

Aus dem Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) [IFZ]
DER UNIVERSITÄT-GESAMTHOCHSCHULE ESSEN
ARBEITSGRUPPE I (LEITER: PROF. DR. M.F. RAJEWSKY)

Zelltyp-spezifische Ausschaltung von DNA-Reparaturgenen zur Analyse ihrer Bedeutung bei der Kanzerogenese

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt

dem Fachbereich

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
der Universität-Gesamthochschule Essen

von

Torsten Schweer
aus Dinslaken

Essen, im Januar 2000

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) [IFZ] der Universität-Gesamthochschule Essen unter Leitung von Prof. Dr. M.F. Rajewsky durchgeführt.

Diese Arbeit wurde für den Zeitraum von 1994-1999 durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des DFG-Projektes „Gewebespezifische, konditionale Ausschaltung von DNS-Reparaturgenen zur Analyse ihrer physiologischen Funktion und Bedeutung bei der Cancerogenese und Krebstherapieresistenz“ sowie des Sonderforschungsbereichs „Genetische und biochemische Grundlagen der Karzinogenese und Metastasierung“ gefördert.

1. Gutachter: Prof. Dr. M.F. Rajewsky

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Obe

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. E. Winterhager

Tag der mündlichen Prüfung: 14.Juni .2000

ZUSAMMENFASSUNG	8
1 EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	14
1.1 DNA-Reparatur.....	14
1.2 DNA-Reparatur und Kanzerogenese	16
1.3 DNA-Alkylierung	17
1.4 O ⁶ -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (MGMT).....	19
1.4.1 Genstruktur und Funktion	19
1.4.2 Funktionsstörungen des <i>MGMT</i> -Gens bei Tier und Mensch	21
1.5 Apurin/Apyrimidin-Endonuklease	23
1.5.1 Funktion und Struktur.....	23
1.5.2 Funktionsstörungen des <i>APE</i> -Gens bei Tier und Mensch	25
1.6 Das Modell der Hepatokarzinogenese bei der Maus	26
1.7 “Gene targeting”	28
1.7.1 Rekombinationsvektoren	29
1.7.2 Das <i>Cre-loxP</i> -System	31
1.7.3 Rekombinationsvektoren für das konditionale „gene targeting“	32
1.8 Cre-Expression bei der Maus.....	33
1.8.1 Das humane C-reaktive Protein-Gen zur Hepatozyten-spezifischen Expression der Cre-Rekombinase bei der Maus.....	34
1.9 Problemstellung.....	36
2 ERGEBNISSE UND KOMMENTAR	38
2.1 Isolierung genomischer DNA-Fragmente des <i>MGMT</i> -Gens.....	38
2.2 Restriktionskartierung des <i>MGMT</i> -Locus	39
2.3 Vektorkonstruktion zum konditionalen “Gene targeting“ des <i>MGMT</i> -Gens.....	40
2.4 Isolierung homolog rekombinanter ES-Zell-Klone	43
2.5 Herstellung von ES-Zelllinien mit “floxed” <i>MGMT</i> -Genotyp	45

2.6	Herstellung homozygot <i>MGMT</i>-defizienter ES-Zelllinien	45
2.7	<i>MGMT</i>-„floxed“ Mäuse	46
2.8	DNA-Reparaturphänotyp homozygot homolog rekombinanter	
	ES-Zellen und transgener Tiere	47
2.8.1	Analyse des <i>MGMT</i> -Status auf Proteinebene	47
2.8.2	<i>MGMT</i> -Aktivitätstest	48
2.8.3	Zelluläre DNA-Reparaturkapazität für O ⁶ -Alkylguanin in der DNA von ES-Zellen mit unterschiedlichem <i>MGMT</i> -Genotyp	49
2.8.3.1	Proliferative Aktivität von ES-Zellen mit unterschiedlichem <i>MGMT</i> -Genotyp	49
2.8.3.2	Elimination von O ⁶ -Alkylguaninen aus der zellulären DNA	50
2.9	Klonierung des <i>Cre</i>^{hCRP}-Expressionsvektors	52
2.10	<i>Cre</i>^{hCRP}-transgene Mäuse	53
2.11	Expressionsanalysen des <i>Cre</i>^{hCRP}-Vektors	54
2.11.1	Untersuchungen an Geweben	54
2.11.2	Untersuchungen auf Einzelzell-Niveau.....	56
2.12	Tierzucht	59
2.13	Applikationsschema zur Nitrosamin-induzierten Hepato-karzinogenese bei partiell <i>MGMT</i>-defizienten Mäusen	60
2.14	Induktion der Hepatokarzinogenese bei partiell <i>MGMT</i>-defizienten Mäusen	64
2.15	Isolierung und Restriktionskartierung genomischer DNA-Fragmente des <i>Ape</i>-Gens der Maus	65
2.15.1	Klonierung des Replacement-Vektors für das <i>Ape</i> -Gen der Maus	67
3	DISKUSSION	69
3.1	Überblick	69
3.2	Der <i>MGMT</i>-Rekombinationsvektor	70
3.3	Analyse des rekombinanten <i>MGMT</i>-Phänotyps	71
3.4	Zelluläre DNA-Reparaturkapazität für O⁶-Methylguanin und O⁶-Ethylguanin.....	72
3.5	Zelltyp-spezifisch induzierbares, konditionales “gene targeting”	74
3.6	Das Hepatokarzinogenese Modell	79

3.7	Ausblick	83
4	EXPERIMENTELLER TEIL	85
4.1	Bakterien- und Phagenkulturen.....	85
4.1.1	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i>	85
4.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	85
4.1.3	Handhabung der Phagen-Bibliothek	85
4.2	Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren	85
4.2.1	Präparation von Phagen-DNA.....	85
4.2.2	Präparation von Plasmid-DNA	85
4.2.3	Präparation von hochmolekularer DNA.....	86
4.2.4	Präparation von Gesamt-RNA	86
4.2.5	Reinigung der DNA durch Ausfällung.....	87
4.2.6	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	87
4.3	Klonierungen	87
4.3.1	Klonierung des <i>MGMT</i> -Rekombinationsvektors	87
4.3.2	Klonierung des zelltypspezifisch induzierbaren <i>Cre</i> -Expressionsvektors	89
4.3.3	Klonierung des <i>Ape</i> -Rekombinationsvektors.....	89
4.4	Markierung der DNA	90
4.4.1	„Random-Primed-Markierung“ von DNA-Fragmenten mit α -[³² P]-dCTP	90
4.4.2	Markierung von Oligonukleotiden durch 5'-Phosphorylierung mit γ -[³² P]-ATP ..	90
4.5	Nukleinsäure-Analyse	91
4.5.1	DNA-Restriktionen	91
4.5.2	Gelelektrophorese	91
4.5.3	Southern-Blot-Analyse der DNA	91
4.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	92
4.6.1	PCR-Bedingungen.....	92
4.6.2	<i>In situ</i> -PCR	92
4.7	Proteinextrakte	93
4.8	„Western-Blot“ Analyse	94
4.9	MGMT-Aktivitätstest	95
4.10	Quantifizierung von O⁶-Alkylguaninen in der gesamt-genomischen DNA mit Hilfe des Immuno-Slot-Blot-Verfahrens	95

4.10.1	DNA-Denaturierung und -Immobilisierung.....	96
4.10.2	Detektion DNA-gebundener MAK durch Enzym-gekoppelte Zweitantikörper ...	96
4.11	Nachweis von O⁶-Ethylguanin in der Kern-DNA einzelner Zellen mit Hilfe der immunzytologischen Analyse (ICA)	97
4.12	Zellkultur	97
4.12.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	97
4.12.2	Embryonale Fibroblasten (EF-Zellen)	99
4.12.3	Buffalo-Rattenleber (BRL)-Zellen	99
4.12.4	ES-Zellen.....	100
4.12.5	Transfektion des Rekombinationsvektors.....	100
4.12.6	Transiente Transfektion eines Cre-Expressionsvektors in rekombinante ES-Zellen.....	101
4.12.7	Eliminationskinetiken	102
4.13	Gewebe und Primärzellen	102
4.13.1	<i>In situ</i> -Perfusion.....	102
4.13.2	FACS-Gal-Färbung	103
4.13.3	Gewebefixierung.....	103
4.13.4	Paraffin-Einbettung	103
4.13.5	Glukose-6-Phosphat-Färbung.....	104
4.14	Tierhaltung	104
4.14.1	Genotypisierung.....	104
5	ANHANG	105
5.1	Abkürzungen.....	105
5.2	DNA Sequenzen	107
5.2.1	Teilsequenz des Plasmids p0,6 B/Xh-SK (<i>MGMT</i> -Gen)	107
5.2.2	Teilsequenzen des Plasmids p3,3-SK (<i>MGMT</i> -Gen).....	107
5.2.3	Teilsequenzen des Plasmids p0,8-B/Xh-SK (<i>MGMT</i> -Gen).....	108
5.2.4	Teilsequenzen des Plasmids p1,8-X/B-SK (<i>MGMT</i> -Gen).....	108
5.2.5	Teilsequenzen des Plasmids p4,5 Eco RI-SK (<i>MGMT</i> -Gen)	109
5.2.6	Teilsequenzen des Plasmids p8,5 Eco RI-SK (<i>MGMT</i> -Gen)	109
5.2.7	Teilsequenzen des Plasmids p3,3-PCR-SK (<i>MGMT</i> -Gen)	110
5.2.8	Teilsequenzen des Cre ^{hCRP} Konstrukts	110
5.2.9	Teilsequenz des Plasmids 15-SK (<i>Ape</i> -Gen)	111
5.2.10	Teilsequenz des Plasmids 17-SK (<i>Ape</i> -Gen)	112

5.2.11	Teilsequenzen des Plasmids 39-SK. (<i>Ape</i> -Gen)	113
5.3	Plasmidkarten	114
5.4	Material	120
5.4.1	Chemikalien	120
5.4.1.1	Alkylierende Agenzien	120
5.4.1.2	O ⁶ -Benzylguanin	121
5.4.2	Radiochemikalien	121
5.4.3	Enzyme	121
5.4.4	Antikörper	122
5.4.5	DNA Größen- bzw. Proteinmolekulargewichts-Standards	123
5.4.6	Puffer und Lösungen	123
5.4.6.1	Puffer und Lösungen für die Biochemie	123
5.4.6.2	Lösungen und Medien für die Zellkultur	124
5.4.7	Kits	124
5.4.8	Geräte und technisches Zubehör	125
5.4.8.1	Geräte	125
5.4.8.2	Technisches Zubehör	125
5.4.9	PC-Programme	126
5.4.10	Bakterienstämme	126
5.4.10.1	Nährmedium zur Plasmid-Amplifikation	126
5.4.11	Zelllinien	126
5.4.12	Versuchstierstämme	127
5.4.13	Nukleotid-Sequenzen	127
5.4.14	DNA Oligonukleotide	127
5.4.14.1	PCR „Primer“ zur DNA Amplifikation	128
5.4.14.2	Oligonukleotide zur Hybridisierung	129
6	LITERATUR	130

Zusammenfassung

In der Krebsforschung wird die Bedeutung der DNA-Reparatur bei der Tumorentstehung und Tumorthherapie zunehmend deutlich. So können fehlende DNA-Reparaturfunktionen zu Mutatorphänotypen führen und die Krebsentstehung verursachen. Um die Rolle spezifischer DNA-Reparaturgene im Rahmen des komplexen Netzwerks der DNA-Reparaturprozesse analysieren zu können, sind Tiermodelle notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Tiermodell der Nitrosamin-induzierten Hepatokarzinogenese etabliert, an dem der Einfluß einzelner DNA-Reparaturfunktionen auf das Zelltyp-spezifische Transformationsrisiko untersucht werden kann. In diesem Maus-Modell wird eine somatische Inaktivierung des O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (*MGMT*)-Gens durch konditionalen „knockout“ mit Hilfe des *Cre-loxP*-Systems bewirkt. Durch Ausschaltung des *MGMT*-Gens in einer Subpopulation der Hepatozyten, den Zielzellen der Hepatokarzinogenese, soll der Prozeß der Tumorigenese möglichst realistisch simuliert werden. Hierbei besteht die zentrale Frage darin festzustellen, ob sich frühe, aber auch spätere prämaligene Klone bevorzugt aus *MGMT*-defizienten oder -kompetenten Hepatozyten rekrutieren. Zur Analyse der im Alter von 14 Tagen mit einer einmaligen Nitrosamin-Dosis behandelten Tiere wurde eine *in situ*-PCR etabliert, die Aufschluß über den *MGMT*-Genotyp individueller Hepatozyten gibt. In Kombination mit histochemischen Markern kann der Anteil der jeweiligen *MGMT*-Allele in den Zellen prämaligener Foci untersucht werden. Entsprechend dem entwickelten Applikationsprotokoll wurde bei insgesamt 88 Tieren die Hepatokarzinogenese induziert.

Es wurde ein Rekombinationsvektor für das *MGMT*-Gen kloniert, bei dem das letzte Exon von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert war („floxed“). Homolog rekombinante embryonale Stammzellen (ES-Zellen), bei denen das *MGMT*-Gen homozygot „floxed“ vorlag, zeigten eine *MGMT*-Aktivität (447 ± 23 fmol/mg Protein), die dem Wildtyp (wt) vergleichbar war (420 ± 52 fmol/mg). Dagegen führte die homozygote Deletion dieses Exons zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Entsprechend war das *MGMT*-Protein durch Western-Blot-Analyse nur bei den Ausgangszellen (wt) und den „floxed“ ES-Zellen nachweisbar, nicht aber bei den *MGMT*-deletierte ES-Zellen. Die Untersuchung der zellulären Reparaturkapazität für O⁶-Alkylguanin in der DNA zeigte erstmals den hohen Anteil der *MGMT*-vermittelten DNA-Reparatur dieses mutagenen DNA-Alkylierungsprodukts bei der Maus. Die Inaktivierung des *MGMT*-Gens führte zu einer drastischen Verringerung der Anteile der eliminierten O⁶-Methyl- (20 % versus 90 %) und O⁶-Ethylguanine (14 % versus 85 %) in der genomischen DNA. Bei *MGMT*-kompetenten Zellen wurde O⁶-Ethylguanin wesentlich schneller repariert als O⁶-Methylguanin ($t_{1/2} = 3$ h versus $t_{1/2} = 17,5$ h). Darüberhinaus zeigten die Daten eine zusätzliche *MGMT*-unabhängige Reparatur der O⁶-Alkylguanine, durch die innerhalb von 24 h 14-20 % dieser DNA-Läsionen aus der DNA eliminiert wurden.

Mit Hilfe der Reimplantation rekombinanter ES-Zellen wurde eine Maus-Linie etabliert, bei der das *MGMT*-Gen „floxed“ vorliegt und somit durch die Cre-Rekombinase *in vivo* deletiert werden kann. Zur Expression der Cre-Rekombinase wurde die *Cre*-cDNA unter Kontrolle des

humanen C-reaktiven Protein Gens (*hCRP*) kloniert. Mit Hilfe der Mikroinjektionstechnik wurde eine *Cre*^{hCRP}-transgene Maus-Linie generiert, bei der die Cre-Expression Hepatozyten-spezifisch induziert werden kann. Eine einmalige intraperitoneale Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) (3,3 µg/g Körpergewicht) bewirkte bei doppelt transgenen Tieren (*MGMT*^{flox/flox}; *Cre*^{hCRP}) die Deletion von ~30 % (♂) und ~13 % (♀) der *loxP*-flankierten *MGMT*-Allele. Eine zweite LPS-Injektion im Abstand von einer Woche erhöhte den Anteil der deletierten *MGMT*-Allele auf ~45 % (♂) und ~35 % (♀).

Zur Erweiterung der analytischen Möglichkeiten auf die Basenexzisions-Reparatur (BER) wurde ein Rekombinationsvektor für das wichtige DNA-Reparaturgen *APE* kloniert, das für die Apurin/Apyrimidin-Endonuklease kodiert. Die Einfügung eines *loxP*-flankierten, vierten kodierenden Exons ermöglicht es, spezifisch die Endonuklease-Funktion unter Erhaltung der Redox-Funktion des *APE*-Gens zu deletieren.

1 EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Untersuchungen an der Maus (*Mus Musculus*) sind ein wesentlicher Bestandteil der modernen Biologie. An der Maus und wenigen anderen Tierarten gewonnene Erkenntnisse eröffnen Einsichten in grundlegende biologische Prozesse, die einen modellhaften Charakter für alle Säuger einschließlich des Menschen besitzen. Ziel der Forschung ist dabei zumeist, Mausmutanten zu generieren, an denen die Auswirkungen spezifischer Genveränderungen untersucht werden können. Noch in den 50er und 60er Jahren wurden Mausmutanten mit Hilfe klassischer Zuchtprogramme etabliert, später dann durch chemisch-induzierte Mutagenese. Der Durchbruch auf diesem Forschungsgebiet gelang mit Methoden der „reversen Genetik“ durch das sogenannte „gene targeting“. Hierunter versteht man die homologe Rekombination eines Vektors mit dem entsprechenden chromosomalen Locus. Das Resultat ist die Integration der Vektor-DNA in eine definierte Position des Genoms. Unter Konstanthaltung aller übrigen genetischen Variablen können Kandidaten-Gene selektiv inaktiviert oder durch definierte Mutationen funktionell modifiziert werden. Diese Methodik wurde Mitte der achtziger Jahre erstmals bei Säugerzellen eingesetzt (Lin *et al.*, 1985; Smithies *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1986) und schnell durch die Anwendung auf embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus ergänzt (Thomas & Capecchi, 1987). Diese Zellen stammen aus der pluripotenten Zellpopulation der inneren Zellmasse der Blastozyste im Pre-Implantationsstadium (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Sie können kultiviert werden und ermöglichen somit eine genetische Modifikation und die Selektion für die seltenen homologen Rekombinationen. Vor allem die Fähigkeit von ES-Zellen, Embryonen zu rekolonisieren und somit ihren veränderten Genotyp in die Keimbahn einzubringen (Bradley *et al.*, 1984) führte zur Entwicklung und Analyse von Maus-Linien, die mutante Allele tragen (Thompson *et al.*, 1989). Die häufigste Anwendung dieser Technologie liegt in der Erzeugung sog. „knockout“-Mäuse, bei denen ein bestimmtes Gen inaktiviert wurde. Entsprechende Untersuchungen haben bereits bedeutende Fortschritte ermöglicht, vor allem hinsichtlich der Funktionsaufklärung von Genen des Immunsystems sowie auch der DNA-Reparatur. Allein für den Bereich der DNA-Reparatur werden mehr als 50 Maus-Linien beschrieben, die Mutationen in Genen tragen, welche an den zellulären Reaktionen auf DNA-Schädigung beteiligt sind (Friedberg & Meira, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methodik verwendet, um ein Tiermodell zu etablieren, an dem die Auswirkungen des Verlustes einer spezifischen DNA-Reparaturfunktion auf die durch ein chemisches Mutagen mit bekannter DNA-Reaktivität ausgelöste Kanzerogenese untersucht werden kann.

1.1 DNA-Reparatur

Die Primärstruktur der DNA ist dynamisch. Sowohl die Sequenz als auch die Struktur der Nukleotide unterliegen Veränderungen durch Replikationsfehler, Rekombination, Integration viraler Sequenzen, inhärente Instabilität unter physiologischen Bedingungen, Reaktion mit endogenen und exogenen Agenzien, sowie fehlerhafte DNA-Reparatur (Lindahl, 1993).

Diesen Mutationsquellen wirkt das DNA-Reparatursystem der Zelle entgegen. Die biologische Konsequenz von Mutationen ist u.a. ein erhöhtes Risiko einer malignen Transformation der betroffenen Zellen.

Ähnlich der „immune surveillance“ auf zellulärer Ebene handelt es sich bei der DNA-Reparatur um ein komplexes Überwachungssystem, das die Sicherung der strukturellen Integrität der genomischen DNA der Zelle zur Aufgabe hat. Bei Säugern verwenden DNA-Reparaturmechanismen zumeist Multienzymsysteme, so die Systeme der Nukleotid- (NER) und Basen-Exzisionsreparatur (BER), die „Mismatch“-Reparatur (MMR) und die DNA-Doppelstrangbruchreparatur (DSBR). Die Ausnahme bildet die Ein-Schritt-Reparatur von O⁶-Alkylguanin in der DNA durch das Reparaturprotein O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (MGMT) (Abb. 1). Aufgrund ihrer breiten Substratspezifität ist die NER ein universeller DNA-Reparaturmechanismus. DNA-Schäden werden vornehmlich an der von ihnen verursachten Konformationsänderung des DNA-Doppelstrangs erkannt und als kurzes DNA-Fragment (27 - 29 Nukleotide) herausgeschnitten. Anschließend wird die Lücke aufgefüllt und somit die ursprüngliche Sequenz durch Polymerisation und Ligation wiederhergestellt (Hoeijmakers, 1994; Aboussekhra *et al.*, 1995; Sancar, 1996; Wood, 1996) (Abb. 1). Im Gegensatz zu der eher unspezifischen Schadensprozessierung im Falle der NER erkennen bei der BER DNA-Glykosylasen spezifische DNA-Addukte (Friedberg *et al.*, 1995). Zur Zeit sind für Säuger 11 verschiedene DNA-Glykosylasen beschrieben. Die Entfernung einer modifizierten Base aus der DNA führt zu einer Apurin/Apyrimidin-Stelle im DNA-Doppelstrang. Die AP-Endonuklease bzw. die Lyase-Aktivität der Glykosylase initiiert dann die Prozessierung dieser DNA-Läsion (Abb. 1).

Die genannten Exzisionsreparatur-„Pathways“, sowie die MGMT dienen dazu, strukturell veränderte Basen aus der zellulären DNA zu entfernen. Hingegen wirkt die MMR der Fehlpaarung intakter Basen entgegen. Solche „Mismatches“ entstehen durch Polymerase-Fehler bei der DNA-Replikation. Bereits während der Replikation werden fehlgepaarte Nukleotide erkannt und aus dem neusynthetisierten Strang entfernt. Neben der „Proofreading“-Funktion von DNA-Polymerasen ist die MMR somit unerlässlich für die Stabilität des Genoms. Eine weitere Funktion hat die MMR bei der Rekombination, vornehmlich während der Meiose. Hier fehlt die Unterscheidung der Stränge, so daß die MMR fehlgepaarte Basen in etwa 50 % der Fälle zu Mutationen führt. Die MMR dient in diesem Zusammenhang also auch der ständigen Generierung von DNA-Sequenzveränderungen, die ein wesentliches Element der Evolution darstellen.

Die einzelnen DNA-Reparatur-„Pathways“ operieren in der Zelle nicht isoliert voneinander. Vielmehr zeigt sich zunehmend ein hoher Grad der Vernetzung spezifischer DNA-Reparaturwege sowohl untereinander als auch mit anderen zellulären Basalfunktionen. DNA-Reparatur-„Pathways“ sind in bezug auf ihre DNA-Schadensspezifität teilweise redundant. So wird z.B. das hoch mutagene und zytotoxische DNA-Alkylierungsprodukt O⁶-Alkylguanin im wesentlichen durch die MGMT repariert, es ist aber auch ein Substrat für die MMR (Duckett *et al.*, 1996) und die NER (Huang *et al.*, 1994). Bei Hefen eliminiert die NER auch

C:C-Fehlpaarungen. Bei Ausfall der MMR prozessiert die NER dann auch andere Basenfehlpaarungen (Fleck *et al.*, 1999). Hier wirkt die NER also als „backup“-Mechanismus für die MMR. Neuere Untersuchungen zeigen auch Verbindungen zwischen der NER und BER. So stimuliert die bislang nur der NER zugerechnete Endonuklease XPG die Bindung der Glykosylase hNth 1 an oxidierte Basen (Klungland *et al.*, 1999). Zudem erfolgt die DNA-Reparatur häufig in konzertierter Aktion mit anderen molekularen Grundfunktionen der Zelle. Beispiele sind die Transkriptions-gekoppelte NER (TCR) (Bohr *et al.*, 1985; Mellon *et al.*, 1986) und die mit der DNA-Replikation assoziierte MMR (Umar *et al.*, 1996; Jiricny, 1998). Darüber hinaus können nicht eliminierte DNA-Läsionen in Abhängigkeit vom DNA-Schadensniveau und -typ zur Zellzyklus-Arretierung aber auch zur Apoptose führen.

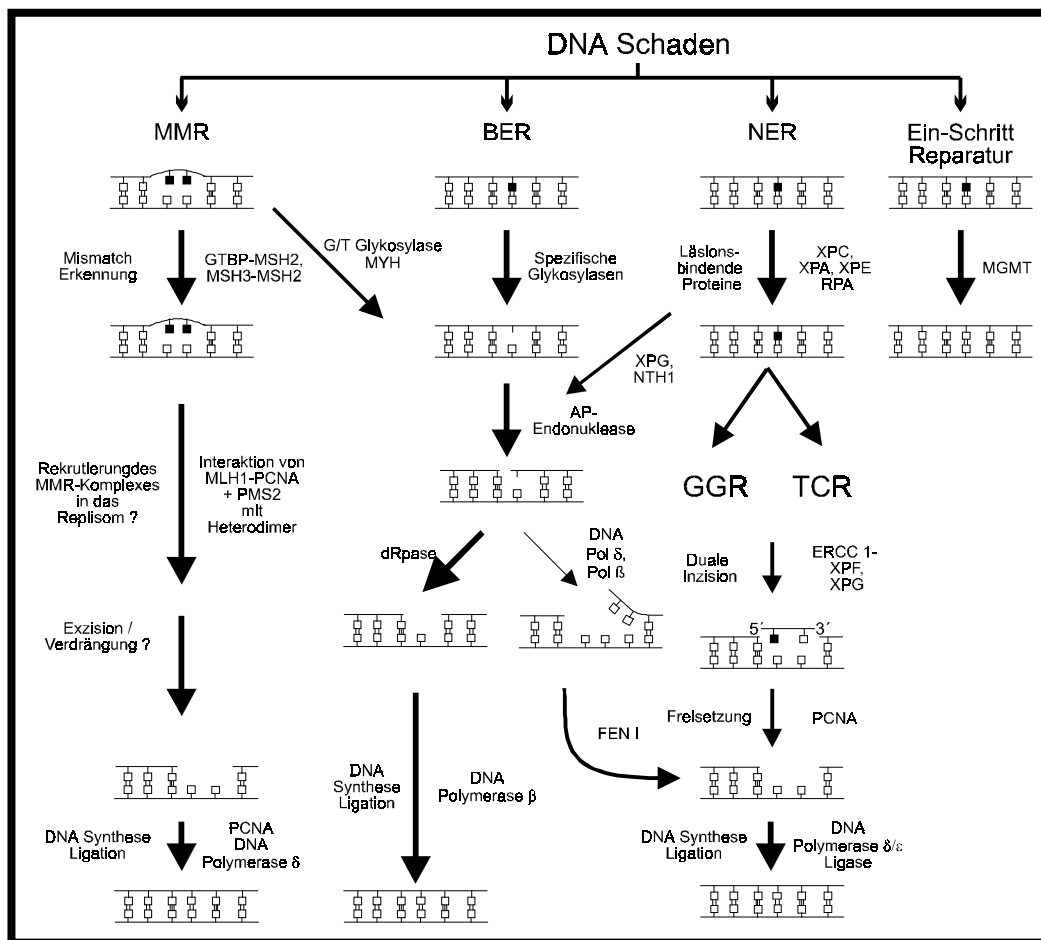


Abb. 1: DNA-Reparatur „Pathways“ in Säugern (ohne DSBR).

1.2 DNA-Reparatur und Kanzerogenese

Die Entstehung maligner Tumoren ist in der Regel ein mehrstufiger Prozeß (Armitage & Doll, 1954). Im Verlauf der Kanzerogenese akkumulieren epigenetische und vor allem genetische Veränderungen, die eine Aktivierung, Fehlexpression oder Inaktivierung kritischer Gene, Protoonkogene bzw. Tumorsuppressorgene, zur Folge haben (Fearon & Vogelstein, 1990). Deren Genprodukte sind an der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Zelltod, Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen, Signaltransduktion, sowie an der Kontrolle von DNA-

Reparaturprozessen und der Stabilität des Genoms beteiligt. Die DNA-Reparatur als Tumorsuppressor-Mechanismus erfährt besondere Aufmerksamkeit. Bereits frühe Arbeiten ergaben einen Zusammenhang zwischen der Persistenz mutagener DNA-Läsionen aufgrund verminderter oder fehlender DNA-Reparatur und dem daraus resultierenden erhöhten Risiko der Zelltyp-spezifischen Kanzerogenese (Goth & Rajewsky, 1974b). Der initiale Ausfall eines spezifischen DNA-Reparaturproteins führt prinzipiell zu einem Mutatorphänotyp der betroffenen Zelle. Die Ausbildung von Mutatorphänotypen fördert naturgemäß die Akkumulation multipler Mutationen als Voraussetzung für die Krebsentstehung (Loeb, 1991; Loeb & Christians, 1996).

Aber auch die initiale Mutation eines bei einer unreifen Vorläuferzelle an der Proliferationskontrolle beteiligten Gens, mit der Folge einer Differenzierungs-Arretierung und fortbestehender proliferativer Aktivität, begünstigt die Akkumulation weiterer Mutationen in dem entstehenden Zell-Klon. Die Bedeutung einzelner DNA-Reparaturfunktionen als Determinante für das Krebsrisiko wird besonders deutlich bei deren Ausfall. Patienten mit dem hereditären Krankheitssyndrom Xeroderma pigmentosum (XP) tragen Keimbahn-Defekte der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER). Sie haben ein über 1000-fach erhöhtes Risiko, nach UV-Bestrahlung Hauttumoren zu entwickeln, da mutagene Reaktionsprodukte von UV-Licht mit der DNA der Hautepithelien nicht repariert werden können (Hoeijmakers, 1994; Boulikas, 1996; Kraemer, 1997). Bei über 90% der Patienten mit dem hereditären Lynch-Syndrom, das die Entwicklung kolorektaler Karzinome beinhaltet, liegt ein Keimbahn-Defekt des „Mismatch“ DNA-Reparatursystems (MMR) vor (Bocker *et al.*, 1999).

Die Entwicklung von Mausmodellen für DNA Reparaturdefekte mit Hilfe der „gene targeting“ Technologie ermöglicht, diese Korrelationen zu verifizieren und das Netzwerk DNA Reparatur mit seinen vielfältigen Verknüpfungen und redundanten „Pathways“ (1.1) zu entflechten. Ziel der vorliegenden Arbeit ist, Mäuse zu generieren, bei denen eine DNA Reparaturfunktion zelltypspezifisch zu einem vorgegebenen Zeitpunkt inaktiviert werden kann. An diesem Tiermodell sollen Untersuchungen zur Bedeutung der DNA Reparaturfunktionen bei der Kanzerogenese durchgeführt werden. Im Fokus ist dabei die induzierte Kanzerogenese nach Applikation methylierender Agenzien. Im nächsten Abschnitt werden daher die Grundlagen zu DNA-Alkylierungsschäden und deren Prozessierung dargestellt.

1.3 DNA-Alkylierung

Die Bildung von DNA-Alkylierungsprodukten, insbesondere von DNA-Methylierungsprodukten nach Einwirkung exogener und endogener DNA-reaktiver Verbindungen ist weit verbreitet und alle lebenden Organismen reagieren auf diese meist mutagenen Veränderungen in der DNA (Pieper, 1998). DNA-Methylierungsprodukte konnten in humaner DNA aus verschiedenen Geweben vielfach nachgewiesen werden (Huh *et al.*, 1989; Saffhill *et al.*, 1995; Kumar & Hemminki, 1996; Saffhill *et al.*, 1995). Die zelluläre

Reaktion auf DNA-Alkylierung -nicht zu verwechseln mit der physiologischen enzymatischen Methylierung von 5-Cytosin, die im Zusammenhang mit der Genregulation von zentraler Bedeutung ist (Vardimon *et al.*, 1983; Laird & Jaenisch, 1994; Jaenisch, 1997)- ist global, und nicht auf DNA-Reparaturmechanismen beschränkt, sondern betrifft nahezu alle Bereiche des zellulären Metabolismus (Jelinsky & Samson, 1999). Die Alkylierung der zellulären DNA *in vivo* ist vor allem auf nicht-enzymatische Mechanismen zurückzuführen (Tannenbaum, 1980),(Kyrtopoulos, 1998) hauptsächlich auf S-Adenoysl-L-Methionin (Barrows & Magee, 1982), potentiell auch auf N⁵-Methyltetrahydrofolsäure (Rebeck & Samson, 1991), N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (Kodama & Saito, 1980) und N, N-Dialkylnitrosamine, aber auch auf alkylierende Agenzien in der Umwelt als Nebenprodukte der industriellen Produktion (Lawley, 1984), im Tabakrauch (Hecht & Hoffmann, 1989) und in Nitrat- bzw. Nitrit-haltigen Nahrungsmitteln (Hotckiss, 1989).

Die wichtigsten DNA-Alkylierungsprodukte sind 7-Alkylguanin (7-AlkGua), 3-Alkyladenin (3-AlkAde) und die O-Alkylierungsprodukte O⁶-Alkylguanin (O⁶-AlkGua) sowie O⁴- und O²-Alkylthymin (O⁴-AlkThy, O²-Alkthy). Die biologischen Konsequenzen dieser Modifikationen sind unterschiedlich. Das DNA-Alkylierungsprodukt 7-AlkGua (66 % - 82 % aller DNA-Alkylierungsprodukte) hat keine direkt mutagenen Konsequenzen (Singer, 1975), da es weder die DNA-Replikation beeinflusst (Prakash & Strauss, 1970), noch fehlpaarend ist (Ludlum, 1970). Allerdings kann die labilisierte N-glykosidische Bindung von 7-AlkGua (Margison *et al.*, 1973) über die Entstehung von Apurin-Stellen (AP-Stellen) zu Mutationen führen. Die Reparatur von 7-AlkGua in der DNA wird initiiert durch die Methyl-Purin-Glykosylase (MPG) (Singer & Brent, 1981; O'Connor & Laval, 1991; O'Connor, 1993) und führt somit in den „Pathway“ der Basen-Exzisionsreparatur (BER) (Abb. 1). Das Hauptsubstrat der MPG ist das 3-MeAde. Diese DNA-Läsion ist ebenfalls nicht direkt mutagen, aber sie inhibiert die Replikation und ist somit autotoxisch (O'Connor *et al.*, 1988; Zhukovskaya *et al.*, 1994). Abschätzungen ergaben mit etwa 600 3-MeAde pro Zelle und Tag eine signifikante, endogene Belastung menschlicher Zellen (Rydberg & Lindahl, 1982). Die biologischen Konsequenzen anderer N-Alkylpurine, die zu geringen Anteilen gebildet werden, sind unklar. Die mutagenen O-Alkylierungsprodukte werden, abhängig vom SN₂/SN₁-Charakter der auslösenden N-Nitroso-Verbindung und wegen der geringeren Nukleophilizität des O⁶-Atoms des Guanins und der O²- und O⁴-Atome des Thymins in geringerem Ausmaß gebildet als die N-Alkylierungsprodukte. Dem O⁶-Alkylguanin kommt eine besondere biologische Relevanz für die Mutagenese und Kanzerogenese zu (Gerchman & Ludlum, 1973; Goth & Rajewsky, 1974a; Goth & Rajewsky, 1974b; Abott & Saffhill, 1979; Day *et al.*, 1980; Lawley, 1984; Loechler *et al.*, 1984; Samson *et al.*, 1986; Dumenco *et al.*, 1993; Nakatsuru *et al.*, 1993). O⁶-MeGua in der DNA ist Substrat des DNA-Reparaturproteins O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (MGMT) (Olsson & Lindahl, 1980; Lindahl *et al.*, 1988; Pegg, 1990), aber auch der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) (Huang *et al.*, 1994) (1.1). O⁴-MeThy und O⁴-EtThy in der DNA werden mit weit geringerer Effizienz repariert als O⁶-AlkGua (Müller & Rajewsky, 1983; Huh & Rajewsky, 1986; Thomale *et al.*, 1990), O²-AlkGua in der DNA bleibt praktisch unrepariert (Kawate *et al.*, 1995). Mutationsstudien haben Hinweise auf eine mögliche Blockierung der NER von O⁴-MeThy

durch Bindung der MGMT an dieses DNA-Alkylierungsprodukt gegeben, ohne sie aus der DNA zu eliminieren (Samson *et al.*, 1997). Obwohl O-Alkylpyrimidine in der DNA nur in geringem Ausmaß gebildet werden, tragen sie aufgrund ihrer Persistenz signifikant zur Erhöhung der Mutationsfrequenz bei.

