reproduzierbarkeit der individuellen Reparatur-Phänotypen. In zwei Fällen wurden bei der jeweils letzten genommenen Probe deutlich schnellere Kinetiken gemessen (CLL 425 und CLL 505).

Ergebnisse aus parallel durchgeführten ICA-Untersuchungen lassen auch für CLL-Lymphozyten den Schluß zu, daß die Reparaturkapazität individueller Zellproben für verschiedene DNA-Reparaturprozesse (O<sup>6</sup>-EtGua-Elimination, Exzisions-Reparatur) tendenziell gleich ist. Der Reparaturphänotyp wird demnach nicht durch die Expression/Aktivität einer "Schlüsselkomponente" bestimmt.

#### 2.4.4 DNA-Reparaturkapazität von CLL-Lymphozyten

CLL-Lymphozyten-Proben wurden aus logistischen Gründen fortlaufend nummeriert. Die mit (\*) versehenen Proben wurden in zeitlichem Abstand von jeweils 6 bis 12 Monaten ein weiteres Mal ( $n \leq 5$ ) untersucht. Da es sich um Blindstudien handelte, wurden diesen Proben bei den Folgemessungen andere Kennziffern zugeordnet, die später jedoch nicht mehr auftauchen.

Bei zwei mehrfach untersuchten Proben einzelner Spender wurde nach mehrfach unverändert gleichgebliebener gemessener Reparaturkapazität bei der letzten Messung eine deutliche Veränderung in der Bildungsrate und Prozessierung von SSB beobachtet (\*\*).

Tab. 3: Klassifizierung der DNA-Reparaturkapazität von CLL-Lymphozyten, gemessen mit Hilfe des Comet Assay

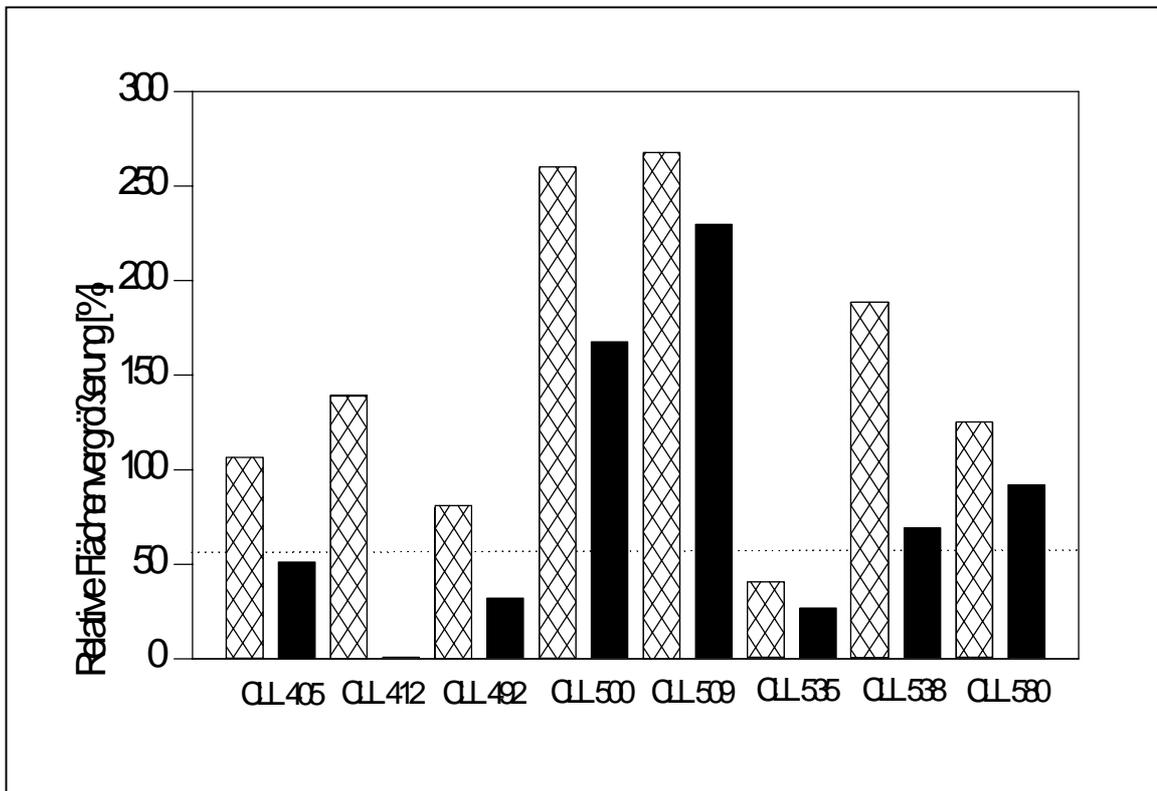
Proband	Initiale Comet-Bildung	t <sub>50%</sub> Reparatur	t <sub>90%</sub> Reparatur	Reparatur-Phänotyp
CLL 405	106	40	55	Mittel
CLL 410	103	45	60	Mittel
CLL 411	138	45	55	Mittel
CLL 412	139	22	60	Mittel
CLL 425 **	226 / 101	40 / 30	70 / 55	Mittel
CLL 426	150	25	50	Mittel
CLL 475	97	30	55	Mittel
CLL 476	157	10	40	Mittel
CLL 492	80	15	50	Schnell
CLL 493	96	13	28	Schnell
CLL 500 *	259	48	70	Mittel
CLL 505 **	279 / 58	30 / 10	8	Mittel / Schnell
CLL 509 *	366	45	70	Langsam
CLL 512	107	32	55	Mittel
CLL 514 *	376	20	60	Langsam
CLL 518 *	137	20	45	Mittel
CLL 523	113	35	60	Mittel

Proband	Initiale Comet-Bildung	t <sub>50%</sub> Reparatur	t <sub>90%</sub> Reparatur	Reparatur-Phänotyp
CLL 527	218	60	90	Langsam
CLL 528 *	232	10	60	Mittel
CLL 530	99	25	90	Mittel
CLL 531 *	313	35	90	Langsam
CLL 535	97	9	14	Schnell
CLL 536	184	65	100	Langsam
CLL 538	189	47	65	Langsam
CLL 565 *	40	10	35	Schnell
CLL 580	125	30	43	Mittel
CLL 595	61	15	70	Mittel
CLL 596	117	19	32	Mittel
CLL 619 *	192	15	40	Mittel
CLL 914	276	60	90	Langsam
CLL 915	299	50	70	Langsam
CLL 917	285	25	50	Mittel
CLL 921	89	15	27	Schnell
CLL 927	89	35	55	Mittel

#### 2.4.5 Die Modulation der DNA-Strangbruchprozessierung führt bei CLL-Lymphozyten zu weiteren Effekten

CLL-Zellen zeigten bei den hier durchgeführten Untersuchungen insgesamt eine höhere Reparaturkapazität für DNA-Alkylierungsschäden als normale Lymphozyten. Da die beiden eingesetzten Meßverfahren nur eine summarische Aussage über alle beteiligten Mechanismen liefern, blieb zunächst unklar, ob dafür in allen Fällen der Beitrag eines spezifischen DNA-Reparatur-Weges verantwortlich war.

Der Anteil der BER an der DNA-Adduktprozessierung wurde auch hier mit Hilfe des Modulators MX über den „Comet Assay“ gemessen. Im Gegensatz zu Normal-Lymphozyten (Abb. 18) war der Beitrag der Basen-Exzision bei individuellen CLL-Proben deutlich unterschiedlich (Abb. 28). Der verbleibende „Kometen-Wert“ nach MX-Behandlung schwankte bei den untersuchten Proben zwischen 10 % (CLL 509 und CLL 528) und fast 100 % (CLL 412 / n= 8).



**Abb. 21: Effekt von Methoxyamin auf die DNA-Strangbruchinduktion bei CLL-Lymphozyten**

CLL-Lymphozyten wurden 1 h vor und während der EtNU Exposition (150 µg/ml; 20 min) entweder ohne (karierte Balken) oder mit Methoxyamin (5 mM; schwarze Balken) im Kulturmedium inkubiert. Die induzierte DNA-Strangbruchrate wurden mit Hilfe des „Comet Assay“ gemessen.

Daraus kann geschlossen werden, daß die CLL-Zellen des Patienten 509 nur eine vergleichsweise geringe BER-Aktivität, dafür aber sehr effiziente Inzisions-Mechanismen im NER und/oder MMR Reparatur-Weg besitzen. Im Gegensatz hierzu reparierten CLL 412-Lymphozyten DNA-Alkylierungsschäden fast ausschließlich über die Basenexzision; NER und MMR waren hier kaum beteiligt. Bei den dreißig analysierten CLL-Proben fanden sich alle Übergangszustände zwischen diesen beiden Extremsituationen. Dies bedeutet, daß bei den untersuchten CLL-Zellen der individuelle Reparaturphänotyp in sehr viel stärkerem Ausmaß durch die relative Aktivität einzelner DNA-Reparaturwege geprägt wird, als dies bei den entsprechenden Normalzellen der Fall war. In welchem Zusammenhang die hier beschriebenen funktionellen DNA-Reparaturkapazitäten normaler und maligner Zellen zu ihrer Empfindlichkeit gegenüber alkylierenden Chemotherapeutika stehen, wird im folgenden Abschnitt erörtert.

### ***3 DISKUSSION***

Die Chemotherapie ist neben Operation und der Anwendung ionisierender Strahlung die dritte Säule, auf der die Behandlung maligner Erkrankungen ruht. Krebs-Chemotherapeutika entstammen zwar unterschiedlichen Substanzklassen, es handelt sich aber überwiegend um Agentien, die mit der DNA der Zielzellen interagieren und diese modifizieren. Wie bei vielen soliden Tumoren werden diese Medikamente auch bei Neoplasien des hämatopoetischen Systems vorwiegend im Rahmen von Kombinations-Therapien eingesetzt, so auch bei Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen (Moser & Stacher, 1989; Collins & Chabner, 1990).

Die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) ist eine Erkrankung, die den Non-Hodgkin-Lymphomen mit niedrigem Malignitätsgrad zugeordnet wird. Bei diesem Krankheitsbild erfolgt eine langsame Überschwemmung des Blutes mit immun-inkompetenten CLL-B-Lymphozyten (Brittinger, 1997). Die Ursache für das Krankheitsbild liegt nach heutiger Kenntnis wahrscheinlich nicht in einer gesteigerten Proliferation maligner Stammzellen, sondern in einer verlängerten Lebensdauer der von diesen abstammenden CLL-B-Lymphozyten. Für den verzögerten „progammierten Zell-Tod“ (Apoptose) dieser Zellen werden eine erhöhte Expression des Apoptose-Regulator-Proteins Bcl-2, bzw. die ungünstige Verteilung der relativen mRNA-Spiegel von *Bcl-2* und *Bax* verantwortlich gemacht (Reed, 1998). Die therapeutischen Maßnahmen sollten sich folglich primär nicht auf die Reduktion der proliferativen Zell-Fraktion richten, sondern auf die Induktion der Apoptose bei G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Zellen. Die Standard-Therapie erfolgt mit in der Regel zunächst guten Ergebnissen durch orale Gabe alkylierender Zytostatika (hauptsächlich Chlorambucil), gegen die sich in weiterem Verlauf aus bisher ungeklärten Gründen häufig eine Resistenz der Ziel-Zellen entwickelt (Müller *et al.*, 1994; Bosanquet & Bell, 1996; Dighiero, 1998).

Die CLL eignete sich für die Fragestellung dieser Arbeit insbesondere wegen der guten Zugänglichkeit der malignen Zellen aus dem peripheren Blut und wegen des relativ langsamen Krankheitsverlaufs, in dessen später Phase es häufig zu zellulären und klinischen Resistenzen gegenüber DNA-reaktiven Agentien kommt. Das CLL-Modell weist noch weitere Vorteile auf: Auch die zugehörigen "Normal"-Zellen sind als B-Lymphozyten gesunder Spender leicht verfügbar und befinden sich -wie die CLL-Zellen- in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus. Somit tritt bei DNA-Reparaturanalysen eine signifikante Überlagerung mit der DNA-Replikation nicht auf und bei der Bestimmung der Empfindlichkeit der Zielzellen gegenüber den entsprechenden Chemotherapeutika wird im wesentlichen Zelltod und nicht Zellzyklusblockade gemessen.

## ***Funktionelle Messung der DNA-Reparatur***

Um die Kapazität von Zellen zur Entfernung chemisch modifizierter Komponenten aus ihrer Kern-DNA zu bestimmen, gibt es grundsätzlich zwei Methoden. Einerseits läßt sich die Geschwindigkeit der Elimination bzw. die Persistenz spezifischer DNA-Modifikationen über die Zeit verfolgen, zum anderen können die Konzentrationen und Aktivitäten einzelner (Schlüssel-) Proteine der DNA-Reparaturmaschinerie gemessen werden. Da für die wichtigsten klinisch relevanten Alkylantien weder genau bekannt ist, über welche Reparaturwege ihre DNA-Addukte prozessiert werden und welches dabei die Geschwindigkeits-bestimmenden Schritte sind, noch welche DNA-Läsionen in welchem Maße zur Zytotoxizität beitragen, ist der zweite Ansatz hier nur von begrenzter Aussagekraft.

Zur Messung der Persistenz spezifischer DNA-Addukte in der Kern-DNA standen lange Zeit nur Methoden zur Verfügung, die relativ große Zellmengen benötigten und eine Auflösung auf dem Niveau einzelner Zellen nicht erlaubten. Dies begrenzte ihre Anwendung vor allem bei klinischem Probenmaterial und ließ Rückschlüsse auf interzelluläre Unterschiede nicht zu. Zu diesen Analyseverfahren gehören vor allem das <sup>32</sup>P-Post-Labeling (Randerath *et al.*, 1989) für modifizierte Nukleotide und das Immuno-Slot-Blot (ISB)-Verfahren (Nehls & Rajewsky, 1982) zu deren Quantifizierung mit Hilfe Addukt-spezifischer Antikörper, sowie die alkalische Filter-Elution zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen (Kohn *et al.*, 1976; Martelli *et al.*, 1995). Weitere Methoden wie die Pulsfeld-Gelelektrophorese (Southern *et al.*, 1987), die "unscheduled DNA repair synthesis" ([UDS; (Sawyer *et al.*, 1988) und andere immunzytologische Verfahren (van Delft *et al.*, 1993) wurden wegen ihrer geringen Empfindlichkeit hier nicht herangezogen.

Die beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden, der Immunzytologische Assay (ICA; Adamkiewicz *et al.*, 1985; Seiler *et al.*, 1993; Engelbergs *et al.*, 1998) zum Nachweis spezifischer DNA-Alkylierungsprodukte, sowie der „Comet Assay“ (Singh *et al.*, 1988; Fairbain *et al.*, 1995) zur Messung von DNA-Strangbruchraten erlaubten die Analyse auf dem Niveau einzelner Zellkerne und benötigten deshalb nur relativ geringe Zell-Mengen (Tab. 4).

**Tab. 4: Für verschiedene funktionale DNA-Reparaturtests erforderliche Zellzahlen humaner Lymphozyten**

<b>Zellzahl</b>	<b>ISB</b>	<b>ICA</b>	<b>Comet Assay</b>	<b>PM2-Test (Proteinextraktion)</b>
Pro Auswertung	1-2 x 10 <sup>6</sup>	1.5 x 10 <sup>6</sup>	1.5 x 10 <sup>2</sup>	-
Pro gemessenem Zeitpunkt*	1-2 x 10 <sup>7</sup>	6 x 10 <sup>6</sup>	2 x 10 <sup>5</sup>	-
Gesamt*	1-1.5 x 10 <sup>8</sup>	5 x 10 <sup>7</sup>	1-2 x 10 <sup>6</sup>	2 x 10 <sup>8</sup>

\* Aufgrund der experimentellen Rahmenbedingungen ist je Probe der Einsatz der angegebenen hohen Zellzahl notwendig.

Bei diesen Methoden sind bestimmte Randbedingungen zu beachten, die für das experimentelle „Design“ und die Interpretation der Analyseergebnisse wichtig sind. So sind Empfindlichkeit und die Meßgenauigkeit des ICA unter anderem abhängig von der Zugänglichkeit der DNA (Antigen-Erkennung) und von der Spezifität des verwendeten Antikörpers für die jeweilige DNA-Läsion.

Anders als bei der ICA-Methode wird beim „Comet Assay“ nicht die An- oder Abwesenheit eines distinkten DNA-Addukts gemessen, sondern das Auftreten induzierter DNA-Strangbrüche. Während der DNA-Reparaturprozesse entstehen in der DNA partiell entwundene Regionen, abasische Stellen oder Strang-Lücken. Sie führen zu einer erhöhten Mobilität der Kern-DNA eingebetteter und lysierter Zellen im elektrischen Feld. Eine genaue Quantifizierung der Anzahl von DNA-Schadensstellen ist mit Hilfe des „Comet Assay“ jedoch nicht möglich.

***DNA-Alkylierungsprodukte führen nur dann zu DNA-Strangbrüchen, wenn sie Substrat für Exzisions-Reparaturprozesse sind***

Eine Schwierigkeit beim „Comet Assay“ bestand darin, daß DNA-Reparatur-Intermediate nur während des Zeitraums dargestellt werden können, in dem genügend offene Reparatur-Stellen vorhanden sind. Mit Ausnahme von *N*3-EtAd (4 % aller Produkte, vgl. **Tab. 5**), sind die nach EtNU-Exposition entstehenden DNA-Addukte chemisch relativ stabil (Rajewsky *et al.*, 1977). Dies wurde durch den Plasmid-Relaxations-Assay bestätigt. Erst bei EtNU-Konzentrationen über 350 µg/ml waren DNA-Einzelstrangbrüche bei einem kleinen Teil der Plasmidmoleküle nachzuweisen (vgl. **Abb. 5**). Nach Inkubation mit EtNU in einer Konzentration von 300 µg EtNU/ml, einer für Säugerzellen bereits hochtoxischen Konzentration, entstehen im Mittel vier Ethyl-Addukte pro Plasmidmolekül ( $4.2 \times 10^4$  Basenpaare). Auf das Gesamt-Genom einer Zelle übertragen entspricht dies ca.  $1.4 \times 10^5$  Läsionen.

Um dieses Ergebnis an intakten Zellen zu überprüfen, wurde eine Lymphozyten-Probe geteilt und die eine Hälfte in Suspensionskultur unter Standardbedingungen ethyliert. Der andere Teil der Zellen wurde zunächst in Agarose eingebettet, lysiert und dann mit EtNU inkubiert. Die Analyse mit Hilfe des „Comet Assay“ zeigte nur bei den im vitalen Zustand behandelten Zellen meßbare Strangbruchraten. Die Kern-DNA von im Gel ethylierten Zellen verhielt sich wie die DNA unbehandelter Kontroll-Zellen. EtNU-induzierte DNA-Strangbrüche sind demnach Folge enzymatischer (Reparatur-) Prozesse an der DNA und nicht eine direkte Auswirkung der DNA-Alkylierung.

Der Einsatz zellfreier Protein-Extrakte im Plasmid-Relaxations-Assay führte innerhalb weniger Minuten zur Induktion von DNA-Strangbrüchen: DNA-Moleküle mit durchschnittlich vier Addukten pro 10 kB wurden durch Kernextrakte normaler Lymphozyten innerhalb von zehn Minuten zu 50% eingeschnitten, durch Extrakte von CLL-Lymphozyten sogar zu 100% (vgl. **Abb. 6**). Somit wurde mindestens eine DNA-Läsion pro Molekül erkannt und in einen DNA-Einzelstrangbruch überführt. Eine Bestätigung hierfür lieferte der „Comet Assay“: Wurden von isolierten Lymphozyten zu verschiedenen Zeiten während der EtNU-Exposition Zell-Aliquots entnommen und analysiert so fanden sich bei manchen Proben bereits nach wenigen Minuten deutlich meßbare Strangbruchraten (**Abb. 14**). Da die DNA-Alkylierung bei allen Proben gleich schnell abläuft, spiegelt die unterschiedliche Kinetik dieser frühen Inzisions-Prozesse die individuelle Varianz der zellulären Reparaturkapazität wider.

### ***Der „Comet Assay“ zeigt die Entstehung und Reparatur von DNA-Strangbrüchen an***

Inzisionen an strukturell modifizierten DNA-Basen sind frühe Schritte in den Reaktionskaskaden einzelner DNA-Reparaturwege, die direkt nach der Schadenserkenung zugreifen. Da diese initialen Reaktionen zum Teil schon während der Exposition einsetzen, wenn gleichzeitig noch Alkylierungsreaktionen ablaufen, bildet die Strangbruch-Messung mit Hilfe des „Comet Assay“ einen dynamischen Prozess im Zellkern während eines (gewählten) zeitlichen Fensters ab, in dem bereits genügend DNA-Reparatur-Intermediate vorliegen.

Dies ist insbesondere dann eine Schwierigkeit, wenn nicht nur die Inzisions-Reaktion innerhalb weniger Minuten abgeschlossen ist, sondern auch die Schritte der Exzision, Polymerisation und Ligation. Ebenfalls dem Nachweis von DNA-Reparatur-Intermediaten entgegenstehend ist eine extrem langsam verlaufende Inzisions-Reaktion. In diesem Fall können alle folgenden Prozesse sofort an den entstehenden DNA-Lücken einsetzen und diese schließen. In beiden Fällen wären zum initialen Messzeitpunkt ( $t_0$ ), d.h. unmittelbar nach EtNU-Exposition, nur wenige mobile DNA-Bruchstücke vorhanden und eine „Kometen“-Bildung würde ausbleiben.

Anders als bei normalen Lymphozyten zeigten sich bei CLL-Lymphozyten nach Standard-Exposition gegenüber EtNU in einer Konzentration von 100 µg/ml nur sehr kleine oder gar keine „Kometen“ (vgl. **Abb. 26**). Verlangsamt ablaufende Initialschritte konnten als Ursache ausgeschlossen werden, da im Relaxationstest für Extrakte von CLL-Zellen regelmäßig vergleichsweise hohe Inzisionsaktivitäten gemessen wurden (**Abb. 6**). Für alle

CLL Proben wurde deshalb eine erhöhte EtNU-Konzentration von 150 µg/ml verwendet.

Der Vergleich individueller Reparaturwerte - dargestellt als die Halbwertszeit für ein bestimmtes DNA-Addukt (ICA  $t_{50\%}$ ) oder der in der DNA verbleibenden Strangbrüche (Comet  $t_{50\%}$ ) - zeigte, daß beide Parameter die individuelle DNA-Reparaturkapazität gleich bewerteten. So konnte der Nachteil, DNA-Reparatur-Intermediate nur über eine kurze Zeit hin nachweisen zu können, vernachlässigt werden, denn der „Comet Assay“ verfügte über eine hohe Empfindlichkeit, gute Reproduzierbarkeit und die Möglichkeit der Einzelzell-Analyse.