Die endogene ebenso wie die exogene Alkylierung der DNA stellt somit ein signifikantes Mutationsrisiko dar. Die Reparatur dieser DNA-Läsionen erfolgt vornehmlich durch die MGMT und über die BER- und NER-Pathways. Die Inaktivierung der MGMT und der AP-Endonuklease (1.1) durch „gene targeting“ bei der Maus inhibiert die Reparatur mutagener DNA-Alkylierungsprodukte in hohem Maße und erlaubt es, den Stellenwert spezifischer DNA-Reparatur-Pathways in bezug auf die Kanzerogenese *in vivo* zu untersuchen. Der konditionale „knockout“ des *MGMT*- und des *APE*-Gens sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit (Schweer & Rajewsky, 1998).

1.4 O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (MGMT)

1.4.1 Genstruktur und Funktion

Das DNA-Reparaturprotein MGMT (EC 2.1.1.63) ist von besonderer Relevanz für Mutagenese, Kanzerogenese und Krebs-Chemotherapie. MGMTs wurden bei allen bisher untersuchten Organismen (Bakterien, Fische, Insekten, Hefen, Nager und Mensch) gefunden, wodurch die Bedeutung dieses Protein unterstrichen wird. Die cDNAs der MGMTs von *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, Hamster, Kaninchen, Maus, Ratte und Mensch wurde kloniert und strukturell charakterisiert (Potter *et al.*, 1987; Morohoshi *et al.*, 1989; Rydberg *et al.*, 1990; Tano *et al.*, 1990; Hakura *et al.*, 1991; Potter *et al.*, 1991; Sakumi *et al.*, 1991; Xiao *et al.*, 1991; Rafferty *et al.*, 1992; Shiraishi *et al.*, 1992). Säuger cDNAs der MGMT weisen extrem hohe Nukleotidsequenz-Homologien über alle Exons auf. Die Proteine haben nahezu die gleiche Größe: MGMTs des Menschen, Hamsters, der Ratte und Maus haben jeweils 207, 209, 209 und 211 Aminosäuren. Der Aminosäure-Sequenzvergleich über 11 pro- und eukaryotische *MGMT*-cDNAs zeigt ein extrem hoch konserviertes Pentapeptid im C-terminalen Bereich mit der Sequenz Pro-Cys-His-Arg-Val/Ile, das sog. aktive Zentrum (Sekiguchi *et al.*, 1996). Das Cystein-145 innerhalb dieses Pentapeptids ist der Akzeptor für Alkylgruppen vom O⁶-Atom des Guanins bzw. dem O⁴-Atom des Thymins transferierte Alkylgruppen, sowie für Alkylphosphotriester (hier nur das bakterielle Homolog *Ada*). Dieser Transfer ist eine stöchiometrische Reaktion zweiter Ordnung in einem Schritt, durch den das Protein inaktiviert wird („Suizid-Reaktion“). Die Effizienz der fehlerfreien DNA-Reparatur durch Säuger-*MGMTs* variiert in Abhängigkeit von der Natur der Basen, welche die O⁶-Alkylguanin Gruppe flankieren (Bender *et al.*, 1996). Die Rate des Alkylgruppen-Transfers auf die MGMT ist eine Funktion der Größe der Alkylgruppe. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die Bindung der MGMT an DNA (auch ungeschädigte DNA) erhöht; O⁶-Alkylguanine in doppelsträngiger DNA werden schneller repariert als O⁶-Alkylguanine in einzelsträngiger DNA oder als freie Basen (Goodtzova *et al.*, 1994).

Die *MGMT*-Gene der Maus (Iwakuma *et al.*, 1996) und des Menschen (Nakatsu *et al.*, 1993) weisen eine sehr ähnliche Struktur auf. Innerhalb der Gesamtlänge von ca. 180 kB liegen 5 Exons. Die vier translatierten Exons II - V kodieren für mRNAs von ca. 1 kB Länge. Die Intron-Exon flankierenden Sequenzen sind nahezu identisch, nur die Länge der Introns ist verschieden. Der Promoter des *MGMT*-Gens der Maus ist in der Region -262 bis +56 lokalisiert. Diese Region ist sehr GC-reich, enthält mehrere Bindungs-Stellen für Transkriptionsfaktoren, so für Sp1, einem ubiquitären Transkriptionsfaktor und für AP-1, einem auf Glukokortikoide reagierenden Element, aber keine TATA und CCAAT „Boxen“, und zeigt somit die typischen Charakteristika eines „Housekeeping“ Gens. In dem Bereich +56 bis +95 ist ein „Enhancer“ Element lokalisiert, dessen stimulierende Wirkung auf die Transkription durch ein weiter 3' gelegenes Element (+95 bis +304) attenuiert wird (Iwakuma *et al.*, 1996). Die Regulation der *MGMT*-Expression erfolgt auf der Transkriptionsebene hauptsächlich in Form der 5-Cytosin-Methylierungen. Die 5' gelegenen CpG-Inseln sowie der Promoter sind in *MGMT*-negativen Zellen stark methyliert. Extensive 5-Cytosin-Methylierungen kondensiert das Chromatin und schließt somit Transkriptionsfaktoren aus, so daß das *MGMT*-Gen abgeschaltet wird (Costello *et al.*, 1994a). Die Methylierung der transkribierten Regionen des *MGMT*-Gens korreliert direkt mit seiner Expression (Costello *et al.*, 1994b). Das aktive *MGMT*-Gen liegt also in einer variablen Chromatin Struktur vor, an die Transkriptionsfaktoren binden können. Bei Säugern ist das *MGMT*-Gen konstitutiv exprimiert, aber die zelluläre *MGMT*-Aktivität variiert zwischen einzelnen Geweben drastisch, ebenso auch innerhalb eines Gewebes (Gerson *et al.*, 1986; Sagher *et al.*, 1989). Die höchste *MGMT*-Aktivität bei der Maus findet sich in der Leber, gefolgt von Niere und Muskel. Das hämatopoetische System sowie Gehirn und die Brustdrüsenepithelien weisen die geringsten Aktivitäten auf (Gerson *et al.*, 1986; Dumenco *et al.*, 1993). Einzelne Untersuchungen zeigten eine Induktion der *MGMT*-Transkription nach genotoxischem Streß bzw. Hormongabe bei verschiedenen Säuger-Zelllinien (Fritz *et al.*, 1991; Lefebvre *et al.*, 1993; Grombacher *et al.*, 1996) und Geweben (Potter *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1994). Das potentielle gemeinsame Signal für diese Induktion könnten DNA-Strangbrüche sein. Dafür spricht u.a. die TP53 (*wt*)-Abhängigkeit der *MGMT*-Induktion (Rafferty *et al.*, 1996) bzw. deren Suppression bei erhöhter Expression von TP53 (Grombacher *et al.*, 1998). Ganz allgemein sind die Induktionsraten geringer als die konstitutiven Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen eines Individuums. Sie könnten dennoch für die Chemotherapie relevant sein im Falle von Geweben, die stark begrenzte *MGMT*-Pools aufweisen, oder zur Therapie-Sensibilisierung TP53-defizienter Tumoren führen.

Die Strukturmodifikation der DNA, die bei Säugerzellen durch *MGMT* spezifisch erkannt und repariert werden, ist O⁶-Alkylguanin und bei der Maus zusätzlich, aber weniger effizient auch O⁴-Methylthymine (Kawate *et al.*, 1995), besonders wichtige mutagene und zytotoxische O-Alkylierungsprodukte in der DNA, deren Bildung auf die Einwirkung exogener und endogener N-Nitroso-Verbindungen (einschließlich einer Reihe von Krebs-Chemotherapeutika wie z. B. Procarbazine und Chlorethylnitrosoharnstoffe) zurückzuführen

ist. Unrepariert in der DNA proliferationskompetenter Zellen persistierendes O⁶-Alkylguanin führt bei der DNA-Replikation meist zu einem "mismatching" mit Thymin und dadurch zu G:C ⇒ A:T Transitionsmutationen. O⁴-Methylthymin kann mit Guanin paaren und führt dadurch zu A:T ⇒ G:C Transitionsmutationen (Loechler *et al.*, 1984; Preston *et al.*, 1986; Singer & Dosanjh, 1990). Diese Punktmutationen, z.B. G:C ⇒ A:T Transitionsmutationen im Kodon 12 des Ha-*ras*-Gens, können an der Kanzerogenese kausal beteiligt sein. Beispiele hierfür sind die durch N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MeNU) induzierte Mamma-Kanzerogenese bei der Ratte (Sukumar *et al.*, 1983) und die starke Korrelation von Ha-*ras* Kodon 61 Mutationen mit der Entstehung spontaner und N, N-Diethylnitrosamin (DEN)-induzierter hepatozellulärer Neoplasien bei der Maus (Maronpot *et al.*, 1995). Neben der mutagenen und zytotoxischen Wirkung des O⁶-Alkylguanins kann diese DNA-Läsion auch zur Induktion der Apoptose führen (Tominaga *et al.*, 1997; Meikrantz *et al.*, 1997).

1.4.2 Funktionsstörungen des *MGMT*-Gens bei Tier und Mensch

Wie verhalten sich Mäuse, die erhöhte zelluläre *MGMT*-Aktivitäten aufweisen? Die Überexpression der *MGMT* bei *MGMT*-transgenen Mäusen erniedrigt die Tumorzinzidenz nach Einwirkung alkylierender N-Nitroso-Kanzerogene. Dies war in allen untersuchten Fällen für diejenigen Gewebe zu beobachten, die eine erhöhte *MGMT*-Aktivität aufwiesen (Nakatsuru *et al.*, 1993; Dumenco *et al.*, 1993; Zaidi *et al.*, 1995; Becker *et al.*, 1996; Allay *et al.*, 1997; Engelbergs *et al.*, 1998b; Liu *et al.*, 1999). Offenbar schützt die raschere Elimination von O⁶-Methylguanin aus der DNA durch die verstärkte *MGMT*-Aktivität vor der Mutationsfixierung.

Was sind die Konsequenzen einer fehlenden *MGMT*-Expression? Zunächst sind homozygot *MGMT*-negative (*MGMT*^{-/-}) Mäuse kleiner, ihr Gewicht beträgt nur 85 % des Wildtyps (Tsuzuki *et al.*, 1996). Die Hauptursache hierfür wird in einer kontinuierlichen Schädigung der Darmschleimhaut durch endogene DNA-Alkylierungen gesehen. Die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber alkylierenden Agenzien zeigt sich besonders deutlich nach exogener Gabe von MeNU. Nach einer für Wildtyp- (*MGMT*^{+/+}) und heterozygote Tiere (*MGMT*^{+/-}) nicht toxischen MeNU-Dosis versterben *MGMT*^{-/-} Mäuse nach etwa 17 Tagen zu 100 %. Die Darmschleimhaut dieser Tiere ist stark geschädigt und es wird eine drastische Myelosuppression beobachtet, die zu einer Reduktion der Leukozyten und Blutplättchen führt, so daß bereits 11 Tage nach MeNU-Applikation massive bakterielle Infektionen in der Leber auftraten (Tsuzuki *et al.*, 1996). Dieser starke myelosupprimierende Effekt ist ebenfalls nach Applikation alkylierender Chemotherapeutika, wie 1, 3-bis(2-chlorethyl)-1-Nitrosoharnstoff (BCNU), Streptozotocin und Temozolomid zu beobachten (Glassner *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse zeigen deutlich die protektive Wirkung der *MGMT* vor der zytotoxischen Wirkung von O⁶-Methylguanin. Diese Zytotoxizität kann in der Aktivität des „Mismatch“-DNA-Reparatursystems (MMR) der DNA begründet sein. Die fehlgepaarten Basenpaare O⁶-Alkylguanin:Thymin und O⁶-Alkylguanin:Cytosin sind Substrate der MMR

(Duckett *et al.*, 1996). Da die MMR jedoch das O⁶-Alkylguanin aus dem misskodierenden Strang der DNA nicht entfernen kann, wiederholt sich dieser Reparaturzyklus. Die Folge könnten akkumulierende DNA Strangbrüche sein, die schließlich zu letalen Doppelstrangbrüchen führen (Karran & Bignami, 1992; Karran & Bignami, 1994). Diese Modellvorstellung erhielt starke Unterstützung durch eine Maus-Doppelmutante. Wird das *Mlh 1* MMR-Gen bei *MGMT*^{-/-} Tieren ausgeschaltet, so zeigen sich die Tiere wieder als tolerant gegenüber MeNU (Kawate *et al.*, 1998). Die *MGMT*-Expression verringert also die zytotoxische Wirkung eines anderen DNA-Reparaturmechanismus. Auch dieses Beispiel zeigt wieder die Verkettung einzelner DNA-Reparaturwege.

Die fehlende Reparatur von O⁶-Alkylguanin bei *MGMT*-„knockout“ Mäusen erhöht auch die Frequenz von Lymphomen und Lungenadenomen nach MeNU-Applikation (Sakumi *et al.*, 1997). Im Fall der Nitrosamin-induzierten Hepatokarzinogenese wurde eine signifikante Erhöhung der Tumorzinzidenz bisher nur bei weiblichen, nicht aber bei männlichen Mäusen nachgewiesen (Iwakuma *et al.*, 1997). Dies ist möglicherweise auf eine höhere Suszeptibilität der Männchen gegenüber N, N-Dimethylnitrosamin (DMN) zurückzuführen, und daran gemessen an einer zu hohen Karzinogendosis im Versuch. Dennoch unterstreichen die Daten klar die Bedeutung der *MGMT*-vermittelten DNA-Reparatur bei der Tumorigenese. Die Versuchsbedingungen stellen in den genannten Fällen extreme An/Aus-Situationen dar, da die Reparaturfunktion in allen Zellen entweder vorhanden ist oder nicht. Die bei *MGMT*-Keimbahnmutanten induzierte Kanzerogenese ist damit ein Modell für die Tumorigenese bei hereditären DNA-Reparaturdefekten des Menschen. Entsprechende Krankheits-Syndrome sind z.B. Xeroderma pigmentosum, Ataxia telangectasia und das Lynch-Syndrom. Insgesamt ist ihr Anteil an der Gesamtheit aller menschlichen Tumoren aber gering. Ein hereditärer *MGMT*-Gendefekt wurde bisher beim Menschen nicht nachgewiesen.

Der Anteil *MGMT*-negativer Tumoren beim Menschen wird mit ~ 20 % angegeben (Citron *et al.*, 1991), bei einzelnen Tumortypen mit ~30 % (Kopf- und Nacken Karzinome) und ~38 % (Gliome, Dickdarmkarzinome) noch höher (Esteller *et al.*, 1999). Allgemein zeigen Untersuchungen an menschlichen Tumoren eine große Varianz der *MGMT*-Aktivität mit Unterschieden von bis zu zwei Größenordnungen (Hirntumoren) (Isowa *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992; Silber *et al.*, 1993; Badawi *et al.*, 1994). Interessante Ergebnisse ergab der Vergleich von *MGMT*-Aktivitäten in Tumorgewebe und den direkt angrenzenden Normalgewebe. So war im Falle von Hirntumoren in mehr als 55 % (64 / 117) der Fälle im angrenzenden Normalgewebe keine *MGMT*-Aktivität nachweisbar war (Silber *et al.*, 1996). Dieser Anteil stieg mit dem Alter der Patienten auf ~75 % an (> 50 Jahre). Andere Gewebe der gleichen Patienten zeigten keine Reduktion der *MGMT*-Aktivität. Ähnliche Resultate ergab der Vergleich von Dickdarmkarzinomen mit dem entsprechenden Normalgewebe (Herfarth *et al.*, 1999). Die Beobachtungen sprechen für eine mögliche altersabhängige Prädisposition *MGMT*-negativer Gewebe für die Tumorigenese. Weshalb ist dann jedoch nur ein vergleichsweise geringer Anteil der bisher analysierten menschlichen Tumoren *MGMT*-negativ? Die Ursache hierfür kann in der Reversibilität der epigenetischen Regulation der

MGMT-Expression durch Promoter-Hypermethylierung liegen (1.4). Offenbar steigt die MGMT-Expression in zunächst MGMT-negativen Geweben während der Tumorprogression dann wieder an (Silber *et al.*, 1993; Preuss *et al.*, 1996; Silber *et al.*, 1998). Die epigenetische Inaktivierung des *MGMT*-Gens in Normalgeweben durch 5-Cytosin-Methylierung könnte somit durchaus ein predisponierender Faktor für die Tumorigenese sein (Cairns-Smith & Karran, 1992; Silber *et al.*, 1996). Als Konsequenz der endogenen oder exogenen Alkylierung reichern sich auf diese Weise O⁶-Alkylguanine in der zellulären DNA an, d.h. es sind „Mutator Phänotypen“ entstanden, die mit erhöhter Frequenz auch Mutationen in kritischen, Transformations-assoziierten Genen bewirken können.

Wie können solche Modellvorstellungen im Tierversuch überprüft werden und wie kann die somatische Inaktivierung einer spezifischen DNA-Reparaturfunktion in definierten Zielzelltypen simuliert werden? Der konditionale „knockout“ eines spezifischen DNA-Reparaturgens, hier des *MGMT*-Gens, ermöglicht die Etablierung eines Tiermodells, mit dem der Prozeß der Kanzerogenese *in vivo* sehr realistisch simuliert werden kann. Aufgrund der Konditionalität des Geninaktivierungsansatzes kann das Gen in einem induzierbaren System zelltypspezifisch zu einem beliebigen Zeitpunkt ausgeschaltet werden. Die zelltypspezifische Inaktivierung unterbindet unerwünschte Nebeneffekte durch DNA-Alkylierung in anderen Geweben, wie z.B. die Myelosuppression im Knochenmark oder Schädigungen der Magen/Darm-Schleimhäute und damit einhergehende Ernährungsprobleme. Ein wesentlicher Vorteil des induzierbaren „knockouts“ ist besonders dann gegeben, wenn die Inaktivierung auf eine Subpopulation der Zielzellen beschränkt bleibt. Erst diese Konstellation simuliert die somatische Inaktivierung des *MGMT*-Gens entsprechend der Modellvorstellung der Kanzerogenese. Da bei jedem Tier Zellen des gleichen Typs mit und ohne MGMT-abhängiger DNA-Reparatur vorliegen, können *MGMT*-negative Zellen direkt mit *MGMT*-positiven Zellen verglichen werden. Die Etablierung eines solchen Tiermodells für das *MGMT*-Gen ist Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit. Mit Hilfe dieses Tiermodells können wesentliche Fragen nach der Bedeutung der MGMT-vermittelten DNA-Reparatur als Determinante für das Krebsrisiko beantwortet werden. Bilden reparaturdefiziente Zellen den höchsten Anteil der frühen, klonalen, initiierten Zellen und welchen Einfluß hat die Reparaturdefizienz auf die Adaptations- und Selektionsvorgänge während der Promotionsphase? Wirkt also die MGMT-vermittelte DNA-Reparatur der Initiation und/oder der Promotion entgegen?

1.5 Apurin/Apyrimidin-Endonuklease

1.5.1 Funktion und Struktur

Neben der direkten Reparatur von O⁶-Alkylguanin in der DNA durch das MGMT-Protein ist der Pathway der BER wichtig, um DNA mit modifizierten oder fehlenden Basen zu reparieren. Bei diesem Reaktionsweg erkennen Glykosylasen modifizierte Basen und entfernen diese durch Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung. Daneben ist auch die

Spontanrate des Basenverlustes, vor allem der Purinbasen, aus der DNA im Falle Karzinogen-modifizierter Basen durch stärkere Labilisierung der N-glykosidischen Bindung erhöht (Lindahl, 1993). Zur Zeit werden elf Glykosylasen beschrieben (Friedberg *et al.*, 1995). Durch die Glykosylase-Aktivität entstehen in der DNA Apurin/Apyrimidin-Stellen (AP-Stellen), die hauptsächlich durch die 5'-Phosphodiesterase-Aktivität der AP-Endonuklease (APE, HAP-1, APEX, REF-1) (EC 4.2.99.18) zum Einzelstrangbruch prozessiert werden. Die APE lädt die DNA-Polymerase β (Pol β) in einen ternären Komplex mit der DNA, so daß der 5'-Desoxyribosephosphat-Rest (5'-dRP) durch Pol β entfernt wird (Bennett *et al.*, 1997). Anschließend wird ein Nukleotid polymerisiert und die DNA-Ligase schließt den Bruch. Neben diesem Hauptweg der BER gibt es die „long patch“ Variante der BER. Liegen veränderte AP-Phosphoribosen vor, die nicht durch Pol β exzidiert werden können, wie z.B. 3'-dRP oder veränderte 5'-dRP, so werden 2-7 Nukleotide in einer PCNA/FEN-1 abhängigen Reaktion entfernt (Biade *et al.*, 1998) (Abb. 1). Nicht prozessierte AP-Stellen sind mutagen und zytotoxisch.

Unter physiologischen Bedingungen entstehen bei Säugerzellen pro Tag zwischen 50.000 und 200.000 AP-Stellen. Die Entstehungsrate von AP-Stellen in verschiedenen menschlichen Geweben ist unterschiedlich (Hirn > Darm > Herz > Leber > Lunge > Niere) (Nakamura & Swenberg, 1999). Da die APE die Reparatur dieser AP-Stellen initiiert, wird sie zum Schlüsselenzym der BER. Inaktiviert man bei Hefen die AP-Endonuklease *Apn1*, so steigt die Spontanmutationsrate z.B. für A:T \rightarrow C:G Transversionen um den Faktor 60 an (Xiao & Samson, 1993).

Die APE ist ein multifunktionales Enzym mit einer molaren Masse von 35,4 kDa. Sie besteht aus zwei nicht überlappenden Domänen. Die C-terminale Domäne beinhaltet die Endonuklease-Funktion, die N-terminale Domäne hat Redox-Aktivität (Xanthoudakis *et al.*, 1994). Die beschriebenen biochemischen Funktionen der Maus-APE *in vitro* sind neben der 5'-Phosphodiesterase-Aktivität eine RNase H- (Barzilay *et al.*, 1995), 3'-Phosphatase- (Seki *et al.*, 1991), 3' \rightarrow 5'-Exonuklease- sowie eine 3'-Diesterase-Aktivität (Chen *et al.*, 1991; Suh *et al.*, 1997). Die Redox-Aktivität der APE (Redox-Faktor, Ref-1) wirkt auf verschiedene Transkriptionsfaktoren. Die DNA-Bindungsaktivität von Fos/Jun-Heterodimeren, NF-kappa B, Myb, ATF/Creb (Xanthoudakis *et al.*, 1992), Pax-5/8 (Tell *et al.*, 1998) und TP53 (Jayaraman *et al.*, 1997; Meira *et al.*, 1997) wird durch Reduktion stimuliert. Zudem agiert die APE durch die Bindung an Ca^{++} „responsive elements“ im eigenen Promoter als Auto-Negativ-Regulator (Izumi *et al.*, 1996). Während die Redox-Funktion der APE spezifisch für Säuger ist, wurden AP-Endonukleasen allgemein bei bisher allen untersuchten Zellen und in Mitochondrien (Pinz & Bogenhagen, 1998) nachgewiesen. Die starke Konservierung der Aminosäuresequenz zwischen der bakteriellen Endonuklease III und der Endonuklease-Domäne der eukaryotischen APEs unterstreichen die zentrale Bedeutung dieser DNA-Reparaturfunktion (Demple *et al.*, 1991). Die APE-Gene von *S. Cerevisiae*, Maus, Ratte und Mensch wurden kloniert und charakterisiert (Popoff *et al.*, 1990; Robson & Hickson, 1991; Harrison *et al.*, 1992; Robson *et al.*, 1992; Takiguchi & Chen, 1994; Wilson *et al.*, 1994; Akiyama *et al.*, 1995; Tan *et al.*, 1996). Das APE-Gen der Maus hat eine Größe von 2,2 kB

und weist fünf Exons auf. Der Transkriptionsstart liegt im ersten, nicht translatierten Exon in einem Bereich von 312 Bp bis 336 Bp 5' vom ATG-Kodon. In der Promoter-Region ist keine TATA-Box vorhanden, jedoch zwei CCAAT-Boxen und potentielle Erkennungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren ATF, NF-IL6, Sp1 und AP2. Der Promoter zeigt damit die typischen Merkmale eines „housekeeping“ Gens. In Übereinstimmung damit, aber im Unterschied zum *MGMT*-Gen, findet sich eine ubiquitäre Expression des *APE*-Gens auf Gesamtgewebe-Niveau (Akiyama *et al.*, 1994). Die *APE*-Promotoren von Mensch und Maus zeigen *in vitro* eine bidirektionale Aktivität (Harrison *et al.*, 1997). Es wurde bisher aber kein Gen oberhalb des *APE*-Gen beschrieben, das durch diesen Promoter kontrolliert wird. Das *APE*-Gen ist bei der Maus auf Chromosom 14 lokalisiert, in einer Region, die bisher nicht mit DNA-Reparaturdefizienzen assoziiert ist (Harrison *et al.*, 1995).

Obwohl die biochemischen Funktionen der APE intensiv untersucht wurden, bleibt die biologische Funktion ihrer Multifunktionalität, vor allem der Verbindung der DNA-Reparatur mit der Redox-Funktion weitgehend ungeklärt. Viele Eigenschaften der APE deuten auf eine Funktion als Sensor für oxidativen Streß hin. Ihre verschiedenen endo- und exonukleolytischen Aktivitäten suggerieren eine Beteiligung der APE an der Entfernung blockierender 3' und 5' Gruppen an Einzelstrangbrüchen, die auf die Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zurückzuführen sind, und die Prozessierung von DNA-Läsionen, die durch Inzision von 3' AP-Lyasen entstehen (Ludwig *et al.*, 1998). Tatsächlich kann die APE durch oxidativen Streß induziert werden (Grösch *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1995). Eine erhöhte Expression der APE steigert die Resistenz gegenüber ROS (Ramana *et al.*, 1998). ROS treten endogen auch als Nebenprodukte der Atmung auf, verstärkt noch bei Entzündungen und nach Gamma-Bestrahlung. Interessanterweise sind die APE-stimulierten Transkriptionsfaktoren NF-kappa B, C/EBP und AP-1 involviert in der Aktivierung früher Gene der zellulären Antwort auf ROS und Gamma-Strahlen (Schreck *et al.*, 1992; Hallahan *et al.*, 1993). Die APE ist in bezug auf ihre biologische Funktion also bifunktional. Neben ihrer zentralen Bedeutung für die BER ist sie beteiligt an der zellulären Reaktion auf oxidativen Streß.

1.5.2 Funktionsstörungen des *APE*-Gens bei Tier und Mensch

Die Inaktivierung des *APE*-Gens bei der Maus ist embryonal letal (Xanthoudakis *et al.*, 1996). Die Embryonen weisen ab dem Embryonaltag 7,5 morphogenetische Defekte auf und werden bis zum Embryonaltag 10 absorbiert (Ludwig *et al.*, 1998). Da bei diesen *APE*-„knockouts“ die Endonuklease- als auch die Redox-Aktivität betroffen waren, bleibt es bisher ungeklärt, ob der Verlust einer oder erst beider Aktivitäten diesen dramatischen Effekt verursachen. Es bleibt auch unbekannt, ob dieser Defekt nur embryonal letal ist, d.h. ob adulte Tiere die *APE*-Defektmutation tolerieren würden?

Beim Menschen sind *APE*-Mutationen bisher nur für die amyotrophische Lateralsklerose (ALS) beschrieben, einer degenerativen Erkrankung der 1. und 2. motorischen Neuronen.

Die Patienten weisen in den Neuronen in hohem Ausmaß (8/11 Fällen) „missense“-Mutationen des *APE*-Gens auf, die eine Akkumulation oxidativer DNA-Läsionen bedingen und zur Zellschädigung führen (Olkowski, 1998). Es müssen allerdings nicht unbedingt Mutationen des *APE*-Gens vorliegen, um die Funktion des Enzyms zu beeinflussen. Die APE wird posttranslational modifiziert (Yacoub *et al.*, 1997). Die Phosphorylierung des Enzyms durch die Casein-Kinase II führt zur Inaktivierung der Endonuklease-Funktion, nicht aber der Redox-Funktion (Yacoub *et al.*, 1997). Diese Phosphorylierung ist also ein Schalter zwischen DNA-Reparatur- und Redox-Aktivität, dessen Bedeutung unklar ist. Möglicherweise ist auch die inter- und intrazelluläre Verteilung der APE für ihre Funktion von Bedeutung. Zwar ist die Expression der APE bezogen auf Gesamtgewebe ubiquitär, auf zellulärem Niveau zeigen sich aber deutliche Expressionsunterschiede in Zell-Subpopulationen einzelner Gewebe und hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation (Duguid *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1996). In der normalen Kolon-Schleimhaut des Menschen ist die intrazelluläre Verteilung der APE abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen. Bei undifferenzierten, proliferativen Zellen ist die APE-Lokalisation nukleär, bei differenzierten Zellen zytoplasmatisch (Kakolyris *et al.*, 1997). Diese differenzierungsabhängige Lokalisation der APE ist bei Adenomen und Karzinomen aufgehoben. Da keine Korrelation mit der Tumorprogression besteht, könnte die Aufhebung der normalen Verteilung der APE ein frühes Ereignis bei der Entstehung dieser Tumoren sein (Kakolyris *et al.*, 1997). Bei Kolon-Karzinomen zeigen etwa 50 % der Zellen eine rein zytoplasmatische APE-Färbung (Kakolyris *et al.*, 1997), d.h. diesen Zellen fehlt zumindest die Kapazität zur BER.

Um die Bedeutung der APE bei der Kanzerogenese untersuchen zu können, werden Tiermodelle benötigt. Da die komplette Inaktivierung des *APE*-Gens embryonal letal ist, führt die Ausschaltung des Gens in der Keimbahn der Maus nicht weiter. Vielmehr muß ein konditionaler „knockout“ gewählt werden.

In der vorliegenden Arbeit war das *APE*-Gen zunächst so in einen Rekombinationsvektor zu klonieren, daß es konditional inaktiviert werden kann. Hierzu wurde eine Konstruktion gewählt, die ausschließlich die Deletion der Endonuklease-Domäne des Enzyms ermöglicht. Die Redox Domäne sollte in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt werden. Anschließend werden mit Hilfe homozygot rekombinanter ES-Zellen die biochemischen Auswirkungen des „knockouts“ zu charakterisieren sein. An Mäusen, deren AP-Endonukleaseaktivität bei einer Subpopulation eines Zelltyps (Hepatozyten) zu einem frei wählbaren Zeitpunkt ausschaltbar ist, sollen dann Untersuchungen zur Hepatokarzinogenese durchgeführt werden. Dabei wird die Frage nach den Konsequenzen nicht prozessierter AP-Stellen für die Kanzerogenese im Vordergrund stehen.

1.6 Das Modell der Hepatokarzinogenese bei der Maus

Die Umwandlung einer normalen Zelle in eine maligne Tumorzelle (Kanzerogenese) ist kein plötzliches Ereignis, sondern ein mehrstufiger Vorgang, der beim Menschen Jahre und Jahrzehnte beanspruchen kann. Seine systematische Untersuchung ist nur in Tiermodellen

möglich, in denen der Transformationsprozeß vergleichsweise im Zeitraffer abläuft und in allen Stadien verfolgt werden kann. Das Modell der Hepatokarzinogenese bei Nagern induziert durch DNA-reaktive Kanzerogene ist sehr gut untersucht. Die Relevanz dieses Modells wird unterstrichen durch den hohen Anteil von 30 % bis 50 % der chemischen Karzinogene, die bei Nagern hepatokarzinogen wirken (Gold *et al.*, 1991; Huff *et al.*, 1991). Das Modell wurde zunächst für die Ratte etabliert (Druckrey *et al.*, 1967b) und dann zunehmend auch auf die Maus übertragen (Vesselinovitch, 1980; Moore *et al.*, 1981; Vesselinovitch & Mihailovich, 1983; Vesselinovitch *et al.*, 1984). In der Sequenz der Tumorigenese folgt den frühen und späten prämaligen Vorstadien (Foci mit verändertem Enzymmuster) das hepatozelluläre Adenom, gefolgt vom hepatozellulärem Karzinom (Goldfarb *et al.*, 1981; Grisham, 1996) (Abb. 2).

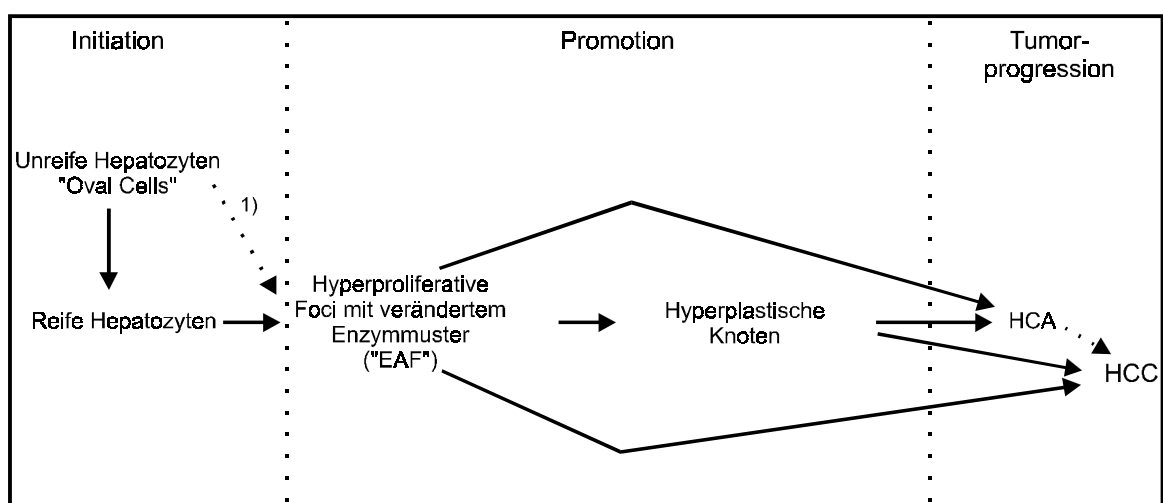


Abb. 2: **Schematische Darstellung der chemisch-induzierten Hepatokarzinogenese der Maus** (adaptiert nach Grisham, 1996). Die Grafik beschreibt die klonale Entwicklung der prämaligen Stadien der Hepatokarzinogenese bis zur Entstehung von Adenomen und Karzinomen. Einer primären Mutation bzw. epigenetischen Veränderung bei den Zielzellen der Kanzerogenese (Hepatozyten) im Stadium der Initiation folgt die Bildung hyperproliferativer Foci mit verändertem Kohlenhydratstoffwechsel (EAF). In diesem Stadium der Promotion sind die phänotypischen Veränderungen noch größtenteils reversibel. Im Gegensatz zur Ratte lassen sich bei der Maus die späteren hyperplastischen „Knoten“ kaum von den EAF unterscheiden (Grisham, 1996). Erst über die Akkumulation weiterer Veränderungen in einzelnen Zellen dieser Foci werden einige von diesen irreversibel zu hepatozellulären Adenomen (HCA) bzw. Karzinomen (HCC) transformiert. 1) (He *et al.*, 1994).

Ein wesentlicher Vorteil des Hepatokarzinogenese-Modells liegt in der Möglichkeit, distinkte Stadien der Tumorentstehung histochemisch charakterisieren zu können. Die frühesten Veränderungen können bereits wenige Wochen nach einmaliger Kanzerogen-Exposition aufgrund ihres veränderten Kohlenhydratstoffwechsels als hyperproliferative „enzyme altered foci“ (EAF) erkannt werden. In den Zellen dieser Foci läßt sich der Übergang von der Glukoneogenese zu erhöhtem Glukose-Verbrauch durch den Pentosephosphat-Stoffwechsel und Glykolyse über eine verminderte Glukose-6-Phosphatase (G6Pase)- und verstärkte Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)- bzw. Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Aktivität nachweisen (Vesselinovitch *et al.*, 1985; Buchmann *et al.*, 1992). In den späteren sog. „hyperplastischen Knoten“ ist die Anordnung der

Hepatozyten verändert, ohne das parenchymale Gewebe zu komprimieren (Frith & Ward, 1980). Diese „Knoten“ zeigen ebenfalls den veränderten Kohlenhydratstoffwechsel, zusätzlich exprimieren sie teilweise den „Insulin-like growth factor II“ (Cariani *et al.*, 1991). Die neoplastischen (aber noch benignen) Adenome sind im wesentlichen gekennzeichnet durch eine übermäßige Einlagerung von Fett und Glykogen. Hingegen weisen die aus einem Teil der Adenome hervorgehenden schnellwachsenden Karzinome neben anderen histochemischen Veränderungen eine Reduzierung des Fett- und Glykogengehalts auf (Hacker *et al.*, 1991).

Für den experimentellen Ansatz ist wesentlich, daß auf eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Entwicklung früher präneoplastischer Foci bis hin zu Hepatokarzinomen zurückgegriffen werden kann. Das Produkt aus Dosis (d) mal Latenzzeit (t^n) bis zur 50-prozentigen Tumorinzidenz ist konstant (k), wobei der Exponent stets > 1 ist (z.B. 2,3 für N, N-Diethylnitrosamin, DEN) und somit den Prozeß der chemisch-induzierten Hepatokarzinogenese als beschleunigten Vorgang ausweist (Druckrey, 1967a). Diese Konstanz gilt für alle Stadien der Hepatokarzinogenese, allerdings erhöht sich der Wert des Exponenten der Zeit mit der Progression des Tumors. So ist bei gleicher Dosis die Entwicklung eines hepatozellulären Adenoms 100 mal wahrscheinlicher als die Ausbildung eines Karzinoms (Vesselinovitch & Mihailovich, 1983). Vereinfachend gilt: Je höher die Dosis, desto mehr frühe EAF werden induziert und desto früher treten auch späte Stadien (Karzinome) auf. Neben der Dosis ist vor allem die proliferative Kapazität der Zielzellen der Kanzerogenese zum Zeitpunkt der Kanzerogen-Exposition entscheidend für die Tumorumitiation. Entsprechend kann die Tumorinzidenz durch eine partielle Hepatektomie, die einen Proliferationsschub auslöst, gesteigert werden (Craddock, 1975; Vesselinovitch *et al.*, 1980). Einen vergleichbaren Proliferations-Peak nutzt man im Modell der durch N-Nitroso-Kanzerogene induzierten Hepatokarzinogenese der Maus. Dabei wird jungen Mäusen im Alter von 15 Tagen das jeweilige Kanzerogen einmalig appliziert. Zu diesem Zeitpunkt durchläuft die Proliferationsrate der Hepatozyten ein Maximum. Bis zu einem Alter von 50 Tagen zeigt die Leber der Maus wellenförmig-verlaufende Raten der makromolekularen Synthesen mit einem 5 Tage-Rythmus, wobei die Amplitude der Synthese-Spitzen mit zunehmendem Alter abnimmt (Itze *et al.*, 1976).

1.7 “Gene targeting”

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methodik des „gene targeting“ eingesetzt, um eine konditionale Inaktivierung der DNA-Reparaturgene *MGMT* und *APE* *in vivo* zu ermöglichen. Grundlagen dieser Technologie sind a) die Konstruktion von „Replacement“- bzw. „Insertions“-Vektoren, b) die Erarbeitung von Selektionsstrategien für homolog rekombinante Klone und c) der konditionale Gen-„knockout“ mit Hilfe des *Cre-loxP* Systems.

1.7.1 Rekombinationsvektoren

Prinzipiell werden zwei Arten von Vektoren für die homologe Rekombination verwendet: "Replacement-" und "Insertions"-Vektoren (Thomas & Capecchi, 1987). Im Falle der "Replacement"-Vektoren wird die endogene DNA durch die homologe DNA im Vektor ersetzt. Dagegen integrieren „Insertions“-Vektoren als Ganzes in den endogenen Locus. Hierbei kommt es zu Verdopplung der gemeinsamen DNA-Anteile (homologer DNA im Vektor und endogener DNA). Beide Arten von Vektoren zeigen gleiche Integrationsfrequenzen (Thomas & Capecchi, 1987; Deng & Capecchi, 1992). Für Gen-"knockout"-Experimente werden meist "Replacement"-Vektoren verwendet, da sie nicht der Gefahr der Reversion zum Wildtyp durch Exzision der Vektor-DNA bzw. durch „Exon-Skipping“ des modifizierten Exons unterliegen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden daher „Replacement“-Vektoren eingesetzt.

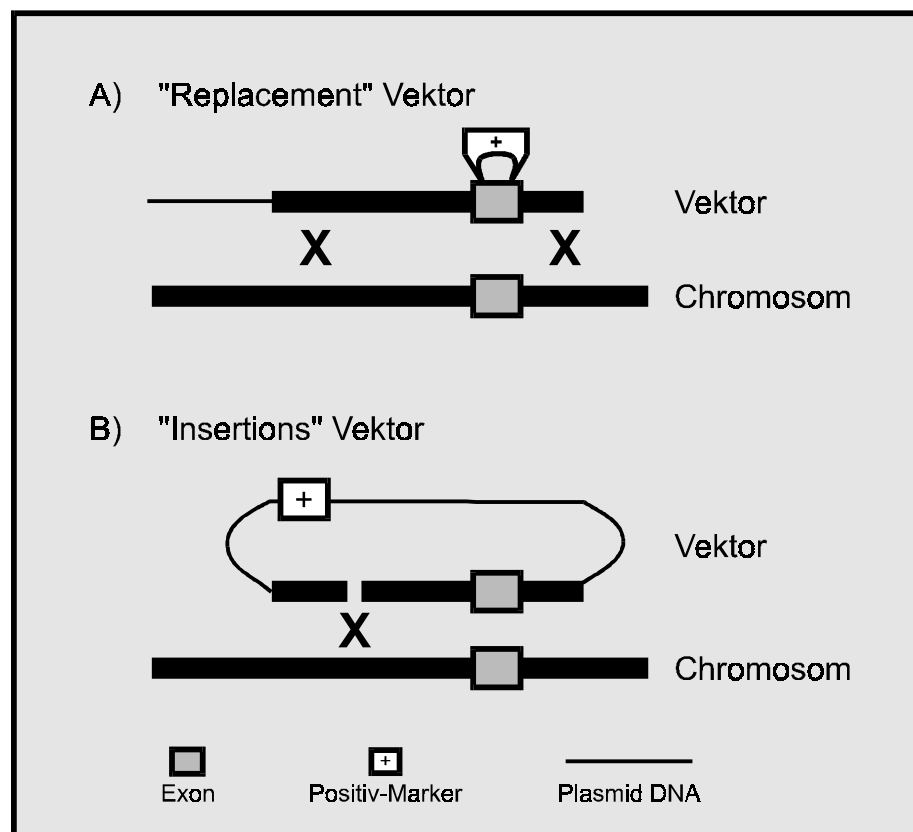


Abb. 3: Schematische Darstellung der Rekombination eines „Replacement“- und eines „Insertions“-Vektors. Beim „Replacement“-Vektor (A) wird der Positiv-Marker meist unter Deletion endogener Sequenzen in ein Exon kloniert. Die Integration erfordert zwei Rekombinationsereignisse (X). Die Plasmid Sequenzen integrieren nicht. Der „Insertions“-Vektor (B) integriert komplett, einschließlich der Plasmid-DNA. Die Integration erfordert hier nur ein Rekombinationsereignis, da der Rekombinationsvektor in der homologen Sequenz linearisiert wird (Hasty & Bradley, 1993).

Die Integration eines Vektors in das Säuger-Genom ist ein sehr seltenes Ereignis. Nur bei etwa jeder zehntausendsten transfizierten Zelle liegt der Vektor rekombinant vor. Zudem erfolgt die homologe Rekombination bei Säugerzellen etwa 1000-fach seltener als die nicht-homologe Rekombination (Capecchi, 1989). Um homolog rekombinante Zell-Klone zu finden, müssen diese mit Hilfe von Selektionsmarkern angereichert werden, die durch den Vektor eingebracht werden. Der am häufigsten verwendete Positiv-Marker ist das Neomycin-Phosphotransferase Gen (*neo*), für das mit Geneticin (G 418) selektioniert wird. Andere Positiv-Marker sind Hygromycin B-Phosphotransferase (*hph*), Xanthine/Guanin-Phosphoribosyltransferase (*gpt*) und Puromycin N-Acetyltransferase (*pac*).

Wichtiger als die Verwendung eines bestimmten Positiv-Markers sind der eingesetzte Promoter und die Transkriptionssignale der Selektionskassette. Die Selektionskassette muß im Ziel-Locus aktiv sein. Dies kann durch weitgehend positionsunabhängige Promotoren, erreicht werden, wie z.B. den Phosphoglycerin-Kinase- (*PGK*), den RNA-Polymerase II- (*Pol 2*) oder den β -Aktin-Promoter. Zumeist werden relativ schwache Promotoren wie der HSV Thymidin Kinase I- oder der *MC 1*-Promoter eingesetzt. Diese bieten im Falle von Genen, die bei ES-Zellen aktiv sind potentiell Vorteile, da homolog rekombinante Klone durch den „enhancer trap“-Effekt selektiv angereichert werden können. In vorliegenden Arbeit wurde deshalb der *MC 1*-Promoter verwendet. Eine weitere, wesentlich effizientere Möglichkeit, homolog rekombinante Klone unter den resistenten ES-Zell-Klonen anzureichern, besteht in einer zusätzlichen Negativ-Selektion (Mansour *et al.*, 1988). Dabei wird eine HSV-Thymidin Kinase (*HSV-tk*) Kassette außerhalb der homologen Region in den Rekombinationsvektor plziert. Wird der Vektor homolog rekombiniert, so geht die *HSV-tk* Kassette verloren. Für diesen Verlust wird mit Hilfe von Ganciclovir selektioniert, einem Substrat nur der viralen Thymidin-Kinase, dessen Metabolisierung toxisch ist. Diese Negativ-Selektion wurde in dieser Arbeit angewendet.

Neben den genannten Selektionsstrategien ist vor allem die Länge der homologen DNA im Rekombinationsvektor und deren Isogenie zum Zielgen von entscheidender Bedeutung für die Rekombinationsfrequenz, die mit der Länge der DNA exponentiell ansteigt. Als Standardgröße wird eine Länge von ~10 kB angesehen, die Sättigung der Integrationsfrequenz tritt bei ~14 kB ein. Nicht isogene homologe DNA kann die Rekombinationsfrequenz bis zu einem Faktor 5 reduzieren (Deng & Capecchi, 1992). Mit den Vorgaben einer isogenen homologen DNA von ~10 kB und der Positiv-/Negativ-Selektion sind 1 - 5 % aller doppelt-resistenten Klone als homolog rekombinante Klone zu erwarten.

Die Verwendung der bisher beschriebenen Rekombinationsvektoren führt stets zur Inaktivierung des Zielgens in der Keimbahn der Maus. Die Nachteile dieser Ansätze in bezug auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu inaktivierenden Gene wurden bereits in den Abschnitten 1.4.2 und 1.5.2 beschrieben. Der konditionale Gen-„knockout“ mit Hilfe des Cre-loxP-Systems hebt diese Beeinträchtigungen der Analysemöglichkeiten von Tiermodellen weitgehend auf; denn es werden nicht nur die embryonale Letalität und die fehlende

Gewebespezifität eines Keimbahn-„knockouts“ umgangen, sondern die Gen-Inaktivierung wird zeitlich frei wählbar und zelltypspezifisch induzierbar und kann somit dem jeweiligen Tiermodell angepaßt werden.

1.7.2 Das Cre-loxP-System

Das Cre-loxP System besteht aus der Cre-Rekombinase, einer sequenz-spezifischen Rekombinase des Bakteriophagen P 1, und den 34 Bp großen Rekombinase-Erkennungssequenzen, den loxP- (locus of crossing over [x] of P1 recombinase) Sequenzen. Die ursprüngliche Funktion von Cre besteht darin, Bakteriophagen-Dimere nach der Replikation im Wirt voneinander zu trennen. Cre erkennt die loxP-Stellen im Phagen-Genom und vermittelt den Strangaustausch, so daß einzelne Phagen-Genome entstehen (Abb. 4). Ende der achtziger Jahre konnte erstmals die Funktionstüchtigkeit dieses Systems bei Säugerzellen nachgewiesen werden (Sauer & Henderson, 1988). Ein Resistenzgen wurde von zwei loxP-Sequenzen („floxed“) flankiert und dieses Plasmid in eine Zell-Linie transfiziert, die zudem die Cre-Rekombinase exprimierte. Das Ergebnis war die Deletion des Resistenzgens unter Beibehaltung nur einer loxP-Sequenz. Der Transfer dieses Systems in Mäuse vollzogen zwei Gruppen gleichzeitig (Lakso *et al.*, 1992; Orban *et al.*, 1992). In beiden Arbeiten wurden fremde Gene durch die Wirkung der Rekombinase im Tier angeschaltet. In der Gruppe von K. Rajewsky und Mitarbeiter (Institut für Genetik, Universität zu Köln) wurde das Cre-loxP-System dann zur konditionalen Geninaktivierung eingesetzt. Damit konnte erstmals die Bedeutung eines Zelltyp-spezifischen Gendefekts bei adulten Tieren analysiert werden, dessen Inaktivierung in der Keimbahn zur embryonalen Letalität geführt hätte (Gu *et al.*, 1994).

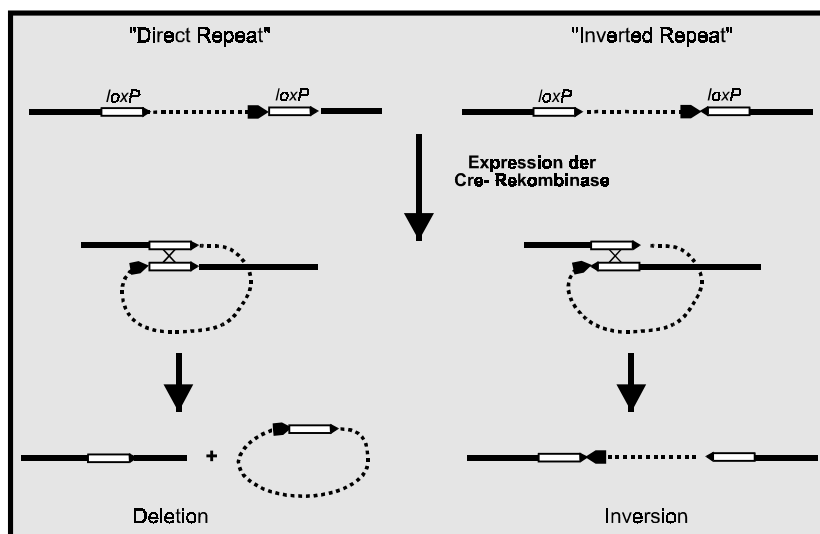


Abb. 4: **Unterschiedlich angeordnete loxP-Sequenzen und ihre Konsequenzen.** Wird ein DNA-Fragment (gepunktete Linie) von loxP-Sequenzen flankiert, die als „direct repeats“ vorliegen, so wird das „geflochte“ Fragment deletiert. Die Anordnung der loxP-Sequenzen als „inverted repeats“ führt zur Inversion des „geflochten“ Fragments. Da diese Rekombination reversibel ist, kann sie durch wiederholte Expression der Cre-Rekombinase als *in vivo* Schalter eingesetzt werden.

Die Verwendung des Cre-loxP-Systems für den konditionalen Gen-„knockout“ hat aufgrund der vielen Vorteile der Konditionalität weite Verbreitung gefunden. Ein ähnliches

Rekombinationssystem aus der Hefe, daß mit der FLP-Rekombinase arbeitet die *frt*-Sequenzen erkennt, ist dagegen bisher auf wenig Akzeptanz gestoßen. Obwohl auch dieses System bei der Maus funktioniert, ist die Rekombinationseffizienz bei ES-Zellen geringer als mit dem *Cre-loxP* System. Ursache hierfür ist die geringere Thermostabilität der FLP-Rekombinase (Buchholz *et al.*, 1996). An stabileren Varianten der FLP-Rekombinase wird zur Zeit gearbeitet, so daß in absehbarer Zeit möglicherweise zwei Rekombinationssysteme zur Verfügung stehen werden, die dann komplexere Rekombinationen *in vivo* ermöglichen sollten (Buchholz *et al.*, 1998). Ein konditionaler „knockout“ mit Hilfe des *Cre-loxP*-Systems ermöglicht es prinzipiell, jedes Gen in jedem Zelltyp zu jeder Zeit *in vivo* zu inaktivieren.

1.7.3 Rekombinationsvektoren für das konditionale „gene targeting“

Die Konstruktion eines „Replacement“-Vektors zum konditionalen „gene targeting“ ähnelt der eines konventionellen Rekombinationsvektors. Für beide Vektoren gelten die gleichen Anforderungen an die Länge der homologen DNA und deren Isogenität, beide ermöglichen die in Abschnitt 1.7.1 angesprochene Positiv-/Negativ-Selektion. Der Unterschied liegt in der Anordnung der Positiv-Selektionskassette. Beim konventionellen Vektor dient diese Kassette nicht nur der Selektion, sondern auch der Inaktivierung des Zielgens, indem sie in eine kodierende Region kloniert wird (Abb. 3). Dabei muß zumindest der Leserahmen des Zielgens verschoben werden, besser aber noch ein essentielles Exon deletiert werden. Ein „gefloxtes“ Allel muß jedoch phänotypisch dem Wildtyp entsprechen, d.h. durch dieses Allel muß das Genprodukt unverändert kodiert werden. Deshalb werden sowohl die Positiv-Selektionskassette, als auch die *loxP*-Sequenzen in Intron Regionen kloniert. Die *loxP*-Sequenzen flankieren dabei ein Fragment des Zielgens, das für die Funktion des Gens essentiell ist. Dennoch werden durch die Selektionskassette zusätzliche Transkriptionsregulatoren wie Promoter, Enhancer, Splice-Sequenzen und eine Polyadenylierungssequenz eingebracht. Diese Steuerelemente könnten mit der Prozessierung des endogenen Gens wechselwirken. Um diesen potentiellen Störungen zu entgehen, wird die Selektionskassette ebenfalls von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert, so daß sie bei ES-Zellen mit Hilfe einer transienten Cre-Expression deletiert werden kann. Das Resultat ist ein „gefloxtes“-Allel, das *loxP*-Sequenzen ausschließlich in irrelevanten Intron-Regionen enthält. Zur Verdeutlichung zeigt Abb. 5 einen Rekombinationsvektor für das konditionale „gene targeting“ des *MGMT*-Gens.

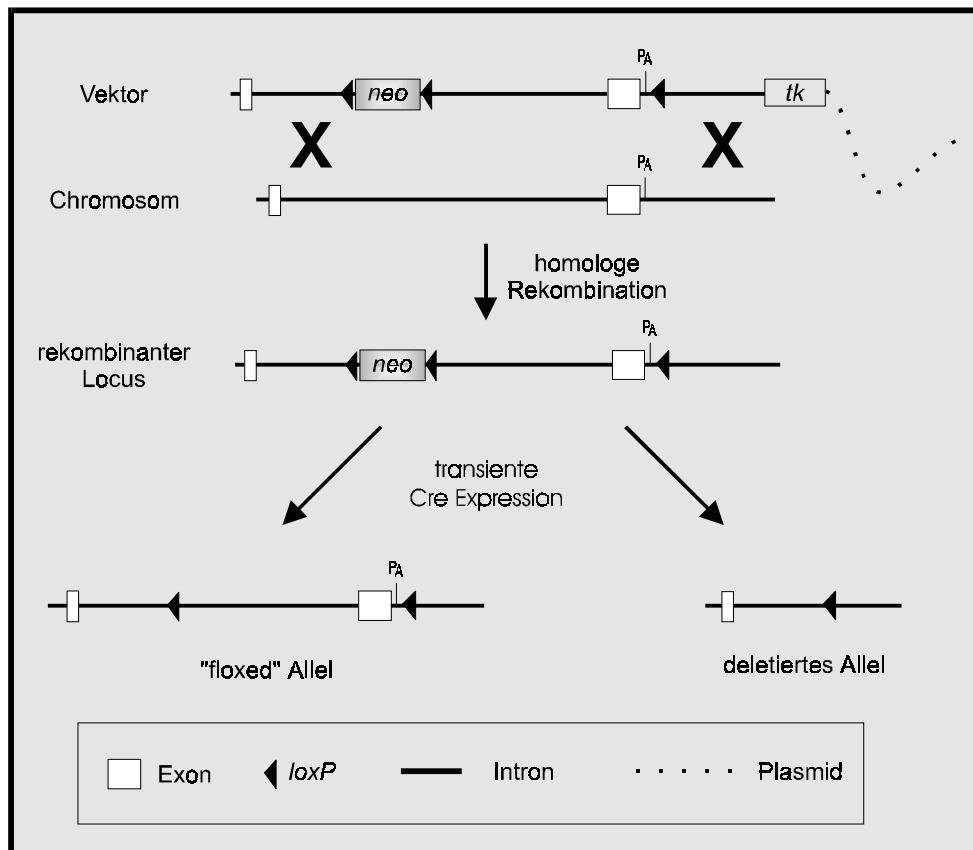


Abb. 5: **Konditionales „gene targeting“.** Der „Replacement“-Vektor enthält eine „floxed“ *neo*-Kassette, eine dritte *loxP*-Sequenz 3' vom Exon, sowie die *HSV-tk* Kassette zur Negativ-Selektion. Nach der homologen Integration des Vektors liegt in den ES-Zellen ein rekombinanter Locus mit „gefloxter“ Positiv-Selektionskassette und einer dritten *loxP*-Sequenz vor. Alle *loxP*-Sequenzen sind als „direct repeats“ angeordnet, um eine irreversible Deletion der jeweiligen Fragmente zu gewährleisten. Wird bei diesen ES-Zellen die Cre-Rekombinase transient exprimiert, so werden unter anderem die Genotypen „floxed“ und „deletiert“ generiert. Nur ES-Zellen vom „floxed“-Genotyp werden in Blastozysten reimplantiert, um transgene Maus-Linien zu erzeugen.

1.8 Cre-Expression bei der Maus

Bisher wurden ausschließlich die zum konditionalen „gene targeting“ notwendigen Elemente eines Rekombinationsvektors besprochen. Die Deletion eines „gefloxten“ DNA-Fragments *in vivo* erfordert jedoch auch eine transgene Maus-Linie, welche die Cre-Rekombinase exprimiert. Dazu muß das *Cre*-Gen unter die Kontrolle einer Regulationseinheit kloniert werden, welche die Anforderungen des zu untersuchenden Tiermodells erfüllt.

In der vorliegenden Arbeit war ein Tiermodell zu etablieren, an dem die Bedeutung spezifischer DNA-Reparaturfunktionen bei der Hepatokarzinogenese der Maus nach Puls-Exposition gegenüber einem N-Nitroso-Kanzerogen analysiert werden kann. Wie bereits in den Abschnitten 1.4.2 und 1.5.2 erwähnt, stellt dieses Tiermodell besondere Anforderungen an die Cre-Expression, und zwar a) eine Hepatozyten-spezifisch induzierbare Expression und b) eine Expression nur in einer Subpopulation der Hepatozyten.

Am Beginn der vorliegenden Untersuchungen waren nur wenige *Cre*-Mauslinien verfügbar, die unterschiedliche Zelltypspezifitäten aufwiesen. Keine dieser Linien zeigte eine Hepatozyten-spezifische Expression. Die einzige induzierbare *Cre*-Linie war die Maus-Linie *Cre^{Mx1}* (Kühn *et al.*, 1995). Bei *Cre^{Mx1}*-Mäusen ist die *Cre*-Expression jedoch ubiquitär, mit unterschiedlicher Effizienz in verschiedenen Geweben. Vor allem die Expression im hämatopoetischen System verhinderte die Verwendung dieser Linie für die geplanten Arbeiten. Bei der Suche nach Promotoren, für die eine induzierbare Hepatozyten-spezifische Expression bei der Maus nachgewiesen wurde, fällt das humane C-reaktive Protein Gen (*hCRP*) auf. Die Analysen der Expression des *hCRP*-Gens bei der Maus sind weit fortgeschritten, detaillierte Expressionskinetiken für das Transgen wurden gemessen und es wurde bereits ein *hCRP*-Konstrukt eingesetzt, um bei der Maus das T-Antigen leberspezifisch und induzierbar zu exprimieren (Rüther *et al.*, 1993).

1.8.1 Das humane C-reaktive Protein-Gen zur Hepatozyten-spezifischen Expression der Cre-Rekombinase bei der Maus

Das menschliche *hCRP*-Gen erfüllt in idealer Weise die Anforderungen an einen induzierbaren, Hepatozyten-spezifischen Promoter bei der Maus. Das C-reaktive Protein, ursprünglich so benannt aufgrund seiner Bindung an das C-Polysaccharid von *Pneumococcus*, gehört zur Gruppe der Akut-Phase-Proteine und ist an der unspezifischen humoralen Abwehr des Organismus maßgeblich beteiligt. Es wirkt opsonierend gegen Bakterien, Parasiten und Immunkomplexe, indem es das Komplement-System aktiviert und die Aktivität natürlicher „Killerzellen“, phagozytotischen Makrophagen und neutrophiler Leukozyten beim Menschen steigert (Ballou & Lozanski, 1992). Nach Infektionen steigt der Serumgehalt an CRP innerhalb von 15 Stunden um das bis zu 1000-fache an (Kushner & Feldmann, 1978). Die Regulation erfolgt hauptsächlich auf der Ebene der Transkription (Whitehead *et al.*, 1983), aber auch posttranslational (Macintyre *et al.*, 1994). Die Basalaktivität des humanen *CRP*-Gens als Transgen bei der Maus schwankt nach den Angaben verschiedener Untersuchungen zwischen nicht nachweisbar (Ciliberto *et al.*, 1987; Murphy *et al.*, 1995) und sehr geringer Aktivität (Szalai *et al.*, 1998). Das *hCRP*-Transgen kann durch eine einmalige Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) bis zu 70-fach induziert werden (Murphy *et al.*, 1995). Die Expression des humanen Transgens ist leberspezifisch (Ciliberto *et al.*, 1987; Murphy *et al.*, 1995; Rüther *et al.*, 1993). Nach persönlichen Angaben von Prof. U. Rüther (Zentrum Laboratoriumsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover) ist die Expression ausschließlich auf Hepatozyten beschränkt. Zur Hepatozyten-spezifischen Expression der *Cre*-Rekombinase unter Kontrolle des *hCRP*-Gens wurde in der vorliegenden Arbeit analog zur Expression des T-Antigens vorgegangen (Rüther *et al.*, 1993) (1.8). Die kodierenden Bereiche des *hCRP*-Gens wurden unter Erhaltung aller bekannten regulatorischen Sequenzen des *hCRP* Gens durch die *Cre*-cDNA ersetzt. Nach erfolgreicher Etablierung einer *hCRP-Cre* transgenen Maus-Linie wurde diese mit der Maus-Linie gekreuzt, die das „floxed“ DNA-Reparaturgen trägt. Zur Illustration dient das Beispiel des *MGMT*-Gens (Abb. 6).

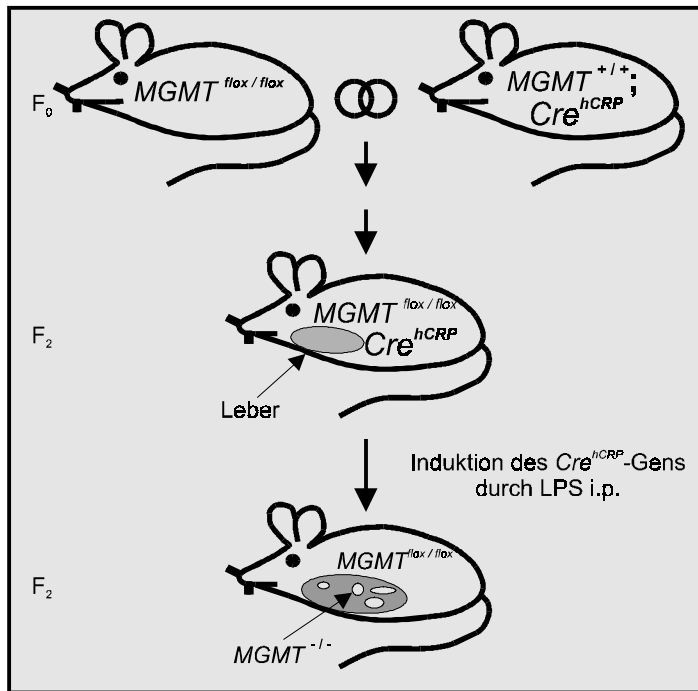


Abb. 6: **Verpaarungsschema zur Hepatozyten-spezifischen, konditionalen Inaktivierung des MGMT-Gens der Maus.** In der F₀-Generation werden Tiere der Genotypen $MGMT^{flox/flox}$ und Cre^{hCRP} gekreuzt. In der F₂-Generation entsteht unter anderem der Genotyp $MGMT^{flox/flox}; Cre^{hCRP}$. Bei diesen Mäusen wird das Cre^{hCRP} -Gen durch eine LPS-Injektion induziert. Die Cre vermittelte Deletion generiert eine Hepatozyten-Subpopulation, die bezogen auf die Expression des MGMT-Gens negativ ist. Bei allen anderen Zellen dieser Tiere entspricht der Phänotyp dem Wildtyp, da sie homozygot für das „floxed“ MGMT-Allel sind.

Diese Mäuse ($MGMT^{flox/flox}; Cre^{hCRP}$) bilden nach Induktion der Rekombinase das Tiermodell, um die Bedeutung des Fehlens spezifischer DNA-Reparatur im Rahmen der Hepatokarzinogenese zu untersuchen. Zunächst muß jedoch die Analyse der histologischen Leberschnitte auf Einzelzell-Niveau, welche und wieviele Zellen den Genotyp $MGMT^{flox/flox}$ bzw. $MGMT^{-/-}$ tragen, etabliert werden. Zu diesem Nachweis könnten grundsätzlich verschiedene Techniken eingesetzt werden: (1) Aktivitätsnachweis des DNA Reparaturproteins *in situ*. Das hierzu erforderliche Verfahren ist jedoch noch nicht etabliert. (2) Immunologischer Nachweis des DNA-Reparaturproteins. Dieser ist für Maus-Gewebe noch nicht möglich. (3) *In situ*-Hybridisierung an bzw. *in situ*-RT-PCR für die mRNA des DNA-Reparaturgens, wobei nur DNA-Reparatur-kompetente Zellen zu Signalen führen. (4) *In situ*-PCR spezifisch jeweils für das „floxed“ Allel oder das deletierte Allel. Beide Zellarten können positiv nachgewiesen werden. (5) Die Mikrodissektion von Zell-Arealen mit anschließender PCR. Beide Zellarten können positiv nachgewiesen werden. (6) Einbringen eines Reporters für die Rekombinase-Aktivität. Hierbei führen nur DNA-Reparatur-defiziente Zellen zu Signalen.

Die Techniken (3) und (4) gelten als anspruchsvoll und in der Durchführung aufwendig. Die Mikrodissektion (5) früher Foci (EAF) setzt eine vorgeschaltete histochemische Reaktion (1.6) voraus, um die ansonsten morphologisch unauffälligen Hepatozyten zu identifizieren. Die dabei gebildeten Farbstoff-Präzipitate verhindern jedoch die Amplifikation der DNA mit Hilfe der PCR. Ein Reporter für Rekombinase-Aktivität (6), dessen Nachweis zudem mit den histochemischen Färbungen kompatibel wäre, stellt daher die beste Alternative dar. In der Gruppe von Dr. F. Sablitzky (University College, London) wurde eine entsprechende Reporter-Maus für die Cre-Rekombinase etabliert. Die Tiere sind transgen für ein β -Galaktosidase-Konstrukt, bei dem zwischen einem ubiquitär aktiven Promoter und der

kodierenden Sequenz eine Stop-Kassette inseriert wurde, die von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert ist (Zhang *et al.*, 1996). Kreuzt man diese Reporterlinie mit *MGMT*^{*flx/flx*}; *Cre*^{*hCRP*} transgenen Mäusen, so können nach Induktion der Rekombinase in der F₂-Generation DNA-Reparatur-defiziente Zellen mit Hilfe eines einfachen Farbnachweises der β -Galaktosidase-Aktivität sichtbar gemacht werden. Diesen dreifach transgenen Tieren ist dann das Kanzerogen zu applizieren, um die Hepatokanzerogenese zu induzieren. Das entsprechende Applikationsschema war zu etablieren.