Um den Anteil verschiedener DNA-Reparaturwege an der Elimination spezifischer DNA-Addukte abzuschätzen, wurden verschiedene DNA-Reparaturmodulatoren verwendet. Voraussetzung hierfür war, daß diese Modulatoren selbst nicht zytotoxisch wirken und/oder DNA-Reparatur-Intermediate oder -Proteine selektiv blockieren. So konnten verschiedene, parallel beschrittene DNA-Reparaturwege analysiert werden.

### ***Verschiedene DNA Addukte können Substrate unterschiedlicher Reparaturwege sein***

Vor einer Analyse der Beteiligung verschiedener Reparaturwege an der Elimination spezifischer DNA-Läsionen ist die Betrachtung der initialen DNA-Modifikationen von besonderer Bedeutung. So bildet jede einzelne *N*-Nitroso-Verbindung ein spezifisches Muster verschiedener DNA-Alkylierungsprodukte (Singer *et al.*, 1978; Beranek *et al.*, 1980; Beranek, 1990). Die monofunktionellen Alkylantien MeNU und EtNU bilden etwa ein Dutzend unterschiedliche, gut charakterisierte DNA-Addukte an Stickstoff- und Sauerstoff-Atomen der DNA-Basen. Die relativen Anteile der gebildeten DNA-Addukte sind für beide Verbindungen unterschiedlich, wie insbesondere die Bildungsraten für *N*7-AlkGua und *O*<sup>2</sup>-AlkThy zeigen (Tab. 5).

**Tab. 5: Bildung von DNA-Alkylierungsprodukten nach Exposition gegenüber *N*-Alkyl-*N*-Nitrosoharnstoffen**

Alkylierungsprodukt	Anteil aller Alkylierungsprodukte [%] *	
	MeNU	EtNU
<i>O</i> <sup>6</sup> -AlkGua	8	9
<i>O</i> <sup>4</sup> -AlkThy	0.9	2
<i>O</i> <sup>2</sup> -AlkThy	0.2	7
<i>O</i> <sup>2</sup> -AlkCyt	<0.1	3
<i>N</i> 7- AlkGua	72	15
<i>N</i> 3-AlkAde	5	4
Alkyl-Phosphotriester	13	57

\* Prozentualer Anteil einer spezifischen DNA-Läsion an der Gesamtheit aller gebildeten DNA-Schäden nach Alkyl-*N*-Nitrosoharnstoff-Exposition: Angegeben sind die Mittelwerte der Meßergebnisse von Singer *et al.* (1978), Beranek *et al.* (1980) und Beranek (1990).

Nicht-reparierte strukturelle Modifikationen der zellulären DNA können grundsätzlich Mutationen auslösen und/oder zytotoxische Wirkungen haben. Ein bestimmtes Ausmaß an DNA-Schäden kann die Zelle tolerieren, insbesondere wenn es sich vorwiegend um Schäden in nicht kodierenden DNA-Sequenzen handelt. Daneben zeigen Zellen einen anderen, evolutionär entstandenen Toleranz-Mechanismus, die Transläsions-DNA-Synthese. Sie bildet einen „Bypass“, d.h. ein Überspringen der Schadensstelle, durch verschiedene DNA-Polymerasen während der Replikation (Wood & Shivij, 1997). Dabei werden bei proliferierenden Zellen Transversions- und Transitions-Mutationen nachgewiesen, da strukturell modifizierte Basen bei der semikonservativen DNA-Replikation zu Basen-Fehlpaarungen führen können, die sich nach zwei Replikations-Ereignissen manifestieren. Insbesondere die O-Alkylierungsprodukte O<sup>6</sup>-AlkGua, O<sup>4</sup>-AlkThy und O<sup>2</sup>-AlkThy stellen potentiell mutagene DNA-Strukturveränderungen dar. Die spontane und enzymatische Freisetzungen von N-Alkylpurinen aus der DNA (Depurinierung) hat die Entstehung sogenannter „abasischer Stellen“ als mögliche Vorstufe für Punktmutationen zur Folge (Gentil *et al.*, 1992; Cabral-Neto *et al.*, 1994).

Bei ausdifferenzierten, nicht proliferativen Lymphozyten können sich promutagene DNA-Strukturschäden nicht über Replikationsereignisse als Mutationen manifestieren. Trotzdem sind bei diesen Zellen verschiedene, auch mit der DNA-Replikation in Verbindung gebrachte Reparatur-Mechanismen aktiv (Thomale *et al.*, 1994a).

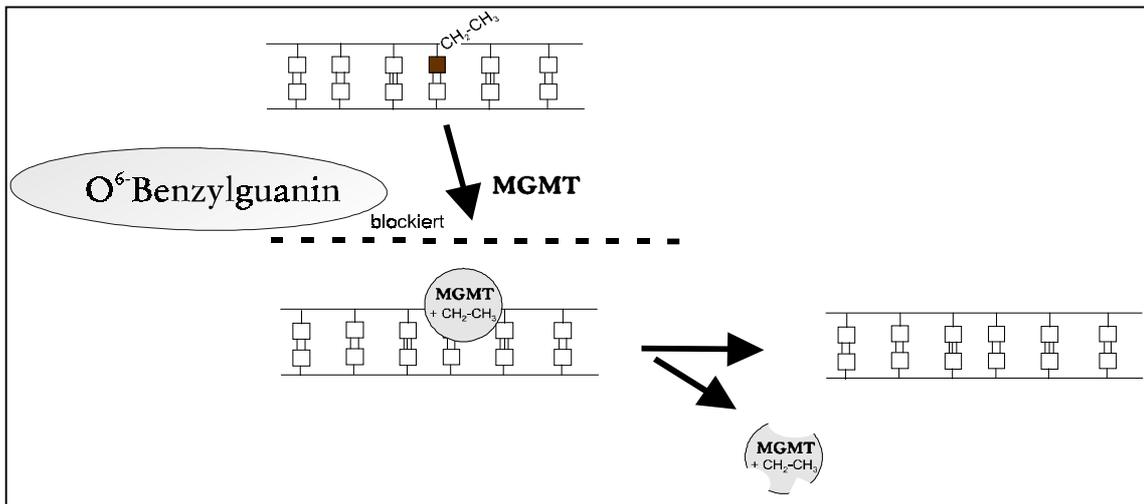
### ***Bedeutung verschiedener Reparatur-Wege für die Prozessierung von DNA-Ethyl-Addukten***

Die Reparatur von DNA-Schäden nach Exposition gegenüber DNA-reaktiven Agentien erfolgt in der Regel über verschiedene Reaktionskaskaden. Im Laufe des vergangenen Jahrzehnts wurde zunehmend deutlich, daß eine Reihe besonders wichtiger DNA-Reparaturwege das Zusammenspiel vieler verschiedener Proteine und Protein-Komplexe erfordern (Übersicht in Friedberg *et al.*, 1995; **Abb. 3**). Im weiteren werden diese DNA-Reparaturwege näher beschrieben und hinsichtlich ihrer Bedeutung insbesondere für die Reparatur spezifischer DNA-Ethylierungsschäden diskutiert.

## 1. **Einschritt-DNA-Reparatur durch das DNA-Reparaturprotein MGMT**

Das Reparatur-Protein O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (MGMT) bewirkt die direkte Entfernung von Alkyl-Resten vom O<sup>6</sup>-Atom des Guanins in der DNA in einer Ein-Schritt-Reaktion (Abb. 29). Bei den meisten untersuchten Pro- und Eukaryonten wurden entsprechende Alkyltransferasen gefunden, die untereinander große Homologien im aktiven Zentrum und im N-terminalen Bereich aufweisen. Die Alkyltransferasen verschiedener Organismen zeigen aber deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Substrat-Spezifität, Induzierbarkeit und Thermostabilität. Während das Ada-Protein von *E. coli* neben O<sup>6</sup>-AlkGua auch O<sup>4</sup>-AlkThy sowie Alkyl-Phosphotriester repariert (Samson, 1992; McCarthy & Lindahl *et al.*, 1985; Schendel *et al.*, 1983), ist bei höheren Organismen die Reparatur in erster Linie auf O<sup>6</sup>-AlkGua beschränkt (Zak *et al.*, 1994; Sassanfar *et al.*, 1991; Pegg, 1990).

**Abb. 22: Die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT)**  
Prozessierung von DNA-Schäden durch die MGMT.



Die Entfernung der Alkylgruppe vom O<sup>6</sup>-Atom des Guanins erfolgt in einer Ein-Schritt-Reaktion durch Übertragung auf einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum des MGMT-Proteins. Diese Reaktion verläuft nicht katalytisch, sondern stöchiometrisch und führt zur Inaktivierung der Alkyltransferase-Moleküle (Demple *et al.*, 1983; Lindahl *et al.*, 1988; Übersicht bei Pegg, 1990). Somit hängt die MGMT-vermittelte Reparaturkapazität einer Zelle sowohl von der Größe des MGMT-Pools der Zelle als auch von der Syntheserate des MGMT-Proteins ab. Mit Hilfe des O<sup>6</sup>-BenzGua konnte der individuell unterschiedliche relative Anteil der MGMT-vermittelten O<sup>6</sup>-EtGua-Elimination bestimmt und zudem gezeigt werden, daß dieser Reparaturweg durch alternative Reparaturprozesse ersetzt wird.

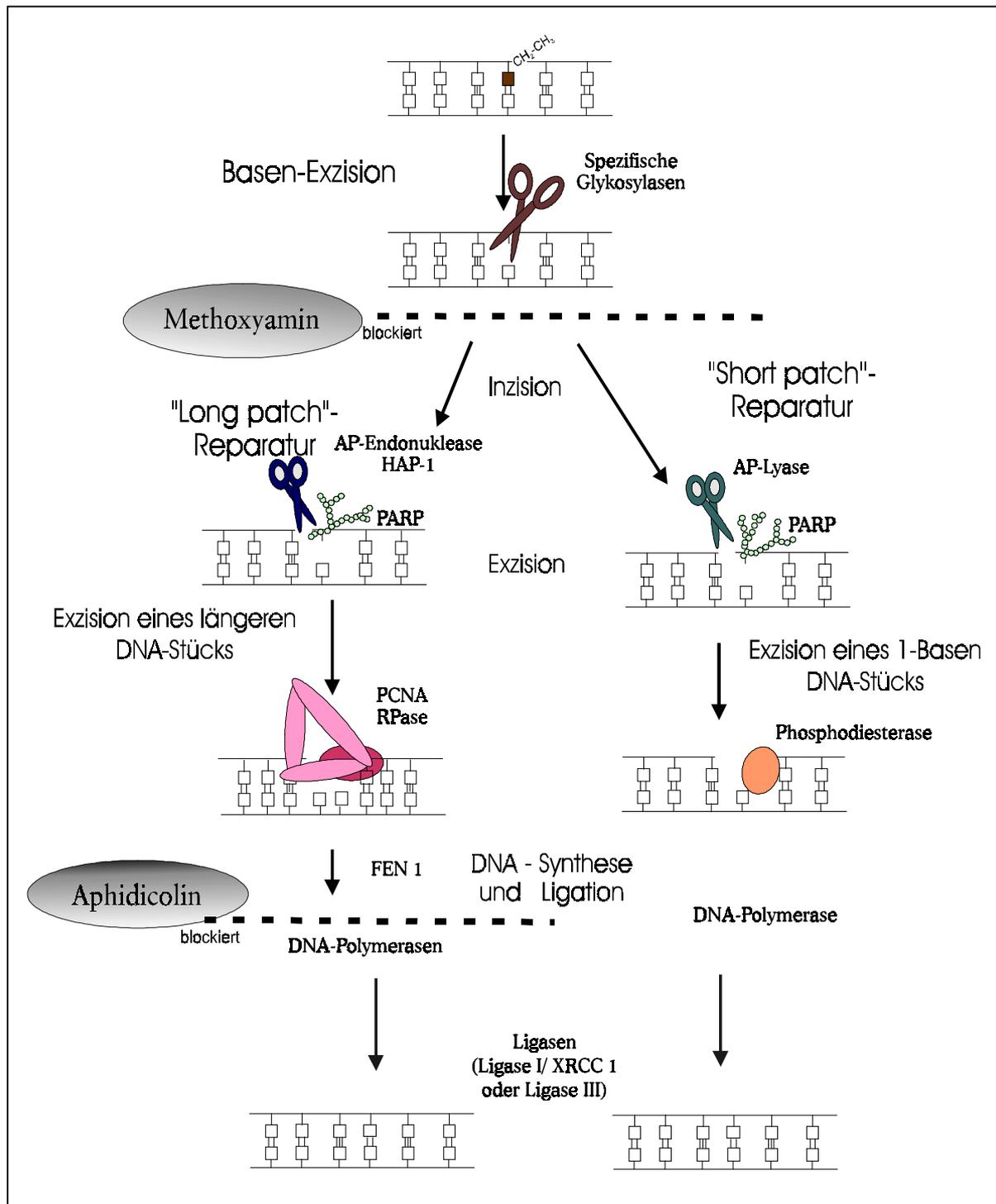
## 2. Die Basen-Exzisions-Reparatur

Einer der wichtigsten Wege zur Entfernung modifizierter DNA-Bausteine aus der DNA ist die Basen-Exzisions-Reparatur (BER). Sie wird auch zur Reparatur von DNA-Läsionen benötigt, die durch zelluläre Stoffwechselreaktionen induziert werden, beispielsweise durch reaktive Sauerstoffspezies verursachte DNA-Oxidationsprodukte. Auch „abasische (AB)-Stellen“, die durch spontane Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung von Purin-Basen entstehen, sowie durch Desaminierung veränderte Basen sind Substrate des BER-Weges.

Schlüssel-Enzyme dieses Prozesses sind eine Vielzahl verschiedener DNA-Glykosylasen, die jeweils ein spezifisches Spektrum atypischer Basen erkennen und die *N*-glykosidische Bindung zwischen der „falschen“ Base und der Desoxyribose lösen. Bei Säuger-Zellen sind insbesondere die Uracil-Glykosylase und die 3-Methyladenin-Glykosylase (MAG) gut charakterisiert. An der aus der Glykosylase-Reaktion resultierenden AB-Stelle in der DNA erfolgt ein Einschnitt 5' durch eine AP-Endonuklease bzw. 3' durch eine AP-Lyase. Der verbleibende Desoxyribose-Phosphat-Rest wird durch eine Phosphodiesterase entfernt, die in der Nukleotid-Sequenz entstandene Lücke wird durch eine Polymerase-/Ligase-Reaktionsfolge aufgefüllt und geschlossen (Lindahl *et al.*, 1997; Übersicht bei Wilson, 1998; **Abb. 30**).

Bei Säugerzellen schließt der Hauptweg der BER die Prozessierung 5' der AB-Stelle durch eine Endonuklease und den Ersatz eines einzelnen Nukleotids an. An diesem Prozess sind die Polymerase  $\beta$  und die Ligase III (im Komplex mit dem Protein XRCC1) beteiligt (Lindahl *et al.*, 1995; Caldecott *et al.*, 1997), oder aber ein Polymerase  $\beta$ /Ligase I-Multienzym-Komplex (Prasad *et al.*, 1996). Alternativ kann der Einschnitt 3' von der AB-Stelle erfolgen, mit Austausch einer 2-6 Basensequenz unter Beteiligung des Proteins PCNA und der Polymerasen  $\alpha$ ,  $\delta$  oder  $\epsilon$  (Fortini *et al.*, 1998; Stucki *et al.*, 1998; Lindahl *et al.*, 1995). An beiden Prozessen ist die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) beteiligt, die an einzelsträngige DNA, insbesondere an DNA-Strangbrüche bindet (Cleaver & Morgan, 1991; Satoh & Lindahl, 1992). Die Funktion dieser PARP-Bindung und ihrer Folge-Reaktionen scheint die Sicherung der DNA-Stabilität zu sein (Jeggo, 1998 a & b; van Gool *et al.*, 1997), da sie eine Transkriptions- und Replikations-Inhibition während des DNA-Reparaturprozesses bewirkt (Oei *et al.*, 1998). Ein zu hoher Grad der DNA-Schädigung induziert die Apoptoseprozesse, da die PARP-Reaktionsfolge von einer starken NAD-Depletion und einem erhöhten p53-Spiegel begleitet wird (Lindahl *et al.*, 1995).

**Abb. 23: Die Basen-Exzisions-Reparatur (BER)**  
 Prozessierung von DNA-Schäden über verschiedene BER-Wege.

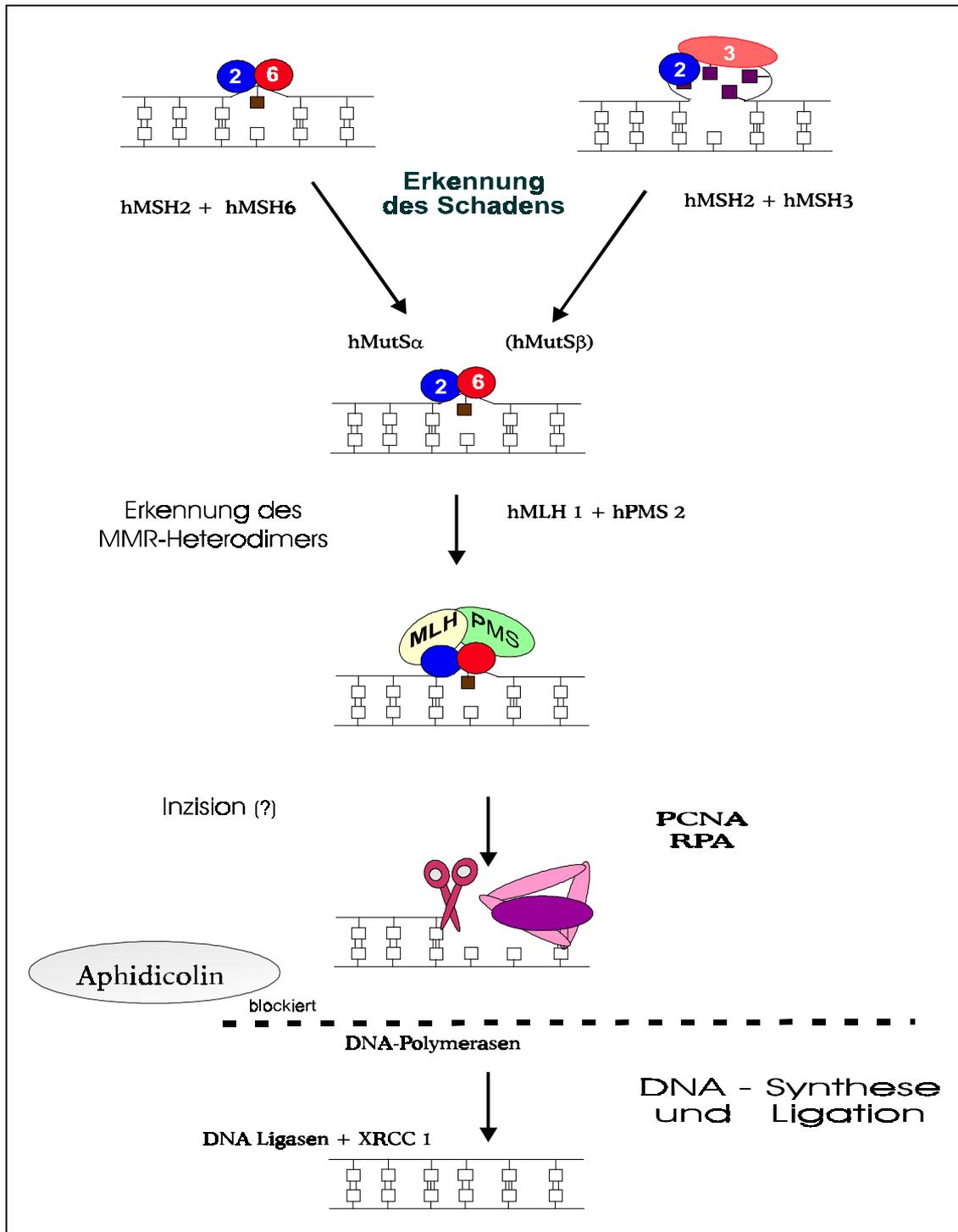


In der vorliegenden Arbeit zeigte die Blockierung der BER, daß ein großer Anteil an DNA-Reparatur-Intermediaten von den Lymphozyten aller normaler Spender über diesen Weg prozessiert wird (Abb. 18). Die großen individuellen Unterschiede in der Prozessierung von DNA Strangbrüchen konnten bei Ausschalten dieses speziellen Weges nicht mehr beobachtet werden.

### 3. Die DNA-Mismatch-Reparatur

Das Mismatch-Reparatur-System (MMR) dient zur Korrektur einzelner Basenfehlpaarungen sowie kurzer fehlgepaarter Nukleotid-Sequenzen, die die Helixstruktur doppelsträngiger DNA beeinträchtigen. Solche Schäden entstehen durch Polymerasefehler bei Replikations- und Rekombinations-Prozessen oder werden durch exogene Schädigung der DNA (z.B. Alkylierung) induziert (Abb. 31).

Abb. 24: Die DNA-Mismatch-Reparatur (MMR)  
Überblick zur Prozessierung von DNA-Schäden über die MMR.



Bei Säuger-Zellen gelang es bisher nicht, das komplette MMR-System zu rekonstituieren. Aus Untersuchungen an *E. coli* geht hervor, daß der Hauptweg der MMR über das MutHLS-System eingeleitet wird (Modrich, 1994). Das Protein MutS erkennt die Fehlpaarung, MutH bindet an ein 5-methylC in hemimethylierter DNA und unterscheidet so zwischen Parental- und Tochter-Strang. MutL, gebunden an MutS, dient zur Aktivierung des MutH-Proteins, das dann eine Helikase (UvrD) rekrutiert. In den entwundenen DNA-Strang setzt anschliessend eine entsprechende Exonuklease (ExoI, ExoIII, RecJ) je nach Orientierung der Fehlstelle 3' oder 5' einen Schnitt und entfernt durch Exzision die falsche Base oder Sequenz. Das Auffüllen der Lücke erfolgt durch Polymerase III, das an DNA-Einzelstrangbrüche bindende (Single-strand-DNA-binding) Protein und die DNA Ligase I (Modrich, 1994; Fishel & Kolodner, 1995). Bei *Saccharomyces cerevisiae* und Säuger-Zellen wurden verschiedene Proteine identifiziert, die große Homologien zu den entsprechenden *E. coli*-Proteinen aufweisen. Die MMR-Mechanismen scheinen hier aber eine höhere Komplexität zu besitzen. Bei menschlichen Zellen erfolgt die Erkennung der Fehlpaarung durch eines von zwei Heterodimeren hMutS $\alpha$  (hMSH2/hMSH6) oder hMutS $\beta$  (hMSH2/hMSH3), die jeweils aus zwei MutS-Homologen bestehen (Drummond et al., 1997; Palombo et al., 1996). An diese Erkennungs-Komplexe bindet das Heterodimer hMutL $\alpha$  (bestehend aus den MutL-Homologen hPMS2 und hMLH1). Die Suche nach MutH-Homologen war bisher wenig erfolgreich, jedoch wurde ein ähnlicher Mechanismus wie bei *E. coli* beobachtet. Auch hier war der Reaktionsablauf in Zell-Extrakten vom Vorhandensein hemimethylierter DNA abhängig (Fang & Modrich, 1993). Weiterhin scheint die Beteiligung des PCNA („Proliferating Cell Nuclear Antigen“; Gu et al., 1998), des Replikationsproteins RPA (Lin et al., 1998) und einer der Polymerasen  $\alpha$ ,  $\delta$  oder  $\epsilon$  gesichert (Fang & Modrich, 1993; Wood & Shivji, 1997).