1.9 Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Tiermodell zu erstellen, an dem sich der Einfluß spezifischer DNA-Reparaturproteine auf das Mutations- und Transformationsrisiko bestimmen läßt. Als Tumormodell dient die Nitrosamin-induzierte Hepatokarzinogenese bei der Maus. Mit Hilfe des konditionalen „gene targeting“ unter Verwendung des *Cre-loxP*-Systems sollen die DNA-Reparaturgene *MGMT* und *APE* Hepatozyten-spezifisch *in vivo* deletiert werden. Um einen somatischen Genverlust mit Hilfe dieses Systems realistisch simulieren zu können, soll das jeweilige DNA-Reparaturgen nur bei einer Subpopulation der Hepatozyten inaktiviert werden. Bei jedem Tier liegen somit zum Zeitpunkt der Tumorinduktion DNA-Reparatur-defiziente und -kompetente Zellen im Lebergewebe vor. Zunächst wird dieser Ansatz für das *MGMT*-Gen durchgeführt, um die Bedeutung der *MGMT*-vermittelter DNA-Reparatur sowohl bei der Initiation, als auch bei der Promotion des Prozesses der Kanzerogenese untersuchen zu können. Zudem gilt es, einen Rekombinationsvektor zu konstruieren, der spezifisch die Inaktivierung der Endonuklease-Funktion des *APE*-Gens ermöglicht, die Redox-Funktion des Enzyms aber unbeeinflusst läßt. Die Ausschaltung eines Gens mit Hilfe des *Cre-loxP*-Systems zu einem beliebigen Zeitpunkt ausschließlich in Hepatozyten erfordert eine Maus-Linie, welche die *Cre*-Rekombinase induzierbar und Hepatozyten-spezifisch exprimiert. Da eine solche Maus-Linie nicht existiert, ist die Etablierung und Charakterisierung dieser transgenen Linie wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

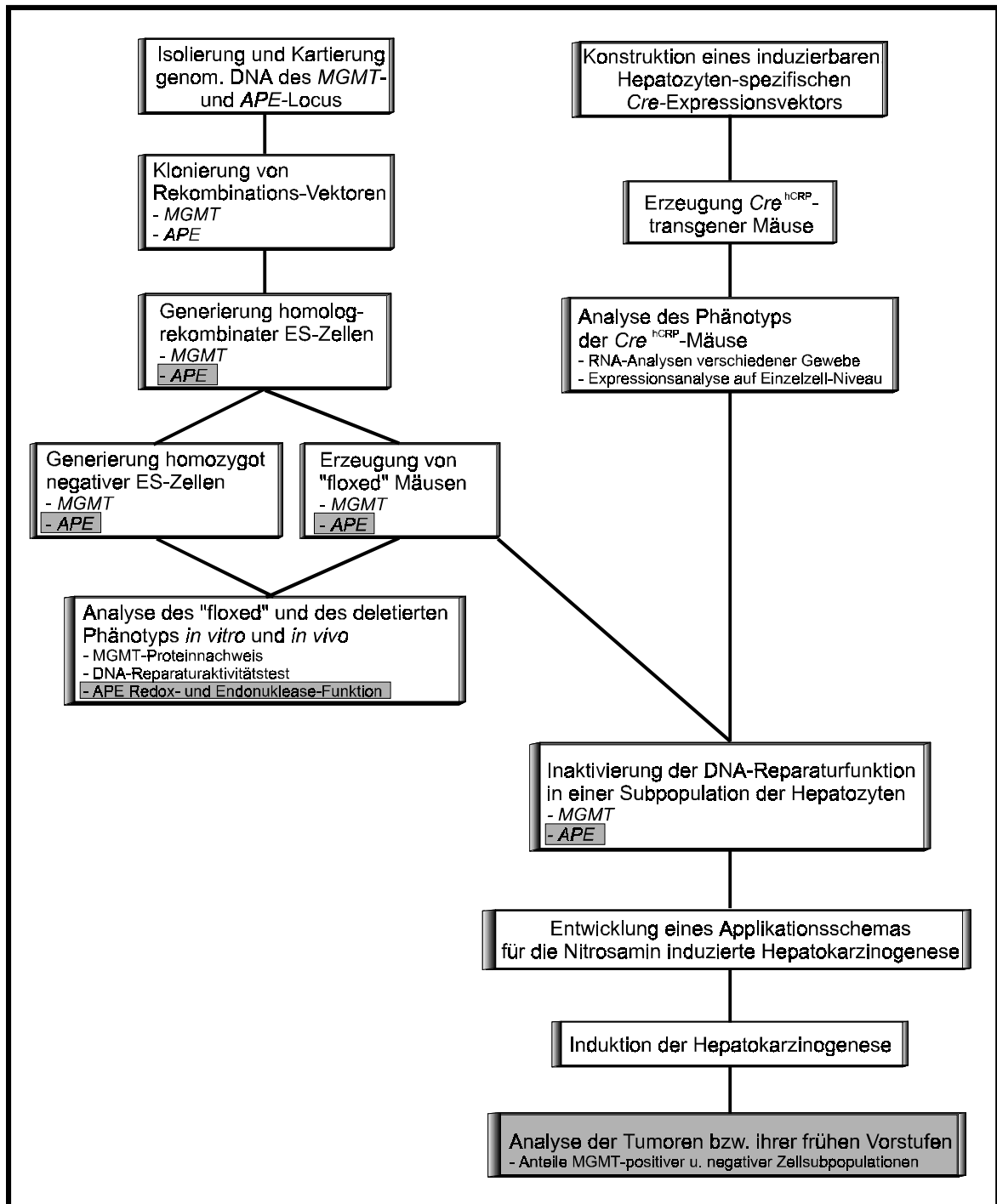


Abb 7: Dieses Flußdiagramm faßt die einzelnen Schritte der vorliegenden Arbeiten zusammen. Grau unterlegte Felder sind nicht Bestandteil dieser Dissertation und werden Gegenstand nachfolgender Untersuchungen sein.

2 ERGEBNISSE UND KOMMENTAR

2.1 Isolierung genomischer DNA-Fragmente des *MGMT*-Gens

Zur Konstruktion eines „Replacement“-Vektors für das „Gene targeting“ werden 10 – 15 kB möglichst isogener (Deng & Capecchi, 1992) genomischer DNA benötigt, die zumindest ein Exon enthält. Diese Größenordnung gewährleistet bei ES-Zellen eine gute Rekombinationsfrequenz des Vektors und ist in bezug auf Restriktionskartierungen und Subklonierungen gut zu handhaben. Ziel war es, etwa 20 kB große Fragmente aus einer Phagen-Bibliothek zu gewinnen. Dazu wurde eine Bibliothek des Maus-Stammes 129/Ola, der mit der verwendeten ES-Zell-Linie E14-1 isogen ist, mit einer cDNA-Sonde des *MGMT*-Gens der Ratte hybridisiert, die in der Arbeitsgruppe bereits kloniert vorlag. Dabei ließ die 98-prozentige Sequenzhomologie der cDNA's von Maus und Ratte gute Hybridisierungsergebnisse erwarten.

Die Insertgröße in den Phagen wurde mit 9 – 23 kB angegeben. Bei einer angenommenen durchschnittlichen Insertgröße von 16 kB müssen $8,6 \times 10^5$ pfu ausplattiert werden (Clarke & Carbon, 1976), damit eine beliebige Sequenz eines Säuger-genoms mit einer Wahrscheinlichkeit von $\geq 99\%$ mindestens einmal vertreten ist. Zur Klonierung von Fragmenten des *MGMT*-Gens wurden 1×10^6 Phagen ausplattiert. Der erste „Screen“ mit der *MGMT*-cDNA der Ratte führte zu acht potentiellen Klonen (Abb. 9). Zur Verifizierung wurden etwa $0,4 \text{ cm}^2$ große Agarstücke aus den Originalplatten ausgestanzt und die Phagen ein zweites Mal ausplattiert (Abb. 8). Vier Klone zeigten weiterhin Hybridisierungssignale. Die einzelnen Plaques wurden dann in einem letzten „Screen“ nochmals überprüft. Nur wenn jeder Plaque mit der cDNA hybridisierte, galt das Phagen-Eluat als reiner Klon (Abb. 10). Exemplarisch sind hier nur die Autoradiographien zur Isolierung des Klons 6.12 gezeigt.

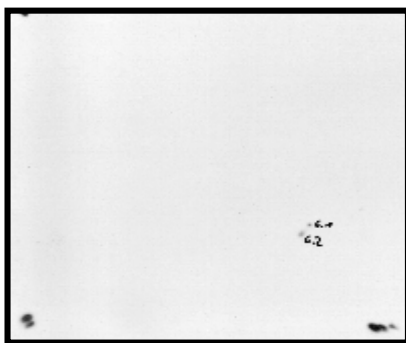


Abb. 9: **Autoradiographie des ersten „Screens“.** Erste Hybridisierung der *MGMT*-cDNA der Ratte mit der Maus-Gen Bibliothek. Zwei potentielle Klone (6.1, 6.2) bei $1,7 \times 10^5$ Phagen.

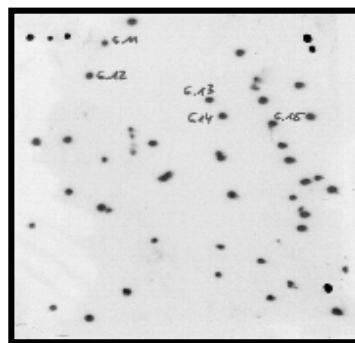


Abb. 8: **Autoradiographie des zweiten „Screens“.** Hybridisierung der *MGMT*-cDNA mit dem Phagen-Eluat eines potentiellen Klons (6.1). Nur ein Teil der Plaques (nicht gezeigt) zeigt Hybridisierungssignale.

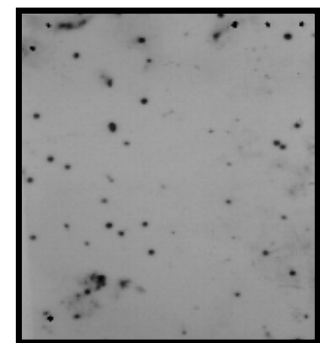


Abb. 10: **Autoradiographie des dritten „Screens“.** Hybridisierung der *MGMT*-cDNA mit dem Phagen-Eluat des Klons 6.12 (Abb. 8). Alle Plaques (nicht gezeigt) hybridisieren mit der cDNA.

Die einzelnen Klone wurden amplifiziert und die Phagen-DNA isoliert. Aufgrund veröffentlichter Sequenzdaten des *MGMT*-Gens der Maus (Shiraishi et al., 1992) konnten Exon-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierungen durchgeführt werden. Die vier Klone beinhalten die Exons II – V, d.h. alle translatierten Exons des *MGMT*-Gens der Maus (Iwakuma et al., 1996). Die Ergebnisse einzelner Restriktionen der Phagen-Inserts sind in Tab. 1 dargestellt. Einzelne Fragmente wurden für weiterführende Arbeiten, wie Klonierungen, Restriktionskartierungen und Sequenzierungen in Plasmiden subkloniert. Diese Fragmente sind in der Tabelle grau unterlegt.

λ -Klon	Restriktions- enzym	Exon- Fragmente [kB]	Intron- Fragmente [kB]
3.11 (Exon 3)	Bam HI	2,7	1,2
	Eco RI	4,0	1,0 / 2,0 / 3,6
	Hind III	0,56	1,3 / 3,5 / 5,0
	Xba I	6,0	
4.12 (Exon 2)	Bam HI	3,3	
	Eco RI	5,5	
	Hind III	5,5	2,2 / 1,2
6.12 (Exon 4)	Bam HI	4,4	
	Eco RI	8,5	3,5 / 12
	Hind III	5,0	1,7 / 4,0
8.12 (Exon 4 + 5)	Bam HI	4,4 (Exon 4)	3,3
		9,5 (Exon 5)	
	Eco RI	8,5 (Exon 4)	1,8
		4,5 (Exon 5)	
	Hind III	5,0 (Exon 4)	10
		> 15 (Exon 5)	3,5

Tab. 1: Restriktionsfragmente des *MGMT*-Gens der Maus

2.2 Restriktionskartierung des *MGMT*-Locus

Zur Inaktivierung des *MGMT*-Gens war ein Rekombinationsvektor zu konstruieren, der die Deletion des „aktiven Zentrums“ des Proteins ermöglicht. Da dieser Teil des Proteins durch das fünfte Exon kodiert wird (Shiraishi et al., 1992), wurde diese Region näher charakterisiert. Die folgende Restriktionskartierung des *MGMT*-Locus umfaßt deshalb die Exons IV und V mit einer Gesamtlänge von 13 kB, isoliert aus dem Phagenklon 8.12 als 4,5 kB- bzw. 8,5 kB Eco RI Fragmente. Exemplarisch ist hier eine Gelelektrophorese-Analyse mit Exon-spezifischer Hybridisierung dargestellt (Abb. 11).

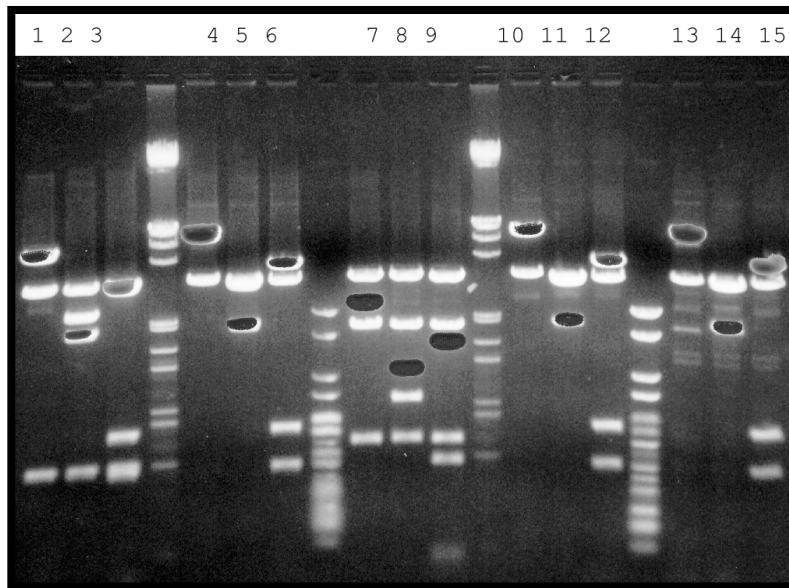


Abb. 11: Restriktionen des 4,5 kB Eco RI-Fragments aus dem Phagen 8.12. Die Autoradiographie der Hybridisierung mit einem Exon V-spezifischen Oligonukleotid wurde überlagert (Schwarze Hybridisierungssignale auf den weiß erscheinenden Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmenten).

Die Kombination der Fragmentlängen und Hybridisierungsergebnisse sowohl mit Exon-spezifischen Oligonukleotiden als auch mit Endstücken der subklonierten Fragmente führten zu folgender linearer Restriktionskarte (Abb. 12).

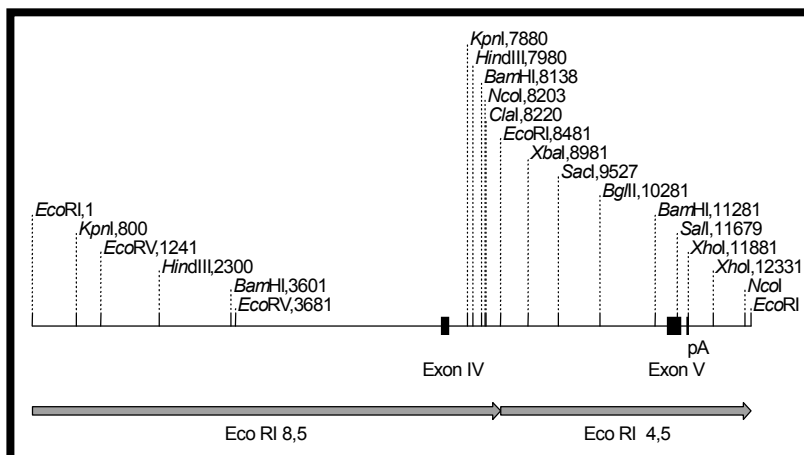


Abb. 12: Restriktionskarte des *MGMT*-Locus der Maus im Bereich der Exons IV und V. Eco RI-Fragmente des Phagen 8.12 der Größen 8,5 kB und 4,5 kB (graue Pfeile). Die Exons sind als schwarze Rechtecke dargestellt. pA, Polyadenylierungssequenz.

2.3 Vektorkonstruktion zum konditionalen "Gene targeting" des *MGMT*-Gens

Zunächst war es notwendig, einzelne Fragmente des *MGMT*-Locus (Abb. 12) subzuklonieren. Anschließend wurden die überlappenden Bereiche dieser Fragmente (5.2.1; 5.2.2; 5.2.3; 5.2.4; 5.2.5; 5.2.6; 5.2.7) sequenziert (Abb. 13), um sicherzustellen, daß keine Deletionen vorlagen, welche die Rekombinationsfrequenz des Vektors in das Säuger genom erheblich vermindern könnten (Deng & Capecchi, 1992).

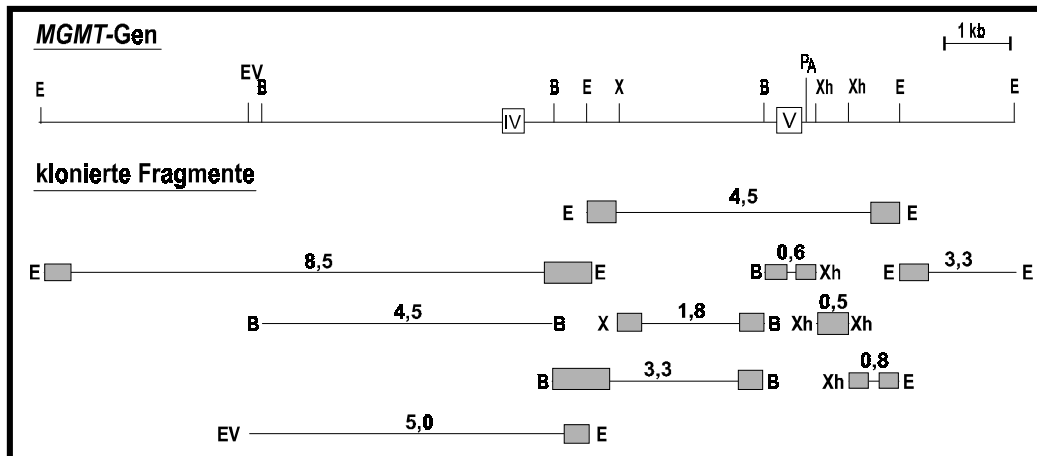


Abb. 13: **Darstellung der subklonierten Fragmente in Bezug auf den MGMT-Locus.** Alle Subklonierungen erfolgten in den pBluescript II-Vektor. Die sequenzierten Bereiche sind durch graue Rechtecke symbolisiert, weiße Rechtecke stellen Exons dar. Die Zahlen geben die Fragmentlängen in Kilobasen an. Abkürzungen: B (Bam HI), E (Eco RI), EV (Eco RV), pA (poly A-Sequenz), X (Xba I), Xh (Xho I).

Eine wichtige Voraussetzung für das konditionale „targeting“ ist, die Funktionstüchtigkeit des rekombinanten Gens vor der Deletion *in vivo*. Um die Prozessierung des Gens durch die inserierten *loxP*-Sequenzen nicht zu verändern, wurden sie in Intron-Regionen kloniert, die weder Spleiß- noch Polyadenylierungssequenzen enthielten. Aus dem gleichen Grund wurde zur Positivselektion eine *Neo*-Kassette gewählt, die von *loxP*-Sequenzen flankiert war (Abb. 51). So konnte anschließend die Selektionskassette mit ihren externen Transkriptionselementen in rekombinanten ES-Zellen deletiert werden. Die *HSV1-tk* Kassette zur Negativselektion wurde an das sogenannte „kurze Ende“, das 3'-Ende, des Rekombinationsvektors, positioniert, um eine effiziente Suche nach homolog rekombinanten ES-Zell-Klonen mit Hilfe der PCR zu ermöglichen.

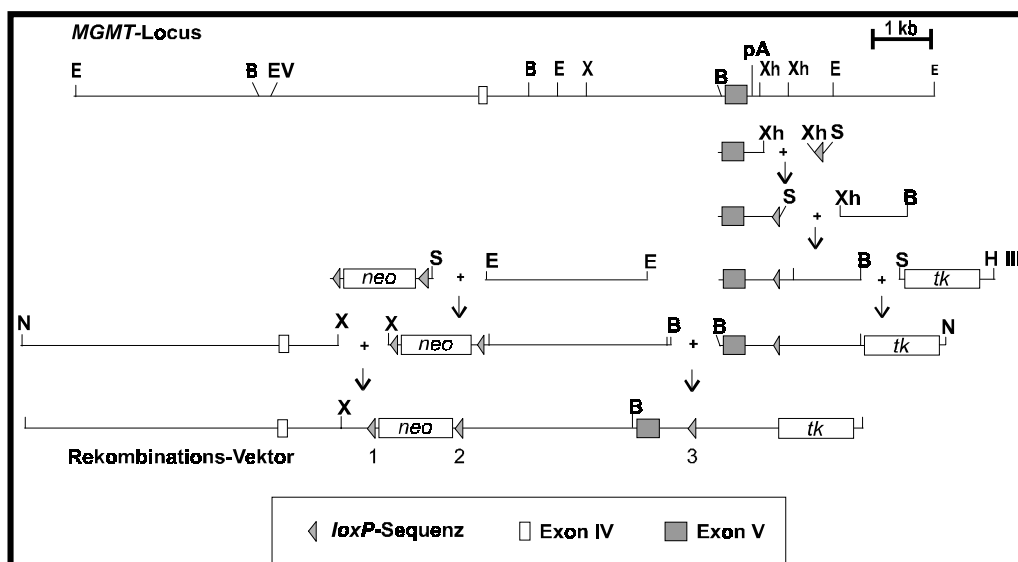


Abb. 14: **Schematische Darstellung der Klonierungsschritte.** Die Fragmente sind nur mit den Restriktionsschnittstellen dargestellt, die zur Klonierung verwendet wurden. Stellen ohne Enzym-Markierung gingen durch Auffüllprozesse während der Klonierungen verloren. Die Vektorteile wurden zur Vereinfachung nicht eingezeichnet. Abkürzungen: neo (Neomycin Phosphotransferase-Gen), pA (Polyadenylierungs-Sequenz), tk (HSV-1 Thymidinkinase), B (Bam HI), E (Eco RI), EV (Eco RV), H III (Hind III), N (Not I), S (Sal I), X (Xba I), Xh (Xho I).

Eine schematische Übersicht zu den Klonierungsschritten ist in Abb. 14 gezeigt. Die ausführliche Beschreibung der Klonierungen, sowie die Restriktionsanalyse des Rekombinationsvektors ist im Abschnitt 4.3.1 nachzulesen. Die Plasmidkarte des Rekombinationsvektors ist in der folgenden Abb. 15 dargestellt.

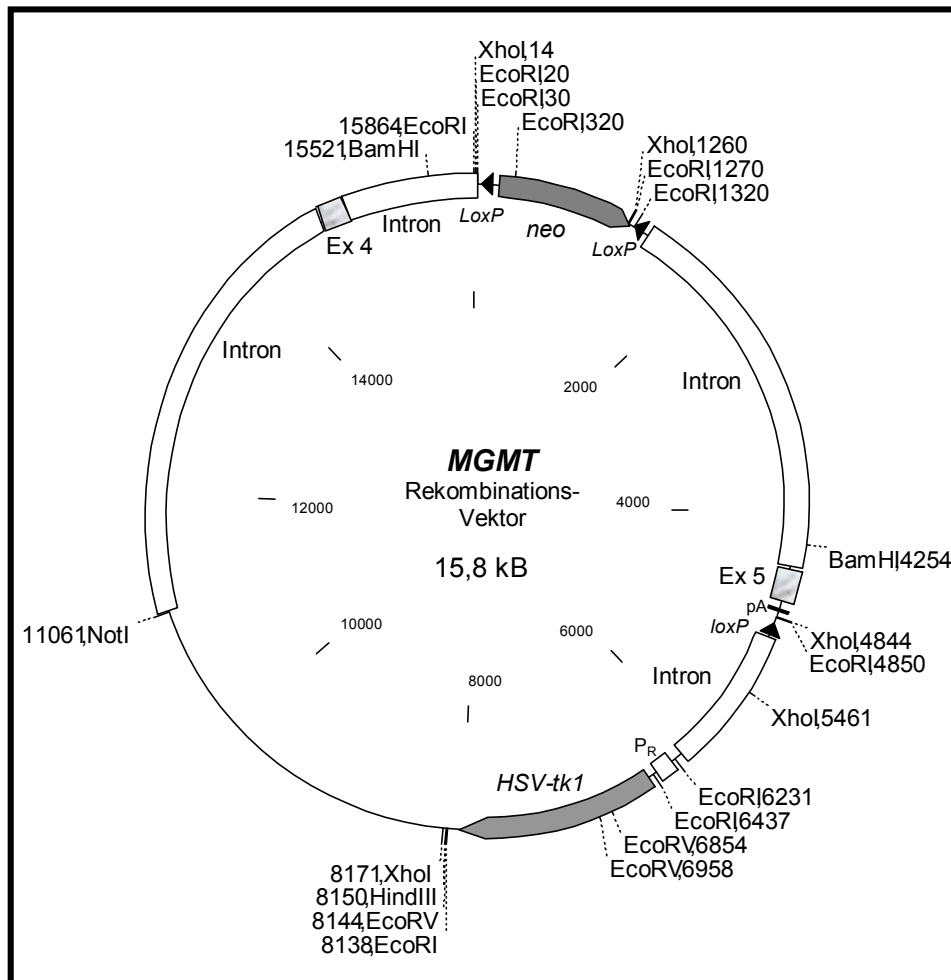


Abb. 15: **Plasmidkarte des MGMT-Rekombinationsvektors.** „Replacement“-Vektor zur homologen Rekombination mit dem *MGMT*-Gen bei der Maus. Das Plasmid enthält ~ 10 kB des *MGMT*-Gens im Bereich der Exons IV und V. Zur Positivselektion unter G418 ist eine *neo*-Kassette integriert. Die *HSV-tk1*-Kassette dient zur Negativselektion unter Ganciclovir. Die drei *loxP*-Sequenzen gewährleisten die Möglichkeit zur Deletion nur der *neo* Kassette oder des fünften Exons sowie des gesamten flankierten Bereichs. Zur Linearisierung des Vektors für die Elektroporation wurde eine singuläre Schnittstelle für Not I (Pos. 11061) eingefügt. In *E. coli* kann für das Plasmid mit Ampicillin selektioniert werden.

2.4 Isolierung homolog rekombinanter ES-Zell-Klone

Nach Elektroporation des Vektors in die ES-Zellen und Doppelselektion mit G 418 (8 Tage) und Ganciclovir (6 Tage) wurden 300 ES-Zell-Klone auf Mikrotiterplatten übertragen. DNA-Präparationen wurden aus parallel ausplattierten Klonen angefertigt. Um die erwarteten 3 bis 15 homolog rekombinanten Klone unter den resistenten Klonen zu finden, wurde eine PCR-Reaktion über das 3'-Ende des Rekombinations-Locus angewendet. Der 5'-Primer war komplementär zur *loxP*-Sequenz und somit im Vektor lokalisiert. Der 3'-Primer wurde außerhalb des Vektors in den *MGMT*-Locus plaziert, so daß ein PCR-Produkt von 1,5 kB nur über homolog rekombinante 3'-Enden amplifiziert werden konnte (Abb. 16). Um die Anzahl der PCR-Reaktionen möglichst gering zu halten, wurden zunächst jeweils 12 Klone in einem „Pool“ analysiert. Als Positivkontrolle für die PCR-Reaktion wurde ein Kontrollvektor (Abb. 53) kloniert und als Matrize verwendet, in dem das zu erwartende rekombinante 3'-Ende bereits vorlag. Exemplarisch ist in Abb. 16 eine PCR „Pool“-Analyse gezeigt.

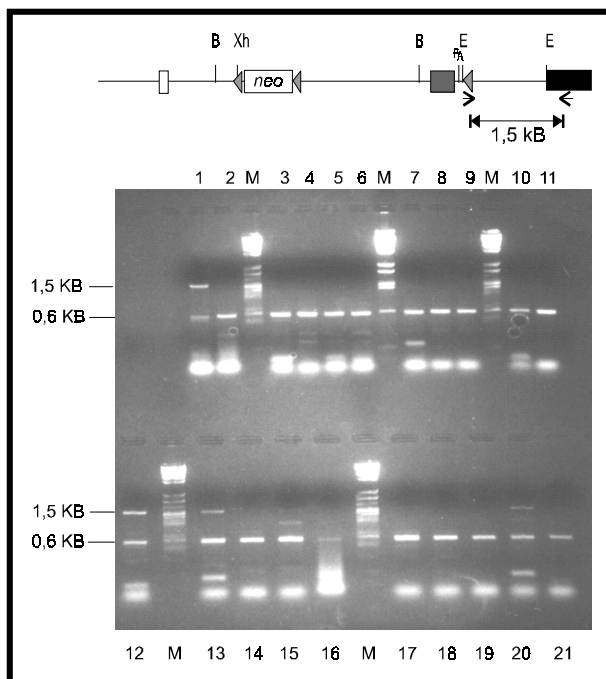


Abb. 16: PCR-Analyse von ES-Zell Klonen.

Das 1,5 kB PCR-Produkt ist indikativ für ein homolog rekombinantes 3'-Ende, da der 3'-Primer bezogen auf den Vektor extern lokalisiert ist. Das 0,6 kB- β -Aktin PCR-Produkt dient zur Kontrolle der PCR-Amplifikation. Spur 1: Positivkontrolle; Spur 2: Negativkontrolle; Spuren 3-21: Jeweils 12 ES-Zell-Klone. M (Marker 15). In den „Pools“ 12, 13, 15 und 20 liegen homolog rekombinante Klone vor.

Aus PCR „Pools“, die für das 1,5 kb Fragment produktiv waren, wurden Einzelklone analysiert. Insgesamt wurden unter dreihundert untersuchten ES-Zell-Klonen elf Klone identifiziert, die bezogen auf das 3'-Ende des *MGMT*-Gens homolog rekombinant waren. Einzelne homolog rekombinante ES-Zell-Klone wurden mit Hilfe der Southern-Blot-Technik verifiziert. Dabei galt es zu zeigen, daß auch das 5'-Ende homolog rekombinant vorlag. Die Hybridisierung erfolgte mit einer bezogen auf den Rekombinationsvektor internen Sonde (Abb. 17). Ein *Eco* RI-Verdau erzeugt entweder ein 8,5 kB- und ein 4,5 kB-Fragment ausgehend vom *wt*-Allel, oder ein 8,5 kB- und ein 3,3 kB-Fragment im Falle des rekombinanten Allels. Das 8,5 kB Fragment reicht über das 5'-Ende des Rekombinationsvektors (*Eco* RV-Stelle) hinaus. Entstehen keine weiteren Fragmente als die

genannten, so muß das 5'-Ende des Rekombinationsvektors homolog rekombinant vorliegen. Das auf 3,3 kB verkürzte 4,5 kB-Fragment zeigt an, daß die *neo*-Selektionskassette integriert ist. Der entsprechende „Southern-Blot“ für einzelne ES-Zell Klone ist in (Abb. 18) dargestellt.

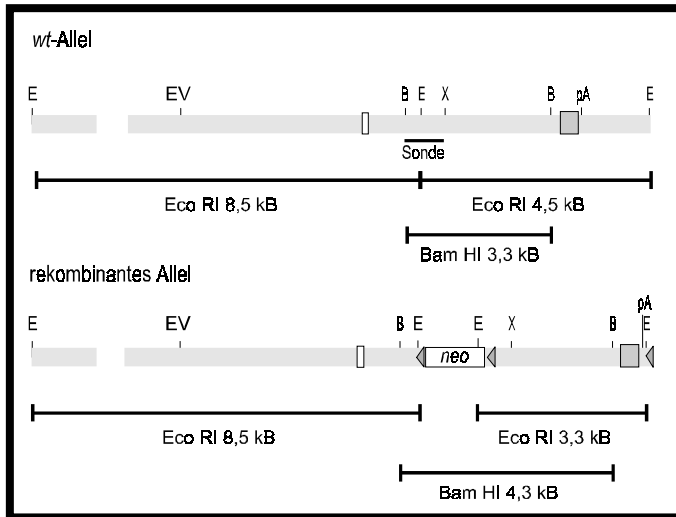


Abb. 17: **Schematische Darstellung der Hybridisierungsstrategie zur Verifizierung homolog rekombinanter ES-Zell-Klone.** Abgebildet sind *wt*- und rekombinantes Allel des *MGMT*-Locus mit entsprechenden Restriktionschnittstellen. Die zu erwartenden Fragmente nach Hybridisierung mit der Sonde (Bam HI-Xba I Fragment) sind jeweils unterhalb der Allele gezeigt. Abkürzungen: B (Bam HI), E (Eco RI), EV (Eco RV), pA (poly A Sequenz), X (Xba I).

Weitere Hybridisierungen wurden mit einem *neo*-Fragment durchgeführt, um potentielle, zusätzlich integrierte Selektionskassetten zu identifizieren. Dazu wurde die DNA mit Bam HI verdaut, also einer Restriktase, für die keine Erkennungssequenz in der Selektionskassette vorliegt. Diese *neo*-Sonde sollte nur mit einem 4,6 kB-Fragment hybridisieren (keine Abbildung). Bei den ES-Zell-Klonen g11, E6 und E9 (Abb. 18) wurde ausschließlich die 4,3 kB-Bande detektiert. Insgesamt wurden unter den resistenten Klonen homolog rekombinante ES-Zell-Klone mit einer Frequenz von 3×10^{-2} gewonnen.

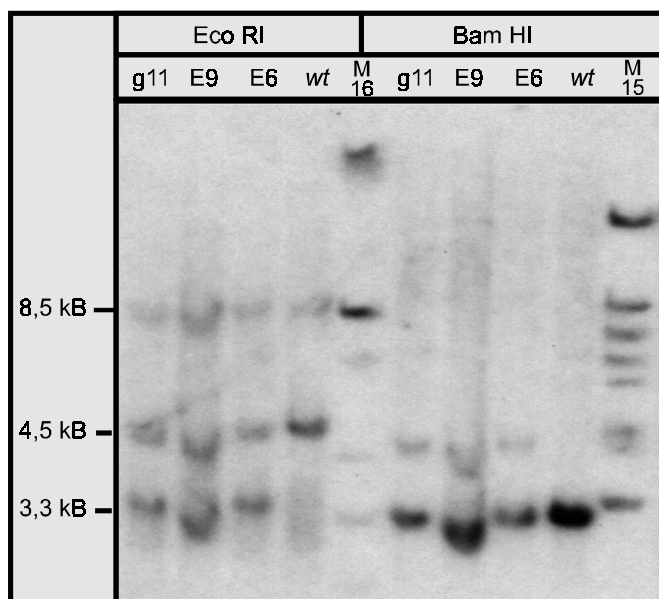


Abb. 18: **Southern-Blot-Analyse zum Nachweis homolog rekombinanter ES-Zellinien.** Die Hybridisierung erfolgte mit der 1,1 kB (Bam HI; Xba I)-Sonde (Abb. 17) und Marker-DNA zur Visualisierung der Größenstandards. Aufgetragen wurden jeweils drei ES-Klone (g11, E9; E6) im Vergleich zur Ausgangslinie (*wt*). Die von 4,5 kB auf 3,2 kB verkürzten Eco RI-Fragmente, sowie die von 3,3 kB auf 4,3 kB vergrößerten Bam HI-Fragmente ergeben sich aufgrund der Insertion der *loxP*-flankierten *neo*-Kassette (Abb. 17). M15 (Marker 15). M16 (Marker 16).

2.5 Herstellung von ES-Zelllinien mit „floxed“ *MGMT*-Genotyp

Das konditionale „Gene targeting“ bedingt, daß sich das rekombinante Allel in bezug auf den Phänotyp wie das *wt*-Allel verhält. Die Positivselektions-Kassette enthält jedoch Transkriptionssteuerelemente, wie einen exogenen Promoter und Enhancer, sowie eine Polyadenylierungssequenz und Spleißsequenzen, die mit der Expression des *MGMT*-Gens interferieren könnten. Um die Kassette bei ES-Zellen *in vitro* deletieren zu können, wurde sie mit zwei *loxP*-Sequenzen flankiert (Abb. 51). Die Expression der Cre-Rekombinase mit Hilfe einer transienten Transformation erzeugt alle Kombinationen der Rekombination zwischen den drei *loxP*-Sequenzen. Es entstehen Klone, die entweder nur die Selektionskassette oder den Intron-Bereich zwischen der Selektionskassette und dem fünften Exon verloren haben, aber auch komplette Deletionen. Im Falle des Strangaustausches zwischen den *loxP*-Sequenzen 1 und 2 (Abb. 14) verbleibt das fünfte Exon von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert („floxed“), so daß dieser Bereich *in vivo* deletiert werden kann. Um für den Verlust der *neo*-Kassette zu selektionieren, wurden transformierte Klone parallel ausplattiert, wobei nur eine Platte mit G 418 versetztes Selektionsmedium erhielt. Die Parallelklone zu G 418-empfindlichen Klonen wurden mit Hilfe der Southern-Blot-Technik analysiert (Abb. 19).