Neben diesem Hauptweg der MMR finden sich sowohl bei *E. coli* als auch bei höheren Zellen alternative Wege zur Eliminierung bestimmter Basenfehlpaarungen. So dient das VSP („Very Short Patch“-)System in erster Linie der Mismatch-Korrektur von G-T Fehlpaarungen, die relativ häufig auftreten, da eine spontane Desaminierung 5-methylC in T verwandelt und damit zu T-G Basenpaaren in der DNA führt. Strang-spezifische Mismatch-Endonuklasen, z.B. die Thymin-Mismatch DNA Glykosylase, die G-T oder G-U Fehlpaarungen in spezifischen Methylierungs-Sequenzen erkennt, finden sich bei *E. coli* (Henneke et al., 1991; Barret et al., 1998) wie auch bei *HeLa*-Zellen (Neddermann & Jiricny, 1993; Neddermann et al., 1996). Für Säuger-Zellen konnte der biochemische Mechanismus der G-T Reparatur allerdings noch nicht gänzlich aufgeklärt werden. Hinweise legen aber nahe, daß eine Reparatur präferentiell an CpG-Sequenzen stattfindet

(Griffin & Karran, 1993; O'Regan *et al.*, 1996). Neben der Korrektur-Spezifität bei G-T Fehlpaarungen (Wiebauer & Jiricny, 1990) wurde gezeigt, daß auch G-U Fehlpaarungen (Neddermann & Jiricny, 1993) und O<sup>6</sup>-methyl-G-T (Sibghat-Ullah & Day III, 1993) Substrate für diese Glykosylase bilden. Die weitere Prozessierung erfolgt über die Polymerase  $\beta$ - (Wiebauer & Jiricny, 1990) oder über die Polymerase  $\delta$ / PCNA/ RPA- (Otterlei *et al.*, 1999) abhängige BER.

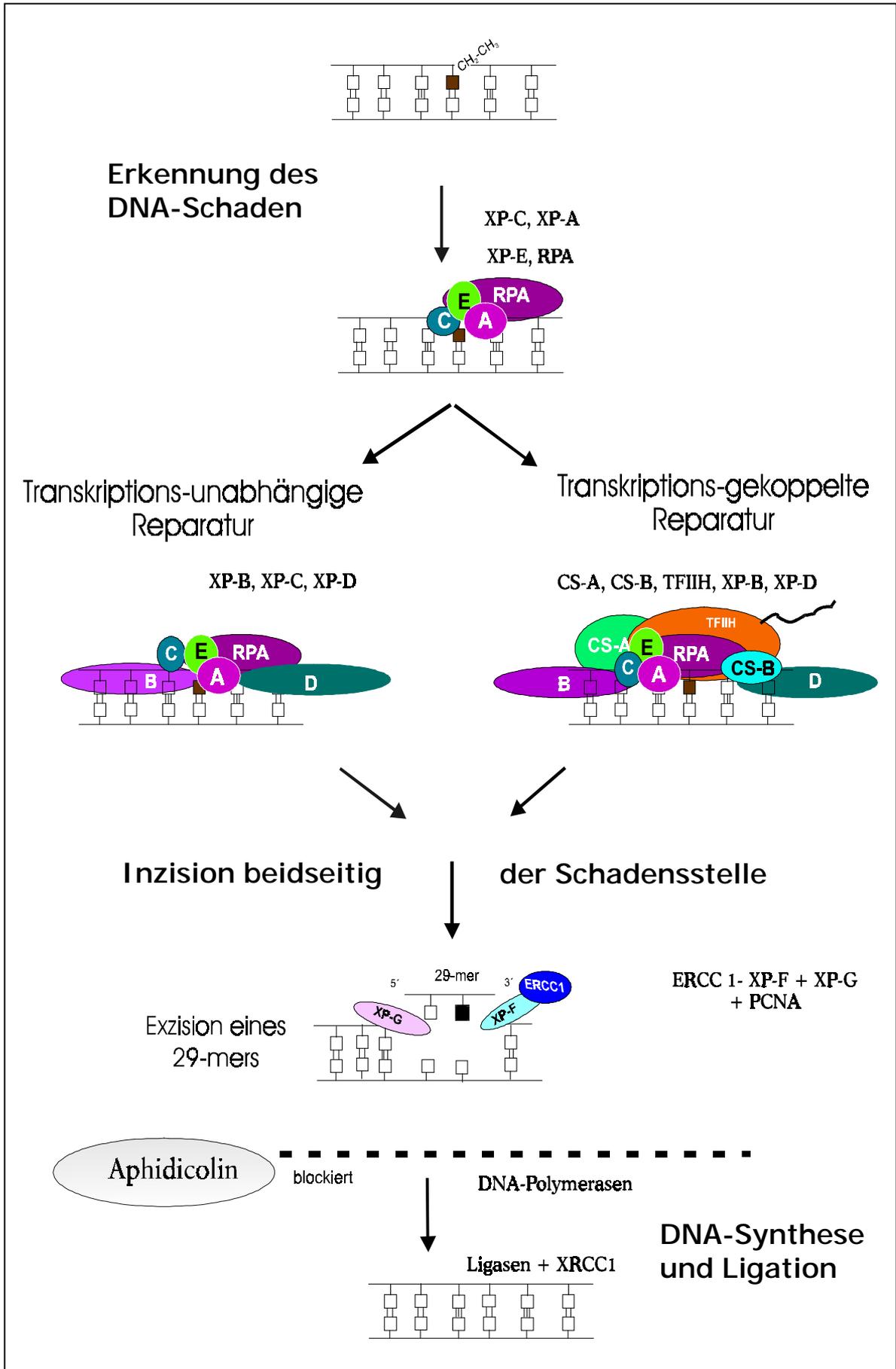
Die Beteiligung der MMR an der Reparatur von DNA-Alkylierungsschäden durch EtNU in humanen Lymphozyten konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Der Einsatz von Aphidicolin konnte nur darüber Auskunft geben, daß eine Beteiligung der Polymerasen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  vorliegt, eine genauere Auskunft über die beschrittenen Wege war hier nicht möglich. Zur Klärung dieser Frage werden weiterführende Arbeitsansätze verfolgt.

#### **4. Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur**

Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) korrigiert vorwiegend exogene DNA-Schäden, vor allem solche, die größere Störungen der Helixstruktur erzeugen. Dazu gehören durch UV-Strahlung induzierte Thymin-Dimere und 6-4-Photoprodukte, aber auch durch andere DNA-reaktive Agentien gebildete DNA-Addukte, insbesondere Inter- und Intra-Strang-Verknüpfungen (Hoeijmakers *et al.*, 1990; Waters *et al.*, 1992; Kuraoka *et al.*, 1996). Ein großer Teil der am NER-Weg beteiligten Gene wurde bereits kloniert, die Proteine charakterisiert und in Bindungs-Studien in ihrer Funktion untersucht (**Abb. 32**).

Die Schadens-Erkennung erfolgt sehr wahrscheinlich durch das XP-C und das XP-A Protein. Durch Bindung dieser Proteine an die Schadensstelle wird die Bildung eines Multi-Enzym-Komplexes initiiert („Repairosome“; Friedberg, 1997). Die folgende Bindung des Einzelstrang-spezifischen Proteins RPA an XP-A ist zur Rekrutierung des Transkriptionsfaktors TFIIH notwendig (Matsuda *et al.*, 1995). Er enthält die beiden Helikasen XP-B und XP-D, mit unterschiedlicher Polarität, sowie einige andere Proteine (Schaeffer *et al.*, 1993; Drapkin *et al.*, 1994; Kripke *et al.*, 1994). Durch diesen Komplex wird die DNA über einen größeren Bereich entspiralisiert und zwei spezifische Nukleasen, XP-G mit 3'-5'-Aktivität (Constantinou *et al.*, 1999) und das Heterodimer ERCC1/ XP-F mit 5'-3'-Aktivität (Bessho *et al.*, 1997; de Laat *et al.*, 1998), schneiden gleichzeitig ein den Schaden enthaltendes Oligonukleotid von ca. 30 Nukleotiden heraus (Sancar, 1994). Für die weitere Prozessierung ist eine der Polymerasen  $\alpha$ ,  $\delta$  oder  $\epsilon$  verantwortlich (Wood & Shivji, 1997). *In vitro*-Experimente haben den Nachweis erbracht, daß zur Synthese des neuen DNA-Strangs weitere Faktoren notwendig sind, nämlich der Replikationsfaktor C ([RFC] (Ellison & Stillman, 1998), das PCNA (Lor *et al.*, 1997) und das RPA-Protein (Stigger *et al.*, 1998).

Abb. 25: Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)  
 Überblick zur Prozessierung von DNA-Schäden über verschiedene Wege der NER.



Die Beteiligung des Transkriptionsfaktors TFIIH an diesem Reparaturweg deutet auf eine enge Verknüpfung mit Proteinen und Prozessen der Transkription hin. TFIIH ist einer der basalen Transkriptions-Faktoren, die an der Promotor-Bindung der RNA Polymerase II beteiligt sind. Die einzelnen Proteine des TFIIH-Komplexes scheinen eine Doppelfunktionen bei Reparatur- und Transkriptions-Aufgaben zu besitzen. Für eine spezifische Kopplung von Reparaturprozessen an die RNA-Synthese sind aber zusätzlich die Produkte der Gene CS-A (Tu *et al.*, 1998) und CS-B (van Gool *et al.*, 1997) verantwortlich. Die Aufgabe dieser besonderen Form der Nukleotid-Exzision, der sogenannten Transkriptions-gekoppelten Reparatur (TCR), besteht wahrscheinlich darin, aktive („housekeeping“) Gene und insbesondere den jeweils abgelesenen DNA Strang, präferentiell von Schäden zu befreien (Mellon *et al.*, 1987). Dabei ist die Bindung von CS-B an die RNA Polymerase II von entscheidender Bedeutung (Tantin *et al.*, 1997; van Gool *et al.*, 1997).

### ***Spezifische DNA-Alkylierungsprodukte können parallel über verschiedene Reparaturwege prozessiert werden***

Durch Reinigung von Reparatur-Proteinen, Klonierung der zugehörigen Gene, der *in vitro*-Rekonstitution ganzer Reparaturwege und mit Hilfe funktioneller Tests konnte die Beteiligung der verschiedenen DNA-Reparatur-Mechanismen an der Elimination spezifischer DNA-Alkylierungsprodukte überprüft werden.

So wurde gezeigt, daß O<sup>6</sup>-EtGua sehr effizient von der MGMT erkannt und eliminiert wird (Brent *et al.*, 1988; Bender *et al.*, 1997). Seit einigen Jahren wird für dieses DNA-Addukt auch eine Reparatur über das NER (TCR)-System diskutiert. Bei kultivierten Ratten-Hepatoma-Zellen erfolgt eine präferentielle Elimination von O<sup>6</sup>-EtGua aus transkribierten Genen (Thomale *et al.*, 1994b), die durch den spezifischen MGMT-Inhibitor O<sup>6</sup>-Benzgua nicht wesentlich beeinflusst wird (Hochleitner, 1992). Dies wurde von Engelbergs *et al.* (1998) bei *in vivo*-Messungen für verschiedene Zell- und Gewebetypen der Ratte bestätigt. Diese präferentielle Reparatur erfolgt, anders als bei der TCR, sehr effizient aus beiden DNA-Strängen aktiver Gene.

Aus Ergebnissen von Zellkultur-Experimenten wurde postuliert, daß O<sup>6</sup>-EtGua nur durch eine Kooperation der MGMT mit NER-Komponenten aus der genomischen DNA humaner Zellen eliminiert werden kann (Ortquist *et al.*, 1995; Bronstein, 1992). Wie sich aus den o. g. Untersuchungen ergibt, ist im Falle transkriptionsaktiver Gene die MGMT zur Reparatur von O<sup>6</sup>-EtGua nicht erforderlich. Alternativ können [O<sup>6</sup>-EtGua]-haltige Basenpaare möglicherweise auch über den MMR-Weg prozessiert werden, und zwar

entweder nach Erkennung durch den Protein-Komplex hMutS $\alpha$  (Duckett *et al.*, 1996) oder durch die VPR Thymin-Mismatch-Glykosylase (Sibghat-Ullah & Day III, 1992, 1993). Für ein modifiziertes Guanin, z.B. O<sup>6</sup>-MeGua, das nach der Replikation mit Thymin gepaart vorliegt, wird aber angenommen, daß der Einschnitt der Glykosylase am neusynthetisierten (also dem T-haltigen Strang) erfolgt und das O<sup>6</sup>-MeGua im Gegenstrang verbleibt. Während der Auffüllsynthese baut die Polymerase wiederum ein T ein, so daß die MMR in diesem Fall nicht den Schaden beseitigt, sondern in einem endlosen Reparaturzyklus („futile repair cycle“) immer neue Einzelstrangbrüche induziert (Karran & Bignami, 1992 & 1994).

N7-EtGua und N3-EtGAdE sind Substrat der DNA-Glykosylase MAG und werden im Gesamtgenom über den BER-Weg repariert (Charkravati *et al.*, 1991; Gallagher & Brent, 1984; Cathcart & Goldthwait, 1981; Scicchitano & Mellon, 1997). Nach einer spontanen Depurinierung des metastabilen N3-EtAdE kann die entstandene abasische Stelle auch direkt über die Endonuklease AP1 weiterprozessiert werden (Ibeanu *et al.*, 1992; Demple *et al.*, 1991; Doetsch & Cunningham, 1990). Reparatur-Analysen an Hamster-Zellen legen nahe, daß N-Ethylpurine möglicherweise parallel auch über die TCR aus der DNA entfernt werden können (Sitaram, 1997). Bei MAG-defizienten embryonalen Stammzellen der Maus wurde kürzlich ein Reparaturprozess für diese Ethyl-Addukte gefunden, der, ähnlich wie für O<sup>6</sup>-EtGua, präferenziell aus beiden Strängen aktiver Gene erfolgt (Plosky *et al.*, 1999). Der molekulare Mechanismus ist auch hier noch ungeklärt.

Über die Reparatur von O<sup>4</sup>-EtThy und O<sup>2</sup>-EtThy in der DNA ist insgesamt noch wenig bekannt. Im Gegensatz zur MGMT II von *E. coli*-Zellen mit hoher Substrat-Spezifität für O<sup>4</sup>-EtThy, besitzen die MGMTs vieler Säuger-Zellen (beispielsweise von Ratte und Mensch) gegenüber diesem Addukt nur eine geringe Spezifität (Sassanfar *et al.*, 1991; Zak *et al.*, 1994). Für die MGMT der Maus wurde demgegenüber für O<sup>4</sup>-EtThy eine ähnliche Reparatur-Effizienz wie für O<sup>6</sup>-EtGua gefunden (Kawate *et al.*, 1995). Aus Mutations-Untersuchungen haben Samson *et al.* (1997) geschlossen, daß die MGMT zwar an O<sup>4</sup>-EtThy in der DNA binden kann, dieser Komplex aber dann die eigentliche Reparatur des Addukte (z.B. über NER) inhibiert. Funktionelle *in vivo* Reparatur-Untersuchungen bei der Ratte (Müller & Rajewsky, 1983; Eberle, 1989; Thomale *et al.*, 1990) und beim Menschen (Den Engelse *et al.*, 1987; Satoh *et al.*, 1988; Dragaan, 1994) haben gezeigt, daß O<sup>4</sup>-EtThy in der DNA über einen ähnlich langen Zeitraum persistiert, wie dies für O<sup>2</sup>-EtThy der Fall ist. Mutations-Analysen an Ratten-Fibroblasten und T-Lymphozyten lassen auf einen TCR-ähnlichen Reparatur-Mechanismus in aktiven Genen schließen (Jansen *et al.*, 1994a-c, 1995).

## ***Gibt es Hinweise auf eine koordinierte Regulation von DNA-Reparaturprozessen ?***

Über die Regulation von Genen, deren Produkte bei Säugerzellen an Reparaturprozessen beteiligt sind, gibt es in der Literatur erstaunlich wenig fundierte Informationen. Lediglich die bereits seit langem bekannte Varianz im zellulären MGMT-Gehalt zwischen einzelnen Zell- und Gewebetypen sowie zwischen verschiedenen Individuen wurde bisher auf der Ebene der Genregulation näher untersucht (Gerson *et al.*, 1986). Erst die von uns erstmalig beschriebenen großen Unterschiede im zeitlichen Ablauf komplexer Reparaturprozesse bei primären menschlichen Zellen rückten die Regulation dieser Aktivitäten in den Blickpunkt. Obwohl es sich bei den hier vorgestellten Untersuchungen zum individuellen DNA-Reparaturphänotyp peripherer Lymphozyten um Messungen verschiedener Reparaturwege und eine Anzahl sehr unterschiedlicher DNA-Addukte handelt, lassen sich aus den Ergebnissen wichtige Schlüsse ziehen. So korrelieren für individuelle Proben die Halbwertszeiten für die Elimination eines spezifischen DNA-Alkylierungsprodukts ( $O^6$ -EtGua) erstaunlich gut mit den parallel gemessenen Prozessierungsraten von DNA-Einzelstrangbrüchen (vgl. **Tab. 2**). Obwohl die Geschwindigkeits-bestimmenden Komponenten der einzelnen DNA-Reparaturwege bisher nicht identifiziert wurden, spricht diese Beobachtung für eine übergeordnete Regulation wichtiger Reparaturmechanismen. Das gilt insbesondere, da verschiedenen Ethyl-Addukte über unterschiedliche Reparaturwege mit vermutlich unterschiedlichen Kinetiken prozessiert werden.

Darüber hinaus zeigen die vorliegenden Untersuchungen, daß zur Entfernung einer spezifischen Läsion ( $O^6$ -EtGua) aus der DNA von Lymphozyten, verschiedene Reparaturwege gleichzeitig beschritten werden können. (**Abb. 15**). Wird die „Comet-neutrale“ Einschnitt-Reparatur von  $O^6$ -EtGua durch Inhibition der MGMT verhindert, so treten zusätzlich DNA-Strangbrüche als Reparatur-Intermediate auf (**Abb. 16**). Dies kann nur bedeuten, daß unter diesen Bedingungen  $O^6$ -EtGua (bzw.  $O^6$ -EtGua - Cyt Basenpaare) über alternative Reparatur-Wege prozessiert werden, die eine Inzision der DNA beinhalten (**Abb. 20**). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für das entsprechende Methyl-Addukt nach Exposition mit MeNU gemacht. Bekannt war zwar, daß  $O^6$ -MeGua nach einer DNA-Replikation, dann mit Thymin gepaart, ein Substrat für die MMR sein kann. Neu jedoch ist die Beobachtung einer Reparatur-Inzision bei der präreplikativen Ausgangssituation  $O^6$ -MeGua - Cyt (**Abb. 22**). Die dabei entstehenden Strangbrüche können als mitverantwortlich für die Zytotoxizität methylierender Agentien wie DTIC, Prokarbazin oder Streptozotocin bei nicht proliferativen Zellen angesehen werden (z. B.

Pegg & Byers, 1992; Müller *et al.*, 1993).

Wurde bei EtNU-exponierten Lymphozyten normaler Spender der BER-Weg auf einer frühen Stufe vor der Inzision des DNA-Strangs blockiert, so fand sich, mit einer Ausnahme, stets eine erhebliche, aber individuell unterschiedliche Verminderung der Reparaturintermediate (**Abb. 18**). Die verbleibenden Strangbruchraten, die als Indikator für die Aktivität von NER- und MMR-Prozessen gelten können, waren bei fast allen untersuchten Proben sehr ähnlich. Dies weist auf ein individuelles Expressions-Profil von (Geschwindigkeits-bestimmenden) BER-Komponenten für diese Zellen hin, aber auch auf eine relativ große Konstanz der übrigen Reparaturwege.

### ***Die Blockierung von DNA-Reparaturprozessen kann zu einer veränderten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Chemotherapeutika führen***

Bereits vor 20 Jahren wurde bei Bakterien das Phänomen der Anpassung nach toxischer und mutagener Schädigung durch Alkylantien beobachtet. Der biochemische Mechanismus dieser „adaptive response“ ließ sich auf verschiedene Reparaturprozesse und deren regulative Veränderung zurückführen. Vor allem Untersuchungen an Negativ-Mutanten von *E. coli* für die Gene *ada* (O<sup>6</sup>-Alkylguanin DNA-Alkyltransferase I), *polA* (Polymerase I) und *alkA* (3-Methyladenin DNA Glykosylase) belegten die Bedeutung von Reparaturvorgängen bei der Entwicklung von zellulärer Resistenz gegenüber alkylierenden Agentien (Jeggo *et al.*, 1978; Eversen & Seeberg, 1982; Karran *et al.* 1982).

Nach der Klonierung einer Reihe von DNA-Reparatur-Genen wurde durch deren Transfektion in Zell-Linien oder in primäre (Stamm-) Zellen der Beitrag der einzelnen Proteine zum Resistenz-Verhalten genauer geklärt (Nakabeppu *et al.*, 1984; McCarthy & Lindahl, 1985; Tanaka *et al.*, 1989; Kataoka *et al.*, 1986). Bei etablierten Linien, aber auch bei transgenen oder „Knockout“-Mäusen waren Veränderungen entlang aller bisher bekannten DNA-Reparaturwege häufig mit einer veränderten Chemosensibilität gegenüber DNA-reaktiven Agentien verknüpft (Selfridge *et al.*, 1982; McWhir *et al.*, 1993; Sobol *et al.*, 1996; Kawate *et al.*, 1998).

Zell-Linien mit erhöhter MGMT-Expression zeigten in der Regel eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber alkylierenden Agentien (Brent *et al.*, 1987; Dolan *et al.*, 1990; Gerson & Willson 1995). Umgekehrt führte eine funktionelle Depletion des zellulären MGMT-Pools häufig zu einer grösseren Chemosensibilität (Dolan *et al.*, 1991, 1993; Gerson *et al.*, 1993; Pegg, 1993). Weiterhin wurde gezeigt, daß auch der Ausfall anderer

Reparatur-assoziiertes Proteine mit einer veränderten Chemosensibilität der Zellen einhergeht. Dazu gehören die NER-Proteine ERCC1 (Cappelli *et al.*, 1995) und XP-A (Cleaver *et al.*, 1995), die 3-Methyladenin-DNA Glykosylase (Engelward *et al.*, 1996), die AP-Endonuklease HAP1 (Walker *et al.*, 1995), sowie die DNA Topoisomerase II  $\alpha$  (Eder *et al.*, 1995) und die DNA-Polymerase  $\beta$  (Sobol *et al.*, 1996).

Eine gesteigerte zelluläre Resistenz gegenüber der Chloroethyl-Nitrosoharnstoff-Verbindung CCNU oder gegenüber UV-Strahlung wurde bei einer erhöhten Expression der Gene ERCC1 bzw. XP-A beobachtet, deren Genprodukte an der Schadens-Erkennung und -Prozessierung im Verlauf der NER beteiligt sind (Cappelli *et al.*, 1995; Cleaver *et al.*, 1995). Eine Aktivitätszunahme einzelner DNA-Reparatur-Funktionen bedeutet aber nicht zwangsläufig eine erhöhte Chemoresistenz von Zellen. Die vermehrte Bildung von Proteinen, die frühe Schritte von Reparaturwegen (z.B. die Inzisions-Reaktion) katalysieren, kann umgekehrt sogar zur Sensibilisierung von Zellen gegenüber alkylierenden Agentien führen. Dies wurde gezeigt für die 3-Methyladenin-DNA Glykosylase MAG (Ibeanu *et al.*, 1992; Coquerelle *et al.*, 1995) und die AP-Endonuklease HAP1 (Walker *et al.*, 1995). Da die Defizienz für eine „späte“ Reparatur-Funktion, beispielsweise bei einem Verlust der DNA-Polymerase  $\beta$ , ebenfalls zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Alkylantien führte (Sobol *et al.*, 1996), liegt die Vermutung nahe, daß in erster Linie die Persistenz von DNA-Reparatur-Intermediaten für die Zytotoxizität DNA-reaktiver Substanzen und die Chemosensibilität von Zellen verantwortlich ist.

Somit sollte die Entstehung der zellulären Resistenz nicht unbedingt die Folge einer gesteigerten Expression früher oder einer verringerten Aktivität späterer Reparatur-Funktionen sein. Im Gegenteil wäre hier eine verkürzte Persistenz sekundär entstehender DNA-Strangbrüche zu erwarten, wie sie bei resistenten CLL-Lymphozyten in der Tat beobachtet wurde (Müller *et al.*, 1997). Ursächlich dafür könnten beispielsweise Funktionsverluste bei der Mismatch-Reparatur durch Ausfall wichtiger Erkennungs-Proteine (hMutS $\alpha$ , hMutS $\beta$  oder hMutL $\alpha$ ) sein. Zelluläre Resistenzen gegenüber Alkylantien (Chaney & Sancar, 1996) und Cisplatin (Aebi *et al.*, 1996; Fink *et al.*, 1998) konnten inzwischen auf MMR-Verluste zurückgeführt werden. Eindrucksvoll belegt werden konnte dieser Zusammenhang kürzlich auch an Mäusen mit einem Doppel-„knockout“ für Reparaturfunktionen: MGMT<sup>-/-</sup>-Tiere sind im Vergleich zum Wildtyp extrem empfindlich gegenüber der akut toxischen Wirkung DNA-methylierender Verbindungen. Bei Tieren mit dem zusätzlichen Ausfall des MMR-Weges (MGMT<sup>-/-</sup>; MLH1<sup>-/-</sup>) wird jedoch wieder die Wildtyp-Resistenz beobachtet (Kawate *et al.*, 1998).

### ***Lymphozyten von CLL-Patienten und von gesunden Spendern weisen ein unterschiedliches Reparatur-Verhalten auf***

Wie eben ausgeführt, konnte bislang noch nicht eindeutig geklärt werden, welche Reparatur-Proteine hauptsächlich für die großen interindividuellen Unterschiede bei der Prozessierung von DNA-Läsionen und für das Resistenz-Verhalten von Tumorzellen verantwortlich sind. Expressions-Analysen für einzelne Reparatur-Gene wurden an klinischem Zellmaterial bisher nur selten durchgeführt oder zeigten, wie beispielsweise im Falle des ERCC1-Proteins, widersprüchliche Resultate (Geleziunas *et al.*, 1991; Dabholkar *et al.*, 1992 und 1995; Bramson *et al.*, 1995).

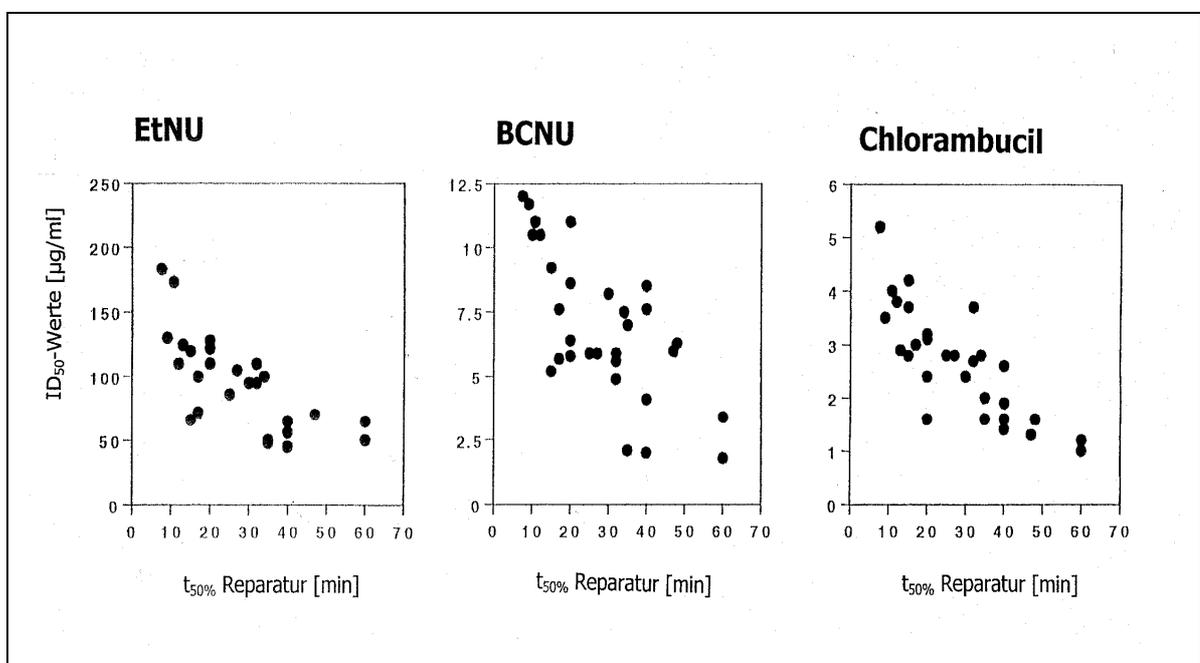
Verständlicher werden diese kontroversen Ergebnisse erst unter dem hier hervorgehobenen Aspekt, daß an der Reparatur von DNA-Alkylierungsschäden nicht nur ein einzelner Mechanismus beteiligt ist, sondern ein komplexes Netzwerk verschiedener, ineinandergreifender Prozesse. Derzeit ist noch nicht genau geklärt, ob für den gleichen Schadenstyp verschiedene Reparaturwege wirklich parallel benutzt werden oder ob erst bei ungenügender Ausprägung bzw. beim Ausfall eines Mechanismus (z. B. durch entsprechende Inhibitoren) Alternativ-Wege beschritten werden. Des weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit die großen inter-individuellen Unterschiede der Reparatur-Aktivitäten bei Lymphozyten gesunder Spender aufgezeigt (s. Abschnitt 2.3). Veränderungen im Reparaturphänotyp von Tumorzellen lassen sich daher eigentlich nur vor dem Hintergrund der Aktivitäten der entsprechenden Normalzellen richtig beurteilen.

Der direkte Vergleich von normalen und CLL-Lymphozyten aus dem peripheren Blut des gleichen Patienten war bishar nicht möglich, weil die Hämatopoese in der Regel so stark gestört ist, daß sich Normal-Lymphozyten nicht in ausreichender Zahl und Reinheit isolieren lassen. Der Gruppenvergleich zwischen den Zell-Proben von gesunden Spendern und CLL-Patienten zeigte jedoch deutliche Unterschiede in der DNA-Reparatur: CLL-Zellen wiesen, bei gleicher Primärschädigung (durch EtNU), im Mittel eine deutlich schnellere Prozessierung von DNA-Strangbrüchen auf (**Abb. 27**) und besaßen eine höhere Inzisions-Aktivität (**Abb. 6**). Welche spezielle Reparatur-Funktion diese beschleunigte Kinetik bestimmt, ist noch ungeklärt. Als zweiter auffälliger Unterschied zu normalen Lymphozyten fand sich bei CLL-Zellen eine erheblich größere Varianz in den relativen Beiträgen einzelner Reparaturwege (**Abb. 28**). Gedeutet werden kann diese Beobachtung ganz allgemein als Kontrollverlust in der Genexpression bei Tumorzellen.

## Gibt es eine kausale Beziehung zwischen der DNA-Reparaturkapazität und der Chemoresistenz bei CLL-Zellen ?

Auf der Basis der hier beobachteten großen Unterschiede im Reparatur-Verhalten bei individuellen Zellproben von CLL-Patienten stellt sich zunächst die Frage nach einer Korrelation dieses Parameters mit der zellulären Resistenz gegenüber der zytotoxischen Wirkung DNA-reaktiver Substanzen. Stellt man für einzelne Zellproben deren Reparaturkapazität (angegeben als Halbwertszeit der Strangbruchprozessierung;  $t_{50\%}$ ) ihrer Chemoresistenz gegenüber (angegeben als notwendige Konzentration der jeweiligen chemischen Verbindung für das Absterben der Hälfte der eingesetzten Zellen;  $ID_{50}$ ), so ergibt sich für die drei Alkylantien EtNU, BCNU und Chlorambucil jeweils eine signifikante Korrelation (**Abb. 33**). Zellen mit schneller Reparaturkinetik entgehen der zytotoxischen Wirkung dieser Substanzen in der Regel also besser, als solche, bei denen Reparaturintermediate länger persistieren. Dieser Zusammenhang ist insofern besonders bemerkenswert, als sich die DNA-Adduktspektren dieser drei Alkylantien deutlich voneinander unterscheiden (vgl. **Abb. 2**; Zeller, 1995).

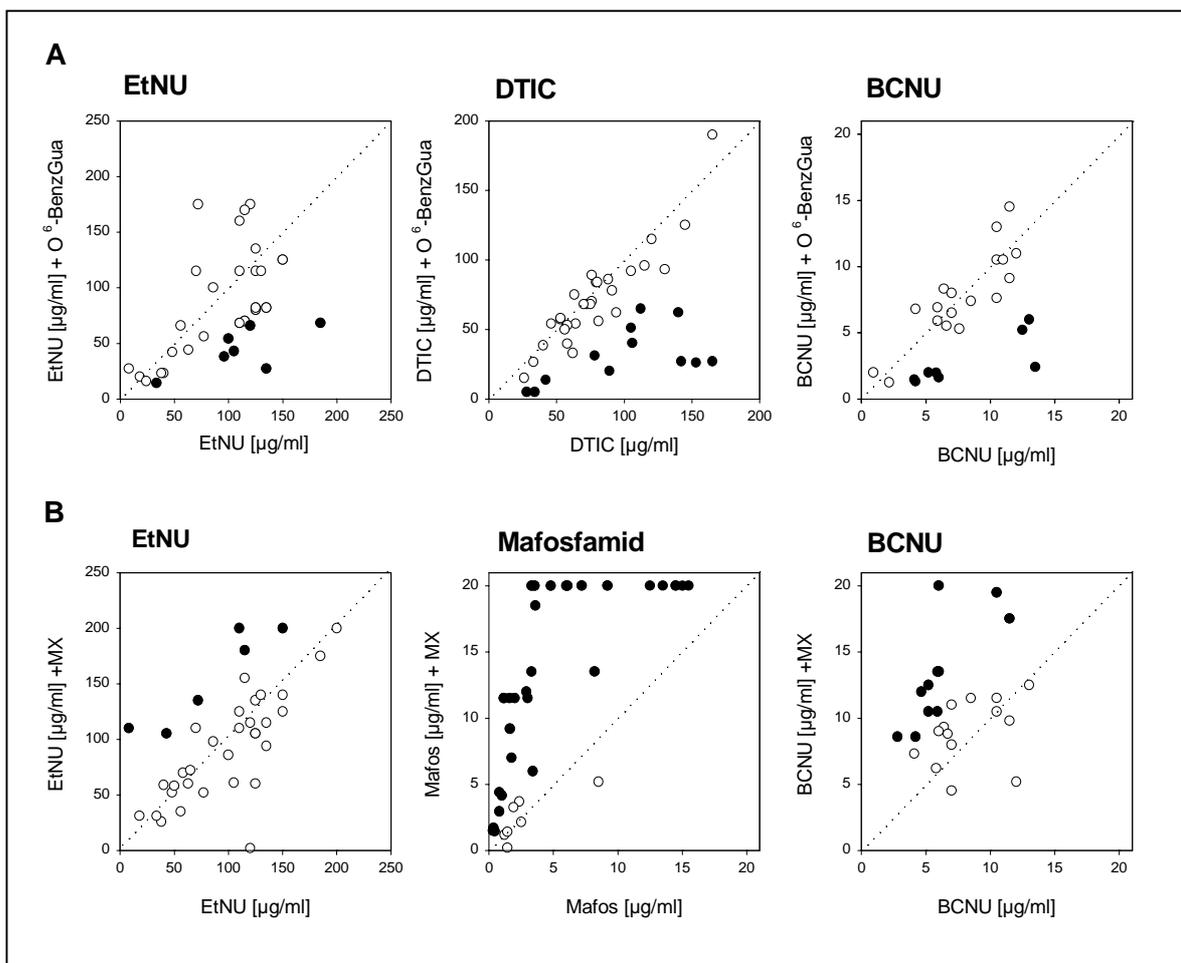
Eine Korrelation der Chemoresistenz von CLL-Zellen zum relativen Beitrag spezifischer Reparatur-Wege konnte auf diese Weise nicht gefunden werden. Erst der Einsatz von DNA-Reparatur-Modulatoren im Zytotoxizitäts-Test gibt hier weiteren Aufschluß.



**Abb. 33: Korrelation zwischen der DNA-Reparaturkapazität und der Chemosensibilität von CLL-Lymphozyten**

Für individuelle CLL-Proben ( $n \geq 26$ ) wurde die Geschwindigkeit der DNA-Strangbruch-Prozessierung nach EtNU (angegeben als  $t_{50\%}$ ; „Comet Assay“; s. Tab. 3) aufgetragen gegen die parallel gemessene *in vitro*-Zytotoxizität von EtNU, BCNU und Chlorambucil (angegeben als letale Dosis für 50% der Zellen [ $ID_{50}$ ]). Die Korrelationen der beiden Parameter ergaben  $r_s$  (Spearman Rank Korrelations-Koeffizient) = -0.71 für EtNU, -0.54 für BCNU und -0.69 für Chlorambucil (Müller *et al.*, 1997).

Bei Exposition gegenüber methylierenden, ethylierenden oder chloroethylierenden Agentien führte die Inaktivierung des MGMT-Proteins durch O<sup>6</sup>-Benzgua nicht nur zu erhöhten Strangbruchraten (vgl. **Abb. 22, 16, 17** und **24**), sondern bei etwa einem Drittel aller CLL-Proben auch zu einer Sensibilisierung gegenüber Alkylantien (**Abb. 35**; EtNU: 38.7%, 12/31; DTIC: 29.3%, 12/41; BCNU: 30.8%, 8/26). Diese Zellen verfügen offensichtlich über effiziente alternative Reparaturwege, die an persistierenden O<sup>6</sup>-AlkGua DNA Inzisions-Reaktionen induzieren. Bisher ungeklärt ist, welche Reparaturfunktion hierfür verantwortlich ist. Die entstandenen Strangbrüche scheinen jedoch ein erhebliches zytotoxisches Potential zu besitzen und an der Einleitung apoptotischer Prozesse beteiligt zu sein. Offen bleibt bei diesen Überlegungen zunächst, weshalb die übrigen CLL-Proben durch O<sup>6</sup>-Benzgua nicht sensibilisiert wurden. Als Ursachen denkbar wären hier ein zu geringer MGMT-Pool, das Fehlen eines Alternativ-Weges oder ein ungenügender Apoptose-Stimulus durch Reparatur-Intermediate.



**Abb. 34:** Einfluß von DNA-Reparatur-Modulatoren auf die Chemotherapie-Empfindlichkeit individueller CLL-Lymphozyten.

Unterschiedliche CLL-Lymphozyten wurden parallel zur Exposition gegenüber verschiedenen mono- und bifunktionellen Alkylantien mit einem DNA-Reparatur-Modulator (A: O<sup>6</sup>-Benzylguanin, 25 µM bzw. B: Methoxyamin, 5 mM) inkubiert. Die mit bzw. ohne Modulation gemessene lethale Dosis (ID<sub>50</sub>) wurde für die individuellen Proben aufgetragen (vgl. **Abb. 34**). Zellproben, deren Empfindlichkeit durch die parallele Gabe eines DNA-Reparatur-Modulators um den Faktor  $\geq 2$  verändert war, sind schwarz dargestellt.

Eine experimentelle Überprüfung dieser Möglichkeiten steht noch aus. Wichtig bleibt jedoch festzuhalten, daß sich aus den dargestellten Zusammenhängen zwischen Reparatur-induzierten DNA-Läsionen und der zytotoxischen Wirkung von Alkylantien für nicht-replizierende Zielzellen ganz neue Vorstellungen zum therapeutischen Wirkungsmechanismus entwickeln ließen.

Zusätzliche Unterstützung erhielt ein mögliches neues Therapiekonzept durch den (zunächst unverständlichen) Einfluß eines anderen Reparatur-Modulators auf die Zytotoxizität von Alkylantien: Wird die Prozessierung von DNA-Alkylierungsprodukten über den BER-Weg auf einer frühen Stufe, vor dem Inzisionsschritt, durch Methoxyamin (MX) unterbrochen, so nimmt nicht nur, wie erwartet, die Zahl der DNA-Strangbrüche ab (vgl. **Abb. 7, 18 und 22**), sondern die Lymphozyten werden in vielen Fällen auch deutlich resistenter, vor allem gegenüber der zytotoxischen Wirkung bifunktioneller Alkylantien. Eine Steigerung der zellulären Resistenz um den Faktor  $\geq 2$  wurde für monofunktionelle Agentien nur bei einem kleinen Teil der Zellproben gefunden, beispielsweise für EtNU bei 6 von 35 Proben. Demgegenüber wurde das zytotoxische Potential bifunktioneller Alkylantien durch MX im Falle von BCNU bei fast der Hälfte der Proben (11/25) und im Falle von Mafosfamid sogar bei 31 von 38 Proben (entspricht 80%!!) erheblich reduziert (Buschfort *et al.*, in Vorbereitung). Die Resistenzfaktoren bei Mafosfamid waren zum Teil  $\geq 10$ .

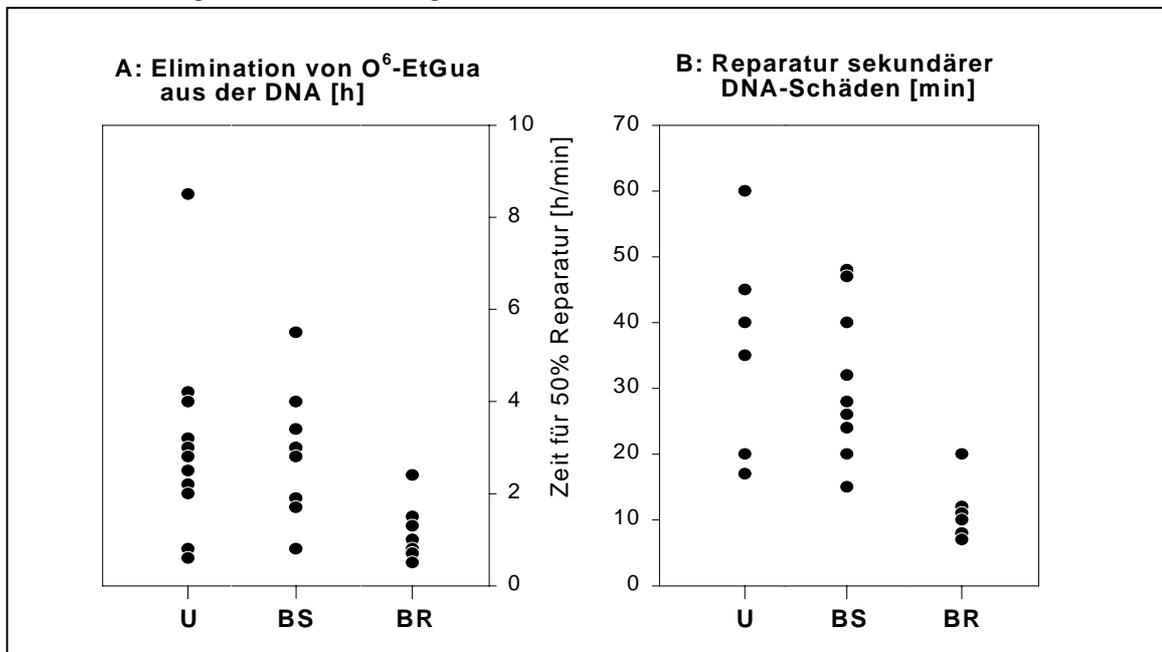
Diese Ergebnisse deuten auf den offensichtlich großen Anteil hin, den Intermediate des BER-Weges am zytotoxischen Potential von DNA-„crosslinkern“ vom Typ des Cyclophosphamids haben. Ebenso kann auch geschlossen werden, daß die zum Zelltod führenden DNA-Schäden hier nicht vorrangig die primären oder sekundären DNA-Alkylierungsprodukte selbst sind, sondern vielmehr die Zwischenstufen von DNA-Reparaturprozessen.

Da die chemoprotektive Wirkung von MX bei DNA-„crosslinkern“ besonders ausgeprägt war, bietet sich als Arbeitshypothese folgender Mechanismus an: Nach Ausbildung der kovalenten Strangverknüpfungen (über G - G bei Mafosfamid bzw. G - C bei BCNU) lösen Reparatur-Glykosylasen in beiden Strängen jeweils die N-glykosidische Bindung der modifizierten Basen, so daß gegenüberliegende abasische Stellen in der DNA entstehen. Diese können dann durch die Einwirkung von AP-Endonukleasen in (letale) Doppelstrangbrüche überführt werden. Die Stimmigkeit dieses Konzepts kann experimentell überprüft werden. Sollte es bestätigt werden, ließen sich darauf neue Wirkprinzipien aufbauen und gegebenenfalls neue, maßgeschneiderte Therapeutika entwickeln.