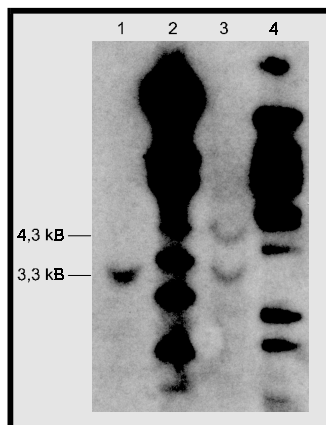


Abb. 19: **Deletion der Selektionskassette.** Southern-Blot-Analyse zweier ES-Zell-Klone nach Bam HI-Verdau und Hybridisierung mit der 1,1 kb Sonde (Bam HI, Xba I) (Abb. 17) und Marker-DNA zur Visualisierung der Größenstandards. Der Wegfall der 4,3 KB-Bande zeigt die Deletion der *neo*-Kassette bei Klon E 5 (Spur 1) im Vergleich zum Ausgangsklon E 6 (Abb. 18) (Spur 3). Spur 2: Marker 16. Spur 4: Marker 15.

2.6 Herstellung homozygot *MGMT*-defizienter ES-Zelllinien

Für *in vitro* Analysen (2.8) des *MGMT*-„knockout“- bzw. „floxed“-Phänotyps war es notwendig, homozygot *MGMT*-„floxed“ und *MGMT*-deletierte ES-Zelllinien zu generieren. Um das verbliebene *wt*-Allel in rekombinanten ES-Zellen ebenfalls zu modifizieren, wurden drei Klone mit dem „floxed“ Genotyp einer zweiten homologen Rekombinationsreaktion mit dem zuvor verwendeten Rekombinationsvektor (2.3) unterzogen. Die Anreicherungsprozedur für homolog rekombinante Klone sowie der Nachweis solcher Klone wurde durchgeführt wie in Abschnitt 2.4 beschrieben. Nach transienter Expression der Cre-Rekombinase in doppelt rekombinanten ES-Zell-Klonen, wurden mit Hilfe der Southern-Blot-Technik die

verschiedenen Genotypen ($MGMT^{flx/flx}$; $MGMT^{del/del}$) identifiziert. Exemplarisch ist hier der Nachweis für einen homozygot $MGMT$ -negativen Klon gezeigt.

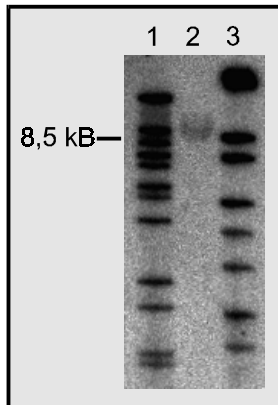


Abb. 20: **Homozygot $MGMT$ -negative ES-Zelllinie.** Southern-Blot-Analyse eines ES-Zell-Klons nach Eco RI-Verdau und Hybridisierung mit der 1,1 kB Sonde (Bam HI; Xba I) (Abb. 17) und Marker-DNA zur Visualisierung der Größenstandards. Der Wegfall der 4,5 kB-Bande ($MGMT^{wt}$ -Allel) und der 3,3 kB-Bande ($MGMT^{flx}$ -Allel) zeigt die homozygote Deletion des *loxP* flankierten Bereichs. Spur 1: Marker 15; Spur 2: ES-Klon; Spur 3: Marker 16.

2.7 $MGMT$ -„floxed“ Mäuse

Ausgehend von den ES-Zell Linien mit dem Genotyp $MGMT^{flx/wt}$ wurden chimäre Mäuse freundlicherweise am Institut für Genetik der Universität zu Köln (Arbeitsgruppe Prof. K. Rajewsky) von Frau Andrea Egert generiert. Die Injektion der ES-Zellen in die Blastozysten von C57BL/6-Spendern, sowie die Reimplantation der manipulierten Blastozysten in scheinchwangere Tiere erfolgte nach Standardmethoden (Torres & Kühn, 1997b; Papaioannou & Johnson, 1993). Zwei ES-Zell-Klone wurden injiziert. Sie führten zu 6 Chimären (4 ♂, 2 ♀), die aufgrund der partiellen Agouti-Fellfärbung identifiziert wurden (Abb. 21). Anschließend wurden die chimären Männchen mit Balb/c-Mäusen gekreuzt, um auf Keimbahntransmission des „gefloxten“ $MGMT$ -Allels zu testen. Eine Southern-Blot-Analyse an DNA aus Schwanzspitzen der F1-Generation ist in Abb. 22 dargestellt. Die Untersuchung zeigt, daß die ES-Zellen bei diesem chimären Männchen die Keimbahn besiedelt haben, da Keimbahntransmittanten in einem hohen Ausmaß (5 von 6 Tieren) erzeugt werden konnten. Die Zucht wurde mit diesem Männchen durchgeführt, da die anderen männlichen Chimären entweder nur eine schwache Transmissionsrate (1 von 7) zeigten oder das manipulierte Allel gar nicht vererbten (2 Tiere). Die nachfolgende Zucht auch homozygot „gefloxter“ Tiere zeigte stets die nach Mendel erwarteten Allel-Verhältnisse. Die Tiere zeigten keinerlei Auffälligkeiten.

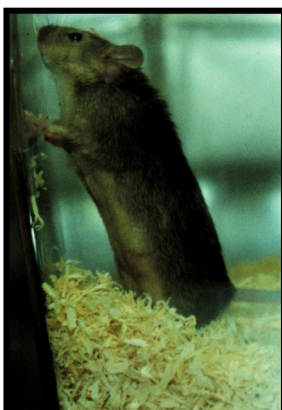


Abb. 21: **Chimäres Männchen.** Das cremefarbene Bauchfell, sowie die allgemeine Braunfärbung zeigt den Chimarismus aus von ES-Zellen abstammenden Zellen und C57BL/6-Zellen.

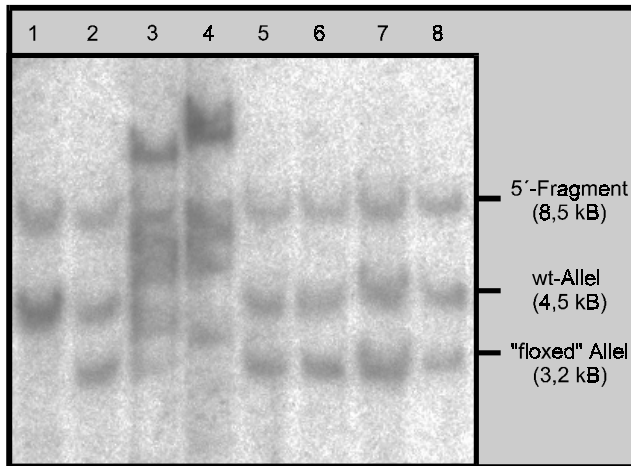


Abb. 22: **Keimbahntransmission des „geflochten“ MGMT-Allels.** Southern-Blot-Analyse von Eco RI verdauter, genomischer DNA der F1-Generation und Hybridisierung mit einer 1,1 kB-Sonde (Bam HI - Xba I) (Abb. 17) und Marker-DNA zur Visualisierung der Größenstandards. Die 3,2 kB-Bande zeigt die Keimbahntransmission des „geflochten“ Allels bei 5 von 6 Tieren (Spuren 2, 5, 6, 7 und 8). Spur 3, Marker 15. Spur 4, Marker 16.

2.8 DNA-Reparaturphänotyp homozygot homolog rekombinanter ES-Zellen und transgener Tiere

Die entscheidende Kontrolle einer Genmodifikation durch homologe Rekombination ist die Analyse des Phänotyps des rekombinanten Gens. Im Falle des konditionalen „gene targeting“ mit Hilfe der *Cre-loxP* Methode muß für das „floxed“ Allel nachgewiesen werden, daß sein Phänotyp dem des *wt*-Allels entspricht, das deletierte Allel muß zum Funktionsverlust führen. In der vorliegenden Arbeit wurden die entsprechenden DNA-Reparaturphänotypen auf zwei Ebenen analysiert. Zum einen auf Proteinebene mit Hilfe der Western-Blot-Analyse (2.8.1), zum anderen mit Hilfe funktionaler DNA-Reparaturtests. Der MGMT-Aktivitätstest (2.8.2) mißt die kovalente Übertragung der Alkylgruppe vom O⁶-Atom des Guanins in der DNA auf das MGMT-Protein direkt und quantitativ. Bei diesem Test wird ausschließlich die MGMT-Aktivität gemessen. Soll dagegen die Kinetik der Reparatur der DNA-Läsion gemessen werden, so muß die Konzentration der Läsion in der DNA als Funktion der Zeit bestimmt werden. Diese Art der Messung mit Hilfe der Immuno-Slot-Blot (ISB) Technik (4.10) spiegelt also die integrale zelluläre Reparaturkapazität wieder. Die Analyse MGMT-positiver wie -negativer Zellen erlaubt somit Rückschlüsse auf den relativen Anteil der MGMT an der Reparatur von O⁶-Alkylguaninen in der zellulären DNA.

2.8.1 Analyse des MGMT-Status auf Proteinebene

In ES-Zell- bzw. Mausleber-Extrakten wurde die MGMT-Expression mit Hilfe polyklonaler Anti-Maus MGMT-Seren durch Western-Blot überprüft (Abb. 23). Das verwendete Serum MF 1 für das N-terminale Ende des MGMT-Proteins war affinitätsgereinigt (5.4.4).

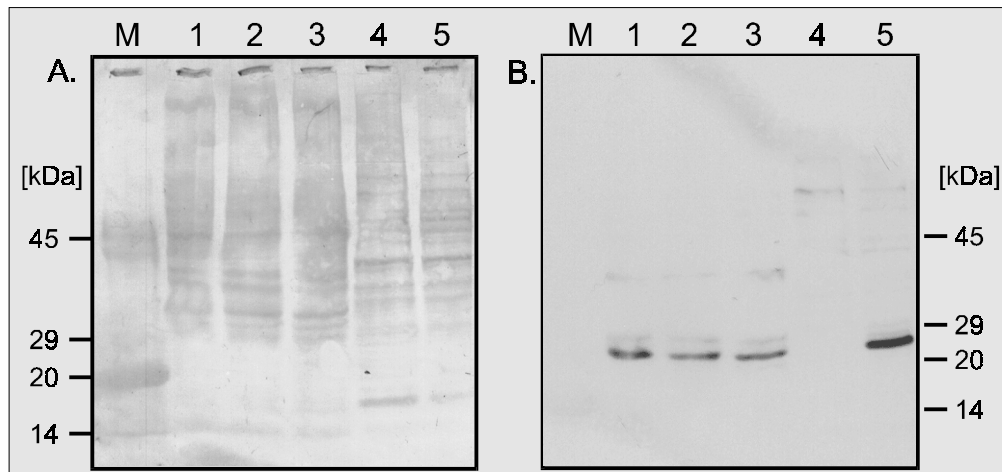


Abb. 23: **Western-Blot mit Anti-MGMT Serum.** Es wurden jeweils 100 μg Gesamt-Zellextrakt in einer 17,5-prozentigen PAGE aufgetrennt und über einen Semi-Dry-Blot auf Nylon-Membran übertragen. Nach Inkubation mit einem Kaninchen-Anti-MGMT Serum (MF-1; 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) erfolgte die Detektion mit einem Anti-Kaninchen-Peroxidase Konjugat und Chemilumineszenz-Entwicklung. A, Ponceau S-Färbung; B, Anti-MGMT Färbung (MF 1-Serum); M, Molekulargewichtsstandard; 1-3, Leberextrakte; 4 + 5, ES-Zell Extrakte; 1, $MGMT^{wt/wt}$; 2, $MGMT^{flox/flox}$; 3, $MGMT^{flox/flox}, Cre^{hCRP}$; 4, $MGMT^{del/del}$; 5, $MGMT^{flox/flox}$

Untersucht wurden die Ausgangszelllinie E-14.1 ($MGMT^{wt/wt}$), eine homozygot deletierte ES-Zell-Linie ($MGMT^{del/del}$), sowie Mausleber-Extrakte von Tieren mit den Genotypen $MGMT^{wt/wt}$, $MGMT^{flox/flox}$ und $MGMT^{flox/flox}, Cre^{hCRP}$. Die MGMT-Bande bei 22,4 kDa wurde für den *wt* und den „floxed“-Genotyp nachgewiesen. Die Leberextrakte wiesen einheitliche Expressionsstärken auf. Im Fall der homozygot deletierten ES-Zelllinie war das MGMT-Protein nicht nachweisbar.

2.8.2 MGMT-Aktivitätstest

Zum Nachweis der MGMT-Aktivität wurde ein Test angewendet, der auf der kovalenten Übertragung von Methyl-Gruppen vom O^6 -Atom des Guanins in der DNA auf das Akzeptor-Cystein-145 des Proteins basiert. Werden Proteinextrakte mit O^6 - $[^3\text{H}]$ -methylguanin enthaltender DNA inkubiert, so kann die MGMT-Aktivität direkt quantifiziert werden (4.9). Mit Hilfe dieses Aktivitätstests wurde am Beispiel von Leberextrakten gezeigt, daß homozygote $MGMT$ -„floxed“ Tiere die gleiche MGMT-Aktivität aufweisen wie *wt*-Mäuse. Die gemessenen Aktivitäten waren mit $32 \pm 3,2$ fmol/mg („floxed“; σ), $28 \pm 4,5$ fmol/mg („floxed“; ♀) und $37 \pm 10,4$ fmol/mg (*wt*; σ) vergleichbar. Sowohl die „floxed“, als auch die *wt*-ES-Zelllinie wiesen mit 447 ± 23 fmol/mg und 420 ± 52 fmol/mg deutlich höhere MGMT-Aktivitäten auf. Die homozygot $MGMT$ -deletierte ES-Zelllinie besaß keine MGMT-Aktivität ($-0,3 \pm 2,5$ fmol/mg).

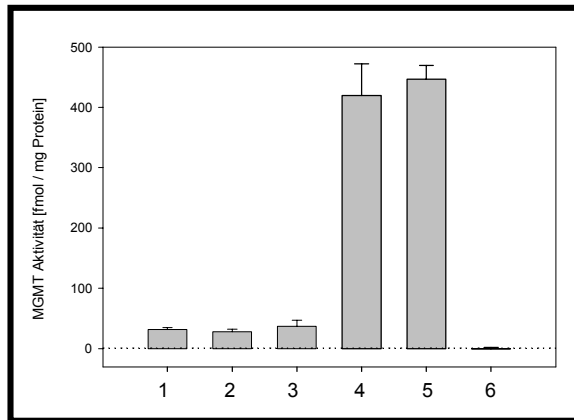


Abb. 24: **MGMT-Aktivitäten von Mausleber- und ES-Zell-Extrakten.** Gemessen wurde die Methyl-Gruppen Übertragung von $[^3\text{H}]$ -MeNU-methylierter Kalbsthymus-DNA auf das MGMT-Protein (4.9). 1 + 3, Leber (σ); 2, Leber (\varnothing); 4 - 6, ES-Zellen. Genotypen: 1, 2 + 5, $MGMT^{\text{flox} / \text{flox}}$; 3 + 4, $MGMT^{\text{wt} / \text{wt}}$; 6, $MGMT^{\text{del} / \text{del}}$.

2.8.3 Zelluläre DNA-Reparaturkapazität für O^6 -Alkylguanin in der DNA von ES-Zellen mit unterschiedlichem *MGMT*-Genotyp

Die Bestimmung der gesamten, zellulären DNA-Reparaturkapazität für O^6 -Methyl- und O^6 -Ethylguanin bzw. des relativen Anteils der MGMT an der O^6 -Alkylguanin-Reparatur in der zellulären DNA ist von besonderer Relevanz für die Frage nach der Bedeutung der MGMT-vermittelten DNA-Reparatur für das Transformationsrisiko bei der N, N-Dialkylnitrosamin induzierten Hepatokarzinogenese.

2.8.3.1 Proliferative Aktivität von ES-Zellen mit unterschiedlichem *MGMT*-Genotyp

Voraussetzung für eine vergleichende Analyse der DNA-Reparaturkapazität mit Hilfe des ISB (4.10) ist die Kenntnis des Proliferationsverhaltens der verschiedenen Zelllinien. Die zu untersuchenden Klone sollten sich in der gleichen Proliferationsphase befinden, um die molaren O^6 -Alkylguanin/Guanin Verhältnisse in der DNA als Maß für die DNA-Reparaturrate für die DNA-Replikation korrigieren zu können.

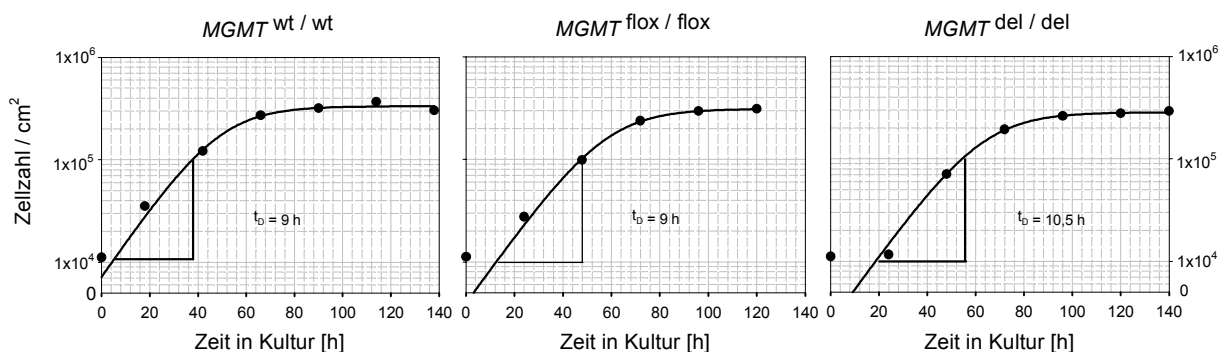


Abb. 25: **Proliferationskurven von ES-Zelllinien mit unterschiedlichem *MGMT*-Genotyp *in vitro*.** Die ES-Zellen wurden auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen (\varnothing 9 cm) mit BRL-Zell konditioniertem Medium kultiviert (4.12). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots trypsinisiert und die Zellzahl mit Hilfe eines Hämocytometers bestimmt. Die Proliferations-Verdopplungszeiten (t_0) wurden während der exponentiellen Proliferationsphase bestimmt (eingezeichnete Zeitintervalle).

Die Proliferationskurven zeigen, daß der Verlust der MGMT-vermittelten DNA-Reparatur die Proliferations-Verdopplungszeit der ES-Zellen leicht verlängert ($t_D = 9$ h für die *wt*- und die „gefloxte“ Linie; $t_D = 10,5$ h für die *MGMT*-deletierte Linie (Abb. 25)).

2.8.3.2 Elimination von O⁶-Alkylguaninen aus der zellulären DNA

Während des Beobachtungszeitraums (24 h bzw. 27 h) wurden im Falle der *MGMT*^{wt/wt}- und *MGMT*^{flox/flox}-Linie ~75 % O⁶-Methylguanin (O⁶-MeGua) und ~90 % bzw. ~85 % O⁶-Ethylguanin (O⁶-EtGua) aus der zellulären DNA eliminiert. Die Inaktivierung des *MGMT*-Gens führte zu einer drastischen Reduktion dieser Werte. Es wurden jetzt nur noch ~20 % O⁶-Methylguanin und ~14 % O⁶-Ethylguanin aus der DNA entfernt (Abb. 26). Die Halbwertszeiten dieser Alkylierungsprodukte in der DNA verlängerten sich von ~17 h für O⁶-Methylguanin (*MGMT*^{wt/wt}, *MGMT*^{flox/flox}) auf mehr als 48 h bei der *MGMT* „knockout“ Linie. Für O⁶-Ethylguanin war diese Differenz noch größer. Die Halbwertszeiten in der DNA verlängerten sich von ~3 h (*MGMT*^{wt/wt}, *MGMT*^{flox/flox}) auf mehr als 48 h (*MGMT*^{del/del}) (Tab. 2).

ES-Zell Genotyp	t ₅₀ % für O ⁶ -MeGua [h]	t ₅₀ % für O ⁶ -EtGua [h]
<i>MGMT</i> ^{wt/wt}	17,5	3,0
<i>MGMT</i> ^{flox/flox}	17,0	2,5
<i>MGMT</i> ^{wt/wt} + O ⁶ -BeG	~48	~38
<i>MGMT</i> ^{del/del}	>48	>48

Tab. 2: Halbwertszeiten für O⁶-Alkylguanine in der genomischen DNA von ES-Zelllinien mit unterschiedlichem *MGMT*-Genotyp. Die Halbwertszeiten wurden aus den DNA-Reparaturkinetiken ermittelt. Dabei wurde für Reparaturkurven für O⁶-Ethylguanin bei ES-Zellen mit *MGMT*^{wt/wt} und *MGMT*^{flox/flox} Genotyp für die Anfangsphase (≤ 5 h) ein linearer Verlauf angenommen. Für Halbwertszeiten die den Beobachtungszeitraum überschritten, wurden die Daten bis zu 48 h extrapoliert.

Die DNA-Reparaturkurven zeigen für O⁶-Ethylguanin zeigen eine deutlich schnellere Reparatur als für O⁶-Methylguanin. Innerhalb der ersten 5 h werden ~80 % der O⁶-Ethylguanine repariert (bezogen auf $t_0=100\%$), in den darauf folgenden 22 h nochmals ~10 % (*MGMT*^{wt/wt}; *MGMT*^{flox/flox}). Der „knockout“ des *MGMT*-Gens bzw. die Inhibition der *MGMT* reduzieren vor allem die initiale, schnelle Reparatur. Dennoch werden ~20 % (*MGMT*^{del/del}) bzw. ~40 % (*MGMT*^{wt/wt} + O⁶-BeG) der O⁶-Ethylguanine innerhalb von 24 h repariert ($t_0=100\%$). Insgesamt unterstützen die DNA-Reparaturanalysen für O⁶-Alkylguanine in zellulärer DNA die vorherigen Ergebnisse (2.8.1; 2.8.2), nach denen *MGMT*-wt und *MGMT*-„floxed“ den gleichen Phänotyp aufweisen.

Um eine experimentelle Kontrolle für den *MGMT*-„knockout“ Phänotyp zu erhalten, wurde die *wt*-Linie 1 h vor, während und nach der Alkylierung zusätzlich mit dem *MGMT*-Inhibitor *O*⁶-Benzylguanin (5.4.1.2) behandelt. *O*⁶-Benzylguanin inhibiert die *MGMT* irreversibel, indem die Benzyl-Gruppe kovalent auf das aktive Zentrum der *MGMT* übertragen wird (Pegg *et al.*, 1993). Unter diesen experimentellen Bedingungen war die *MGMT*-abhängige Reparatur zu ~75 % (*O*⁶-Methylguanin) bzw. ~83 % (*O*⁶-Ethylguanin) der „knockout“-Reduktion verringert. Sowohl für *O*⁶-Methyl- als auch für *O*⁶-Ethylguanin verlaufen die Reparaturkurven nahezu parallel, d.h. der „knockout“ und die Inhibitionskontrolle bzw. die *wt*- und die homozygot „floxed“-Linie weisen jeweils die gleiche Reparaturcharakteristik auf.

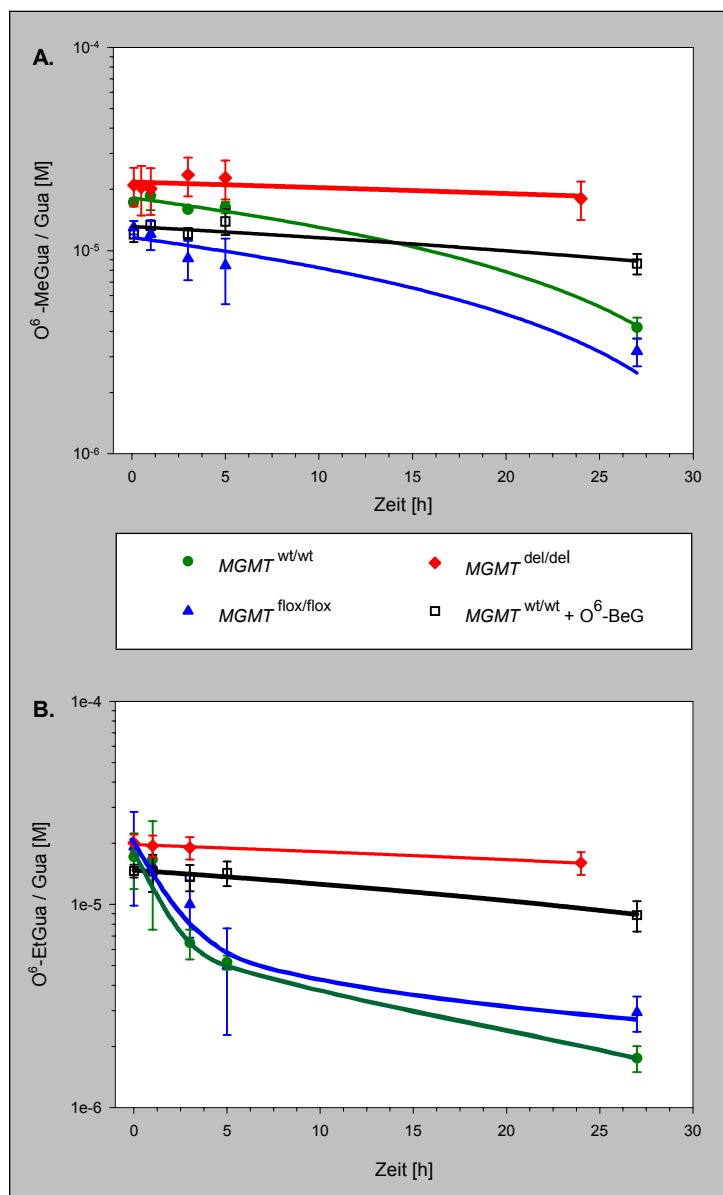


Abb. 26: **DNA-Reparaturkinetiken für *O*⁶-MeGua (A.) und *O*⁶-EtGua (B.) bei ES-Zellen nach Puls-Exposition gegenüber Alkylnitrosoharnstoffen.** A. MeNU (50 µg/ml) B. EtNU (100 µg/ml) (4.12.7). Als interne Kontrolle diente jeweils eine Meßreihe mit dem *MGMT*-Inhibitor *O*⁶-Benzylguanin (*O*⁶-BeG) (4.12.7). Das *O*⁶-BeG wurde vor und während der Inkubationen zugegeben (25 µM). Die molaren *O*⁶-AlkylGua/Gua Verhältnisse in der zellulären DNA wurden mit Hilfe der Immuno-Slot-Blot (ISB) Technik bestimmt (Nehls *et al.*, 1984; Engelbergs, 1998a) und für die Proliferationsraten der Zellen korrigiert (4.10). Für jeden Zeitpunkt wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und die Meßwerte gemittelt. Detektionslimits: O^6 -MeGua / Gua = 2×10^{-6} [M]; O^6 -EtGua / Gua = 3×10^{-7} [M].

2.9 Klonierung des Cre^{hCRP} -Expressionsvektors

Ziel dieser Klonierungen war es, die endogenen Exons des *hCRP*-Gens durch die *Cre*-cDNA so zu ersetzen, daß eine Regulation der *Cre*-Expression durch das *hCRP*-Gen resultiert. Als Ausgangsvektor für die Klonierung des *Cre*-Expressionsvektors diente das *hCRP*-Konstrukt 79 (Murphy *et al.*, 1995) (Abb. 55), das alle bekannten regulatorischen Sequenzen des *hCRP*-Gens enthält. Im einzelnen:

- ◆ Der Promoter enthält die zwei Akut-Phase Antwort Elemente APRE 1 (Pos. -94 bis -50) und APRE 2 (3'-Strich Ende zwischen Position -137 bis -106) (Arcone *et al.*, 1988). Dies sind Konsensus-Sequenzen für Leber spezifische Transkriptionsfaktoren (HNF 1, NF-IL-6), deren Bindung durch Interleukin 6 (IL-6) verstärkt wird und die somit das *hCRP*-Gen induzieren (Toniatti *et al.*, 1990; Li & Goldman, 1996).
- ◆ Untranslatierte Regionen (UTR), die 540 bp 5'- und 1,2 kB 3'- der *hCRP* kodierenden Sequenz liegen, vermitteln die Leber-spezifische, aber konstitutive Expression des *hCRP*-Gens (Murphy *et al.*, 1995).
- ◆ Erweiterte UTR, die 1,7 kB 5'- der *hCRP*-kodierenden Sequenz liegen, sowie das 3'- lokalisierte *hCRP*-Pseudogen reprimieren den konstitutiv aktiven *hCRP*-Promoter (Murphy *et al.*, 1995).
- ◆ Die *hCRP*-Poly A-Sequenz und direkt umgebende Sequenzen sind notwendig zur Expression des *hCRP*-Gens (Murphy *et al.*, 1995).

Zunächst wurden Exon 1 und 2 des *hCRP*-Gens deletiert. Um die *hCRP*-Promotersequenz komplett zu erhalten, wurde das 5'-Ende des deletierten Bereichs in die 5'-UTR nach Transkriptionsstart an Position +9 gelegt. Die *Cre*-cDNA einschließlich einer SV 40 Polyadenylierungs-Sequenz wurde einkloniert. Das 5'-Ende der *Cre*-cDNA lag 4 Nukleotide 5' vom ATG-Kodon, so daß die bereits vorhandene Kozak-Sequenz (Kozak, 1986; Gu *et al.*, 1993) erhalten blieb. Anschließend wurden die zuvor deletierte 3'-UTR wieder eingefügt, so daß im Ergebnis der Bereich Position 1753 bis Position 2936 des Konstrukts 79 (Abb. 55) durch die *Cre* cDNA ersetzt wurde. Die genaue Beschreibung der Klonierungsarbeiten findet sich im Abschnitt. 4.3.2.

Durch die Deletion der *hCRP*-Exons wurde auch das Kernlokalisierungssignal (Aminosäureposition 136 bis 141) im Exon 2 (DuClos *et al.*, 1990) entfernt. Auf die Insertion eines synthetischen Kernlokalisierungssignals wurde bewußt verzichtet, um einer möglichen Basalaktivität des Cre^{hCRP} -Expressionsvektors entgegenzuwirken.

2.11 Expressionsanalysen des Cre^{hCRP} -Vektors

2.11.1 Untersuchungen an Geweben

Zur Überprüfung der Funktionalität der fünf Cre^{hCRP} -transgenen Linien wurde zunächst die Expression der Cre^{hCRP} -RNA in der Leber nach Induktion des Transgens analysiert. Jeweils einem Männchen der F₂-Generation wurde zur Induktion des Transgens LPS intraperitoneal (3 µg/g Körpergewicht) injiziert. Neun Stunden nach Induktion wurden die Organe entnommen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Menge an $hCRP$ -mRNA in $hCRP$ -transgenen Mäusen maximal (Ciliberto et al., 1987). Die Analyse erfolgte mit Hilfe von Northern-Blots durch Hybridisierung der Cre -cDNA an Gesamt-RNA (Abb. 29).

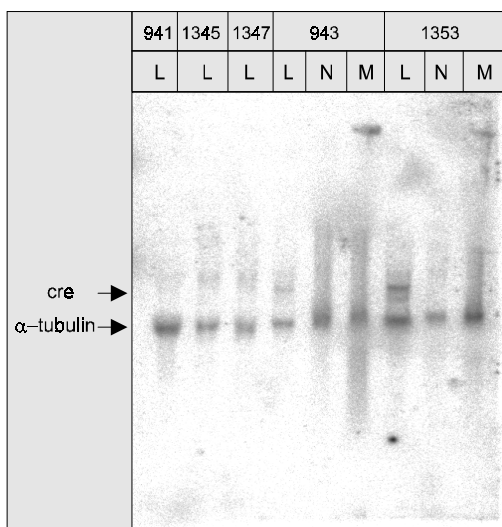


Abb. 29: **Northern-Blot-Analyse der Cre -Expression in Geweben Cre^{hCRP} -transgener Tiere nach LPS-Induktion.** Zur Induktion des Transgens wurde LPS (3 µg/g Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden neun Stunden nach Induktion getötet. Es wurden jeweils 15 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte gleichzeitig mit der Cre -cDNA und einer humanen α -Tubulin-cDNA. Die Nummern stehen für die Mauslinien. L, Leber; N, Niere; M, Milz.

Cre -mRNA konnte ausschließlich in Leber-RNA Präparationen der Mauslinien 943 und 1353 nachgewiesen werden. Die Linie 1353 wies die stärkere Cre -Expression auf. Sie war nur unwesentlich geringer, als die des „Haushalts Gens“ α -Tubulin. In den RNA-Präparationen aus Niere und Milz war unter diesen Bedingungen keine Cre -mRNA nachweisbar.

Eine Cre^{hCRP} -Expression konnte bei 2 von 5 Linien nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, denn die Maus-Linien weisen unterschiedliche Cre^{hCRP} Integrationsorte auf. Mit einem vergleichbaren $hCRP$ -Konstrukt war in 4 von 10 Linien eine zumindest intermediäre Expression des Transgens nachgewiesen worden (Rüther et al., 1993).

In den weiteren Untersuchungen sollten nun folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist das Cre^{hCRP} -Konstrukt *in vivo* aktiv?
2. Wie effizient ist die Cre -vermittelte Deletion *in vivo*?
3. Weist das Cre^{hCRP} -Konstrukt Basalaktivität auf?
4. Ist die Expression Hepatozyten-spezifisch?

Zur Beantwortung dieser Fragen war es notwendig, das Endprodukt der Rekombinase-Reaktion, den Cre-vermittelten Strangaustausch zwischen *loxP*-Sequenzen zu analysieren. Zum einen sollten sich nur geringe Basalaktivitäten aufsummieren und somit einen empfindlichen Nachweis dieser Rekombinationsereignisse ermöglichen. Zum anderen war aus der Literatur bekannt, daß zur effizienten Deletion *loxP*-flankierter Sequenzen *in vivo* eine Mindestmenge an Cre-Protein vorhanden sein muß (Tsien *et al.*, 1996), so daß weitere Analysen auf RNA-Ebene fehlerleitend sein konnten. Die Untersuchungen wurden an 8 Wochen alten Tieren durchgeführt, denen im Alter von 6 Tagen entweder PBS (Kontrolltiere) oder LPS (induzierte Tiere) injiziert worden war. Aus den einzelnen Geweben wurde die DNA isoliert und das „floxed“ bzw. das deletierte *MGMT*-Allel mit Hilfe einer semi-quantitativen PCR ko-amplifiziert. Um eine direkte Vergleichbarkeit der PCR-Produktmengen zu gewährleisten, wurde die PCR in der exponentiellen Amplifikationsphase (25 Zyklen) beendet. Zudem wurden die PCR-Primer so gewählt, daß die PCR-Produkte ähnlich groß waren (340 Bp und 390 Bp) und der gleiche 3'-Primer verwendet wurde.

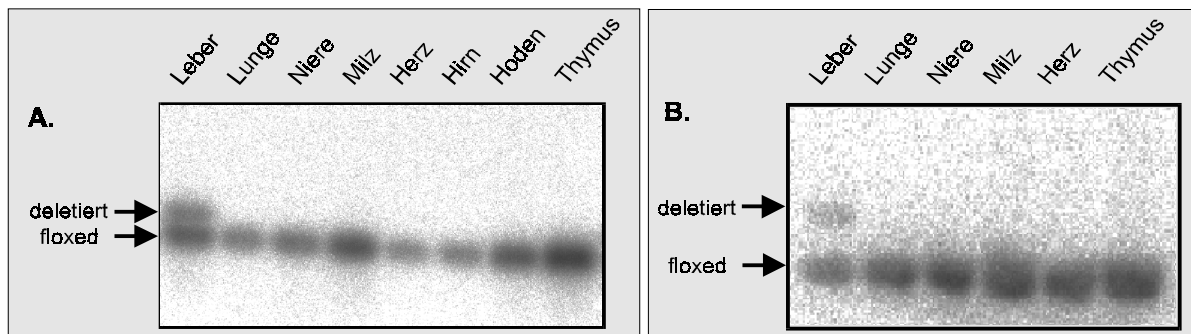


Abb. 32: **Cre^{hCRP}-vermittelte Deletion *in vivo***. Analyse verschiedener Gewebe einzelner Tiere. Semi-quantitativer Nachweis: Ko-Amplifikation der „floxed“ bzw. deletierten *MGMT*-Allele 8 Wochen alter Mäuse (*MGMT^{lox/flox}*, *Cre^{hCRP}*) nach LPS-Induktion (3,3 µg/g; Tag 6). Die PCR-Produkte wurden über Southern-Blots durch Hybridisierung mit einem [³²P]-markierten, internen Oligonukleotid visualisiert und mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung quantifiziert. A, Männchen; B, Weibchen.