In diesem Zusammenhang erscheinen die sieben CLL-Proben, die nach dem BER-Block nicht mit einer erhöhten Mafosamid-Resistenz reagieren, besonders interessant. Es wäre denkbar, daß diese Zellen zu der Gruppe gehören, bei der ein kompletter Ausfall des BER-Weges vorliegt (vgl. **Abb. 28**). Allerdings reicht die Anzahl der bisher daraufhin untersuchten Proben für eine schlüssige Aussage noch nicht aus.

Die beobachtete Deregulation der einzelnen DNA-Reparaturwege bei CLL-Lymphozyten scheint somit unter bestimmten Voraussetzungen wichtig für die Chemosensitivität individueller Zellproben zu sein. Ob diese regulatorischen Veränderungen zu einer Resistenzbildung beitragen, bleibt offen. Notwendige Voraussetzung für eine Resistenzentwicklung der Zellen ist die Geschwindigkeit, mit der DNA-Reparatur-Intermediate prozessiert werden. Betrachtet man die DNA-Reparatur vor dem Hintergrund des klinischen Status der einzelnen CLL-Patienten, so sind bereits unter den noch unbehandelten Patienten auch solche zu finden, die über eine schnelle DNA-Reparatur verfügen. Erst bei den behandelten, über die Zeit resistent gewordenen Patienten sind ausschließlich solche des schnellen DNA Reparatur-Phänotyps zu finden (**Abb. 35**).

Diese Beobachtung verdeutlicht, daß die CLL-Zellen im Verlaufe der Resistenzbildung neben der u.U. notwendigen Entwicklung einer effizienteren DNA-Reparatur eine zweite Veränderung durchlaufen müssen. Ob diese beiden Veränderungen in kausalem Zusammenhang stehen ist bislang unklar.



**Abb. 35: Korrelation der individuellen DNA-Reparaturkapazität zum klinischen Bild einzelner CLL-Probanden**  
 Das klinische Bild der einzelnen untersuchten CLL-Probanden wurde zu einer Klassifizierung in Gruppen benutzt (U=unbehandelt; BS=behandelt, therapieempfindlich; BR=behandelt, resistent) und gegen die Ergebnisse der Untersuchungen zur individuellen DNA-Reparaturkapazität ( $t_{50\%}$ ) einzelner CLL-Lymphozytenproben gemessen mit Hilfe des ICA und des Comet-Assay aufgetragen.

### ***Welche Bedeutung könnte dem Mismatch-Reparaturweg für die Resistenzentwicklung zukommen?***

Es wird bislang davon ausgegangen, daß CLL-Zellen bereits *per se* über eine hohe Inzisionskapazität verfügen (**Abb. 6**). Eine sekundäre Veränderung dieser Zellen begleitet von einer verstärkten Resistenzentwicklung könnte in den späten, die Polymerisation und Ligation betreffenden Mechanismen der DNA-Reparatur zu finden sein. Betroffen sein könnte auch eine Veränderung der Regulation von DNA-Reparaturprozessen, u.U. begleitet von dem Ausfall einzelner DNA-Reparaturwege.

In diesem Zusammenhang gilt es zu prüfen, ob auch die MMR in CLL-Zellen aktiv ist und so einen Beitrag zur Resistenzentwicklung leisten kann. Bei einem Ausfall dieses Reparaturweges könnte der oben beschriebene „futile repair cycle“ nicht mehr stattfinden, bei dem Einschnitte präferenziell immer wieder an der Base gegenüber O<sup>6</sup>-EtGua stattfinden und für lang-persistierende DNA-Reparaturintermediate sorgen. Bislang wurde die Entstehung einer zellulären Resistenz gegenüber alkylierenden Agenzien bedingt durch eine fehlerhafte MMR nur für einige proliferative Tumorzellsysteme beschrieben (Liu *et al.*, 1996; Lage & Dietel, 1999; Humbert *et al.*, 1999). Begleitet wird das Fehlen des MMR vom Phänotyp der genomischen Instabilität („Microsatellite Instability“; MI) und der damit verbundenen erhöhten Replikationsfehlerrate („Replication Error“-Phänotyp; RER+). In primären Tumoren wurde dieser Phänotyp ursprünglich beim hereditären Nichtpolypösen Kolorektalkarzinoms (HNPCC) beobachtet, einer autosomal dominant vererbaren Tumorerkrankung des Darms. Für dieses Krankheitsbild wurde die Disfunktion unterschiedlicher MMR-Proteine beschrieben (Lynch, 1993; Modrich, 1994; Marra & Boland, 1995; Thomas *et al.*, 1996; Umar & Kunkel, 1999). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß auch andere primäre und sekundäre Tumorerkrankungen diesen Phänotyp (MI/RER+) aufweisen (**Tab. 6**).

Bei primären leukämischen Erkrankungen war der Anteil eines MMR-defizienten Phänotyps auffällig gering, dies galt sowohl für die akut myeloische ([AML] Tasaka *et al.*, 1996), als auch für die chronisch lymphatische Leukämie (Gartenhaus *et al.*, 1996). Anders sah das Verhältnis bei sekundären, nach massiver Chemotherapie entstandenen akuten Leukämien aus ([AML, ALL] Ben-Yehuda *et al.*, 1996).

Tab. 6: Untersuchungen zur Ausbildung eines MI/RER+ Phänotyps bei verschiedenen Tumorerkrankungen

Erkrankung	MI/RER+ [%]	Literatur
Sporadisches Kolonkarzinom	10-20	Ionov <i>et al.</i> , 1993 Aaltonen <i>et al.</i> , 1993
Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom	29	Wieland <i>et al.</i> , 1996
Primäre AML Primäre Myelodysplasie	< 2	Tasaka <i>et al.</i> , 1996
Sekundäre AML und ALL Sekundäre Myelodysplasie	94	Ben-Yehuda <i>et al.</i> , 1996
Chronisch lymphatische Leukämie	7	Gartenhaus <i>et al.</i> , 1996

Es gilt hier zu bedenken, daß bei den akuten Leukämien das Blutbild stark von peripheren Blasten überschwemmt ist, die undifferenziert und stark proliferativ sind. Im Gegensatz dazu liegen die CLL-Lymphozyten ausschließlich in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase vor. Dies ließe vermuten, daß diese Zellen nicht über ein postreplikativ aktives MMR-System verfügen. Es wäre also denkbar, daß im Falle der CLL der MI/RER+ Phänotyp in erster Linie auf eine maligne Transformation der Stammzellen hinweist, die die Resistenzentwicklung der peripheren Lymphozyten aber nicht beeinflusst. Andererseits besteht aber hypothetisch auch die Möglichkeit, daß die in einer kleinen Gruppe der CLL beobachtete Deregulation der DNA-Reparaturprozesse doch auf ein Fehlen der MMR beruht und ihr eine wesentliche Rolle hinsichtlich der Therapieempfindlichkeit zukommt.

Verschiedene Ansätze zur Prüfung dieser Frage werden z.Z verfolgt. Sollte sich herausstellen, daß der Ausfall der MMR auch bei ruhenden Zellen von kritischer Bedeutung ist, so könnten Strategien der Wiederherstellung dieses DNA-Reparaturweges entwickelt werden.

***Ausblick: Unter Berücksichtigung individueller DNA-Reparaturdaten könnte eine individuelle Therapie für einige CLL-Probanden geeigneter erscheinen***

Die vorliegenden Untersuchungen zum Beitrag der DNA-Reparatur am Bild der zellulären Resistenz und der Entwicklung des Krankheitsbildes von CLL-Patienten haben gezeigt, daß bei der Therapie dieser Patienten noch nicht alle Möglichkeiten ausgeschöpft werden. Dringend notwendig erscheint ein besseres Verständnis der molekularen Wirkungsmechanismen DNA-reaktiver Anti-Tumormedikamente (Schadensspektrum und biologische Folgereaktionen), sowie eine gezielte, individualisierte Auswahl von Zytostatika (und ihrer Kombinationen) aufgrund funktioneller Messungen (z.B. von DNA-Reparaturmechanismen) an Tumorzellen.

Da *in vitro* gezeigt werden konnte, daß die DNA-Reparatur einen großen Beitrag an der Entwicklung einer zellulären Resistenz der Tumorzellen leistet, sollte eine individualisierte Therapie insbesondere für solche Patienten vorteilhaft sein, die über eine schnelle DNA-Reparatur verfügen und zudem als resistent gelten. Eine Modulation der individuellen DNA-Reparatur könnte hier zur Resistenz-Überwindung beitragen.

Für den Einsatz im klinischen Bereich eignen sich als pharmakologische DNA-Reparaturmodulatoren wahrscheinlich eher kleine Moleküle. Deshalb würde die Suche nach neuen spezifischen Inhibitoren für definierte (DNA-Reparatur-) Mechanismen beispielsweise in Bibliotheken chemischer Verbindungen („random synthesis libraries“) von besonderer Bedeutung sein. Außerdem könnte der Einsatz „maßgeschneiderter“ Ribozyme zur Modulation spezifischer DNA-Reparaturwege für die Therapie nutzbringend sein. Ribozyme wurden entwickelt, spezifische mRNA Moleküle zu erkennen und zu spalten, um einzelne Gen-Funktionen auszuschalten (Krueger, 1995; Jones & Sullinger, 1997; Hampel, 1998). Besonders in der AIDS-Therapie wurden verschiedene Ribozyme entwickelt, die insbesondere darauf abzielten, die Replikation des HIV-1 in T-Lymphozyten zu unterdrücken (Zhou *et al.*, 1997; Duan *et al.*, 1997; Poznansky *et al.*, 1998). Darüber hinaus gelang es bereits in Modell-Ansätzen, Onkogen-Transkripte zu spalten und dadurch (*BCR/ABL*-abhängige) Protein-Kinase-Aktivitäten (Leopold *et al.*, 1996) oder das (*erbB-2*-abhängige) Tumor-Wachstum stark zu verringern (Juhl *et al.*, 1997; Wiechen *et al.*, 1998).

Nach einer Identifizierung definierter DNA-Reparaturschritte bzw. -Komponenten, die für die zytostatische oder zytotoxische Wirkung von besonderer Bedeutung sind, sollte eine gezielte Manipulation dieser Parameter erfolgen. Diese könnte entweder im Sinne einer Sensibilisierung der Tumorzellen geschehen, z.B. durch die Ausschaltung „kritischer Gene“ oder einer Protektion des Normalgewebes. Um die Validität des jeweiligen Ansatzes zu prüfen, könnten solche Eingriffe zunächst mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten funktionellen Messungen *in vitro* erfolgen. So könnte eine „individuell zugeschnittene“ Chemotherapie zu einem verbesserten Therapieerfolg beitragen.

## ***4 Zusammenfassung***

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Bedeutung DNA-Reparaturprozesse für die Empfindlichkeit humaner Tumorzellen gegenüber DNA-reaktiven Chemotherapeutika haben. Dazu wurden zunächst zwei Analyseverfahren etabliert, die eine quantitative Bestimmung der DNA-Reparaturkapazität auf der Ebene einzelner Zellen erlaubten: die immunzytochemische Analyse (ICA) zur Messung spezifischer DNA-Alkylierungsprodukte und die Einzelzell-Gelelektrophorese („Comet Assay“) zur Bestimmung Reparatur-induzierter DNA-Strangbrüche.

Funktionelle Messungen an humanen Normal-Lymphozyten, die *ex vivo* mit einem Standard-Alkylanz (EtNU) behandelt wurden, wiesen auf eine nur geringe inter-zelluläre aber eine große inter-individuelle Varianz der DNA-Reparaturkapazität hin. Der Beitrag spezifischer Mechanismen bei der Prozessierung von EtNU-induzierten DNA-Läsionen wurde durch die funktionelle Blockierung einzelner Reparaturwege ermittelt.

Als Untersuchungsmodell einer malignen Erkrankung, bei der die Resistenzentwicklung gegen Alkylantien ein großes klinisches Problem darstellt, wurde die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) gewählt. Homogene Populationen monoklonaler primärer Tumorzellen sind aus dem peripheren Blut von Patienten als CLL-Lymphozyten verfügbar. Auch hier fand sich, ähnlich wie bei normalen Lymphozyten, eine große Bandbreite individueller Reparaturkapazitäten, sowohl für initiale DNA-Alkylierungsschäden als auch für die Prozessierung von sekundären Strangbrüchen. Extreme individuelle Unterschiede im relativen Beitrag einzelner Reparaturwege weisen aber auf einen Verlust von stringenter Regulation in diesem komplexen Netzwerk bei Tumorzellen hin.

Die Analyse dieser Daten mit parallel durchgeführten Zytotoxizitätsbestimmungen zeigte, daß die Reparatur-Halbwertszeiten für DNA-Läsionen bei CLL-Lymphozyten signifikant korrelieren mit deren *in vitro*-Chemosensitivität gegenüber einer Reihe von Alkylantien, die unterschiedliche Muster von DNA-Schäden induzieren. Dieser Befund legt einen kausalen Zusammenhang zwischen zellulärer Reparaturkapazität und dem Chemosensitivitätsprofil von Tumorzellen nahe.

Ein Hinweis auf die klinische Bedeutung der zellulären DNA-Reparaturkapazität für das therapeutische Ansprechen der CLL ergibt sich aus der Beobachtung, daß alle Zellproben von Patienten, die nicht mehr auf eine Alkylantien-Therapie mit Chlorambuzil ansprachen, ausnahmslos einem sehr schnellen Reparaturphänotyp zugeordnet waren.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse weisen hin auf neue molekulare Angriffspunkte für eine Resistenzüberwindung (beispielsweise durch pharmakologische Reparaturmodulatoren) und auf Möglichkeiten einer Labor-gestützten individualisierten Tumorthherapie.

## 5 LITERATUR

- Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J.-P., Jarvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., Hamilton, S.R., Petersen, G.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. & de la Chapelle, A. (1993) Clues of the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, **260**, 812-816.
- Adamkiewicz, J., Eberle, G., Huh, N., Nehls, P. & Rajewsky, M.F. (1985) Quantitation and visualization of alkyl-deoxynucleosides in the DNA of mammalian cells by monoclonal antibodies. *Environ. Health Perspect.*, **62**, 49-55.
- Aebi, S., Kurdi-haidar, B., Gordon, R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R.D., Boland, C.R., Koi, M., Fishel, R. & Howell, S.B. (1996) Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res.*, **56**, 3087-3090.
- Baer, J.C., Freeman, A.A., Newlands, E.S., Watson A.J., Rafferty, J.A. & Margison, G.P. (1993) Depletion of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells. *Br. J. Cancer*, **67**, 1299-1302.
- Barrett, J.M. & Hill, B.T. (1998) DNA repair mechanisms associated with cellular resistance to antitumor drugs: potential novel targets. *Anticancer Drugs*, **9**, 105-23.
- Barrett, T.E., Savva, R., Panayotou, G., Barlow, T., Brown, T., Jiricny, J. & Pearl, L.H. (1998) Crystal structure of a G:T/U mismatch-specific DNA glycosylase: mismatch recognition by complementary-strand interactions. *Cell*, **92**, 117-129.
- Bender, K., Federwisch, M., Loggen, U., Nehls, P., & Rajewsky, M.F. (1996) Binding and repair of O<sup>6</sup>-ethylguanine in double-stranded oligodeoxynucleotides by recombinant human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase do not exhibit significant dependence on sequence context. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2078-2094.
- Ben-Yehuda, D., Krichevsky, S., Caspi, O., Rund, D., Polliack, A., Abeliovich, D., Zelig, O., Yahalom, V., Paltiel, O., Or, R., Peretz, T., Ben-Neriah, S., Yehuda, O., & Rachmilewitz, E.A. (1996) Microsatellite instability and p53 mutations in therapy related leukemia suggest mutator phenotype. *Blood*, **88**, 4296-4303.
- Beranek, D.T., Weis, C.C. & Swenson, D.H. (1980) A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis*, **1**, 595-606.
- Beranek, D.T. (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.*, **231**, 11-30.
- Bessho, T., Sancar, A., Thompson, L.H. & Thelen, M.P. (1997) Reconstitution of human excision nuclease with recombinant XPF-ERCC1 complex. *J. Biol. Chem.*, **272**, 3833-3837.
- Black, S.M. & Wolf, C.R. (1991) The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance. *Pharmacol. Ther.*, **51**, 139-154.
- Bosanquet, A.G. & Bell, P.B. (1996) Novel *ex vivo* analysis of nonclassical pleiotropic drug resistance and collateral sensitivity induced by therapy provides a rationale for treatment strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **87**, 1962-1971.
- Boyle, J.M., Margison, G.P. & Saffhill, R. (1986) Evidence of excision repair of O<sup>6</sup>-n-butyldeoxyguanosine in human cells. *Carcinogenesis*, **7**, 1987-1990.
- Bramson, J., McQuillan, A., Aubin, R., Alaoui-Jamali, M. & Batist, G. (1995) Nitrogen mustard drug resistant B-cell chronic lymphocytic leukemia as an *in vivo* model for crosslinking agent resistance. *Mutat. Res.*, **336**, 269-278.

- Brent, T.P., Houghton, P.J. & Houghton, J.A. (1985) O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity correlates with the therapeutic response of human rhabdomyosarcoma xenografts to 1-(2-chloroethyl)-3-(trans-4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2985-2989.
- Brent, T.P., Lestrup, S.O., Smith, D.G. & Remack, J.S. (1987) Formation of DNA-interstrand crosslinks by the novel chloroethylating agent 2-chloroethyl (methylsulfonyl)methanesulfonate: Suppression by O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase purified from human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res.*, **47**, 3384-3387.
- Brent, T.P., Dolan, M.E., Fraenkel-Conrat, H., Hall, J., Karran, P., Laval, L., Margison, G.P., Montesano, R., Pegg, A.E. & Potter, P.M. (1988) Repair of O-alkylpyrimidines in mammalian cells: A present consensus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1759-1762.
- Brittinger, G., Hellriegel, K.P. & Hiddemann, W. (1997) Empfehlungen einer Konsensuskonferenz zu Diagnose und Therapie chronischer lymphatischer Leukämie und Haarzell-Leukämie. *Onkologie*, **20**, 256-260.
- Bronstein, S.M., Skopek, T.R. & Swenberg, J.A. (1992) Efficient repair of O<sup>6</sup>-ethylguanine, but not O<sup>4</sup>-ethylthymine or O<sup>2</sup>-ethylthymines, dependent upon O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase and nucleotide excision repair activities in human cells. *Cancer Res.*, **52**, 2008-2011.
- Buschfort, C. & Witte, I. (1994) Induction and mechanism of DNA single- and double-strand breaks by tetracycline/Cu(II) in the absence of light. *Carcinogenesis*, **15**, 2927-2930.
- Buschfort, C., Müller, M.R., Seeber, S., Rajewsky, M.F. & Thomale, J. (1997) DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: Functional analysis at the single cell level. *Cancer Res.*, **57**, 651-658.
- Buschfort, C., Müller, M.R., Seeber, S., Rajewsky, M.F. & Thomale, J. (1999). Modulation of individual DNA repair processes in normal and malignant human lymphocytes by several DNA repair modifiers. (In Vorbereitung).
- Cabral-Neto, J.B., Cabral, R.E., Margot, A., Le Page, F., Sarasin, A. & Gentil, A. (1994) Coding properties of a unique apurinic/aprimidinic site replicated in mammalian cells. *J. Mol. Biol.*, **240**, 416-420.
- Caldecott, K.W., Aoufouchi, S., Johnson, P. & Shall, S. (1997) XRCC1 polypeptide interacts with polymerase  $\beta$  and possibly poly(ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' *in vitro*. *Nucleic. Acids Res.*, **24**, 4387-4394.
- Cappelli, E., Redaelli, A., Rivano, M.E., Abbondandolo, A. & Frosina, G. (1995) Repair of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea-induced damage by mammalian cell extracts. *Carcinogenesis*, **16**, 2267-2270.
- Cathcart, R. & Goldthwait, D.A. (1981) Enzymatic excision of 3-methyladenine and 7-methylguanine by a rat liver nuclear fraction. *Biochemistry*, **20**, 273-280.
- Chaney, S.G. & Sancar, A. (1996) DNA repair: Enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 1346-1360.
- Chao, C.C. (1996) Cross-resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) of a multidrug-resistant lymphoma cell line associated with decreased drug accumulation and enhanced DNA repair. *Eur. J. Pharmacol.*, **305**, 213-222.
- Charkravati, D., Ibeanu, G.C., Tano, K. & Mitra, S. (1991) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a human cDNA encoding the DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 15710-15715.

- Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M. & Roninson, I.B. (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, **47**, 381-389.
- Chen, F.X., Zhang, Y., Church, K.M., Bodell, W.J. & Gold, B. (1993) DNA crosslinking, sister chromatid exchange and cytotoxicity of *N*-2-chloroethylnitrosoureas tethered to the minor groove binding peptides. *Carcinogenesis*, **14**, 935-940.
- Cleaver, J.E. (1990) Specificity and completeness of inhibition of DNA repair by novobiocin and aphidicolin. *Carcinogenesis*, **3**, 1171-1174.
- Cleaver, J.E. & Morgan, W.F. (1991) Poly (ADP-ribose) polymerase: A perplexing participant in cellular responses to DNA breakage. *Nucleic Acids Res.*, **257**, 1-18.
- Cleaver, J.E., Charles, W.C., McDowell, M.L., Sadinsky, W.J. & Mitchell, D.L. (1995) Overexpression of the XPA repair gene increases resistance to ultraviolet radiation in human cells by selective repair of DNA damage. *Cancer Res.*, **55**, 6152-6160.
- Colvin, M., & Chabner, B.A. (1990) Alkylating agents. In: Chabner, B.A. & Collins, J.M. (eds.): *Cancer Chemotherapy: Principles and Practice*, Lippincott, Philadelphia, pp.276-314.
- Constantinou, A., Gunz, D., Evans, E., Lalle, P., Bates, P.A., Wood, R.D. & Clarkson, S.G. (1999) Conserved residues of human XPG protein important for nuclease activity and function in nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5637-5648.
- Coquerelle, T., Dosch, J. & Kaina, B. (1995) Overexpression of N-methylpurine-DNA glycosylase in Chinese hamster ovary cells renders them more sensitive to the production of chromosomal aberrations by methylating agents: a case of imbalanced DNA repair. *Mutat. Res.*, **336**, 9-17.
- Curt, G.A., Clendenin, N.J. & Chabner, B.A. (1984) Drug resistance and cancer. *Cancer Treatm. Rep.*, **68**, 87-99.
- Dabholkar, M.D., Bostick-Bruton, F., Weber, C., Bohr, V.A., Egwuagu, C. & Reed, E. (1992) ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, **84**, 1512-1517.
- Dabholkar, M.D., Berger, M.S., Vionnet, J.A., Egwuagu, C., Silber, J.R., Yu, J.J. & Reed, E. (1995) Malignant and nonmalignant brain tissues differ in their messenger RNA expression patterns of ERCC1 and ERCC2. *Cancer Res.*, **55**, 1261-1266.
- van Delft, J.H.M., van Winden, M.J.M., van den Ende, A.M.C. & Baan, R.A. (1993) Determinating N7-Alkylguanine adducts by immunochemical methods and HPLC with electrochemical detection: Application in animal studies and in monitoring human exposure to alkylating agents. *Environm. Health Persp.*, **99**, 25-32.
- de Laat, W.L., Sijbers, A.M., Odijk, H., Jaspers, N.G. & Hoeijmakers, J.H.J. (1998) Mapping of interaction domains between human repair proteins ERCC1 and XPF. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4146-4152.
- Demple, B., Herman, T. & Chem, D.S. (1991) Cloning and expression of *APE*, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11450-11454.
- Den Engelse, L., De Graaf, A., De Brij, R-J. & Menkveld, G.J. (1987) O<sup>6</sup>- and O<sup>4</sup>-ethylthymine and the ethylphosphotriester dTp(Et)dT are highly persistent DNA modifications in slowly dividing tissues of the ethylnitrosourea-treated rat. *Carcinogenesis*, **8**, 751-757.
- Dighiero, G. (1997) Chronic lymphocytic leukemia treatment. *Hematol. Cell Ther.*, **39**, 31-40.