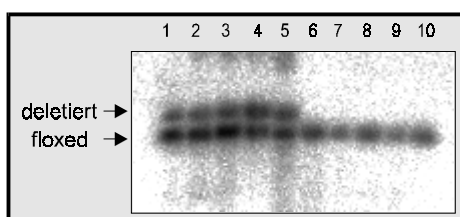


Abb. 31: **Cre^{hCRP}-vermittelte Deletion *in vivo* in der Leber männlicher Mäuse**. 1 - 3: 1 x LPS (3,3 µg/g). 4 - 5: 2 x LPS (3,3 µg/g) im Abstand von 1 Woche. 6 - 10: 1 x PBS (Kontrollen). Zur Detektion siehe Abb. 32.

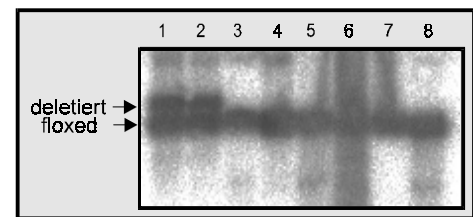


Abb. 30: **Cre^{hCRP}-vermittelte Deletion *in vivo* in der Leber weiblicher Mäuse**. 1 - 2: 2 x LPS (3,3 µg/g) im Abstand von einer Woche.. 3 - 8: 1 x PBS (Kontrollen). Zur Detektion siehe Abb. 32.

Zunächst zeigen die Daten, daß die *Cre*-Expression den Strangaustausch zwischen 2 *loxP*-Stellen *in vivo* vermittelt. Exemplarisch ist die Analyse von genomischer DNA verschiedener Gewebe für ein Männchen und ein Weibchen gezeigt (Abb. 32 bis Abb. 30). Zu beobachten ist bei diesen Tieren, wie auch bei jeweils 2 weiteren Tieren (ohne Abb.), eine Deletion ausschließlich in der Leber und nur nach Induktion des *Cre*^{hCRP}-Gens. Die nicht-induzierten Tiere zeigen keine *Cre*-Basalaktivität. Diese Ergebnisse gelten ausschließlich für Tiere, die unter spezifisch Pathogen-freien (SPF) Bedingungen gehalten wurden. Untersuchungen an Hepatitis-infizierten Tieren zeigten dagegen in Einzelfällen eine *Cre*-Basalaktivität (ohne Abb.). Das Transgen war bei Männchen nach einmaliger LPS-Injektion stärker induzierbar als bei Weibchen. Zudem konnte der Anteil *MGMT*-deletierter Zellen durch eine zweite LPS-Injektion im Abstand von einer Woche erhöht werden. Die jeweils gemittelten Anteile deletierter Allele sind in Tab. 3 dargestellt.

Männliche Mäuse		Weibliche Mäuse	
1 x LPS	2 x LPS	1 x LPS	2 x LPS
28±1,5 [%]	45±7 [%]	13±2 [%]	35±9 [%]

Tab. 3: **Effizienz *Cre*^{hCRP} vermittelter Deletion *in vivo*.** Den Tieren wurde erstmals im Alter von 6 Tagen LPS (3,3 µg/g) in PBS gelöst injiziert. Die zweite Injektion erfolgte 7 Tage später. Die Gewebe wurden im Alter von 8 Wochen entnommen. Angegeben sind die gemittelten Anteile der *MGMT*-deletierten Allele. Zur Auswertung siehe Abb. 32.

2.11.2 Untersuchungen auf Einzelzell-Niveau

Die nächste Analysestufe sollte nachweisen, daß die Induktion des *Cre*^{hCRP}-Konstrukts selektiv bei Hepatozyten zur Deletion *loxP*-flankierter Fragmente führt. Wie bereits in Abschnitt 1.8.1 erwähnt, wurden hierzu „Reporter“-Mäuse mit *Cre*^{hCRP}-Mäusen verpaart. Die „Reporter“-Linie wurde freundlicherweise von Dr. F. Sablitzky (University College, London) zur Verfügung gestellt. Sie sind transgen für ein *lacZ*-Konstrukt (Abb. 50), bei dem zwischen Promoter und kodierender Sequenz eine von *loxP*-Sequenzen flankierte „Stop-Kassette“ einkloniert wurde (Zhang *et al.*, 1996), so daß β -Galaktosidase Aktivität erst nach *Cre*-vermittelter Deletion der „Stop-Kassette“ auftritt.

Bei doppelt transgenen Tieren (*Cre*^{hCRP}+; *lacZ*+) wurde durch LPS-Injektion das *Cre*^{hCRP}-Konstrukt induziert und die Tiere nach einer Woche getötet, um Gefrierschnitte der Leber anzufertigen. Die anschließenden Färbungen für β -Galaktosidase mit dem Farbstoff X-Gal zeigten bei keinem der Tiere (5 ♂; 5 ♀) Signale (ohne Abb.). Wegen der bekannt schlechten Nachweisbarkeit der β -Galaktosidase in Geweben (MacGregor *et al.*, 1991) und unter Ausnutzung der höheren Empfindlichkeit indirekter Immunfluoreszenz wurden Färbungen mit einem Anti- β -Galaktosidase Antikörper durchgeführt (Abb. 33). Auf diese Weise wurde die β -Galaktosidase bei einem kleinen Teil der Zellen nachweisbar, jedoch erlaubten die

Gefrierschnitte keine klare Zelltypzuordnung der markierten Zellen. Zudem war der Anteil β -Galaktosidase-positiver Zellen deutlich geringer als aufgrund der PCR-Analyse zu erwarten (Abb. 34).

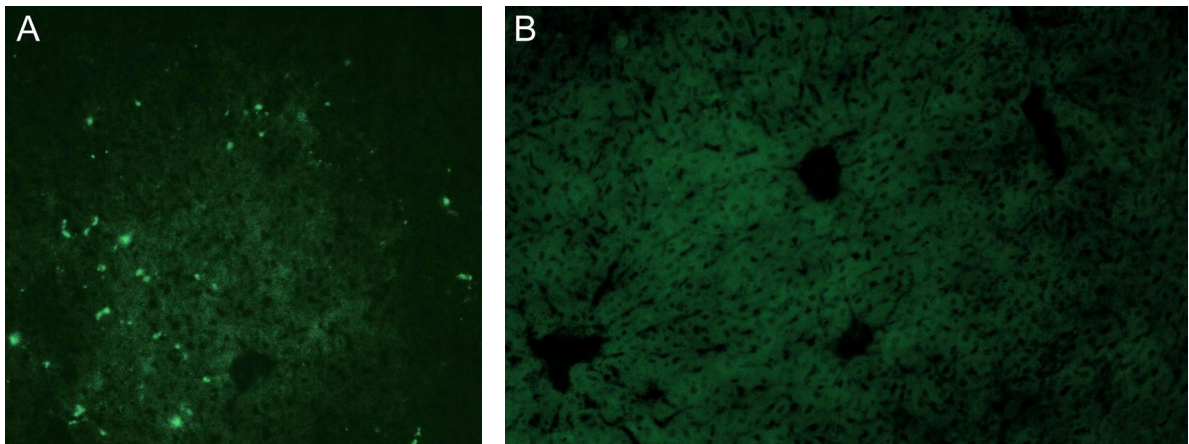


Abb. 33: Immunfluoreszenz-Nachweis für β -Galaktosidase in der Leber. Gefrierschnitte doppelt transgener Mäuse ($Cre^{hCRP+}; lacZ+$) mit (A) oder ohne LPS-Induktion (B). Anti- β -Galaktosidase (Maus) und Anti-Maus-Alexa 488 (Schaf) (5.4.4). Vergr. 125 x.

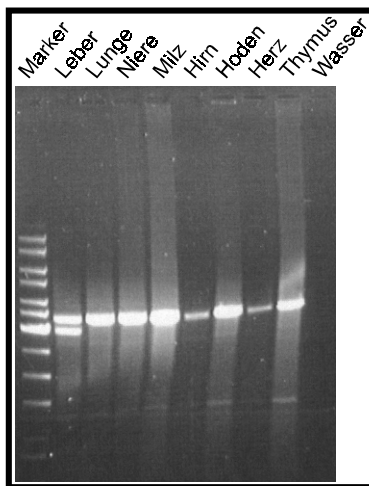


Abb. 34: **Deletion der „Stop-Kassette“ des *lacZ*-Reportergens *in vivo*.** PCR-Analyse genomischer DNA verschiedener Gewebe einer doppelt transgenen Maus (σ) nach LPS-Induktion des Cre^{hCRP} -Konstrukts. Die Primer waren im Promotor und in der kodierenden Region des *lacZ*-Gens lokalisiert, so daß das PCR-Produkt die „Stop-Kassette“ überspannte. Das von 3,4 kB auf 2,9 kB verkleinerte PCR-Produkt ist indikativ für die deletierte „Stop-Kassette“. Die Deletion ist nur in der Leber nachzuweisen. Marker: 1 kB Ladder (5.4.5).

Zum definitiven Nachweis der Cre-vermittelten Deletion des *MGMT*-Gens bei individuellen Zellen wurde die *in situ* PCR (IS-PCR) durchgeführt. Die Technik der IS-PCR verbindet die hohe Nachweisempfindlichkeit durch exponentielle Amplifikation einzelner Allele mit der besseren Darstellung einzelner Zellen in histologischen Gewebeschnitten. Um die Gewebestruktur bestmöglich zu erhalten wurden Paraffinschnitte verwendet (4.13.4). Diese wurden entparaffiniert und einer speziellen Vorbehandlung unterzogen, um die Durchlässigkeit des Gewebes zu erhöhen (4.6.2). Durch Verwendung 5'-DIG-markierter Primer konnten die PCR-Produkte direkt nachgewiesen werden, ohne daß eine zusätzliche Hybridisierung mit einer markierten Sonde durchgeführt werden mußte. Die Primer und die

Extensionszeiten der PCR wurden so gewählt, daß die resultierenden PCR-Produkte spezifisch für das „floxed“ oder das deletierte *MGMT*-Allel waren.

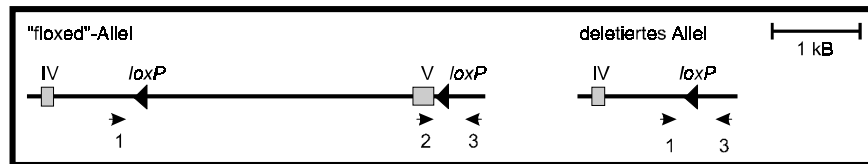


Abb. 35: **Schematische Darstellung der Primer-Lokalisation bei der IS-PCR für das *MGMT*-Gen.** Die Extensionszeiten (4.6.2) wurden so gewählt, daß nur kurze PCR-Produkte (< 1 kB) exponentiell amplifiziert werden konnten. Das „floxed“ Allel konnte nur durch das Primerpaar 2 + 3, nicht aber durch das Primerpaar 1 + 3 nachgewiesen werden. Das Primerpaar 1 + 3 war spezifisch für das deletierte Allel, da ein PCR-Produkt nur nach Deletion von Exon V und eines großen Teils von Intron IV gebildet wurde. Primer 1, Bam 3,3 kB; Primer 2, Invers; Primer 3, IntronV (0)



Abb. 37: **In situ-PCR für das „floxed“ *MGMT*-Allel an einem Leberschnitt eines nicht induzierten Männchens (*MGMT*^{flox/flox}; *Cre*^{hCRP+}).** Alkalische Phosphatase (NBT / BCIP)-Detektion DIG-markierter Primer. Bis auf wenige Ausnahmen (Pfeile) weisen alle Hepatozyten das „floxed“ *MGMT*-Allel auf. (Vergr.: 125 x)

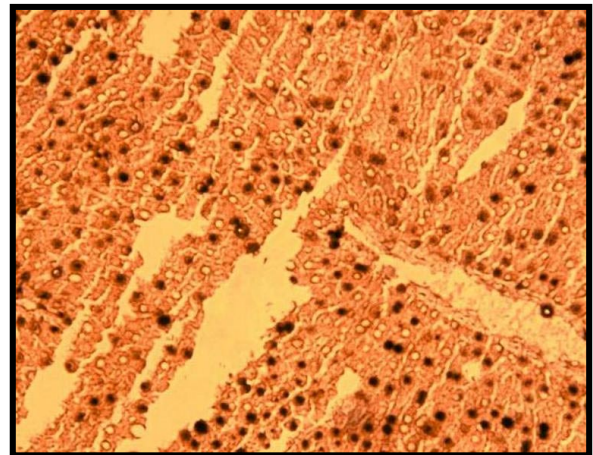


Abb. 36: **In situ-PCR für das „floxed“ *MGMT*-Allel an einem Leberschnitt eines LPS-induzierten Männchens (*MGMT*^{flox/flox}; *Cre*^{hCRP+}).** Alkalische Phosphatase (NBT / BCIP)-Detektion DIG-markierter Primer. Gefärbte Zellen haben den Genotyp *MGMT*^{flox/flox}, ungefärbte Zellen den Genotyp *MGMT*^{del/del}. (Vergr.: 125 x)

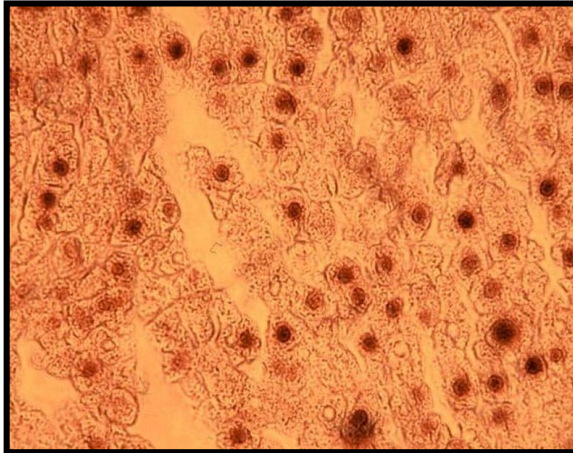


Abb. 38: *In situ*-PCR für das deletierte *MGMT*-Allel an einem Leberschnitt eines LPS-induzierten Männchens (*MGMT*^{flox/flox}; *Cre*^{hCRP+}). Alkalische Phosphatase (NBT/BCIP)-Detektion DIG-markierter Primer. Die gefärbten Zellen weisen den Genotyp *MGMT*^{del/del}, ungefärbte Zellen den Genotyp *MGMT*^{flox/flox} auf. (Vergr. 250 x, Phasenkontrast)

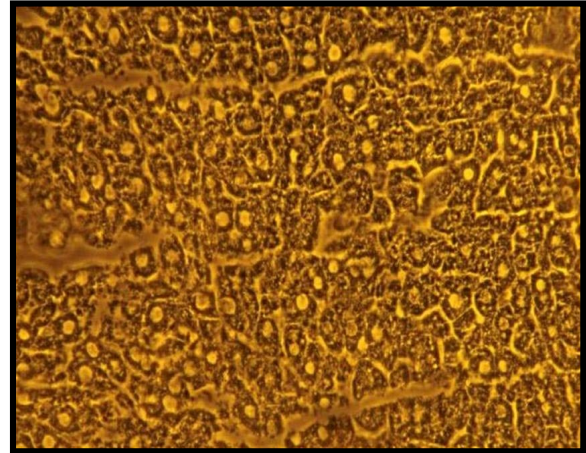


Abb 39: *In situ*-PCR für das deletierte *MGMT*-Allel an einem Leberschnitt eines nicht-induzierten Männchens (*MGMT*^{flox/flox}; *Cre*^{hCRP+}). Alkalische Phosphatase (NBT/BCIP)-Detektion DIG-markierter Primer. Die ungefärbten Kerne belegen, daß Deletionen ohne LPS-Induktion nicht nachweisbar sind (Vergr. 250 x)

Zunächst konnte die prinzipielle Durchführbarkeit der *in situ*-PCR für „floxed“, bzw. deletierte *MGMT*-Allele gezeigt werden (Abb. 36- Abb 39). Die IS-PCR bei einem nicht induzierten Tier belegt auch mit dieser extrem empfindlichen Detektionsmethode, daß nahezu keine Basalaktivität des *Cre*^{hCRP}-Transgens zu beobachten ist, da bis auf wenige Ausnahmen alle Zellen den „floxed“ Genotyp aufweisen (Abb. 37) bzw. keine *MGMT*^{del}-Allele ohne LPS-Induktion nachzuweisen sind (Abb 39). Analysiert man dagegen ein induziertes Tier, so erkennt man die gleichmäßige räumliche Verteilung von *MGMT*-„floxed“ (schwarze Kerne) und deletierten-Zellen (weiße Kerne) in der Leber (Abb. 36). Die IS-PCR für das deletierte *MGMT*-Allel (Abb. 38) zeigt den Erwartungen entsprechend das gleiche Ergebnis wie der „floxed“ Nachweis. Zudem belegt sie die *Cre*^{hCRP}-vermittelte Deletion in Hepatozyten.

2.12 Tierzucht

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 1327 Mäuse gezüchtet, bzw. mit Hilfe der Reimplantationstechnik generiert. 69 Tieren wurden Gewebe zur weiteren Analyse entnommen. Insgesamt wurden 255 Tiere behandelt (LPS, O⁶-Benzylguanin, DMN, DEN, MeNU oder EtNU). Die einzelnen transgenen Linien vererbten ihre Allele entsprechend dem Mendelschen Gesetz, auch wenn sie untereinander verpaart wurden. Der „spezifisch Pathogen-freie Status“ der Tiere wurde durch halbjährliche Blut und pathologische Untersuchungen (BioDoc) sichergestellt. Zur Dokumentation der Tierzucht wurde ein Datenbankprogramm unter MS-Access entworfen, in dem alle Daten der Tiere, der Behandlungen und der entnommen Gewebe verzeichnet sind.

2.13 Applikationsschema zur Nitrosamin-induzierten Hepatokarzinogenese bei partiell *MGMT*-defizienten Mäusen

Wie bereits in Abschnitt 1.6 ausgeführt, sollte bei den vorliegenden Untersuchungen das Hepatokarzinogenese-Modell Anwendung finden, bei dem den Tieren im Alter von 14 - 16 Tagen eine einmalige Dosis eines N, N-Dialkylnitrosamins appliziert wird. Die Übertragung dieses Modells auf partiell *MGMT*-defiziente Mäuse erforderte entsprechend den folgenden Fragen die Festlegung einer Reihe von Randbedingungen:

- Wie hoch soll der Anteil *MGMT*-defizienter Hepatozyten sein?
- Wie schnell erfolgt die Cre-vermittelte *MGMT*-Deletion?
- Wie kann der generierte *MGMT* „knockout“ Genotyp möglichst schnell in den *MGMT*-negativen Phänotyp konvertiert werden?
- Welche Nitrosamin-Dosis soll appliziert werden?

Durch eine einmalige intraperitoneale LPS-Injektion (3,3 µg/g Körpergewicht) im Alter von 6 Tagen wurde der Anteil *MGMT*-defizienter Hepatozyten auf ~30 % eingestellt.

Für die Cre-vermittelte Deletion wurde ein Zeitraum von 48 h als ausreichend angesehen, da das *hCRP*-Transgen seine maximale Proteinexpression schon nach 18 h zeigt (1.8.1) und die Cre Rekombinase-Reaktion *in vivo* nach weniger als 15 h abgeschlossen ist (Sauer & Henderson, 1988).

Das Ergebnis der Rekombinase Reaktion ist eine Hepatozyten Subpopulation, bei denen das *MGMT*-Gen inaktiviert ist, die aber dennoch einen aktiven *MGMT* „Pool“ aufweisen. Zunächst muß also der gesamte *MGMT* „Pool“ inaktiviert werden. Anschließend führt die *MGMT* Neusynthese in den Zellen mit „gefloxten“ Allelen zur Angleichung des Phänotyps an den Genotyp. Zur Inaktivierung der *MGMT* wurde den Tieren eine einmalige Dosis von O⁶-Benzylguanin (15 µg/g Körpergewicht) intraperitoneal appliziert. Die Reaktion ist auch *in vivo* schnell, so daß bei dieser Dosis in der Leber bereits nach 1 h nur noch weniger als 1 % *MGMT*-Ausgangsaktivität nachweisbar ist (Roy *et al.*, 1996). Der zur Wiederherstellung der *MGMT*-Ausgangsaktivität durch Neusynthese notwendige Zeitraum wurde experimentell bestimmt (Abb. 40). Nach schneller Depletion der *MGMT* in weniger als 5 h steigt die *MGMT*-Aktivität innerhalb 40 h nach Inhibition wieder auf das Ausgangsniveau an und weist nach 48 h sogar einen erhöhten Wert von ~130 % auf. Dieser Zeitpunkt wurde für die Applikation des Karzinogens gewählt, da er die größte Differenz in der *MGMT*-Aktivität aufweist.

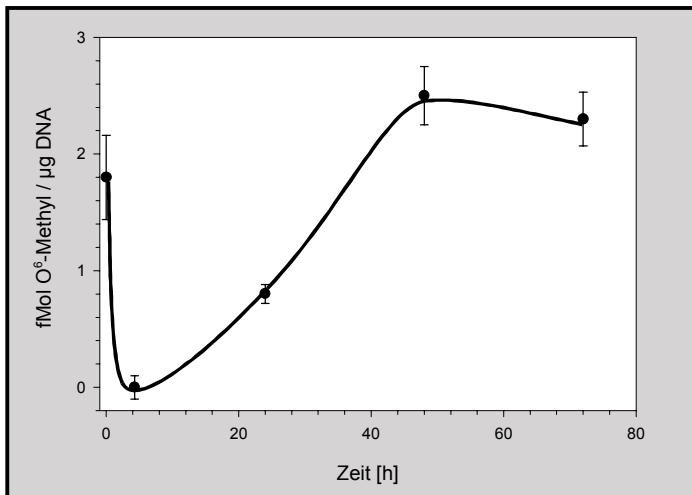


Abb. 40: **MGMT-Aktivität in der Leber der Maus nach einmaliger Applikation von O⁶-Benzylguanin.** 3 - 4 Monate alten Männchen wurden 15 µg/g O⁶-Benzylguanin gelöst in DMSO intraperitoneal injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Lebern entnommen und die MGMT-Aktivität in Leberextrakten bestimmt ([4.9];. 2 Tiere pro Zeitpunkt).

Die Karzinogendosis wurde mit 0,5 µg/g Körpergewicht niedrig gewählt, um die Reparaturkapazität in MGMT-kompetenten Zellen nicht zu depletieren und somit mögliche Unterschiede zu verwischen.

Um zu überprüfen, ob die einzelnen Phasen (Cre-Induktion, MGMT-Depletion, MGMT-Neusynthese, Kanzerogen-Applikation) auch *in vivo* in direkter Abfolge innerhalb von 2 Wochen nach Geburt zu dem Ergebnis führen, daß *MGMT*-deletierte Zellen deutlich weniger O⁶-Alkylguanin eliminieren als *MGMT*-"floxed" Zellen, wurde das folgende Experiment durchgeführt. Mäusen mit dem Genotyp *MGMT*^{fl^{ox}/fl^{ox}}; *Cre*^{hCRP}; *lacZ*^{fl^{ox}} wurde im Alter von 8 Tagen einmal LPS (3,3 µg/g Körpergewicht) oder PBS (nicht induzierte Kontrolle) injiziert. Am Tag 12 folgte eine intraperitoneale Injektion von O⁶-Benzylguanin (15 µg/g Körpergewicht). Am Tag 14 wurde EtNU (100 µg/g Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Bei diesen Tieren wurde 72 h nach EtNU-Exposition die Leber perfundiert (4.13.1), und die gewonnenen Einzelzellen einer FACS-Gal-Färbung (4.13.2) unterzogen. Zellen, in denen die Cre-Rekombinase aktiviert wurde, sollten zum einen *MGMT*-negativ sein und zum anderen die Stop-Kassette zwischen Promoter und kodierender Sequenz des *LacZ*-Konstrukts (1.8.1) verloren haben.

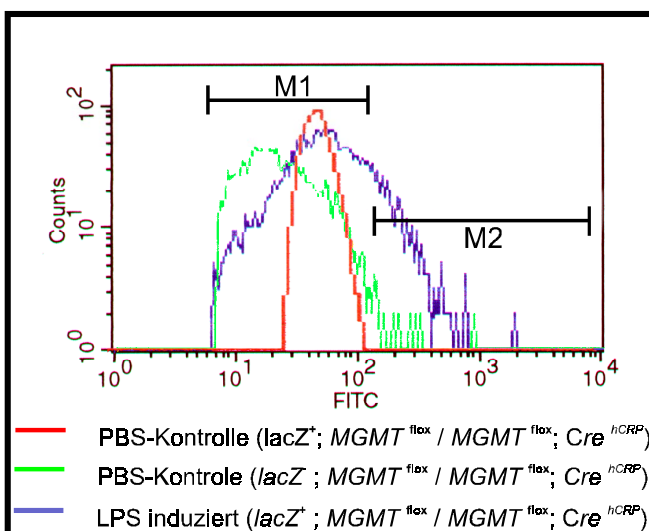


Abb. 41: **FACS-Analyse von primären Hepatozyten der Maus zur Isolation *lacZ*-positiver und negativer Zellen.** FACS-Gal Färbung für β-Galaktosidase Aktivität. Zellen im Bereich M2 (positiv) und im Bereich M1 (negativ) wurden getrennt isoliert. Behandlung der Tiere s. Text (2.13).

Die FACS-Analyse zeigt das Vorliegen einer Subpopulation FACS-Gal-positiver Zellen. Die Divergenz der „Peaks“ im niedrig-fluoreszenten Bereich (< 20 rel. Einh. [FITC]) und die daraus resultierenden relativ breiten „Peaks“ bei der grünen und lila Linie sind auf einen signifikanten Anteil von Erythrozyten in der Präparation zurückzuführen. Die rote Linie weist auf die wirksame Spülung der Leber mit PBS vor der Dissoziation mit Kollagenase hin. Mit Hilfe des FACS wurden die Zellsuspensionen in β -Galaktosidase-positiv (Bereich M2) und negative-Zellen (Bereich M1) sortiert und isoliert (Abb. 41).

Im nächsten Schritt wurden diese Zellpopulationen dann einer Immunzytologischen Analyse (ICA) (4.11) unterzogen, mit deren Hilfe der O^6 -Alkylguanin-Gehalt in der DNA individueller Zellen bestimmt wurde.

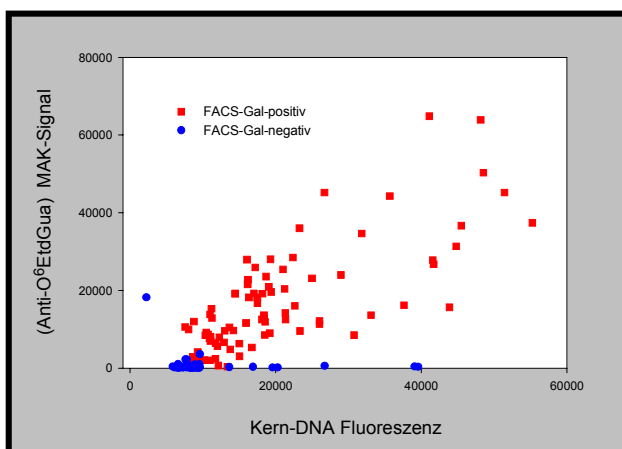


Abb. 42: O^6 -Ethylguanin-Gehalt in der Kern-DNA primärer Mausleberzellen nach EtNU-Puls. Die Leberzellen wurden vor der ICA-Analyse auf Basis ihrer β -Galaktosidase-Aktivität als Marker für die Cre-Rekombinase Aktivität getrennt (Abb. 41).

Zunächst zeigt die ICA-Analyse deutlich, daß die Fraktion der FACS-Gal-positiven Zellen einen drastisch erhöhten O^6 -Ethylguanin-Gehalt ihrer Kern-DNA aufweisen. Das mutagene O^6 -Ethylguanin der DNA dieser Zellen wird aufgrund fehlender MGMT-Aktivität wesentlich langsamer repariert. Der gewählte Ansatz einer initialen Depletion der MGMT und der Kanzerogen-Exposition nach erfolgter Neusynthese der MGMT war somit erfolgreich, denn bei den FACS-Gal-negativen Zellen wurde O^6 -Ethylguanin aus der Kern-DNA nahezu vollständig eliminiert. Ebenso zeigen die Ergebnisse, daß die β -Galaktosidase-Aktivität als Indikator für die Cre-Rekombinase-Aktivität verwendet werden kann. Dies wird besonders deutlich in einer Histogramm-Darstellung der ICA-Meßergebnisse. Die Normierung des MAK-Signals auf den DNA-Gehalt ergibt für jede einzelne Zelle das relative MAK-Signal. Unterteilt man diese relativen MAK-Signale in Klassen, so ergibt sich die Verteilung des O^6 -Ethylguanin-Gehalts der Kern-DNA in den beiden Fraktionen. Die geringen Anteile von Zellen mit hohem MAK/DNA-Signal (≥ 10) in der Fraktion FACS-Gal-negativer Zellen ($\sim 0,02$ %) und mit niedrigem MAK/DNA-Signal (≤ 1) in der Fraktion der FACS-Gal-positiver Zellen ($\sim 5,6$ %), spiegeln die Subpopulationen von Zellen wider, in denen das *MGMT*-Gen deletiert, nicht aber die β -Galaktosidase aktiviert wurde und vice versa.

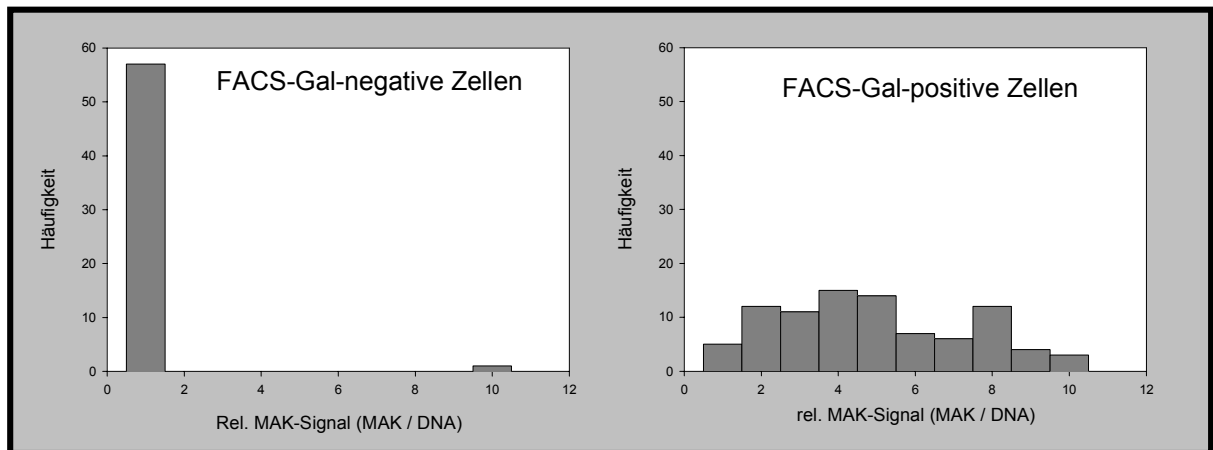


Abb. 43: Histogramm der Ergebnisse der ICA-Analysen.

Die oben aufgeführten Ergebnisse führten zu dem in Abb. 44 gezeigten Applikationsschema zur Nitrosamin-induzierten Hepatokarzinogenese. Um in diesem Tiermodell zusätzlich den Anteil der endogenen DNA-Alkylierung untersuchen zu können, wurde einer Gruppe PBS statt der Nitrosamin-Verbindung injiziert (Abb. 44). Eine Kontrollgruppe, bei denen die Cre-Rekombinase nicht induziert wird, kann entfallen, da bei jedem Tier auch nach der Cre-vermittelten Rekombination Zellen vorhanden sind, die den *wt*-Phänotyp aufweisen.

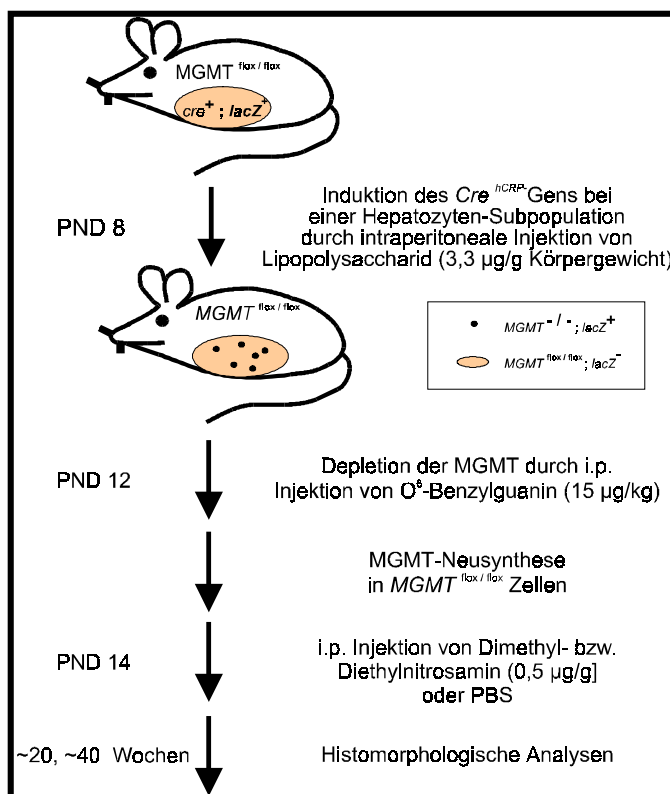


Abb. 44: Applikationsschema zur Nitrosamin-induzierten Hepatokarzinogenese bei partiell *MGMT*-defizienten Mäusen.

2.14 Induktion der Hepatokarzinogenese bei partiell *MGMT*-defizienten Mäusen

Das oben gezeigte Applikationsschema (Abb. 44) wurde bei insgesamt 88 Tieren angewandt. Dabei erhielten zu den in Tab. 4 angegebenen Zeitpunkten 36 Tiere N, N-Dimethylnitrosamin, 21 Tiere N, N-Diethylnitrosamin und 31 Tiere PBS (jeweils als letzte Injektion). Die Injektionen wurden jeweils zwischen 13⁰⁰ Uhr und 15⁰⁰ Uhr vorgenommen, um diurnale Varianzen der Leberaktivität zu begrenzen.

Woche der letzten Injektion (1999)	Anzahl der Tiere	LPS + O ⁶ -BeG + DMN	LPS + O ⁶ -BeG + DEN	LPS + O ⁶ -BeG + PBS
21	7	X		
25	7	X		
27	6	X		
29	7	X		
39	9	X		
10	8			X
33	7			X
33	8			X
39	8			X
46	9		X	
47	12		X	

Tab. 4: Zeitplan zu Hepatokarzinogenese-Induktionen.

Die histomorphologische Überprüfung des Verlaufs der Hepatokarzinogenese erfolgte an Leberschnitten von Tieren, die entsprechend dem entwickelten Applikationsschema (Abb. 44) mit DMN behandelt worden waren. Diese Kontrollen waren um so notwendiger, als aus der Literatur keine Informationen zu der Kombination aus dem verwendeten Mausstamm und der niedrigen einmaligen Dosis von DMN vorliegen. Die Tiere wurden 19 Wochen nach der Nitrosamin-Injektion getötet. Zu diesem Zeitpunkt sind prä-maligne Vorstufen der späteren Hepatokarzinome, sogenannte „enzyme altered foci“ (EAF) (1.6) zu erwarten (Vesselinovitch & Mihailovich, 1983). EAF können aufgrund ihres veränderten Stoffwechsels mit Hilfe histochemischer Färbungen identifiziert werden. Als aussagekräftigster Marker bei der Maus gilt die Glukose-6-Phosphatase (G6Pase)-Aktivität. Die Aktivität dieses Enzyms ist in EAFs drastisch reduziert. In Abhängigkeit von der Nitrosamin-Dosis zeigen EAF bei der Maus bereits nach 12 Wochen zu nahezu 100 % die charakteristischen hellen Regionen ungefärbter Zellen (Vesselinovitch et al., 1985). Ein weiterer EAF-Marker mit vergleichbarer Empfindlichkeit ist die Toluidin Blau (TB)-Färbung. Im Unterschied zur G6Pase-Färbung, die an Gefrierschnitten durchgeführt wird, erfolgt die TB-Färbung an Paraffinschnitten. In Abb. 45 sind diese Regionen geringer G6Pase-Aktivität deutlich zu erkennen. Sie zeigen,

daß die gewählte DMN-Dosis in ausreichendem Maße prämaligne Läsionen der Leber induziert.

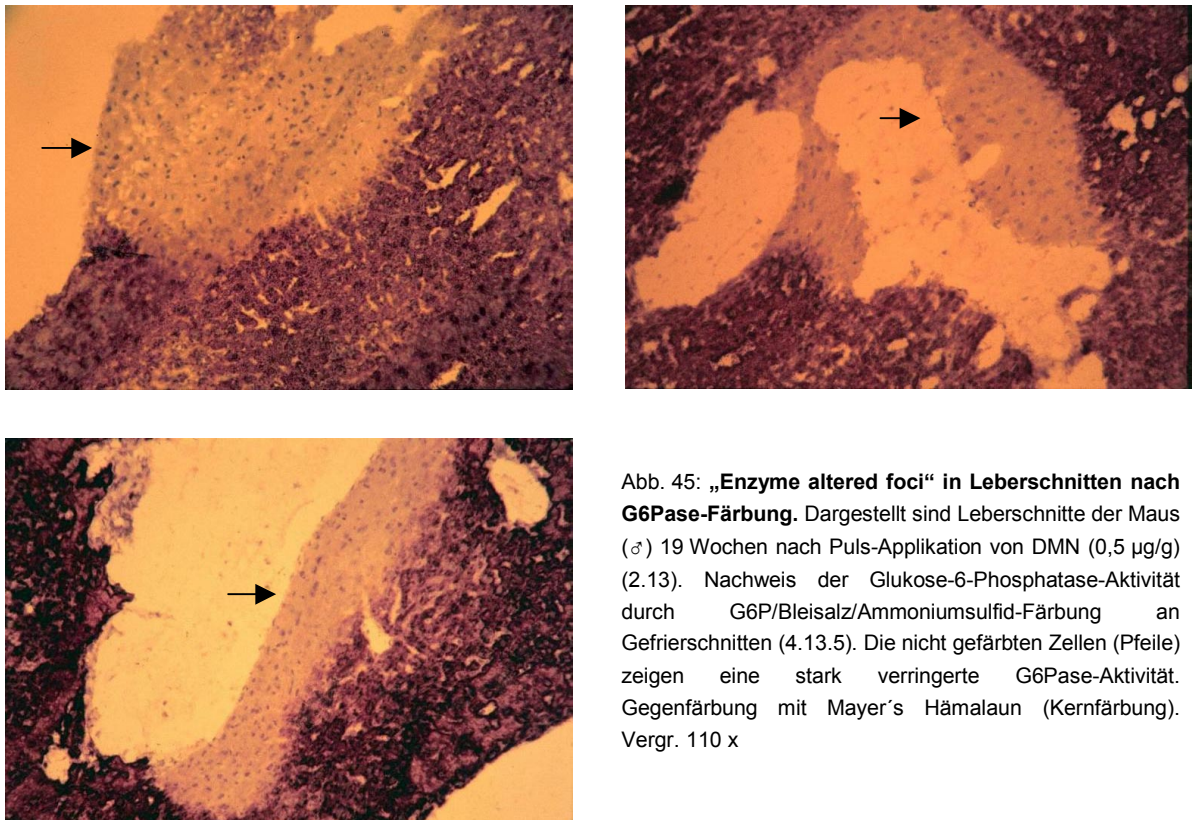


Abb. 45: „Enzyme altered foci“ in Leberschnitten nach **G6Pase-Färbung**. Dargestellt sind Leberschnitte der Maus (σ) 19 Wochen nach Puls-Applikation von DMN (0,5 $\mu\text{g/g}$) (2.13). Nachweis der Glukose-6-Phosphatase-Aktivität durch G6P/Bleisalz/Ammoniumsulfid-Färbung an Gefrierschnitten (4.13.5). Die nicht gefärbten Zellen (Pfeile) zeigen eine stark verringerte G6Pase-Aktivität. Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun (Kernfärbung). Vergr. 110 x

2.15 Isolierung und Restriktionskartierung genomischer DNA-Fragmente des *Ape*-Gens der Maus

Neben dem Aufbau eines Tiermodells für Untersuchungen zur Bedeutung der MGMT abhängigen DNA-Reparatur bei der Nitrosamin induzierten Hepatokarzinogenese waren Vorarbeiten zur Übertragung dieses Modells auf ein zweites wichtiges DNA-Reparaturgen, das *Ape*-Gen durchzuführen. In den folgenden beiden Abschnitten werden die Arbeiten zur Klonierung eines Rekombinationsvektors für das konditionale „gene targeting“ des *Ape*-Gens bei der Maus beschrieben.

Für die Konstruktion eines Rekombinationsvektors für das *Ape*-Gen galten die gleichen Voraussetzungen, wie für das *MGMT*-Gen (2.1). Auch für dieses Konstrukt sollten ca. 10 kB isogener DNA des *Ape*-Locus verwendet werden. Die Strategie zur Isolierung genomischer DNA-Fragmente des *Ape*-Gens aus einer genomischen λ -Gen-Bibliothek entsprach derjenigen zur Isolierung von *MGMT*-Genfragmenten (2.1). Zunächst wurde ein *Ape*-cDNA-Fragment mit Hilfe der RT-PCR Technik aus der Gesamt-RNA der Mäuseleber amplifiziert. Die dazu notwendigen Sequenzinformationen lagen vor (Seki et al., 1991) (D90374). Die

cDNA wurde subkloniert und sequenziert. Durch Hybridisierung der cDNA an λ -Phagen einer Bibliothek des Maus-Stammes 129/Ola (5.4.7; 4.1.3) wurden 3 λ -Phagen-Klone isoliert. Aus dem Klon λ III/2 (Gesamtinsertlänge von ~20 kB) wurden zur Restriktionskartierung die Fragmente 39 (Xba I; 2,75 kB), 17 (Eco RI; 5,4 kB) und 15 (Xba I; 3,6 kB) subkloniert. Die Identität der genomischen Fragmente wurde durch Sequenzierungen überprüft (5.2.9; 5.2.10). Sowohl das 5'-Ende des Fragments 15 als auch das 3'-Ende des Fragments 17 stimmten mit der veröffentlichten Sequenz für das *Ape*-Gen der Maus überein (Takiguchi & Chen, 1994), die in der Abb. 46 den Bereich 4523 - 7106 überspannt. Um ein Kontinuum des *Ape*-Gens aus den drei Genfragmenten darstellen zu können, wurde ein Hind III-Fragment (1770-2120; Abb. 46) des Fragments 39 subkloniert. Die Sequenz des subklonierten Fragments stimmte mit der Sequenz des 5'-Endes des Fragments 17 überein (5.2.11; 5.2.10), so daß ein Kontinuum des *Ape*-Gens von 9,4 kB Länge restriktionskartiert werden konnte (Abb. 46).

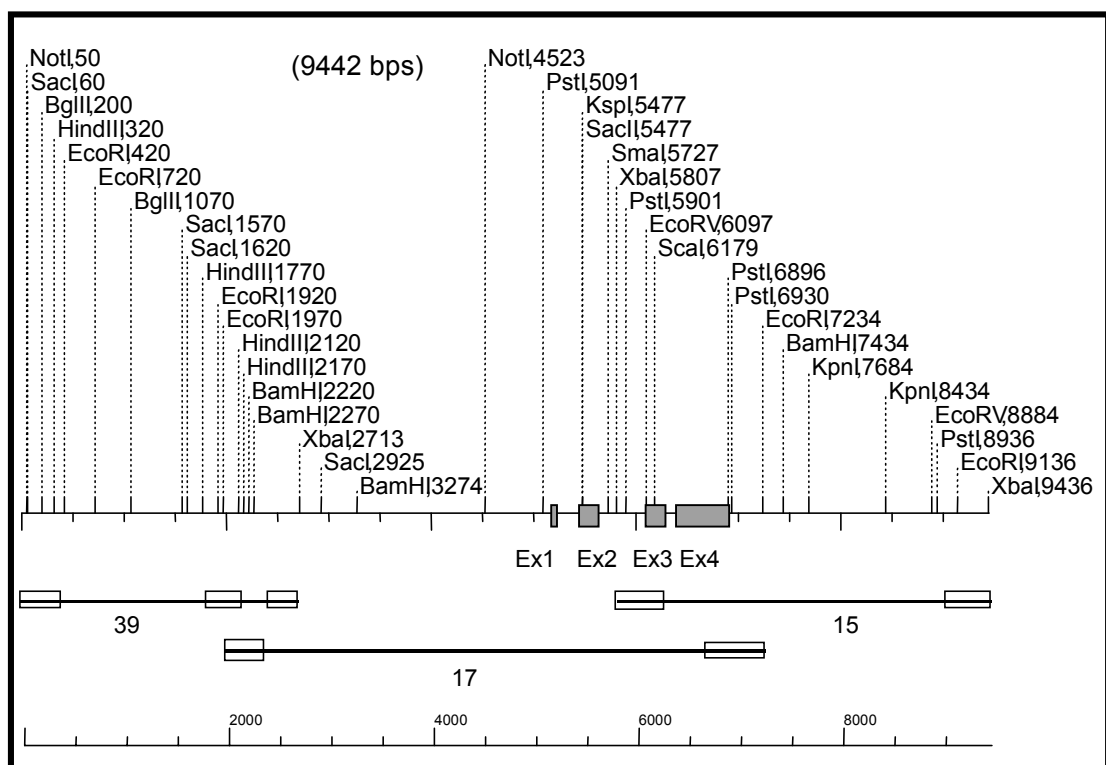


Abb. 46: **Restriktionskartierung des *Ape*-Locus der Maus.** Der Locus setzt sich zusammen aus den Fragmenten 39 (Xba I; 2,5 kB), 17 (Eco RI; 2,7 kB) und 15 (Xba I; 3,6 kB) (als Linien dargestellt). Die Exons (Ex 1 - Ex 4) sind als graue Rechtecke dargestellt. Sie wurden anhand der veröffentlichten Daten zur Struktur des *Ape*-Gens eingetragen (Takiguchi & Chen, 1994) (U12273). Sequenzierte Regionen sind jeweils als weiße Rechtecke dargestellt. Die Sequenzen sind im Abschnitt 5.2 aufgelistet.

2.15.1 Klonierung des Replacement-Vektors für das *Ape*-Gen der Maus

Wie bereits im Abschnitt 1.5.1 erwähnt, ist die APE ein multifunktionales Enzym, dessen komplette Inaktivierung in der Keimbahn der Maus embryonal letal ist (Xanthoudakis et al., 1996; Ludwig et al., 1998). Es war daher ein Rekombinationsvektor für das konditionale „targeting“ des *Ape*-Gens zu konstruieren, der es erlaubt, die Endonuklease-Aktivität des Enzyms von seiner Redox-Aktivität zu einem frei wählbaren Zeitpunkt *in vivo* zu entkoppeln. Hierzu war die Endonuklease-Aktivität spezifisch zu inaktivieren ohne die Redox-Funktion zu beeinträchtigen. Die Tertiärstruktur des Enzyms zeigt, daß die beiden Funktionen in nicht überlappenden Domänen lokalisiert sind, die zudem unabhängig voneinander exprimiert werden können. Die N-terminale Domäne, kodiert durch die Exons 1-3, beinhaltet die Redox-Aktivität. Die C-terminale Domäne wirkt endonukleolytisch und wird vom vierten Exon kodiert. Eine Vektorkonstruktion die es ermöglicht, das vierte Exon mit Hilfe der *cre-loxP*-Technik zu deletieren, sollte demnach zum Verlust der Endonuklease-Funktion führen.

Im folgenden ist die Klonierung des Rekombinationsvektors kurz dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Schritte findet sich im Abschnitt 4.3.3. Zunächst wurde ein 3,7 kB Xba I-Fragment des *Ape*-Gens subkloniert, das eine 5' nicht-kodierende Region und die Exons 1 - 3 enthielt. Anschließend wurde eine *loxP*-Sequenz 3' vom dritten Exon eingebracht. Im letzten Schritt dieses ersten Klonierungsstrangs wurde das vierte Exons als Hpa I - Eco RI-Fragment 3' der *loxP*-Sequenz inseriert.

Analog zum *MGMT*-Rekombinationsvektor (2.3) wurde auch hier eine Positiv- (*neo*) und eine Negativ-Selektionskassette (*HSV-tk*) eingebracht. Dazu wurde das Plasmid *Ineo-tk* (Abb. 57) zwischen der „geflochten“ *neo*- und der *HSV-tk*-Kassette geöffnet und an dieser Position ein 1,8 kB Eco RI-Fragment aus der 3'-Region des *Ape*-Gens inseriert. Im letzten Schritt dieses zweiten Klonierungsstrangs wurde dann ein 2,7 kB Xba I-Fragment der 5'-Region des *Ape*-Gens 5' von *neo*-Kassette eingebracht, um das Plasmid *tk10floxneo* zu erhalten.

Im letzten Schritt wurden die beiden Klonierungsstränge vereinigt, indem das Plasmid *tk10floxneo* zwischen dem 5'-Bereich des *Ape*-Gens und der *neo*-Kassette geöffnet und an dieser Position das Zwischenprodukt des ersten Klonierungsstranges eingesetzt wurde. Die Plasmidkarte des kompletten Rekombinationsvektors zeigt Abb. 47.

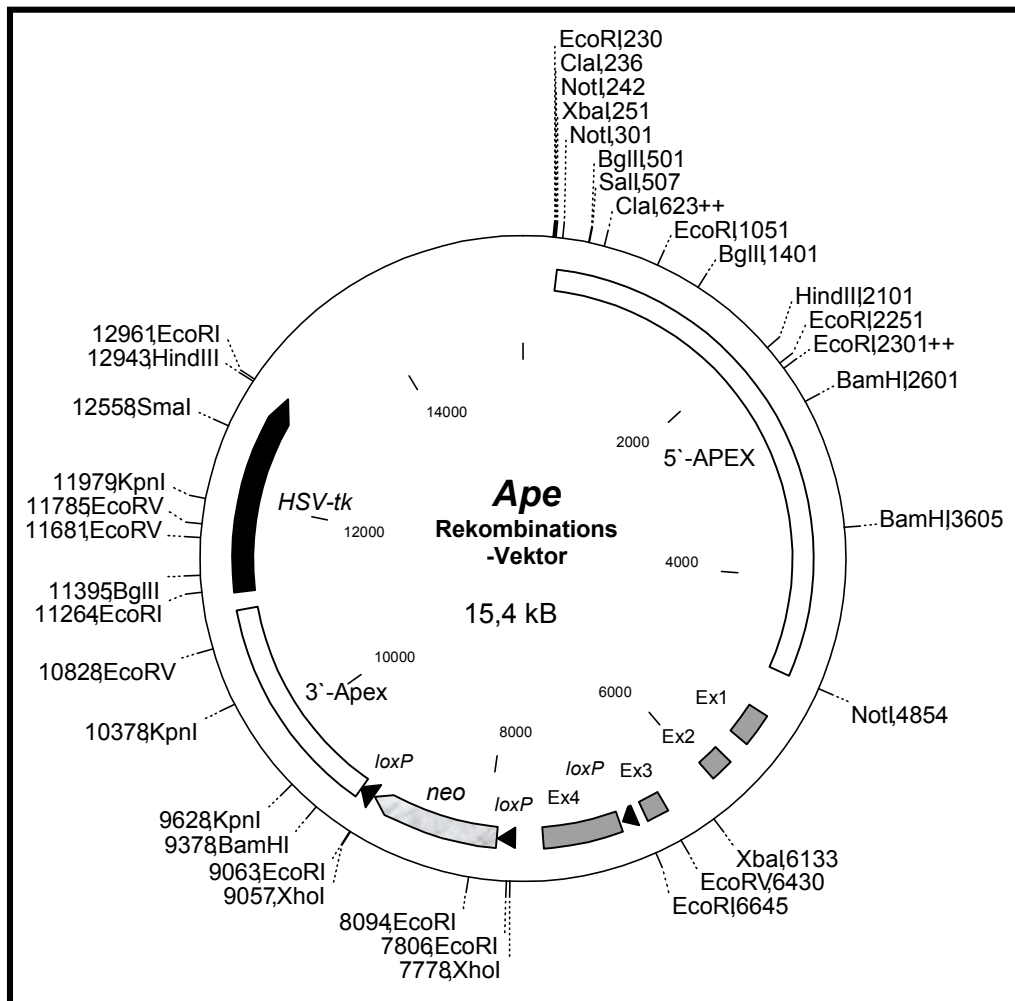


Abb. 47: **Plasmidkarte des Ape-Rekombinationsvektors, d.h. des „Replacement“-Vektor zur homologen Rekombination mit dem Ape-Gen bei der Maus.** Das Plasmid enthält ca. 9 kB des Ape-Gens, einschließlich des kompletten kodierenden Bereichs. Zur Positivselektion unter G418 wurde eine *neo*-Kassette integriert. Die *HSV-tk*-Kassette dient zur Negativselektion unter Ganciclovir. Die 3 *loxP*-Sequenzen gewährleisten die Deletion nur der *neo*-Kassette oder des vierten Exons, sowie des gesamten Bereichs. Zur Linearisierung des Vektors für die Elektroporation dienen die *Cla* I Erkennungssequenzen (236, 623) unter Verlust eines ~0,4 kB Fragments. In *E. coli* kann für das Plasmid mit Ampicillin selektioniert werden.

3 DISKUSSION

3.1 Überblick

Die Kanzerogenese ist in der Regel mit einer Vielzahl von Mutationen verbunden, die mit der niedrigen spontanen Mutationsrate nicht leicht in Übereinstimmung zu bringen sind (Fearon & Vogelstein, 1990). Eine Erklärung könnte z.B. die Entstehung von Mutator-Phänotypen als Voraussetzung für die Krebsentstehung bilden (Loeb, 1991; Loeb & Christians, 1996). Defekte in DNA-Reparaturgenen führen zu Mutator-Phänotypen und Untersuchungen an Menschen mit DNA-Reparaturdefekten für die NER oder MMR zeigen die Bedeutung des Ausfalls einzelner DNA-Reparaturfunktionen vor allem bei hereditären Krebs-Syndromen (Beispiele: Xeroderma pigmentosum [NER-Defekte], HNPCC [MMR-Defekte]). Derartige Krankheitsbilder können mit Hilfe von „knockout“-Mäusen simuliert werden, bei denen einzelne DNA-Reparaturgene gezielt inaktiviert wurden (Friedberg & Meira, 1999). Diese Ansätze haben tiefgreifende Einsichten in die physiologischen Funktionen des DNA-Reparatur-Netzwerks der Zelle ermöglicht. In bezug auf die Kanzerogenese bilden diese Modelle aber nur den kleinen Teil der hereditären menschlichen Tumoren ab. Der weitaus größte Teil der humanen Tumoren weist dagegen somatische Mutationen auf, die durch Ausschaltung eines spezifischen Gens in der Keimbahn der Maus und somit nachfolgend in allen somatischen Zellen des Tieres nicht simuliert werden können; vor allem auch deshalb nicht, weil sehr viele Gen-„knockouts“ in der Keimbahn mit dem Überleben der Embryonen nicht vereinbar sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde diesem Umstand durch die Etablierung eines neuen Tiermodells Rechnung getragen, in dem erstmals definierte DNA-Reparaturgene in einer Subpopulation eines definierten Zelltyps zu einem frei wählbaren Zeitpunkt „konditional“ inaktiviert werden können. Dazu wurde eine transgene Maus-Linie entwickelt, die es erstmals ermöglicht, mit Hilfe des Cre-*loxP* Systems ein beliebiges Gen ausschließlich in den Hepatozyten der Maus konditional auszuschalten. Bei einer zweiten Maus-Linie wird das DNA-Reparaturgen *MGMT* durch *loxP*-Sequenzen flankiert, die eine konditionale Inaktivierung ermöglichen. Die Kombination beider Maus-Linien führt zu einem neuartigen Tiermodell der Hepatokarzinogenese, an dem die Bedeutung spezifischer DNA-Reparaturfunktionen für das Zelltyp-spezifische Risiko der malignen Transformation zunächst am Beispiel des *MGMT*-Gens untersucht werden kann. Zur Erweiterung dieses Konzepts wurde ein weiterer Rekombinationsvektor für das wichtige DNA-Reparaturgen *APE* entwickelt, der es ermöglichen soll, ausschließlich die DNA-Reparaturdomäne, nicht aber die Redoxdomäne des Enzyms zu deletieren. Dadurch wird der analytische Zugriff auf die BER ausgeweitet und eine Möglichkeit geschaffen, um die bislang nicht wirklich verstandene Verbindung der Redox- mit der Endonuklease-Funktion in diesem Enzym zu entkoppeln.

3.2 Der *MGMT*-Rekombinationsvektor

Zur Konstruktion eines „Replacement“-Vektors für das „gene targeting“ werden 10 – 15 kb (Deng & Capecchi, 1992) genomischer DNA benötigt. Diese Größenordnung gewährleistet eine ausreichende Rekombinationsfrequenz ($\sim 10^{-5}$) zur homologen Integration des Vektors in die genomische DNA von ES-Zellen. Fragmente dieser Größe werden aus genomischen Phagen-Bibliotheken gewonnen. Die verwendete Bibliothek war isogen zur ES-Zelllinie E-14-1; nicht-isogene DNA hätte die Rekombinationsfrequenz des Vektors um den Faktor 4-5 verringern können (Deng & Capecchi, 1992). Es wurden vier unabhängige Klone isoliert, deren Inserts ca. 70 kB des *MGMT*-Locus umfaßten und alle kodierenden Exons enthielten (Tab. 1).

Zur kompletten Inaktivierung eines Gens durch „gene targeting“ werden meist möglichst 5'-gelegene kodierende Exons deletiert, indem sie zumindest partiell durch eine Selektionskassette ersetzt werden. Zum Zeitpunkt der Klonierungen waren die exakten Exon-Grenzen des *MGMT*-Gens der Maus nur für die Exons III, IV und V bekannt (Shiraishi *et al.*, 1992). Eine partielle Deletion des zweiten Exons barg das Risiko des „exon skipping“, d.h. das Herausspleißen des modifizierten Exons. Eine Leserasterverschiebung ergibt sich dadurch jedoch nur in zwei von drei Fällen und entsprechende N-terminale Deletionsmutanten des humanen *MGMT*-Gens zeigten noch DNA-Reparaturaktivität (Bender *et al.*, 1996). Daher wurde ein anderer Ansatz gewählt. Das sogenannte „aktive Zentrum“ der *MGMT* wird durch das fünfte Exon kodiert. Mutationsstudien für das humane *MGMT*-Gen hatten gezeigt, daß die DNA-Reparaturaktivität der *MGMT* schon durch einen Aminosäureaustausch des Alkylgruppenakzeptor-Cysteins-145 im „aktiven Zentrum“ in ein Methionin vollständig aufgehoben wird [eigene unveröffentlichte Ergebnisse; (Edara *et al.*, 1999)]. Die Deletion von Exon V sollte also zur Inaktivierung der *MGMT* führen. Die Konstruktion des Rekombinationsvektors erforderte zunächst eine detaillierte Restriktionskarte dieser Region. Dazu wurden Fragmente eines Phagen-Klons subkloniert um insgesamt 13 kB zu kartieren, welche die Exons IV und V enthielten (Abb. 12). Anhand der Restriktionskarte wurden weitere Subklonierungen (Abb. 13) vorgenommen, um aus diesen Fragmenten den Rekombinationsvektor aufbauen zu können (Abb. 14).

Der Aufbau eines Rekombinationsvektors zum konditionalen „gene targeting“ unterscheidet sich von dem eines konventionellen Rekombinationsvektors. Der konditionale Ansatz bedingt, daß das rekombinante „floxed“-Allel phänotypisch dem Wildtyp gleicht. Die notwendige Selektion für homologe Rekombinationsereignisse erfordert jedoch einen Selektionsmarker, dessen externe Transkriptionselemente (Promoter, Enhancer, Spleiß-Sequenzen, pA-Sequenz) mit der Prozessierung des Zielgens interferieren könnten. Um diesen (vermeintlichen) Widerspruch aufzulösen wurde zur Positivselektion eine *neo*-Kassette gewählt, die von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert war (Abb. 14). So wurde gewährleistet, daß die Selektionskassette mit Hilfe einer transienten Expression der Cre-Rekombinase auf ES-Zell-Niveau deletiert werden konnte. Durch Platzierung des Selektionsmarkers in das Intron IV verbleibt nach der Deletion nur eine *loxP*-Sequenz, die

zusammen mit einer weiteren *loxP*-Sequenz im Intron V das Exon V flankiert. Gleichzeitig diente die *loxP* Sequenz im Intron V dazu, einen sogenannten „kurzen“ Bereich nicht unterbrochener Sequenzhomologie zu begrenzen, um den effizienten Nachweis homologer Rekombinationsereignisse mit Hilfe der PCR zu ermöglichen (Abb. 16). Zur weiteren Anreicherung homolog rekombinanter ES-Zellen wurde eine *HSV*-Thymidinkinase-Kassette zur Negativselektion mit Ganciclovir (1.7.1) am „kurzen“ Ende des Vektors positioniert. Diese Negativselektion erhöhte die Ausbeute an homolog rekombinanten Klonen um den Faktor 10. Insgesamt ermöglichte es die Vektorkonstruktion, unter den doppelt-resistenten Klonen ($G418^R$ / $GANC^R$) homolog rekombinante Klone mit einer Frequenz von 3×10^{-2} zu isolieren (2.4). Diese Häufigkeit liegt im Rahmen der mit vergleichbaren Konstrukten erzielten Rekombinationsfrequenzen (Mortensen *et al.*, 1991; Rubinstein *et al.*, 1993; Torres & Kühn, 1997a).

3.3 Analyse des rekombinanten MGMT-Phänotyps

Ein wesentlicher Teil der „gene targeting“-Methodik besteht in der Analyse des Phänotyps des inaktivierten Gens. In bezug auf das *MGMT*-Gen war zu zeigen, daß die Deletion nur des fünften Exons zu einem vollständigem Funktionsverlust führt. Zusätzlich muß im Fall des konditionalen „knockout“ der Nachweis geführt werden, daß das „floxed“-Allel den gleichen Phänotyp aufweist wie der Wildtyp. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, wurden ES-Zellen mit dem Genotyp *MGMT*^{flox/wt} einer zweiten Rekombinationsrunde unterworfen. Nach transienter Cre-Expression in doppelt rekombinanten ES-Zellen gelang es, homozygot *MGMT*-„floxed“ wie auch homozygot *MGMT* negative Klone zu isolieren (2.6). Die Western-Blot Analyse von Leberextrakten (Abb. 23) mit einem Antiserum gegen die N-terminale Region des *MGMT*-Proteins zeigte eine im Vergleich zum Wildtyp unveränderte *MGMT*-Expression für *MGMT* „floxed“ Zellen. Zudem konnte bei doppelt transgenen Tieren (*MGMT*^{flox/flox}; *Cre*^{hCRP}) nachgewiesen werden, daß das nicht induzierte *Cre*-Transgen keinen Einfluß auf das „floxed“-*MGMT* Gen hat. Da die „floxed“-Modifikation homozygot vorlag, ist abzuleiten, daß wie erwartet die *loxP*-Sequenzen in den Introns die *MGMT*-Expression nicht beeinflussen. Bei der homozygot negativen ES-Zelllinie war das *MGMT*-Protein nicht nachweisbar. Da das Antiserum die ersten 50 N-terminalen Aminosäuren spezifisch erkennt und eine Bindung an den denaturierten Extrakt nicht festzustellen war, die Deletion aber die 69 C-terminalen Aminosäuren betrifft, wird die Halbwertszeit der *MGMT*-mRNA durch die Deletion der Polyadenylierungssequenz offenbar so stark herabgesetzt, daß eine effiziente Proteinsynthese nicht mehr möglich ist. Dafür spricht auch, daß bei homozygot *MGMT* deletierten ES-Zellen *MGMT*-mRNA nicht nachzuweisen war (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse können nur deutliche Expressionsunterschiede oder Strukturveränderungen eines Proteins nachgewiesen werden, nicht notwendigerweise aber z.B. durch Punktmutationen in kodierenden Regionen verursachte Modifikationen. Zudem ist die Empfindlichkeit dieser Technik begrenzt, so daß eine nur geringfügig veränderte

Regulation der MGMT-Expression z.B. aufgrund der inserierten *loxP*-Sequenzen nicht detektiert werden könnte. Zum Nachweis der Funktionstüchtigkeit des konditionalen Ansatzes war es daher notwendig, die MGMT-Aktivität direkt zu bestimmen. Dazu wurde ein Aktivitätstest angewendet, der auf der spezifischen Übertragung einer [³H]-markierten Methyl-Gruppe auf das Cystein-145 im aktiven Zentrum der MGMT beruht (Nakabeppu *et al.*, 1985). Die Meßwerte für Leberextrakte von Tieren mit unterschiedlichem *MGMT*-Genotyp zeigten mit $32 \pm 3,2$ fmol/mg („floxed“, ♂), $28 \pm 4,5$ fmol/mg („floxed“, ♀) und $37 \pm 10,4$ fmol/mg (wt, ♂) vergleichbare MGMT-Aktivitäten (2.8.2). Im Vergleich zu publizierten Daten für männliche CD-1 Mäuse (58 ± 19 fmol/mg) (Gerson *et al.*, 1986) ergaben sich somit etwas geringere Aktivitäten, die wahrscheinlich Stammesunterschiede widerspiegeln. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere sind eine Mischung der Stämme C57BL/6, Balb/c und 129 SV/Ola. In Übereinstimmung mit publizierten Daten (370 fmol/mg) (Tominaga *et al.*, 1997) wiesen die ES-Zell-Klone mit 447 ± 23 fmol/mg („floxed“) und 420 ± 52 fmol/mg (wt) weitaus höhere MGMT-Aktivitäten auf. Im Gegensatz dazu war bei der MGMT-negativen ES-Zelllinie keine Aktivität nachzuweisen. Hieraus kann geschlossen werden, daß die MGMT den einzigen Akzeptor der Säugerzelle für Alkyl-Gruppen in der O⁶-Position des Guanins darstellt.

Messungen der proliferativen Aktivität der entsprechenden ES-Zellen zeigten eine geringfügige Verlängerung der Populations-Verdopplungszeit bei der *MGMT* „knockout“ Linie ($t_D = 9$ h [*MGMT*^{wt/wt} und *MGMT*^{flox/flox}]; $t_D = 10,5$ h [*MGMT*^{-/-}]). Ursache hierfür könnten z.B. endogene Alkylierungen der DNA sein, wie sie für eukaryotische Zellen bereits beschrieben wurden (Xiao & Samson, 1993). Folge der *MGMT*-Inaktivierung ist die Anreicherung von O⁶-Alkylguaninen, welche die DNA-Replikation behindern (Voigt & Topal, 1995) und aufgrund ihrer Fehlpaarungseigenschaften auch eine abortive MMR induzieren können (1.4.2). Nach exogener Alkylierung *MGMT*-negativer Zellen sind Zellzyklus-Arretierung und Apoptose beobachtet worden (Meikrantz *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1997). Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse, daß der „*MGMT*-,floxed“ Genotyp phänotypisch dem Wildtyp entspricht und die Deletion des letzten *MGMT*-Exons ausreicht, um jegliche DNA-Reparaturaktivität der MGMT zu annullieren.

3.4 Zelluläre DNA-Reparaturkapazität für O⁶-Methylguanin und O⁶-Ethylguanin

Neben der direkten Bestimmung der MGMT-Aktivität wurde auch die zelluläre Reparaturkapazität für das mutagene O⁶-Alkylguanin gemessen. Durch den Vergleich von ES-Zell Linien mit und ohne intaktem *MGMT*-Gen konnte so erstmals der Anteil der MGMT-abhängigen DNA Reparatur an der zellulären Gesamt-Reparaturkapazität für O⁶-Methylguanin und O⁶-Ethylguanin bei der Maus bestimmt werden. Diese Frage war von erheblicher Relevanz für das erarbeitete Tiermodell der Hepatokarzinogenese, an dem die Bedeutung MGMT-vermittelter Reparatur von O⁶-Alkylguaninen in der DNA von Hepatozyten

für deren Transformationsrisiko untersucht werden soll. Die ES-Zell-Reparaturkinetiken (Abb. 26) zeigen den hohen Anteil der MGMT-vermittelten Reparatur für beide O⁶-Alkylguanine. Die Inaktivierung des *MGMT*-Gens führte zu einer drastischen Reduktion der Reparatur sowohl von O⁶-Methylguanin (90 % versus 20 %) als auch von O⁶-Ethylguanin (85 % versus 14 %), gemessen jeweils für den *MGMT*^{wt/wt} gegenüber dem *MGMT*^{-/-}-Genotyp. Die beobachtete Verringerung des molaren O⁶-MeGua/Gua Verhältnisses in der DNA um 8×10^{-6} für *MGMT*^{wt/wt} und *MGMT*^{flox/flox} stimmt gut mit der MGMT-Aktivität von wt ES-Zell Extrakten überein (420 fmol/mg Protein) (Umrechnungsfaktor Protein [mg]/DNA [µg] = 0,0137) (2.8.2).

Die Daten zeigen aber auch eine MGMT-unabhängige Reparatur von O⁶-Alkylguanin in der genomischen DNA, durch die im Beobachtungszeitraum 14 - 20 % dieses DNA-Alkylierungsprodukts eliminiert wurden. Diese Ergebnisse widersprechen Publikationen, die eine Kooperation der MGMT mit der NER als Voraussetzung zur Reparatur von O⁶-Ethylguanin in der zellulären DNA postuliert hatten (Bronstein *et al.*, 1992a; Bronstein *et al.*, 1992b). Vielmehr ist eine parallele Prozessierung von O⁶-Alkylguaninen durch MGMT und einen alternativen „Pathway“ zu erkennen. Ein Kandidat für diesen letzteren Reaktionsweg ist die NER, da O⁶-Alkylguanin sowohl bei Bakterien (Samson *et al.*, 1988), als auch bei menschlichen Zellen ein Substrat für die NER darstellt (Huang *et al.*, 1994). Der direkte Nachweis könnte an Tieren geführt werden, die weder MGMT- noch NER-Aktivität aufweisen. Entsprechende doppelt-negative Mäuse (*XP-A*^{-/-}; *MGMT*^{-/-}) werden daher zur Zeit gezüchtet.