- Doetsch, P.W. & Cunningham, R.P. (1990) The enzymology of apurinic/aprimidinic endonucleases. *Mutat. Res.*, **236**, 173-201.
- Dolan, M.E., Larkin, G.L., English, H.K. & Pegg, A.E. (1989) Depletion of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in mammalian tissues and human tumor xenografts in nude mice by treatment with O<sup>6</sup>-methylguanine. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **25**, 103-108.
- Dolan, M.E., Moschel, R.C. & Pegg, A.E. (1990) Depletion of mammalian O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase activity by O<sup>6</sup>-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5368-5372.
- Dolan, M.E., Mitchell, R.B., Mummert, C., Moschel, R.C. & Pegg, A.E. (1991) Effect of O<sup>6</sup>-benzylguanine analogues on the sensitivity of human tumor cells to the cytotoxic effect of alkylating agents. *Cancer Res.*, **51**, 3367-3372.
- Dolan, M.E., Pegg, A.E., Moschel, R.C. & Grindey, G.B. (1993) Effect of O<sup>6</sup>-benzylguanine on the sensitivity of human colon tumor xenografts to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU). *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 285-290.
- Dolan, M.E. (1996) Importance of DNA repair in cancer therapy. In: Schilsky, R.L., Milano, G.A. & Ratain, M.J. (eds.): *Principles of Antineoplastic Drug Development and Pharmacology*. Marcel Dekker, New York.
- Dragan, Y.P., Hully, J.R., Nakamura, J., Mass, M.J., Swenberg, J.A. & Pitot, H.C. (1994) Biochemical events during initiation of rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, **15**, 1451-1458.
- Drapkin, R., Sancar, A. & Reinberg, D. (1994) Where transcription meets repair. *Cell*, **77**, 9-12.
- Drummond, J.T., Genschel, J., Wolf, E. & Modrich, P. (1997) *DHFR/MSH3* amplification in methotrexate-resistant cells alters the human hMutS $\alpha$ /hMutS $\beta$  ratio and reduces the efficiency of base-base mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10144-10149.
- Duckett, D.R., Drummond, J.T., Murchie, A.I.H., Reardon, J.T., Sancar, A., Lilley, D.M.J. & Modrich, P. (1996) Human MutS $\alpha$  recognizes damaged DNA base pairs containing O<sup>6</sup>-methylguanine, O<sup>4</sup>-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6443-6447.
- Duan, L., Zhu, M., Ozaki, I., Zhang, H., Wei, D.L. & Pomerantz, R.J. (1997) Intracellular inhibition of HIV-1 replication using a dual protein- and RNA-based strategy. *Gene Ther.*, **4**, 533-543.
- Eberle, G. (1988) Monoklonale Antikörper gegen Kanzerogen-DNA-Addukte. Dissertation, Universität-Gesamthochschule Essen.
- Eder, J.P. Jr., Chan, V.T-W., Ng, S.W., Rizwi, N.A., Zacharoulis, S., Teicher, B.A. & Schnipper, L.E. (1995) DNA topoisomerase II  $\alpha$  expression is associated with alkylating agent resistance. *Cancer Res.*, **55**, 6109-6116.
- Eisenbrand, G., Berger, M.R., Brix, H.P., Fischer, J.E., Mühlbauer, K., Nowrousian, M.R., Przybilsky, M., Schneider, M.R., Stahl, W., Tang, W., Zelezny, O. & Zeller, W.J. (1986) Nitrosoureas. Modes of action and perspectives in the use of hormone receptor affine carrier molecules. *Acta Oncol.*, **28**, 203-211.
- Ellison, V. & Stillman, B. (1998) Reconstitution of recombinant human replication factor C (RFC) and identification of an RFC subcomplex possessing DNA-dependent ATPase activity. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5979-5987.
- Engelbergs, J. (1998) Zelltyp-spezifische Kanzerogenese durch N-Nitroso-Verbindungen: Bedeutung der Gen-spezifischen DNA-Reparatur für das Mutations- und Krebsrisiko. Dissertation, Universität-Gesamthochschule Essen.

- Engelbergs, J., Thomale, J., Galhoff, A. & Rajewsky, M.F. (1998) Fast repair of O<sup>6</sup>-ethylguanine, but not O<sup>6</sup>-methylguanine, in transcribed genes prevents mutations of H-ras in rat mammary tumorigenesis induced by ethylnitrosourea in place of methylnitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1635-1640.
- Engelward, B.P., Dreslin, A., Christensen, J., Huszar, D., Kurahara, C. & Samson, L. (1996) Repair-deficient 3-methyladenine DNA glycosylase homozygous mutant mouse cells have increased sensitivity to alkylation-induced chromosome damage and cell killing. *EMBO J.*, **15**, 945-952.
- Eversen, G. & Seeberg, E. (1982) Adaptation to alkylation resistance involves the induction of a DNA glycosylase. *Nature*, **296**, 773-775.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. & O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: A comprehensive review. *Mutat. Res.*, **339**, 37-59.
- Fang, W. & Modrich, P. (1993) Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction. *J. Biol. Chem.*, **268**, 11838-11844.
- Fink, D., Aebi, S., & Howell, S.B. (1998) The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin. Cancer Res.*, **4**, 1-6.
- Fishel, R. & Kolodner, R.D. (1995) Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 382-395.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R.W., Wilson, S.H. & Dogliotti, E. (1998) Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry*, **37**, 3575-80.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. & Siede, W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM, Washington, D.C.
- Gallagher, P.E. & Brent, T.P. (1984) Further purification and characterization of human 3-methyladenine-DNA glycosylase. Evidence for broad specificity. *Biochim. Biophys. Acta*, **782**, 394-401.
- Gartenhaus, R., John, M.M. III, Wang, P., Rai, K. & Sidransky, D. (1996) Mutator phenotype in a subset of chronic lymphatic leukemia. *Blood*, **87**, 38-41.
- Gentil, A., Cabral-Neto, J.B., Mariage-Samson, R., Margot, A., Imbachm, J.L., Rayner, B. & Sarasin, A. (1992) Mutagenicity of a unique apurinic/aprimidinic site in mammalian cells. *J. Mol. Biol.*, **227**, 981-984.
- Geleziunas, R., McQuillan, Malapetsa, Hutchinson, M., Kopriva, D., Weinberg, M.A., Hiscott, J., Bramson, J. & Panasci, L. (1991) Increased DNA synthesis and repair enzyme expression in lymphocytes from CLL patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, **83**, 557-564.
- Gerson, S.L., Trey, J.E., Miller, K. & Berger, N.A. (1986) Comparison of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis*, **7**, 745-749.
- Gerson, S.L., Zborowska, E., Norton, K., Gordon, N.H. & Willson, J.K. (1993) Synergistic efficiency of O<sup>6</sup>-benzylguanine and 1.3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) in a human colon cancer xenograph completely resistant to BCNU alone. *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 483-491.
- Gerson, S.L. & Willson, J.K. (1995) O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase, a target for the modulation of drug resistance. *Hematol. Oncol. Clin. Nat. Am.*, **9**, 431-50.
- van Gool, L., Meyer, R. Tobiasch, E., Cziepluch, C., Jauniaux, J.C., Mincheva, A., Lichter, P., Poirier, G.G., Buerkle, A. & Kuepper, J.H. (1997) Overexpression of human poly(ADP-ribose) polymerase in transfected hamster cells leads to increased poly(ADP-ribose) and cellular sensitization to irradiation. *Eur. J. Biochem.*, **244**, 15-20.

- van Gool, A.J., Citterio, E., Rademakers, S., van Os, R., Vermeulen, W., Constantinou, A., Egly, J.M., Bootsma, D. & Hoeijmakers, J.H.J. (1997) The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. *EMBO J.*, **16**, 5955-5965.
- Goth, R. & Rajewsky, M.F. (1972) Ethylation of nucleic acids by ethylnitrosourea-1-<sup>14</sup>C in the fetal and adult rat. *Cancer Res.*, **32**, 1501-1505.
- Griffin, S. & Karran, P. (1993) Incision by alkyltransferase G:T mispairs by extracts of mammalian cells occurs preferentially at cytosine methylation sites and is not targeted by a separate G:T binding reaction. *Biochemistry*, **32**, 13032-13013.
- Griswold, D.P., Corbett, T.H. & Schabel, F.M. (1981) Clonogenicity and growth of experimental tumors in relation to developing resistance and therapeutic failure. *Cancer Treatm. Rep.*, **2**, 51-54.
- Gu, L., Hong, Y., McCulloch, S., Watanabe, H. & Li, G.M. (1998) ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1173-1138.
- Hampel, A. (1998) The hairpin ribozyme: Discovery, two dimensional model, and development of gene therapy. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **58**, 1-39.
- Harris, A.L. & Hochhauser, D. (1992) Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. *Acta Oncol.*, **31**, 205-213.
- Hartley, J.A. (1993) Selectivity in alkylating agent-DNA interactions. In: Neidle, S. & Waring, M. (eds.): *Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA Interactions*. Macmillan Press, London.
- Haskell, C.M. (1990) *Drugs in Cancer Therapy*. Saunders, Philadelphia.
- Henneke, F., Kolmar, H., Bründl, K. & Fritz, H.-J. (1991) The *vsr* gene product of *E. coli* K-12 is a strand and sequence-specific DNA mismatch endonuclease. *Nature*, **353**, 776-778.
- Hochleitner, K. (1992) Verteilung und Reparatur des Kanzerogen-induzierten DNA-Alkylierungsproduktes O<sup>6</sup>-Ethyl-2'-Deoxyguanosin in spezifischen Gen-Sequenzen der Ratte. Dissertation, Universität-Gesamthochschule Essen.
- Hoeijmakers, J.H.J., Eker, A.P.M., Wood, R.D. & Robins P. (1990) Use of *in vitro* and *in vivo* assays for the characterization of mammalian excision repair and isolation of repair proteins. *Mutat. Res.*, **236**, 223-238.
- Humbert, O., Fiumicino, S., Aquilina, G., Branch, P., Oda, S., Zijno, A., Karran, P. & Bignami, M. (1999) Mismatch repair and differential sensitivity of mouse and human cells to methylating agents. *Carcinogenesis*, **20**, 205-214.
- Ibeanu, G., Hartenstein, B., Dunn, W.C., Chang, L.Y., Hofmann E., Coquerelle, T., Mitra, S. & Kaina, B. (1992) Overexpression of human DNA repair protein *N*-methylpurine-DNA glycosylase results in the increased removal of *N*-methylpurines in DNA without a concomitant increase in resistance to alkylating agents in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*, **13**, 1989-1995.
- Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colorectal carcinogenesis. *Nature*, **363**, 558-561.
- Jansen, J.G., de Groot, A.J., van Teijlingen, C.M., Lohman, P.H., Mohn, G.R., Vrieling, H. & van Zeeland, A.A. (1994A) Formation and persistence of DNA adducts in pouch skin fibroblasts and liver tissue of rats exposed *in vivo* to the monofunctional alkylating agents *N*-methyl-*N*-nitrosourea or *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. *Mutat. Res.*, **307**, 95-105.

- Jansen, J.G., Mohn, G.R., Vrieling, H., van Teijlingen, C.M., Lohman, P.H. & van Zeeland, A.A. (1994B) Molecular analysis of *hprt* gene mutations in skin fibroblasts of rats exposed *in vivo* to *N*-methyl-*N*-nitrosourea or *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. *Cancer Res.*, **54**, 2478-2485.
- Jansen, J.G., van Teijlingen, C.M., Mohn, G.R., van Zeeland, A.A. & Vrieling, H. (1994C) A:T base pairs are the main target for mutations at the *hprt* locus of rat skin fibroblasts exposed *in vitro* to the monofunctional alkylating agent *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. *Mutagenesis*, **9**, 417-421.
- Jansen, J.G., Vrieling H., van Teijlingen C.M.M., Mohn G.R., Tates A.D. & van Zeeland A.A. (1995) Marked differences in the role of O<sup>6</sup>-alkylguanine in *hprt* mutagenesis in T-Lymphocytes of rats exposed *in vivo* to ethylmethansulfonate, *N*-(2-hydroxyethyl)-*N*-nitrosourea or *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. *Cancer Res.*, **55**, 1875-1882.
- Jeggo, P.A., Defais, M., Samson, L. & Schendel, P. (1978) The adaptive response of *E. coli* to low levels of alkylating agent: the role of *polA* in killing adaptation. *Mol. Gen. Genet.*, **162**, 299-305.
- Jeggo, P.A. (1998a) DNA breakage and repair. *Adv. Genet.*, **38**, 185-218.
- Jeggo, P.A. (1998b) DNA repair: PARP- another guardian angel? *Curr. Biol.*, **8**, 49-51.
- Jones, J.T. & Sullinger, B.A. (1997) Evaluating and enhancing ribozyme reaction efficiency in mammalian cells. *Nature Biotechnol.*, **15**, 902-905.
- Juhl, H., Downing, S., Hsieh, S., Wellstein, A. & Czubayko, F. (1997) Ribozym-targeting reduziert die erb-B2 Expression bei SKOV-Karzinomzellen und inhibiert das Tumorstadium *in vivo*. *Langenbecks Arch. Chir. (Suppl.)*, **114**, 41-45.
- Judson, I.R. (1992) Understanding anticancer drug resistance: Opportunities for modulation and impact on new drug design. *Eur. J. Cancer*, **28**, 285-289
- Kaina, B., Lohrer, H., Karin, M. & Herrlich, P. (1990) Overexpressed human metallothionein IIA gene protects Chinese hamster ovary cells from killing by alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2710-2714.
- Karran P., Stevens, S. & Sedwick, B. (1982) The adaptive response to alkylating agents: the removal of O<sup>6</sup>-methylguanine from DNA is not dependent on polymerase 1. *Mutat. Res.*, **104**, 67-73.
- Karran P. & Bignami, M. (1992) Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2933-40.
- Karran P. & Bignami, M. (1994) DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *BioEssays*, **16**, 833-39.
- Kataoka, H., Hall, J. & Karran, P. (1986) Complementation of sensitivity to alkylating agents in *Escherichia coli* and Chinese hamster ovary cells by expression of a cloned bacterial DNA repair gene. *EMBO J.*, **5**, 3195-3200.
- Kawate, H., Ihara, K., Kohda, K., Sakumi, K. & Sekiguchi, M. (1995) Mouse methyltransferase for repair of O<sup>6</sup>-methylguanine and O<sup>4</sup>-methylthymine in DNA. *Carcinogenesis*, **16**, 1595-1602.
- Kawate, H., Sakumi, K., Tsuzuki, T., Nakatsuru, Y., Ishikawa, T., Takahashi, S., Takano, H., Noda, T. & Sekiguchi, M. (1998) Separation of killing and tumorigenic effects of an alkylating agent in mice defective in two of the DNA repair genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5116-5120.
- Kohn, K.W., Erickson, L.C., Ewig, R.A.G. & Friedman, C.A. (1976) Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry*, **15**, 4629-4637.
- Kohn, K.W. (1977) Interstrand cross-linking of DNA by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and other 1-(2-haloethyl)-1-nitrosoureas. *Cancer Res.*, **37**, 1450-1457.

- Krueger, R.J. (1995) Ribozymes: RNA as a therapeutic agent. *Am. Pharm.*, **35**, 12-13.
- Kuraoka, I., Morita, E.H., Saijo, M., Matsuda, T., Morikawa, K., Shirakawa, M. & Tanaka, K. (1996) Identification of a damaged-DNA binding domain of the XPA protein. *Mutat. Res.*, **362**, 87-95.
- Lage, H. & Dietel, M. (1999) Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **125**, 156-165.
- Leopold, L.H., Shore, S.K. & Reedy, E.P. (1996) Multi-unit anti-BCR-ABL ribozyme therapy in chronic myelogenous leukemia. *Leuk. Lymphoma*, **22**, 365-373.
- Lijinsky, W., Pegg, A.E., Anver, M.R., Moschel, R.C. (1994) Effects of inhibition of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase in rats on carcinogenesis by methylnitrosourea and ethylnitrosourea. *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 226-230.
- Lin, Y.L., Shivji, M.K., Chen C., Kolodner, R., Wood, R.D. & Dutta, A. (1998) The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1453-1461.
- Lindahl, T., Sedgwick, B., Sekiguchi, M. & Nakabeppu, Y. (1988) Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 133-157.
- Lindahl, T., Satoh, M.S. & Dianov, G. (1995) Enzymes acting at strand interruptions in DNA. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.*, **347**, 57-62.
- Lindahl, T., Karran, P. & Wood, R.D. (1997) DNA excision repair pathways. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **7**, 158-169.
- Link, C.J. Jr., Mitchell, D.L., Nairn, R.S. & Bohr, V.A. (1992) Preferential and strand-specific DNA repair of (6-4) photo-products detected by a photochemical method in the hamster *DHFR* gene. *Carcinogenesis*, **13**, 1975-1980.
- Lim, I.K., Dumenco, L.L., Hatzoglu, M., Hanson, R.W. & Gerson, S.L. (1990) Increased drug resistance following retroviral gene transfer of a chimeric *P*-enolpyruvate carboxykinase (GTP)-bacterial O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene into NRK cells. *Carcinogenesis*, **11**, 737-743.
- Liu, L., Markowitz, S. & Gerson, S.L. (1996) Mismatch repair mutations override alkyltransferase in conferring resistance to temozolomide but not to BCNU. *Cancer Res.*, **56**, 5375-5379.
- Liuzzi, M. & Talpaert-Borle, M. (1985) A new approach to the study of the base-excision repair pathway using methoxyamine. *J. Biol. Chem.*, **260**, 5252-5258.
- Loor, G., Zhang, S.-J., Zhang, P., Toomey, N.L. & Lee, M.Y.W.T. (1997) Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 5041-5046.
- Lynch, H.T., Smyrk, T.C., Watson, P., Lamspa, S.J., Lynch, J.F., Lynch, P.M., Cavalieri, R.J. & Boland, C.R. (1993) Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: An updated review. *Gastroenterology*, **104**, 1535-1549.
- Marie, J.P. (1995) Glutathione-S-transferases pi, alpha, mu and mdr1 mRNA expression in normal lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, **10**, 1742-1747.
- Marra, G. & Boland, C.R. (1995) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: The syndrome, the genes, and the historical perspectives. *J. Natl. Cancer Inst.*, **87**, 1114-1125.
- Martelli, A., Mattioli, F., Fazio, S., Andrae, U. & Brambilla, G. (1995) DNA repair synthesis and DNA fragmentation in primary cultures of human and rat hepatocytes exposed to cyproterone acetate. *Carcinogenesis*, **16**, 1265-1269.

- Matsuda, T., Saijo, M., Kuraoka, I., Kobayashi, T., Nakatsu, Y., Nagai, A., Enjoji, T., Masutani, K., Hanaoka, F., Yasui, A. & Tanaka, K. (1995) DNA repair protein XPA binds replication protein A (RPA). *J. Biol. Chem.*, **270**, 4152-4157.
- May, A., Nairn, R.S., Okumoto, D.S., Wassermann, K., Stevnsner, T., Jones, J.C., & Bohr, V.A. (1993) Repair of individual DNA strands in the hamster dihydrofolate reductase gene after treatment with ultraviolet light, alkylating agents, and cisplatin. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1650-1657.
- McCarthy, T.V. & Lindahl, T. (1985) Methyl phosphotriesters in alkylated DNA are repaired by the Ada regulatory protein of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 2683-2698.
- McWhir, J., Selfridge, J., Harrison, D.J., Squires & Melton, D.W. (1993) Mice with DNA repair gene (*ERCC-1*) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. *Nat. Genet.*, **5**, 217-224.
- Mellon, I., Spivak, G. & Hanawalt, P.C. (1987) Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian *DHFR* gene. *Cell*, **51**, 241-249.
- Modrich, P. (1994) Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science*, **266**, 1959-1960.
- Morrow, S.C. & Cowan, K.H. (1990) Glutathione-S-transferase and drug resistance. *Cancer cells*, **2**, 15-22.
- Moser, K. & Stacher, A. (1989) *Chemotherapie maligner Erkrankungen. Ein Leitfaden für Klinik und Praxis*. Dt. Ärzte-Verlag, Köln.
- Müller, R. & Rajewsky, M.F. (1978) Sensitive radioimmunoassay for detection of O<sup>6</sup>-ethyldeoxyguanosine in DNA exposed to the carcinogen ethylnitrosourea *in vivo* or *in vitro*. *Z. Naturforsch.*, **33c**, 897-901.
- Müller, R. & Rajewsky, M.F. (1983) Enzymatic removal of O<sup>6</sup>-ethylguanine versus stability of O<sup>4</sup>-ethylthymine in the DNA of rat tissues exposed to the carcinogen ethylnitrosourea: Possible interference of guanine-O<sup>6</sup> alkylation with 5-cytosine methylation in the DNA of replicating target cells. *Z. Naturforsch.*, **38c**, 1023-1029.
- Müller, M.R., Thomale, J., Lensing, C., Rajewsky, M.F. & Seeber, S. (1993) Chemosensitisation to alkylating agents by pentoxifylline, O<sup>6</sup>-benzylguanine and ethacrynic acid in haematological malignancies. *Anticancer Res.*, **13**, 2155-2160.
- Müller M.R., Seiler F., Thomale J., Buschfort C., Rajewsky M.F., and Seeber S. (1994) Capacity of individual chronic lymphatic leukemia lymphocytes and leukemic blast cells for the repair of O<sup>6</sup>-ethylguanine in DNA: Relation to chemosensitivity *in vitro* and treatment outcome. *Cancer Res.*, **54**, 4524-4531.
- Müller, M.R., Buschfort, C., Thomale, J., Lensing, C., Rajewsky, M.F. & Seeber, S. (1997) DNA repair and cellular resistance to alkylating agents in chronic lymphatic leukemia. *Clin. Cancer Res.*, **3**, 2055-2061.
- Nakabeppu, Y., Kondo, H. & Sekigushi, M. (1984) Cloning and characterization of the *alkA* gene of *Escherichia coli* that encodes 3-methyladenine DNA glycosylase II. *J. Biol. Chem.*, **259**, 13723-13729.
- Neddermann, P. & Jiricny, J. (1993) The purification of a mismatch-specific thymine-DNA glycosylase from HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21218-21224.
- Neddermann, P., Gallinari, P., Lettieri, T., Schmid, D., Truong, O., Husan, J.J., Wiebauer, K. & Jiricny, J. (1996) Cloning and expression of human G/T mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 12767-12774.
- Nehls, P. & Rajewsky, M.F. (1990) Monoclonal antibody-based immunoassay for the determination of cellular enzymatic activity for repair of specific carcinogen-DNA adducts (O<sup>6</sup>-alkylguanine). *Carcinogenesis*, **11**, 81-87.

- Noonan, K.E., Beck, C., Holzmayer, T.A., Chin, J.E., Wunder, J.S., Andrulis, I.L., Gazdar, I.L., Willman, C.L., Griffith, B., Von Hoff, D.D. & Roninson, I.B. (1990) Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7160-7164
- Nooter, K. & Herweijer, H. (1991) Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer. *Br. J. Cancer*, **63**, 633-669.
- Oberli-Schrämmli, A.E., Joncourt, F., Stadler, M., Altermatt, H.-J., Buser, K., Ris, H.-B., Schmid, U. & Cerny, T. (1994) Parallel assessment of glutathione-based detoxifying enzymes, O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase and P-glycoprotein as indicators of patients with lung cancer. *Int. J. Cancer*, 629-636.
- Oei, S.L., Griesenbeck, J., Ziegler, M. & Schweiger, M. (1998) A novel function of Poly(ADP-ribosyl)ation: Silencing of RNA polymerase II-dependent transcription. *Biochemistry*, **37**, 1465-1469.
- O'Regan N.E., Branch P., Macpherson P., and Karran P. (1996) hMSH2-independent DNA mismatch recognition by human proteins. *J. Biol. Chem*, **271**, 1789-1796.
- Ortquist, L., Maher, V.M., Lukash, L., Mah, M.C-M. Wang, Y-C. & McCormick, J.J. (1995) Effect of nucleotide excision repair (NER) and O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AGT) repair on the frequency and spectrum of mutations induced in human cells by ethylnitrosourea (ENU). *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, **36**, 160.
- Otterlei, M., Warbrick, E., Nagelhus, T.A., Haug, T., Slupphaug, G., Akbari, M., Aas, P.A., Steinsbekk, K., Bakke, O. & Krokan, H.E. (1999) Post-replicative base excision repair and replication. *EMBO J.*, **18**, 3834-3844.
- Palombo, F., Iaccarino, I., Nakajima, E., Ikejima, M. Shimada, T. & Jiricny, J. (1996) hMutS $\beta$ , a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Current Biol.*, **6**, 1181-1184.
- Pastan, I.H. & Gottesmann, M.M. (1988) In: DeVita, V.T., Hellman, S. & Rosenberg, S.A. (eds.): *Important Advances in Oncology*. Lippincott, New York, pp. 3-16.
- Pegg, A.E. (1990) Mammalian O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.*, **50**, 6119-29.
- Pegg, A.E. & Byers, T.L. (1992) Repair of DNA containing O<sup>6</sup>-alkylguanine. *FASEB J.*, **6**, 2302-2310.
- Pegg A.E. (1993) Mechanism of inactivation of human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase by O<sup>6</sup>-benzylguanine. *Biochemistry*, **32**, 11998-12006.
- Plosky, B.S., Schor, J.A., Schlaen, B.R., Magnotti, M.A., Engelward, B.P., Samson, L.D. & Scicchitano, D.A. (1999) Repair of alkylation damage in the absence of the alkyladenine DNA glycosylase. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, **40**, 699 (Abstr.)
- Prasad, R., Singhal, R.K., Srivastava, D.K. (1996) Specific interaction of polymerase  $\beta$  and DNA ligase I in a multiprotein base excision complex from bovine testis. *J. Biol. Chem.*, **271**, 16000-16007.
- Poznansky, M.C., Foxall, R., Mhashilkar, A., Coker, R, Jones, S., Ramstedt, U. & Marasco, W. (1998) Inhibition of human immunodeficiency virus replication and growth advantage of CD4+ T cells from HIV-infected individuals that express intracellular antibodies against HIV-1 gp120 or Tat. *Hum. Gene Ther.*, **9**, 487-496.
- Rajewsky, M.F., Augenlicht, L.H., Biessmann, R., Goth, R., Hülser, D.F., Laerum, O.D. & Lomakina, L.Y. (1977) Nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea in the rat: Molecular and cellular mechanisms. *Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation*, **4**, 709-726.

- Randerath, K., Randerath, E., Danna, T.F., van Golen, L. & Putman, K.L. (1989) A new sensitive  $^{32}\text{P}$ -postlabeling assay based on the specific enzymatic conversion of bulky DNA lesions to radiolabeled dinucleotides and 5'-monophosphates. *Carcinogenesis*, **10**, 1231-1239.
- Reed, J.C. (1998) Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.*, **25**, 11-18.
- Rosa, S. Fortini, P., Karran, P., Bignami, M. & Dogliotti, E. (1991) Processing *in vitro* of abasic site reacted with methoxyamine: A new assay for the detection of abasic sites *in vivo*. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5569-5574.
- Samson, L. (1992) The suicidal DNA repair protein methyltransferases in microbes. *Mol. Microbiol.*, **6**, 825-831.
- Samson, L., Han, S., Marquis, J.C. & Rasmussen, L.J. (1997) Mammalian DNA repair methyltransferases shield O<sup>4</sup>-MeT from nucleotide excision repair. *Carcinogenesis*, **18**, 919-924.
- Sassanfar, M., Dosanjh, M., Essigmann, J. & Samson, L. (1991) Relative efficiencies of the bacterial, yeast, and human DNA methyltransferases for the repair of O<sup>6</sup>-methylguanine and O<sup>4</sup>-methylthymine. *J. Biol. Chem.*, **266**, 2767-2771.
- Sato, W., Yusa, K., Naito, M. & Tsuruo, T. (1990) Staurosporine, a potent inhibitor of C-kinase, enhances drug accumulation in multidrug-resistant cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 1252-1257.
- Satoh, M.S., Huh, N., Rajewsky, M.F. & Kuroki, T. (1988) Enzymatic removal of O<sup>6</sup>-ethylguanine from mitochondrial DNA in rat tissues exposed to N-ethyl-N-nitrosourea *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6854-6856.
- Satoh, M.S. & Lindahl, T. (1992) Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*, **356**, 356-358.
- Sawyer, T.W., Gill, R.D., Smith-Oliver, T., Butterworth, B.E. & DiGiovanni, J. (1988) Measurement of unscheduled DNA synthesis in primary cultures of adult epidermal keratinocytes. *Carcinogenesis*, **9**, 1197-1202.
- Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H.J., Chambon, P. & Egli, J.-M. (1993) DNA repair helicase: A component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science*, **260**, 58-63.
- Schendel, P.F., Edington, B.V., McCarthy, J.G. & Todd, M.L. (1983) Repair of alkylation damage in *E. coli*. In: Friedberg, E.C. & Bridges, B.A. (eds.): *Cellular Responses to DNA Damage*. A.R. Liss, New York, pp. 227-240.
- Scicchitano, D.A. & Mellon, I. (1997) Transcription and DNA damage: A link to a kink. *Environ. Health Perspect.*, **105**, 145-153.
- Seiler, F., Kirstein, U., Eberle, G., Hochleitner, K. & Rajewsky, M.F. (1993) Quantification of specific DNA O-alkylation products in individual cells by monoclonal antibodies and digital imaging of intensified nuclear fluorescence. *Carcinogenesis*, **9**, 1907-1913.
- Selfridge, J., Pow, A.M., McWhir, W., Margin, T.M. & Melton, D.W. (1992) Gene targeting using mouse HPRT minigene/ HPRT-deficient embryonic stem cell system: inactivation of the mouse ERCC-1 gene. *Somatic Cell Mol. Genet.*, **18**, 325-336.
- Sibghat-Ullah & Day R.S. III. (1992) Incision at O<sup>6</sup>-methylguanine: Thymine mispairs in DNA of extracts of human cells. *Biochemistry*, **31**, 7998-8008.
- Sibghat-Ullah & Day R.S. III. (1993) DNA-substrate sequence specificity of human G:T mismatch repair activity. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1281-1287.

- Singer, B., Bodell, W.J., Cleaver, J.E., Thomas, G.H., Rajewsky, M.F. & Thon, W. (1978) Oxygens in DNA are main targets for ethylnitrosourea in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts and fetal rat brain cells. *Nature*, **276**, 85-88.
- Singh, N.P., Tice, R.R., Stephens, R.E. & Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, **175**, 184-191.
- Sitaram, A., Plitas, G., Wang, W. & Scicchitano, D.A. (1997) Functional nucleotide excision repair is required for the preferential removal of N-ethylpurines from the transcribed strand of the dihydrofolate reductase gene of Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 564-570.
- Skovgaard, T., Nielsen, D., Maare, CLL. & Wassermann, K. (1994) Cellular resistance to cancer chemotherapy. *Int. Rev. Cytol.*, **156**, 77-157.
- Sobol, R.W., Horton, J.K., Kühn, R., Singhal, R.K., Prasad, R., Rajewsky, K. & Wilson, S.H. (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase  $\beta$  in base excision repair. *Nature*, **379**, 183-186.
- Southern, E.M., Anand, R., Brown, W.R.A. & Fletcher, D.S. (1987) A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucleic. Acids Res.*, **15**, 5925-5943.
- Stigger, E., Drissi, R. & Lee, S.-H. (1998) Functional analysis of human replication protein A in nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.*, **273**, 9337-9343.
- Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S.H., Hubscher, U. & Dogliotti, E. (1998) Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene*, **17**, 835-43.
- Tanaka, K., Satokata, I., Ogita, Z., Uchida, T. & Okada, Y. (1989) Molecular cloning of a mouse repair gene that complements the defect of group-A xeroderma pigmentosum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4071-4075.
- Tantin, D., Kansal, A. & Carey, M. (1997) Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 6803-6814.
- Tasaka, T., Lee, S., Spira S., Takeuchi, S., Hatta, Y., Nagai, M., Takahara, J. & Koeffler, H.P. (1996) Infrequent microsatellite instability during the evolution of the myelodysplastic syndrome to acute myelocytic leukemia. *Leuk. Res.*, **20**, 113-117.
- Thomale, J., Huh, N., Nehls, P., Eberle, G. & Rajewsky, M.F. (1990) Repair of O<sup>6</sup>-ethylguanine in DNA protects rat 208F cells from tumorigenic conversion by N-ethyl-N-nitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9883-9887.
- Thomale, J., Seiler, F., Müller, M.R., Rajewsky, M.F. & Seeber, S. (1994a) Repair of O<sup>6</sup>-alkylguanines in the nuclear DNA of human lymphocytes and leucemic cells: Analysis at the single-cell level. *Br. J. Cancer*, **69**, 698-705.
- Thomale, J., Hochleitner, K. & Rajewsky, M.F. (1994b) Differential formation and repair of the mutagenic DNA alkylation product O<sup>6</sup>-ethylguanine in transcribed and nontranscribed genes of the rat. *J. Biol. Chem.*, **269**, 1681-1686.
- Thomas, D.C., Umar, A. & Kunkel, T.A. (1996) Microsatellite instability and mismatch repair defects in cancer cells. *Mutat. Res.*, **350**, 201-205.
- Tornaletti, S. & Pfeifer, G.P. (1994) Slow repair of pyrimidine dimers at *p53* mutation hotspots in skin cancer. *Science*, **263**, 1436-1438.
- Tu, Y., Bates, S. & Pfeifer, G.P. (1998) The transcription-repair coupling factor CSA is required for efficient repair only during the elongation stages of RNA polymerase II transcription. *Mutat. Res.*, **400**, 143-151.

- Umar, A. & Kunkel, T.A. (1996) DNA-fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur. J. Biochem.*, **238**, 297-307.
- Walker L.J., Craig B.E., Harris A.L. & Hickson I.D. (1995) A role for the human DNA repair enzyme HAP1 in cellular protection against DNA damaging agents and hypoxic stress. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4884-4889.
- Waters, R., Jones, C.J., Martin, E.A., Yang, A.-L. & Jones, N.J. (1992) The repair of large DNA adducts in mammalian cells. *Mutat. Res.*, **273**, 145-155.
- Wiebauer, K. & Jiricny, J. (1990) Mismatch-specific thymine DNA glycosylase and DNA polymerase  $\beta$  mediate the correction of G:T mismatches in nuclear extracts from human cells. *Proc. Natl. Sci. Acad. USA*, **87**, 5842-5845.
- Wiechen, K., Zimmer, C. & Dietel M. (1998) Selection of a high activity c-erbB-2 ribozyme using a fusion gene of c-erbB-2 and the enhanced green fluorescent protein. *Cancer Gene Ther.*, **5**, 45-51.
- Wieland, I., Ammermüller, T., Böhm, M., Totzeck, B. & Rajewsky, M.F. (1996) Microsatellite instability and loss of heterozygosity at the hMLH1 locus on chromosome 3p21 occur in a subset of nonsmall cell lung carcinomas. *Oncol. Res.*, **8**, 1-5.
- Wilson, S.H. (1998) Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta. *Mutat. Res.*, **407**, 203-215.
- Wood, R.D. & Shivij, M.K.K. (1997) Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eukaryotes? *Carcinogenesis*, **18**, 605-610.
- Zak, P., Kleibl, K. & Laval, F. (1994) Repair of O<sup>6</sup>-methylguanine and O<sup>4</sup>-methylthymine by the human and rat O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 730-733.
- Zeller, W.J. (1995) Allgemeine Tumorthherapie: Stickstoff-Lost-Derivate, Nitrosoharnstoffe, monofunktionelle und nicht-klassische Alkylantien. In: Zeller, W.J. & zur Hausen W. (eds.): *Onkologie*. Ecomed Verlagsgesellschaft, München.
- Zhou, CLL., Bahner, I.C. Larson, G.P., Zaia, J.A., Rossi, J.J. & Kohn, E.B. (1994) Inhibition of HIV-1 in human T-lymphocytes by retrovirally transduced anti-tat and rev hammerhead ribozymes. *Gene*, **149**, 33-39.

## 6 ANHANG

### 6.1 Verwendete Materialien

#### 6.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

*N*-Ethyl-*N*-Nitrosoharnstoff (EtNU) und *N*-Methyl-*N*-Nitrosoharnstoff (MeNU) wurden von Serva, Heidelberg; 4-{4-[Bis(2-chloethyl)amino]phenyl}buttersäure (**Chlorambucil**), 5-(3,3-Dimethyl-1-triazeno-)imidazol-4-carboamid (**DTIC**) und 1,3-Bis-(2-Chloroethyl)-1-Nitrosoharnstoff (**BCNU**) von Bristol-Myers, Tübingen, bezogen (Strukturformeln und Reaktionsmechanismen, siehe **Abb. 2**). **Methoxyamin** (MX) und **Aphidicolin** (APH) stammten von Sigma, Deisenhofen. **O<sup>6</sup>-Benzylguanin** (O<sup>6</sup>-Benzgua) wurde synthetisiert von Herrn Chem. Ing. Wolfgang Drosdziok, Institut für Zellbiologie (Tumorforschung).

**PM2 DNA** (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH 7.5) wurde in gereinigter Form mit <0.2 DNA-Einzelstrangbrüchen von Frau PD Dr. Irene Witte, Arbeitsgruppe Biochemie, Universität Oldenburg bezogen.

**Monoklonale Antikörper** (MAK): Die DNA-Addukt-spezifischen MAK „EM-2-3“ (Maus anti [O<sup>6</sup>-Alkyl-2'-Desoxyguanosin]), „ER-6“ (Ratte anti [O<sup>6</sup>-Alkyl-2'-Desoxyguanosin]) und „ER-17“ (Ratte anti [O<sup>6</sup>-Alkyl-2'-Desoxyguanosin]) (Bindungsspezifitäten, siehe Eberle, 1989), wurden in Zellkultur-Überständen der entsprechenden Hybridom-Zelllinien in der „Laboreinheit Monoklonale Antikörper“ des Instituts für Zellbiologie (Tumorforschung) hergestellt. Vor dem Einsatz wurden die MAK über Mono Q und Mono S Säulen (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gereinigt und die MAK-Konzentrationen mit Hilfe eines RIA (Müller & Rajewsky, 1978) bestimmt.

**Zweit-Antikörper** (jeweils als IgG F[ab]<sub>2</sub>-Fragmente): Für den ISB-Test wurden [<sup>125</sup>I]-markierte Ziege anti [Ratten-IgG] Antikörper verwendet (Amersham-Buchler, Braunschweig). Für den ICA-Test wurden Rhodamine-Isothiocyanat (TRITC)-markierte Ziege anti [Maus-IgG] bzw. Ziege anti [Ratten-IgG] Antikörper eingesetzt (Dianova, Hamburg).

Die **Enzyme** RNase T1 und RNase A sowie Proteinase K wurden bezogen von Boehringer-Mannheim, Mannheim.

Die **DNA Farbstoffe** 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) und Ethidiumbromid, sowie [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)]-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) wurden von Merck (Darmstadt), SYBR<sup>TM</sup> Green I von MoBiTec (Göttingen) bezogen.

Die **Agarosen** Seakem LE und NuSieve GTG für die Einzelzell-Elektrophorese und Biozyme DNA Agarose für den Plasmid-Relaxations-Assay stammten von FMC Bioproducts, Biozyme, Hameln.

**Verbrauchs-Chemikalien** wie Silikonlösung, Titriplex II (EDTA), Tris, HEPES, EGTA, Dimethylsulfoxid (DMSO), Glycerin (97%), NP40, Saccharose, MgCl<sub>2</sub>, DTT und PMSF wurden von Merck (Darmstadt) bezogen. NaCl, NaOH, , Bromphenolblau, Xylencyanol, Triton-X-100, DNase freies Rinderserumalbumin (BSA), Morpholin-Ethan-Sulfonsäure (MES) und MOPS stammten von Serva (Heidelberg), Elvanol, n-Laurylsarcosin, Natrium-Dodecylsulfat (SDS), Benzamidin, Pepstatin A, Leupeptin, 1,4,-Dithioerythriol (DTE), β-Mercaptoethanol von Sigma (Deisenhofen). Sämtliche Substanzen wiesen mindestens den Reinheitsgrad „pro analysi“ (p.a.) auf.

**Verbrauchs-Materialien:** Dialyse-Schläuche wurden von Serva (Heidelberg), Szintillationsflüssigkeit „Ready-Safe“ von Beckman Instruments (München), Röntgenfilme von Fuji, Sterilfilter und Nitrocellulose-Membran BA 85 von Schleicher & Schuell (Dassel) und Mikrotiterplatten von Greiner (Nürtingen) bezogen. Zellkultur-Röhrchen, -Platten und -Flaschen stammten von Renner (Konstanz), Nunc (Wiesbaden) und Falcon (Heidelberg).

## 6.1.2 Puffer und Lösungen

### 6.1.2.1 Puffer und Lösungen für die Nitrosoharnstoffe

EtNU und MeNU wurden nach dreifacher Rekristallisierung als Stamm-Lösung in DMSO (100mg/ml) bei -20°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die Konzentration spektrophotometrisch in MES-Puffer bestimmt. BCNU wurde vor jedem Experiment frisch in Ethanol gelöst.

Die DNA-Reparatur-Modulatoren wurden als Stammlösungen hergestellt und bei -20°C aufbewahrt: MX in Na-Phosphat-Puffer (100mM, pH 7.25), O<sup>6</sup>-BeGua in Ethanol (25mM), APH in DMSO (140mM).

#### MES-Puffer

(pH 7.25) 60mM NaCl  
1mM 2-Morpholin-Ethan-Sulfonsäure  
0.5mM EDTA;

#### MOPS-Puffer

(pH 6.0) 50 mM MOPS  
0,5 mM EDTA  
60 mM NaCl

### 6.1.2.2 Lösungen und Medien für die Zellkultur

RPMI-1640 Medium sowie Trypsin-Lösung (2.5g/l in PBS) wurden von Gibco (Eggenstein) bezogen, fötales Kälber-Serum von Seromed (Berlin), Trypanblau-Färbelösung, Glutamin, Pyruvat und essentielle Aminosäuren von Merck (Darmstadt).

#### PBS

(pH 7.25) 137mM NaCl  
2.7mM KCl  
8.1mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### PBS<sup>++</sup>

PBS mit 0.9mM CaCl<sub>2</sub>  
0.49mM MgCl<sub>2</sub>

#### Alkylierungspuffer

PBS<sup>++</sup> mit 25mM HEPES

### 6.1.2.3 Puffer und Lösungen für biochemische Zwecke

#### 6.1.2.3A DNA Relaxations-Assay

##### Na-Phosphat-Puffer

(pH 7.25) 100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

##### Reaktions-Puffer

(pH 7.25) 100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
20% Glycerin  
0.5mM DTT  
0.5mM PMSF

##### Elektrophorese-Puffer

(pH 7.2) 89mM Tris-HCl  
8.9mM EDTA

##### Stop-Lösung

15% (v/v) Ficoll  
3% (w/v) SDS  
0.25% (w/v) Bromphenolblau  
0.25% (w/v) Xylolecyanol FF  
6mM EDTA

#### 6.1.2.3B Kernprotein-Extraktion

##### Lyse-Puffer

(pH 8.5) 0.6% NP40  
300mM Sucrose 10mM HEPES  
1mM EDTA  
1.5mM MgCl<sub>2</sub>  
0.5mM DTT  
0.5mM PMSF  
0.1mM Benzamidin  
0.1mM Pepstatin A  
0.1mM Leupeptin

##### Elutionspuffer

25% Glycerin  
0.5M NaCl  
10mM HEPES  
0.1mM EDTA  
0.1mM EGTA  
1.5mM MgCl<sub>2</sub>  
0.5mM DTT  
0.5mM PMSF  
0.1mM Benzamidin  
0.1mM Pepstatin A  
0.1mM Leupeptin

##### Dialyse-Puffer

20% Glycerin  
50mM NaCl  
10mM HEPES  
0.5mM DTT  
0.5mM PMSF  
0.1mM Benzamidin  
0.1mM Pepstatin A  
0.1mM Leupeptin

#### 6.1.2.3C Immun-histologische Färbung

##### Schutzlösung

Rezeptur der Firma Euro-Immun, Lübeck, unter Vorbehalt der Geheimhaltung, erhalten; enthält PBS, BSA und Sucrose.

##### 2xSSC

(pH 7.2) 300mM NaCl  
30mM Trinartriumcitrat

##### Eindecklösung

in PBS<sup>++</sup> 50mM Tris-HCl  
33mM DTE  
30% (v/v) Glycerin  
10% (w/v) Elvanol

### 6.1.2.3D Einzelzell-Gelelektrophorese

#### Lyse-Puffer

(pH 10) 2.5M NaCl  
100mM EDTA  
10mM Tris  
1% (w/v) n-Laurylsarkosin  
10% (v/v) DMSO  
1% (v/v) Triton-X-100

#### Elektrophoreselösung

(pH 12) 300mM NaOH  
1mM EDTA

#### Neutralisations-Puffer

(pH 7.5) 0.4M Tris-HCl

### 6.1.3 Geräte

#### Bildanalyse:

Kamera: CCD Kamera (Photonics, Hamamatsu City, Japan) und Vier-Parameter Bildanalyse-Programm (ACAS, Ahrens Cytometry Analysis System; Ahrens Electronics, Bargteheide).

Auto-Imager (ray-test; Shimadzu).

Dünnschicht-Scanner „Dual Wavelength TLC-Scanner CS-930“ (Shimadzu).

Elektrophorese Midi (Bio-rad), Power-Supply (Renner).

ELISA-Reader Dyantech 4000 (Dyantech, Hamburg).

Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer Wallac 1410 (Pharmacia).

#### FPLC-Anlage (Pharmacia):

Gradienten-Kontrolleinheit „Liquid Chromatography Controller LCC 500“; 2 FPLC-Pumpen „Pump P500“; UV-Durchflußphotometer „Single Path Monitor UV-1 (Optical Unit, Control Unit)“; Flachbettschreiber „REC-1“; Fraktionssammler „Frac-100“; Mixer; Motor-gesteuertes Injektionsventil „MV-7“; peristaltische Pumpe „P1“; Probenschleifen (10 ml, 50 ml); präparative FPLC-Kationen-Austauschersäule „Highload™ 26/10 S Sepharose®“; präparative FPLC-Anionen-Austauschersäule „Mono Q™ HR 10/10“.

Mehrfachfiltrations-Gerät (Hölzel) mit Vakuum-Pumpe „Vacuskan“ (Skan).

#### Mikroskopie:

Fluoreszenz Photo-Mikroskop (Axioplan, Zeiss)  
mit Lichtquelle: Quecksilberlampe HBO 100 W, Standard Filter-Kombination mit den Filtern Zeiss 2, Zeiss 14 und Zeiss 15.

Speed Vac-Konzentrator (Savant) mit Kühlfalle „Refrigerated Condensation Trap RT 100“ (Savant), Vakuum Pumpe „High Vacuum Pump Model Serial“ (Edwards) und Vorfilter „Model VPOF-100 (Savant).

Spektralphotometer „Modell 150-20“ (Hitachi).

Überkopfschüttler „Rotator Drive STR4“ (Stuart Scientific).

Ultrafiltrations-Rührzelle (Amicon).

Ultraschall-Desintegrator „B 12“ (Branson).

#### Zentrifugen:

„Refrigerated Superspeed Centrifuge Sorvall RC-5B“ (DuPont); „Minifuge T“ (Heraeus); „202 MK“ (Sigma); „Megafuge 1.0“ (Heraeus), „Tisch-Zentrifuge 5412“ (Eppendorf); Tisch-Zentrifuge „Christ“ (Heraeus).

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Zellkultur

#### 6.2.1.1 Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut

Lymphozyten wurden aus peripherem Blut isoliert. Heparinisiertes Blut (10 ml) wurde 1:2 in PBS<sup>++</sup> verdünnt, zur Dichte-Gradienten-Zentrifugation auf ein gleiches Volumen Ficoll-Hypaque® pipettiert und für 25 min (200 x g; RT) zentrifugiert. Die Lymphozyten wurden aus der Interphase entnommen, zweimal mit PBS gewaschen und in vorgewärmtem supplementiertem RPMI 1640-Medium resuspendiert. Die so gewonnene Zell-Fraktion bestand zu >90% aus Lymphozyten (Licht-Mikroskopie), waren zu >95% vital (Trypanblau-Färbung) und befanden sich zu >95 % in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase des Zell-Zyklus (FACS Analyse).

Bei allen klinischen Proben von Patienten wurde bei der ersten Untersuchung durch Immuno-Typisierung der Zell-Typ bestimmt. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden ausschließlich B-CLL-Zellen eingesetzt.

#### 6.2.1.2 Kultivierung der Zellen („liquid holding“)

Die Kultivierung der isolierten Zellen fand in H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre bei 5% CO<sub>2</sub> und 37° C statt. Das dazu verwendete RPMI 1640-Medium wurde supplementiert mit 10 % (v/v) fötalem Kälber-Serum, 1 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat, 1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren und 8 µg Refobazin/ ml.

Die Blutproben von Patienten wurden ausschließlich vor einer eventuellen Chemotherapie verwendet. Sie wurden jeweils frisch gewonnen und die Experimente am selben Tag durchgeführt.

#### 6.2.1.3 *In vitro*-Zytotoxizitätsmessung (MTT-Test)

Parallel zu den DNA-Reparatur-Messungen wurde für alle Lymphozyten-Proben ein *in vitro*-Chemosensibilitätstest durchgeführt. Die Zellen wurden dazu in 96-well Platten (5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro well) überführt und mit verschiedenen alkylierenden Agentien (EtNU, MNU, DTIC, Chlorambucil, BCNU) in serumfreiem Medium für 4 Tage bei 37°C kultiviert (jeweils ≥3 Parallel-Ansätze pro Konzentration).

## **6.2.2 *In vitro*-Alkylierung**

### **6.2.2.1 *In vitro*-Alkylierung von Plasmid-DNA**

Zu doppelsträngiger PM2 Plasmid-DNA (1  $\mu$ l; 140 ng/ $\mu$ l) wurde 1  $\mu$ l EtNU (aus der Stammlösung in MOPS-Puffer, auf pH 6 vorverdünnt), und 8  $\mu$ l Na-Phosphat-Puffer, pH 7.25, zugegeben und für 1 h bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde beendet durch Zugabe der Stop-Lösung (Verhältnis 1:6 v/v) und durch Überführen des Reaktionsansatzes auf Eis.

### **6.2.2.2 Alkylierung von Zell-Suspensionen**

Die zu behandelnden Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen, in 10 ml vorgewärmtem Alkylierungspuffer (pH 7.25) aufgenommen und als Suspension mit verschiedenen Alkylantien bei 37° C inkubiert. Die Standard-Expositionszeit war für EtNU und MeNU jeweils 20 min, für BCNU 60 min. Die Reaktion wurde durch Zufügen von kalter PBS<sup>++</sup> abgestoppt und die Zellen bei 4° C zentrifugiert, in supplementiertem, vorgewärmtem RPMI resuspendiert und weiter unter Zellkultur-Bedingungen inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots zur weiteren Auswertung entnommen.

## **6.2.3 Isolierung von Kernproteinen aus humanen Lymphozyten**

Kernproteine humaner Lymphozyten wurden wie folgt isoliert: Die Zellen wurden in PBS<sup>++</sup> (4° C) gewaschen, in Lyse-Puffer II 10 min lang bei 4° C inkubiert und dann zentrifugiert (10 min, 120 x g, 4° C). Diese Schritte wurden mit dem Sediment wiederholt und die pelletierten Kerne in Elutions-Puffer resuspendiert. Die Protein-Extraktion wurde über 16 h bei 4° C und konstanter Bewegung der Proben durchgeführt. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde der Überstand gegen einen Dialyse-Puffer dialysiert (5 h bei 4° C; Puffer-Wechsel nach 1 h). Die Protein-Konzentration wurde nach Lowry betimmt und Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80° C gelagert.

## **6.2.4 Bestimmung von DNA-Strangbrüchen nach EtNU-Exposition**

Die Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen durch DNA-reaktive Agentien wurde mit Hilfe eines Relaxations-Assays mit isolierter Plasmid-DNA bestimmt (Buschfort & Witte, 1993). Hierzu wurde superhelikale PM2 DNA alkyliert wie oben beschrieben. Nach der Exposition wurden die verschiedenen DNA-Konformationen

elektrophoretisch getrennt (0.5% Agarose; 4 V/cm, 2 h), mit SYBR<sup>TM</sup> Green I gefärbt und densitometrisch bestimmt, um den relativen Anteil der durch einen Strangbruch relaxierten Plasmid-DNA zu ermitteln.

### **6.2.5 Bestimmung der Reparatur-Inzision an ethylierter DNA**

Die Erzeugung von DNA-Einzelstrangbrüchen durch Reparaturprozesse wurde mit Hilfe des oben beschriebenen Relaxations-Assays für ethylierte und unbehandelte PM2-Plasmid-DNA *in vitro* bestimmt (Buschfort *et al.*, 1997). Dazu wurde superhelikale Plasmid-DNA (140 ng) mit 250 ng einer Kern-Protein Fraktion inkubiert (Reaktion-Puffer pH 7.25; 37° C). In einigen Experimenten wurde dem Reaktionsansatz vor Zugabe des Kern-Proteins Methoxyamin (5 mM) zugesetzt. Die Induktion von DNA-Strangbrüchen wurde gemessen wie unter 5.2.4 beschrieben.

### **6.2.6 Immunzytologische Bestimmung von O<sup>6</sup>-Ethylguanin an individuellen Zell-Kernen (ICA)**

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der *in vitro*-Alkylierung wurden die Zellen in eine gepufferte Schutzlösung überführt und auf einen Objektträger gebracht. Nach einer Schnell-Trocknung wurden die Proben bei -80°C bis zur weiteren Aufbereitung gelagert.

Für die immunzytologische Färbung (Adamkiewicz *et al.*, 1985; Seiler *et al.*, 1993; Thomale *et al.*, 1996) wurden die Proben 15 min bei RT in Methanol fixiert, in 2 x SSC-Puffer rehydriert und für 1h bei 37°C mit RNase T1 (50 U/ml) und RNase A (200 µg/ml) inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit 140 mM NaCl gewaschen und die DNA durch Alkali-Behandlung teilweise entspiralisiert (70 mM NaOH in 140 mM NaCl, 5 min bei 0° C). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit BSA blockiert (20 % BSA in PBS; 20 min bei RT). Daraufhin erfolgte eine Inkubation mit einem der anti (O<sup>6</sup>-Alkyl-2'-Desoxyguanosin) MAK EM-2-3, ER-6 oder ER-17 (0.2 µg/ml PBS mit 1 % BSA; 16 h bei 4° C). Die Proben wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und mit einem Rhodamin [TRITC]- konjugierten Zweit-Antikörper (2 µg/ml 1 % BSA in PBS; 3 h bei RT) inkubiert. Die Kern-DNA wurde mit DAPI gefärbt (3 x 10<sup>-7</sup> M in PBS; 10 min bei RT). Um das Ausbleichen der Fluoreszenz zu reduzieren, wurden die Proben vor der Auswertung mit einer Eindecklösung beschichtet.

## **6.2.7 Einzelzell-Gelelektrophorese zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen (Comet Assay)**

DNA-Strangbrüche wurden mit Hilfe der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) quantifiziert (Singh *et al.*, 1988; Buschfort *et al.*, 1997). Nach der EtNU-Exposition wurden jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen in Low-Melting-Point (LMP)-Agarose (100  $\mu$ l; 0.5 %) suspendiert und auf angerauchte Objektträgern gebracht, die zuvor mit einer dünnen Schicht 0.7 % LE-Agarose (Volumen 350  $\mu$ l) beschichtet waren. Mit Hilfe eines Deckglases wurde die Zellsuspension gleichmäßig verteilt. Danach wurde mit 100  $\mu$ l LMP-Agarose eine ebenfalls geglättete Deckschicht aufgetragen. Zwischen dem Auftragen der einzelnen Schichten wurden die Objektträger für jeweils 5 min bei 4° C gelagert.

Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation der Objektträger in Lyse-Puffer III (16 h bei 4° C) lysiert, durch zweimaliges Waschen entsalzt (Elektrophorese-Lösung; pH 12) und zur DNA-Denaturierung in dieser Lösung inkubiert (20 min bei 4° C). Danach wurde die DNA unter diesen Bedingungen elektrophoretisch getrennt (20 min bei 4° C und 4 V/Cm), in Tris-Puffer neutralisiert (3 x 10 Minuten bei RT) und abschließend mit Ethidiumbromid (2  $\mu$ g/ml) gefärbt.

## **6.2.8 Quantifizierung von Fluoreszenz-Signalen in Kern-DNA**

Die Fluoreszenz-Signale der Kern-DNA einzelner Zellen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenz-Photomikroskops (Zeiss Axioplan) mit der Filter-Kombination der Zeiss-Filter 2 (für DAPI), 14 (für TRITC) and 15 (für Ethidiumbromid) gemessen, mit einer CCD-Kamera aufgenommen, amplifiziert und einem Vier-Parameter Bildanalyse-Programm (ACAS) zugeführt. Das Programm integrierte die Fluoreszenz-Signale auf Einzelzell-Niveau mit automatischer Subtraktion der Hintergrund-Fluoreszenz. In jeder Probe wurden 100 -150 einzelne Zell-Kerne ausgewertet.

### **6.2.11.1 Messung von O<sup>6</sup>-Ethylguanin in der Kern-DNA individueller Zellen**

Der Gehalt von O<sup>6</sup>-Alkyl-2'-Desoxyguanosin in der Kern-DNA einzelner Zellen wurde mit Hilfe des ICA durch eine Mehrparameter-Messung bestimmt. Über einer durch DNA-Fluoreszenz-Signale (DAPI) definierten Kern-Fläche wurde parallel die Antikörper-TRITC Fluoreszenz gemessen und auf den DNA-Gehalt des Kerns normiert.

#### **6.2.11.2 Nachweis von abasischen Stellen und DNA-Strangbrüchen mit Hilfe des Comet Assay**

Die Häufigkeit abasischer Stellen und Einzelstrangbrüche in der Kern-DNA individueller Zellen wurde durch Messung ihrer elektrophoretischen Mobilität im Agarose-Gel bestimmt (Comet Assay). Dabei wurde sich zu Nutze gemacht, daß DNA-Fragmente, entstehend durch DNA-Strangbrüche, eine stärkere Mobilität besitzen als ungeschädigte, super-helikale DNA. Durch die Messung der Gesamt-Fläche der Kern-DNA einzelner Zellen über den Bereich der detektierbaren (Ethidiumbromid-) Fluoreszenz konnte der Grad der DNA-Schädigung ausgedrückt werden als relative Flächenvergrößerung. Dabei wurde die Fläche der Kern-DNA exponierter Zellen bezogen auf die Kern-Fläche unbehandelter Kontroll-Zellen (also ungeschädigter DNA) desselben Spenders im gleichen Experiment.

## 6.3 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn PD Dr. Jürgen Thomale bedanken, nicht nur für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, sondern vor allem für die vielen Diskussionen und Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Manfred F. Rajewsky gilt mein besonderer Dank für die großzügige Unterstützung und die vielen kritischen wissenschaftlichen Anregungen.

Für das gute Gelingen der Zusammenarbeit mit der Inneren Klinik danke ich Prof. Dr. med. Siegfried Seeber und dem Labor unter der Leitung von Herrn Dr. med. Mark R. Müller, besonders Frau Bettina Baack und Frau Martina Heim, sowie Dr. med. Carmen Lensing.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen I und IV (IfZ) möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonderen Dank an Dr. Jörg Engelbergs, Dipl. Biol. Torsten Schweer und Dipl. Chem. Bernd Liedert, die mich während der langen Zeit begleiteten und mir immer bei Problemlösungen zur Seite standen. Ebenso haben eine Zeit lang Dr. Kirsten Bender, Dipl. Biol. Bettina Böhm, Dr. Karl Heinz Glüsenkamp, Dr. Kai Krüger, Dr. Ursula Loggen, Dr. Catrin Lutze, Dr. Christian Mengede und Dr. Bernadette Reuber, sowie PD Dr. Petra Pfeiffer meine Arbeit begleitet und durch viele Diskussionen an der Entwicklung dieser Arbeit mitgewirkt.

Gleichzeitig gilt mein Dank Dr. Andreas Hartmann, der mich in die Feinheiten des Comet Assay einführte, sowie Dr. Gabriele Krieger, Dr. Heike Jakobi und PD Dr. Irene Witte, die immer Interesse an meiner Arbeit hatten und die mir mit Hilfe ihres anderen wissenschaftlichen Blickwinkels in langen Diskussionen wertvolle Anregungen gaben.

Ein besonderer Dank gilt Frau Birgit Opgenoorth und Frau Anke Galhoff für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die tatkräftige technische Unterstützung.

Herrn Dipl. Ing. Klaus Lennartz danke ich für die FACS-Analysen und die Unterstützung bei allen Fragen, die mit den Computern und der Bildanalyse zusammenhingen. Herrn Chem. Ing. Wolfgang Drodziok danke ich für die Synthesen und das Reinigen der Alkylantien. Der Belegschaft der Laboreinheit „Monoklonale Antikörper“ danke ich für die Herstellung der Antikörper. Nicht zuletzt gilt der Dank den guten Geistern in diesem Haus Frau Birgit Weber, Herrn Michael Derda, Herrn Hans Zieren und Frau Barbara Mutzenbach!

Meinen Freunden und Sportskameraden ein großes Dankeschön, daß Ihr mich so oft vom Stress ablenken konntet und meine Gereiztheit und schlechte Laune ausgehalten habt, wenn mal wieder etwas nicht geklappt hat.

Meinen Eltern möchte ich für die jahrelange Geduld und Unterstützung während meines Studiums und der Promotion danken. Meinem Sohn danke ich für sein Lachen und seine Liebe, die mir über die schwere letzte Zeit hinweggeholfen hat. Meinem Mann möchte ich an dieser Stelle nicht danken, auch wenn er mir durch seine harte und ehrliche Kritik eine große Stütze war. Er weiß warum.

Diese Arbeit wurde seit 1992 von der „Mildred Scheel Stiftung“ für Krebsforschung gefördert.

## 5.4 Erklärungen

### **Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Bedeutung von DNA-Reparaturprozessen für die Zytostatika-Resistenz menschlicher Leukämie-Zellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Papewalis befürworte.

Essen, den 10. November 1999

### **Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 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 10. November 1999

### **Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 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 10. November 1999

## 5.5 Lebenslauf

<b>Name</b>	Claudia Papewalis geb. Buschfort
<b>Geburtsdatum/Ort</b>	11.10.1959
<b>Familienstand</b>	verheiratet mit Jörg Papewalis, Sohn Janis (06.10.1997)
<b>Schulbildung</b>	1966 bis 1971 Besuch der Grund- und Hauptschule (bis Jahrgangsstufe 5) in Bottrop  1971 bis 1980 Vestisches Gymnasium Bottrop  1980 Abitur
<b>Studium</b>	10/1980 bis 03/ 1982 Studium zum Lehramt (Sek.II) Sozialwissenschaften, Germanistik, Geographie an der RWTH Aachen
	10/1983 bis 12/1990 Studium der Dipl.Biologie an der Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg
	01/1984 bis 12/1985 Mitglied des Studenten-Parlaments und des AStA (Referentin für Umweltfragen)
	10/1997 Vordiplomsprüfung
	01/1991 bis 02/1992 Diplomarbeit: „Untersuchungen zur toxischen Wirkung von Tetracyclin und CuCl <sub>2</sub> an PM2 DNA und auf Fibroblasten.“
	04/1992 Diplomprüfung
<b>Berufstätigkeit</b>	04/1980 bis 09/1983 beschäftigt als Postzustellerin
	05/1982 bis 10/1982 Auslandsaufenthalt (Kibuz Bet Zera/Israel)
	05/1992 bis 10/1992 tätig als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg im deutsch-israelischen Forschungsprojekt: „ <i>The mechanism of DNA strand breaks induced by Xenobiotics in the enviroment</i> “
	seit 11/1992 tätig als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) am Universitätsklinikum Essen im Forschungsprojekt: „ <i>Untersuchungen zur enzymatischen DNS- Reparatur als Parameter zellulärer Resistenz</i> “

## Veröffentlichungen

**I. Witte, G. Oetken, C. Buschfort & A. Hartmann**

A comparison of DNA-damaging, the cytotoxic and genotoxic properties of tetracycline in human fibroblasts in the presence and absence of light. *Mutation Research*, Vol **315**, 33-40 (1994).

**C. Buschfort & I. Witte**

Induction and mechanism of DNA single- and double-strand breaks by tetracycline/ Cu(II) in the absence of light. *Carcinogenesis*, Vol **15**, 2927-2930 (1994).

**M.R. Mueller, F. Seiler, J. Thomale, C. Buschfort, M.F. Rajewsky & S. Seeber**

Capacity of individual chronic lymphatic leukemia lymphocytes and leukemic blast cells for repair of O<sup>6</sup>-ethylguanine in DNA: Relation to chemosensitivity in vitro and treatment outcome. *Cancer Research*, Vol **54**, 4524-4531 (1994).

**C. Buschfort, C. Lensing, F. Seiler, M.R. Mueller, S. Seeber, M.F. Rajewsky & J. Thomale**

Contribution of specific DNA repair pathways to the chemoresistance of human lymphocytes to alkylating agents. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol **21A**, 278 (1995).

**C. Buschfort, F. Seiler, M.R. Mueller, S. Seeber, M.F. Rajewsky & J. Thomale**

DNA repair processes and sensitivity to DNA damage of human lymphocytes and blasts: Analysis at the single cell level. In: W.J. Zeller, M. D'Incalci & D.R. Newell (Hrg.): *Novel Approaches in Anticancer Drug Design. Molecular Modelling - New Treatment Strategies. Contributions to Onkology*, Vol 49, No 20, 155-161. Karger, Basel (1995).

**C. Buschfort, M.R. Müller, S. Seeber, M.F. Rajewsky & J. Thomale**

DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: Functional analysis at the single cell level. *Cancer Research*, Vol **57**, 651-658 (1997).

**M.R. Müller, C. Buschfort, J. Thomale, C. Lensing, M.F. Rajewsky & S. Seeber**

DNA repair and cellular resistance to alkylating agents in chronic lymphatic leukemia. *Clinical Cancer Research*, Vol **3** (1997) 2055-2061.

**J. Thomale, M.R. Müller, C. Buschfort, S. Seeber & M.F. Rajewsky**

Alterations in DNA repair: Implications for leukemia cell biology. In: W. Hiddemann, T. Büchner, B. Wörtmann, J. Ritter, U. Creutzig, M. Keating & W. Plunkett (Hrg.): *Acute Leukemias VII. Experimental Approaches and Novel Therapies. Haematology and Blood Transfusion*, Vol. 39, S. 3-12. Springer, Berlin (1998)