Die Befunde der vorhergehenden Untersuchungen zeigten weiter eine unterschiedliche Reparaturcharakteristik in Abhängigkeit von der Struktur des Alkylierungsprodukts auf. O⁶-Ethylguanin wurde wesentlich rascher eliminiert als O⁶-Methylguanin ($t_{1/2} = 3$ h versus $t_{1/2} = 17,5$ h; Tab. 2). Der Geschwindigkeitsunterschied ist vor allem auf die schnelle initiale Reparatur von O⁶-Ethylguanin zurückzuführen. Sie wird durch Inaktivierung des *MGMT*-Gens vollständig unterbunden. Vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Reparaturkinetik liegen für Brustdrüsenzellen der Ratte vor (Engelbergs *et al.*, 1998b). Insgesamt unterstützen diese Reparaturdaten die zuvor beschriebenen Ergebnisse zum rekombinanten *MGMT*-Phänotyp, denn die „floxed“-Linie weist die gleiche Reparaturcharakteristik auf wie die wt-Linie.

Die Reparaturkinetiken zeigten auch einen Unterschied zwischen der *MGMT*-„knockout“ Linie und der mit dem MGMT-Inhibitor O⁶-Benzylguanin behandelten Kontrolle. Im Gegensatz zur vollständigen Inhibition der MGMT in Extrakten (2.8.2), war in Zellen die Reparatur von O⁶-Alkylguanin durch den MGMT-Inhibitor O⁶-Benzylguanin im Vergleich zur „knockout“ Linie nicht vollständig zu unterbinden (83 % O⁶-MeGua; 75 % O⁶-EtGua). Ähnliche Ergebnisse wurden für Zelllinien publiziert, die mit *MGMT*-cDNA der Maus transfiziert wurden (Liu *et al.*, 1996). Die MGMT-Aktivität wurde durch Inhibition mit O⁶-Benzylguanin [2,5 µM] nur zu 75 % reduziert. Da die Ausgangsaktivität der *MGMT*-Transfektanten fünfmal höher war als diejenige der hier untersuchten ES-Zellen, die O⁶-Benzylguanin-Konzentration mit 2,5 µM aber nur 10 % der im vorliegendem Experiment

verwendeten Konzentration betrug, wäre eine stärkere Reduktion zu erwarten gewesen. Die beobachtete partielle Inhibition kann also nicht allein durch eine zu geringe Dosis des Inhibitors begründet sein. Vielmehr zeigt sich, daß eine vollständige Inhibition zumindest unter Zellkulturbedingungen kaum zu erreichen ist. Bei Zellen mit intaktem *MGMT*-Gen muß die *MGMT*-Inhibition gegen die Neusynthese des Proteins geleistet werden. Diese erfolgt aufgrund der relativ langen Halbwertszeit der *MGMT*-cDNA von 10 - 12 h (Kroes & Erickson, 1995) stetig, d.h. ohne Zeitverzug durch RNA-Synthese. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit der vollständigen Inaktivierung des *MGMT*-Gens, um den Anteil der *MGMT*-vermittelter DNA-Reparatur von O⁶-Alkylguanin zu bestimmen.

3.5 Zelltyp-spezifisch induzierbares, konditionales „gene targeting“

Eine wesentliche Voraussetzung des zu etablierenden Tiermodells war die Hepatozyten-spezifische Inaktivierung des *MGMT*-Gens. Dies bedeutet die selektive Ausschaltung lediglich einer Subpopulation von Leberzellen. Im gleichen Tier waren daher sowohl DNA-Reparatur-kompetente als auch -defiziente Zellen des gleichen Zelltyps zu generieren. Erst dadurch kann ein somatischer Genverlust realistisch simuliert werden, wie er bei malignen Tumoren sehr häufig vorgefunden wird (3.1).

Basis der Rekombinations-Methodik war das *Cre-loxP*-System (Kühn et al., 1995). Das prokaryotische Enzym Cre gehört zu einer Superfamilie sequenzspezifischer Rekombinasen (Guo et al., 1997). Sie vermitteln einen Strangaustausch zwischen DNA-Fragmenten, die von Rekombinase-Erkennungssequenzen flankiert sind (1.7.2). Aufgrund seines prokaryotischen Ursprungs zeigt das *Cre loxP*-Systems bei Säugerzellen keine Rekombinations-Hintergrundaktivität. Die Sequenzspezifität der Cre-Rekombinase, gekoppelt mit ihrer hohen Effizienz bei Säugerzellen macht sie zum Standard für das konditionale „gene targeting“ in Säuger-Systemen. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen vier transgene *Cre* Maus-Linien vor. Die *lck-Cre*-Linie (Orban et al., 1992) und die *mαA-Cre*-Linie (Lakso et al., 1992) zeigten eine Zelltyp-spezifische Cre-Expression bei T-Zellen bzw. Augenlinsenzellen, nicht aber bei Hepatozyten, dem Zielzelltyp der Hepatokarzinogenese. Die *hCMV-Cre*-Linie (Lakso et al., 1992) weist eine starke Cre-Expression auf, die bereits im Embryonalstadium zu Deletionen in allen Geweben führt. Dies entspricht der Ausschaltung eines Gens in der Keimbahn und somit nicht den Anforderungen des hier zu etablierenden Tiermodells. Allein die *Mx-Cre*-Linie (Kühn et al., 1995) ermöglichte eine induzierbare Cre-Expression bei Hepatozyten. Allerdings waren nahezu alle Gewebe in unterschiedlichem Ausmaß von der Deletion betroffen. Insbesondere die Cre-Aktivität im hämatopoetischen System schloß die Verwendung dieser Linie aus, da diese Zellen eine hohe Empfindlichkeit für die zytotoxische Wirkung alkylierender Agenzien aufweisen (1.4.2). Gerade solche Nebenwirkungen der applizierten Nitrosamine waren aber in dem vorliegendem Tiermodell auszuschließen, um die Frage nach der Bedeutung spezifischer DNA-Reparaturfunktionen bei der Kanzerogenese einzig auf die DNA-Reparaturfunktion zu fokussieren. Daher war eine transgene Maus-Linie zu etablieren, die eine induzierbare, Hepatozyten-spezifische Cre-Expression ermöglicht.

Das zu Beginn der Arbeiten einzig bekannte Gen, das bei der Maus leberspezifisch in der Maus exprimiert wird und induzierbar ist, kodiert für das humane C-reaktive Protein (hCRP) (1.8.1). Das Produkt des *hCRP*-Gens ist Bestandteil des Komplementsystems. Es wird Interleukin-abhängig induziert. Experimentell kann dieser Effekt bei *hCRP*-transgenen Mäusen durch Injektion eines Antigens (bakterielles Lipopolysaccharid, LPS) erzielt werden (Murphy et al., 1995). Vor allem die Tatsache, dass die Exons des *hCRP*-Gens durch eine unabhängige cDNA ersetzt werden können und ein so modifiziertes Transgen bei der Maus weiterhin induzierbar bleibt und leberspezifisch exprimiert wird (Rüther et al., 1993), ließen diesen Promoter zur Expression der Cre-Rekombinase als ideal geeignet erscheinen.

Zur Konstruktion des Cre^{hCRP} -Vektors wurde als Basis das *hCRP*-Konstrukt 79 gewählt (Murphy et al., 1995). Dieser Vektor enthält zusätzlich zu den von Rüther et al. (1993) verwendeten Elementen des *hCRP*-Gens weitere 5' und 3' gelegene untranslatierte Regionen, welche die Basalaktivität des Transgens weiter reduzieren (2.9). Bei der Konstruktion des Cre^{hCRP} -Vektors wurden die Exons I und II durch die *Cre*-cDNA ersetzt. Auf die Implementierung eines Kernlokalisierungssignals wurde bewusst verzichtet, um einer potentiellen Basalaktivität entgegenzuwirken. Insgesamt wurden 5 Maus-Linien etabliert, die transgen für das Cre^{hCRP} -Konstrukt sind. Zwei Linien zeigten Transkription des Cre^{hCRP} -Gens in der Leber, nicht aber in Niere oder Milz (Abb. 29). An der stärker exprimierenden Linie wurden weitere Untersuchungen zur Gewebespezifität und Induzierbarkeit durchgeführt. An dem Endprodukt der Rekombinase-Reaktion, der genomischen DNA, wurden mit Hilfe einer semi-quantitativen PCR die Verhältnisse der deletierten und *loxP*-flankierten *MGMT*-Allele in verschiedenen Geweben bestimmt. Die Ergebnisse zeigten die Cre-vermittelte Deletion stets ausschließlich in der Leber und jeweils nur nach Induktion des Cre^{hCRP} -Gens mit LPS. In Übereinstimmung mit publizierten Daten (Rüther et al., 1993; Szalai et al., 1998) wurde das Transgen bei Männchen stärker induziert als bei Weibchen. Zudem konnte der Anteil deletierter Zellen in der Leber variiert werden. Eine zweite LPS-Injektion erhöhte den Anteil deletierter Zellen bei Männchen von ~28 % auf ~45 % und bei Weibchen von ~13 % auf ~43 % (Tab. 3). Die nächste Analysestufe sollte zeigen, bei welchen Zelltypen der Leber die Induktion des Cre^{hCRP} -Gens zur Deletion *loxP*-flankierter Fragmente führt. Dazu wurde die Cre^{hCRP} -Linie mit einer Reportermaus gekreuzt, die transgen für einen β -Galaktosidase-Expressionsvektor war, bei dem eine *loxP*-flankierte „Stop-Kassette“ die Expression erst nach Cre-vermittelter Deletion der Kassette erlaubt (1.8.1) (Abb. 50) (Zhang et al., 1996). Zehn (5 ♂; 5 ♀) doppelt transgenen Tieren ($Cre^{hCRP}; lacZ^+$) wurde LPS injiziert und eine Woche später die Leber entnommen, um eine X-Gal Färbung für β -Galaktosidase Aktivität durchzuführen. Entgegen den Erwartungen waren auf diese Weise in keiner Leber Signale nachzuweisen. Um die Empfindlichkeit des β -Galaktosidase-Nachweises zu erhöhen, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung für das *lacZ*-Genprodukt durchgeführt (Abb. 33). Mit Hilfe dieser Technik ließen sich vereinzelt β -Galaktosidase-positive Zellen identifizieren. Allerdings war deren Anteil wesentlich geringer, als aufgrund der parallel durchgeführten PCR-Analyse für die Deletion der „Stop-Kassette“ zu erwarten war (Abb. 34). Der empfindlichste β -Galaktosidase Nachweis ist die FACS-Gal Methode bei Einzelzellen

(MacGregor et al., 1991). Erst bei Verwendung dieser Technik bei Hepatozyten-Suspensionen konnte die β -Galaktosidase-Aktivität empfindlich nachgewiesen werden (2.13). Offenbar reichte die Expression des *lacZ*-Gens bei diesem Konstrukt nicht aus, um β -Galaktosidase für histologische Nachweismethoden in ausreichenden Mengen zu produzieren. Um dennoch Informationen über die Zelltypen mit deletiertem, bzw. „floxed“ *MGMT*-Gen und über deren räumliche Verteilung zu erhalten, wurde eine *in situ* PCR-Analyse an Leberschnitten durchgeführt (2.11.2). Diese Technik erlaubt einen sehr empfindlichen Nachweis Cre-vermittelter Deletion im Gewebe über spezifisch deletierte bzw. *loxP*-flankierte Allele. Untersucht wurden Tiere, die transgen für das *Cre*^{hCRP}-Konstrukt waren und bei denen das *MGMT*-Gen homozygot „floxed“ vorlag. Diese Tiere wiesen ohne LPS-Induktion nahezu ausschließlich den „floxed“ Genotyp auf (Abb. 36), wie es aufgrund der PCR-Analysen an Geweben zu erwarten war (2.11.1), obwohl die IS-PCR Methode eine ungleich höhere Empfindlichkeit bietet. Die Induktion des *Cre*^{hCRP}-Transgens durch LPS führt zur Deletion der *loxP*-flankierten *MGMT*-Genfragmente. Die IS-PCR Präparate zeigen hier klare Unterschiede zwischen dem „floxed“ und dem deletierten Genotyp. Da die Nachweisempfindlichkeit offenbar hoch genug ist, um die entsprechenden Allele sicher zu detektieren, und die Gewebeschnitte zudem eine „Schwarz-Weiß“-Situation darstellen (Abb. 37 und Abb 39), muß davon ausgegangen werden, daß in der überwiegenden Mehrzahl der Zellen, in denen die Cre-Rekombinase aktiviert wurde, alle Allele deletiert waren. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die FACS-Analysen an Hepatozyten-Suspensionen (2.13), bei denen der Anteil der Zellen, in denen nicht alle *loxP*-flankierten Allele (*MGMT*; *lacZ*) deletiert wurden, kleiner als 5 % war. Zudem wurde die Deletion spezifisch bei Hepatozyten nachgewiesen (Abb. 38). Das Resultat der Cre-Induktion ist also eine Leber, in der die Hepatozyten entweder den homozygot „floxed“ oder den homozygot deletierten Genotyp tragen.

Im Ergebnis konnte eine transgene Maus-Linie etabliert werden, die es erstmals ermöglicht, bei Hepatozyten *loxP*-flankierte Gene zelltypspezifisch und induzierbar zu deletieren. Dabei ist zu betonen, daß Tiere, die unter „spezifisch Pathogen-freien“ Bedingungen gehalten wurden und somit keine Infektionen aufwiesen, keine Basalaktivität des *Cre*^{hCRP} Transgens zeigten. Die *Cre*^{hCRP}-Linie erfüllt somit in idealer Weise die Anforderungen des in der vorliegenden Arbeit zu etablierenden Hepatokarzinogenese-Modells.

In der Literatur wurden eine ganze Reihe transgener *Cre*-Linien beschrieben, die zur besseren Übersicht in Tab. 5 zusammengestellt wurden. Da sich das Tiermodell des konditionalen „gene targeting“ als sehr erfolgreich erwiesen hat, ist zu erwarten, daß weitere *Cre*-Linien mit anderen Gewebe-, bzw. Zelltypspezifitäten folgen werden. Besonders interessant sind hier die induzierbaren Konstrukte. Die Induzierbarkeit ist eine Voraussetzung für neue Ansätze der *Cre-loxP*-Technologie. Durch Anordnung der *loxP*-Sequenzen als „inverted repeats“ vermittelt die Cre-Rekombinase nicht die Deletion *loxP*-flankierter Fragmente, sondern sie verändert nur die Orientierung dieser Bereiche (1.7.2). In bezug auf die Genfunktion kann dieser Orientierungswechsel genauso wie die Deletion zur Inaktivierung des Gens führen. Zusätzlich kann dieses System in Kombination mit der

induzierbarem Cre-Expression als molekularer Schalter verwendet werden. So kann für einen frei gewählten Zeitraum z.B. der „knockout“-Phänotyp und anschließend wieder der Wildtyp im gleichen Tier hergestellt werden. In Hinsicht auf die Induzierbarkeit hat sich das Östrogen-Rezeptor/Tamoxifen-System als sehr erfolgreich erwiesen. Durch die Expression der Cre-Rekombinase als Fusionsprotein mit einer modifizierten Östrogen-Rezeptor Domäne erfolgt die Rekombination nur nach Tamoxifen-Applikation. Dieser Schalter ist universell und somit unabhängig vom verwendeten Promoter und dessen Zelltyp-Spezifität (Tab. 5). Leider wirkt Tamoxifen auch als Tumorpromoter für die Hepatokarzinogenese (Dragan *et al.*, 1994) und verstärkt die Bildung prämaligener Foci nach DEN-Applikation (Yager & Shi, 1991). Ein anderer universell einsetzbarer Schalter ist das Tetracyclin-System (Gossen & Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1995). In Kombination mit zelltypspezifischen Elementen kann dieses System ebenfalls die Induktion der Cre-Expression ermöglichen (Kistner *et al.*, 1996). Ansätze, die Cre-Rekombinase mit Hilfe adenoviraler Vektoren zu exprimieren, stellen sich dagegen als schwierig dar. Zum einen werden Laboratorien mit erhöhter Sicherheitsstufe benötigt, zum anderen ist die Herstellung großer Mengen eines rekombinanten Adenovirus schwierig, die erforderlich ist, um größere Tierzahlen zu behandeln. Weiter muß eine Injektion unter Narkose in die Jugularvene erfolgen, um eine Expression vorwiegend in der Leber zu erreichen. In bezug auf Untersuchungen zur Karzinogenese ist die Verwendung von Adenoviren grundsätzlich als kritisch zu betrachten, da diese Viren im Zielgewebe Zytotoxizität und reaktive Zellproliferation verursachen.

Cre-Expressionsvektor	Expressionsgewebe oder Zelltyp	Induzierbarkeit	Referenz
<i>αCaMKII-Cre</i>	Pyramidenzellen (Cortex)	Nein	(Tsien <i>et al.</i> , 1996)
<i>αCaMKII-Cre-ER</i>	Pyramidenzellen (Cortex)	Tamoxifen	(Kellendonk <i>et al.</i> , 1999)
<i>Ad (P_{hCMV}-Cre)</i> , (Adenovirus-Infektion)	Leber, Herz, Pankreas, Darm, Lunge, Muskel u.a.	Nein	(Rohlmann <i>et al.</i> , 1996; Akagi <i>et al.</i> , 1997; Lee <i>et al.</i> , 1997)
<i>Ad (P_{HSV-tk}-Cre)</i> , (Adenovirus-Infektion)	Leber, Milz, Niere, Herz, Lunge, CNS	Nein	(Wang <i>et al.</i> , 1996)
<i>αFP-CRE-Cre</i>	Leber	Wird kurz nach der Geburt hormonell angeschaltet	(Montoliu <i>et al.</i> , 1995)
<i>Alb-hGH-Cre</i>	Hepatozyten	Nein	(Postic <i>et al.</i> , 1999)
<i>aP2-Cre</i>	Fettgewebe	Nein	(Barlow <i>et al.</i> , 1997)
<i>Ella-Cre</i>	Präimplantations-Embryo (Zygote)	Nein	(Lakso <i>et al.</i> , 1996)
<i>Eμ / SV40-Cre</i>	B-Zellen	Tamoxifen	(Schwenk <i>et al.</i> , 1998)
<i>Eμ-P_{SV40}-Cre-EBD</i>	B-Zellen	Tamoxifen	(Schwenk <i>et al.</i> , 1998)
<i>En2-Cre</i>	Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze	Nein	(Zynik <i>et al.</i> , 1998)
<i>hCMV-Cre</i>	Ubiquitär	Nein	(Lakso <i>et al.</i> , 1992)
<i>hCMV-Cre-ER</i>	Epidermis, Niere, Milz, Leber, Magen, Uterus, Lunge u.a.	Tamoxifen	(Brocard <i>et al.</i> , 1997)
<i>hβ-Aktin-Cre</i>	Ubiquitär (Blastozyste)	Nein	(Lewandoski & Martin, 1997a)
<i>IRBP-Cre</i>	Retina	Nein	(Akagi <i>et al.</i> , 1997)
<i>Ick-Cre</i>	T-Zellen	Nein	(Orban <i>et al.</i> , 1992)
<i>mαA-Cre</i>	Augenlinse, (Embryonalstadium)	Nein	(Lakso <i>et al.</i> , 1992)
<i>MMTV (LTR)-Cre</i>	Mamma, Lunge, Herz, Niere, CNS, Milz, Muskel	Nein	(Wagner <i>et al.</i> , 1997)
<i>Mx-Cre</i>	Leber, Milz, Herz, Lunge, Uterus, Thymus, Niere, Muskel, Schwanz, Hirn	IFNα/β, pl:pC	(Kühn <i>et al.</i> , 1995)
<i>Nestin-Cre</i>	Ubiquitär (Mosaik)	Nein	(Betz <i>et al.</i> , 1996)
<i>P0-Cre</i>	Schwann-Zellen	Nein	(Akagi <i>et al.</i> , 1997)
<i>POMC-Cre</i>	Hypophyse	Nein	(Akagi <i>et al.</i> , 1997)
<i>Protamin 1-Cre</i>	Männliche Keimbahn	Nein	(O’Gorman <i>et al.</i> , 1997)
<i>RIP-Cre</i>	Beta-Zellen	Nein	(Ray <i>et al.</i> , 1999)
<i>Tet-Cre</i>	Ubiquitär	Reverses Tet- System	(St-Onge <i>et al.</i> , 1996)
<i>WAP-Cre</i>	Brustdrüsenepithel	Nein	(Wagner <i>et al.</i> , 1997)
<i>Wnt 1-Cre-ER</i>	CNS (embryonal)	Tamoxifen während Gravidität	(Danielian <i>et al.</i> , 1998)
<i>Zp3-Cre</i>	Oozyten	Nein	(Lewandoski <i>et al.</i> , 1997b)

Tab. 5: **Spezifitäten publizierter Cre-Expressionsvektoren.** Bis auf die Adenovirus-Vektoren (*Ad(hCMV-Cre)* und *Ad(HSV-tk-Cre)* gelten alle Angaben für transgene Maus-Linien.

3.6 Das Hepatokarzinogenese Modell

Das Modell der Nitrosamin-induzierten Hepatokarzinogenese bei der Maus ist ein etabliertes, sehr gut untersuchtes Tumormodell. Es liegen eindeutige Dosis-Wirkungs Beziehungen für alle Stufen der Tumorigenese vor (1.6), welche die Ausarbeitung eines Karzinogen-Applikationsschemas erleichtern. Für das vorliegende Forschungsvorhaben war es besonders wichtig, aufeinanderfolgende Stufen der Krebsentstehung unterscheiden zu können. Um die Bedeutung spezifischer DNA-Reparaturfunktionen für das Transformationsrisiko beurteilen zu können, ist die Frage nach der Tumorinzidenz bei DNA-Reparatur-defizienten Tieren allein nicht ausreichend. Das Hepatokarzinogenese Modell erlaubt es, alle Phasen des Prozesses der Initiation über prä-maligne Stadien bis hin zu den Karzinomen zu identifizieren (1.6). Die spezifische Fragestellung des vorliegenden Projekts zielt auf den Anteil *MGMT*-defizienter Zellen vor allem in der frühen Postinitiationsphase der Karzinogenese. Die wesentliche Neuerung bei diesem Tumormodell besteht darin, daß durch die konditionale Inaktivierung des *MGMT*-Gens zu einem frei wählbaren Zeitpunkt Subpopulationen Reparatur-kompetenter und defizienter-Zielzellen (Hepatozyten) im gleichen Tier präsentiert werden können. Zu jedem beliebigen Zeitpunkt kann somit *in vivo* für den einen oder anderen Zelltyp selektioniert werden. Erst diese Voraussetzung ermöglicht es einen somatischen Gendefekt und seine biologischen Konsequenzen realistisch zu simulieren. Insofern bildet dieses Tiermodell ein generelles Modell zur Analyse der Tumorentstehung, das auf jedes andere Gen erweitert werden kann.

Ist das Modell der Hepatokarzinogenese kompatibel mit der speziellen Frage nach der Bedeutung der DNA-Reparatur bei der Karzinogenese? Die Beantwortung dieser Frage führt zur Betrachtung der DNA-reaktiven Verbindungen, die zur Induktion der Hepatokarzinogenese bei der Maus eingesetzt werden. Die am häufigsten verwendeten Karzinogene sind hier N, N-Dimethylnitrosamin (DMN), bzw. N, N-Diethylnitrosamin (DEN). Diese Substanzen sind nicht nur von experimentellem Interesse, sondern finden sich auch in der Umgebung des Menschen. Die Exposition des Menschen gegenüber Kanzerogenen N-Nitroso-Verbindungen erfolgt vor allem durch die Aufnahme Nitrat- bzw. Nitrit-haltiger Speisen und Getränke sowie durch Tabakrauch (Hotckiss, 1989; Hecht & Hoffmann, 1989). Bedeutende Mengen dieser Verbindungen sind endogenen Ursprungs (Bartsch & Montesano, 1984; Spiegelhalder & Preussmann, 1984; Marletta, 1988; Leaf *et al.*, 1989; Montesano *et al.*, 1990; Pignatelli *et al.*, 1993). Die Abschätzung der Exposition gegenüber DMN und ähnlichen methylierenden Agenzien endogenen Ursprungs errechnet sich aufgrund der Alkylierungsrate menschlicher DNA zu einer Menge von mehreren hundert Mikrogramm pro Tag, einer Belastung, die ein signifikantes Krebsrisiko darstellt (Kyrtopoulos, 1998). N, N-Dialkylnitrosamine sind äußerst potente Mutagene und Karzinogene, die bei der Maus bereits nach einer einmaligen Dosis zur Entstehung vor allem von Lebertumoren führen. Ihre Wirkung entfalten diese N-Nitroso-Verbindungen erst nach Metabolisierung vor allem durch Cytochrom P450. Das dabei entstehende hochreaktive Diazonium Ion alkyliert dann nukleophile O- und N-Atome zellulärer Makromoleküle wie der DNA (Yoo *et al.*, 1990). In der DNA werden nach DMN-Exposition etwa

12 Alkylierungsprodukte gebildet, darunter 7-Methylguanin (~70 % aller Alkylierungsprodukte), O⁶-Methylguanin (~7 %), 3-Methyladenin (~3 %), O⁴-Methylthymine (< 0,1 %) sowie Methylphosphotriester (~12 %) (Beranek, 1990). Wenn nicht zuvor durch DNA-Reparatur eliminiert, sind O-methylierte Basen infolge Basenfehlpaarung bei der DNA-Replikation mutagen (1.4). 7-Methylguanin und 3-Methyladenin können nach enzymatischer oder spontaner Depurinierung als Apurinstellen mutagen wirken (1.5) (Takeshita & Eisenberg, 1994). Das zelluläre Mutations- und Transformationsrisiko nach Einwirkung von DMN wird somit bestimmt durch die Natur der entstandenen DNA-Alkylierungsprodukte und die Effizienz bzw. die Ineffizienz der entsprechenden DNA-Reparaturmechanismen.

Um die konditionale Inaktivierung des *MGMT*-Gens mit dem Hepatokarzinogenese Modell abzustimmen, wurde ein spezielles Protokoll entwickelt. Die DMN-induzierte Hepatokarzinogenese bei der Maus beruht auf der Applikation des Karzinogens im Alter von 14 - 16 Tagen, da zu diesem Zeitpunkt ein Proliferationschub der Hepatozyten zu beobachten ist (Itze et al., 1976) (1.6). Die Proliferation der Hepatozyten verläuft in der jungen Leber phasenförmig mit einer Phasendauer von 5 Tagen, mit alterungsabhängig abnehmender Amplitude (Itze et al., 1976). Um mit veröffentlichten Studien (Vesselinovitich & Mihailovich, 1983; Vesselinovitich et al., 1985; Hacker et al., 1991; Iwakuma et al., 1997) vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden die Nitrosamine in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zu diesem Zeitpunkt appliziert.

Die konditionale Inaktivierung des *MGMT*-Gens erfordert, daß die Cre-Rekombinase induziert wird und den Strangaustausch vermittelt, und daß in den betroffenen Zellen der vorhandene Pool des aktiven MGMT-Proteins depletiert wird. Zur Induktion des *Cre^{hCRP}*-Gens wurde eine Dosis gewählt, die bei etwa 30 % der Hepatozyten zur Deletion des *MGMT*-Gens führte (2.11.1). Für die Deletion wurde ein Zeitraum von 4 Tagen als ausreichend angesehen. Diese Zeitspanne setzt sich zusammen aus der schnellen Induktion des *Cre^{hCRP}*-Gens, die zur maximalen Proteinkonzentration innerhalb von 18 h führt, der Rekombinase-Reaktion, die in 15 h abgeschlossen ist, sowie der schnellen Degradation der Rekombinase innerhalb von 48 h (Ciliberto et al., 1987) (2.13). Es sollte daher sichergestellt sein, daß die Rekombination abgeschlossen war, bevor der zelluläre MGMT-Pool durch eine einmalige Injektion des spezifischen MGMT-Inhibitors O⁶-Benzylguanin vollständig depletiert wurde. Dies war notwendig, um zu gewährleisten, daß Hepatozyten mit dem „knockout“-Genotyp kein aktives MGMT-Protein mehr beherbergten. Der „Turnover“ des MGMT-Proteins allein ist aufgrund der langen Halbwertszeit der *MGMT*-cDNA (1.4.2) hierfür nicht ausreichend. Die MGMT-Aktivitätsmessungen der Leberextrakte O⁶-Benzylguanin behandelte Tiere zeigen die erfolgreiche Reduktion des MGMT-Proteins innerhalb von 4 h auf weniger als 1 % der Ausgangsaktivität (Abb. 40). Die Neusyntheserate wurde experimentell bestimmt. Sie führte in Übereinstimmung mit publizierten Daten (Dolan et al., 1991) nach 48 h zu einem „rebound“-Wert von 130 % der MGMT-Ausgangsaktivität. Dieser Zeitpunkt wurde für die Applikation der Nitrosamine gewählt, da er den größten Unterschied in der MGMT-Aktivität der Zielzellen aufweist.

Ist die initiale Größe der *MGMT*-defizienten Subpopulation mit ~30 % aller Hepatozyten groß genug, um einen deutlichen Effekt auf die Karzinogenese erwarten zu lassen? Zu groß ist dieser Anteil nicht, da Mäuse, die zu 100 % *MGMT*-defizient waren und DMN-Dosen von 1 mg / kg (σ), bzw. 5 mg / kg (φ) DMN für zumindest 9 Monate überlebten (Iwakuma et al., 1997). Größer sollte der Anteil der *MGMT*-defizienten Subpopulation jedoch nicht sein, denn es soll eine Situation simuliert werden, in der nur eine Subpopulation der Zielzellen Reparatur-negativ ist (1.4.2). Für die eigentliche Fragestellung, wie hoch die Beteiligung *MGMT*-defizienter bzw. kompetenter Zellen an der Bildung prämaligener Foci oder maligner Klone ist, wird der Nachweis mit Hilfe der *in situ* PCR auf Einzelzell-Niveau geführt (2.11.2).

Zur Dosis-, Geschlechts- und Stammabhängigkeit der Nitrosamin-induzierten Hepatokarzinogenese der Maus sind zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden (Vesselinovitch, 1969; Vesselinovitch & Mihailovich, 1983; Vesselinovitch et al., 1984; Vesselinovitch et al., 1985; Wiseman et al., 1986; Vesselinovitch, 1987; Buchmann et al., 1992; Lee et al., 1991; Dass et al., 1998). Ihre Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden: Jede DMN- oder DEN-Dosis im Bereich von $\geq 0,5$ mg/kg und ≤ 30 mg/kg (toxisch) führt zu allen Stufen der Hepatokarzinogenese, allerdings verkürzt sich entsprechend dem Druckrey-Gesetz [$d * t^n = \text{const.}$ (d, Dosis; t, Latenzzeit; const., karzinogene Wirkung)] die Latenzzeit mit steigender Dosis. Männliche Tiere weisen eine höhere Tumor-Suszeptibilität auf und die Stämme Balb/c und C57BL/6 sind im Vergleich zu allen anderen untersuchten Maus-Stämmen relativ resistent gegenüber der Nitrosamin-induzierten Leberkarzinogenese sind.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere waren eine Kombination der Stämme 129/Ola (ES-Zellen), Balb/c (Blastozysten) und C57BL/6 (*Cre*^{hCRP}), für die keine Daten zur chemisch-induzierten Hepatokarzinogenese vorliegen. Analoge Untersuchungen an Keimbahn-*MGMT*-„knockout“ Mäusen einer Kombination aus den Stämmen 129/SV und C57BL/6, ergaben bei einer DMN-Dosis von 1 $\mu\text{g/g}$ bei Männchen keine signifikant unterschiedliche Tumorzinzidenz im Vergleich zum Wildtyp, wohl aber bei Weibchen die eine Dosis von 5 $\mu\text{g/g}$ erhalten hatten (Iwakuma et al., 1997). Möglicherweise war bei den Männchen die Dosis zu hoch und führte zur Depletion des *MGMT*-Proteins beim Wildtyp. Untersuchungen zur *MGMT*-Reparaturkapazität von Hepatozyten bei männlichen C57BL/6-Mäusen haben gezeigt, daß bereits bei einer DMN-Dosis von 0,5 $\mu\text{g/g}$ nur noch 70 % der O⁶-Methylguanine repariert werden (Maru et al., 1982). Um den Unterschied zwischen wt- und *MGMT*-„knockout“-Mäusen möglichst groß und gleichzeitig die Latenzzeit möglichst kurz zu halten, wurde daher eine DMN-Dosis von 0,5 $\mu\text{g/g}$ gewählt. Kontrolltiere erhielten anstelle des Kanzerogens PBS. Mit Hilfe dieses Ansatzes kann die Bedeutung der endogenen DNA-Alkylierung für die Hepatokarzinogenese abgeschätzt werden. Pilot-Untersuchungen an Lebern einzelner Tiere zeigten nach Applikation dieser DMN-Dosis bereits 19 Wochen nach Kanzerogen-Exposition zahlreiche prämaligene Foci mit verändertem Enzymmuster (2.14).

Unter Berücksichtigung dieser Daten wurde ein Protokoll erstellt (Abb. 44), demzufolge zum Zeitpunkt der Karzinogen-Applikation eine Subpopulation (~30 %) der Hepatozyten für die MGMT-abhängige DNA-Reparatur defizient war. Um die Validität dieses Applikationsschemas zu überprüfen, wurden Untersuchungen an Hepatozyten-Suspensionen durchgeführt (2.13). Für diese Analysen wurden Tiere verwendet, bei denen das *MGMT*-Gen homozygot „floxed“ vorlag und die zudem transgen für das *Cre*^{hCRP}-Gen und den β -Galaktosidase-Reporter waren (1.8.1). Bei diesen Tieren wurde das genannte Applikationsprotokoll angewandt, sie erhielten aus experimentellen Gründen jedoch statt DMN oder DEN EtNU, da dieses N-Nitrosamid eine schnellere Reaktionskinetik aufweist (Goth & Rajewsky, 1974a). Mit Hilfe des Reporters wurden *MGMT*-„floxed“ von *MGMT*-deletierten Hepatozyten durch Fluoreszenz-aktivierte elektronische Zellsortierung (FACS) getrennt (Abb. 41). Die an diesen Zell-Subpopulationen durchgeführten Analysen des O⁶-Alkylguanin-Gehalts der DNA zeigte erwartungsgemäß, daß dieses DNA-Alkylierungsprodukt von den Reparatur-kompetenten Zellen eliminiert werden konnte, während die *MGMT*-deletierten Hepatozyten auch 72 h nach Applikation noch bis zu 10-fach höhere Werte aufwiesen (Abb. 42). Entsprechend dem gewähltem Applikationsprotokoll (Abb. 44) wurden insgesamt 88 Tiere mit DMN, DEN oder PBS behandelt (Tab.), so daß in jeder Versuchsgruppe eine ausreichende Anzahl von Tieren zur Analyse zur Verfügung steht.

Betrachtet man die umfangreichen Vorarbeiten und den technischen Aufwand zur konditionalen, zelltypspezifischen Inaktivierung eines DNA-Reparaturgens, so stellt sich die Frage, ob diese Bemühungen gerechtfertigt sind, um ein Tiermodell zu entwickeln, an dem die Bedeutung spezifischer DNA-Reparaturfunktionen kritisch untersucht werden kann. Ein wesentlich einfacherer Ansatz wäre gewesen, das MGMT-Protein durch systemische Applikation von O⁶-Benzylguanin zu inhibieren und bei diesen Tieren die Hepatokarzinogenese durch DMN oder DEN zu induzieren (Lijinsky *et al.*, 1994). Dieser Ansatz hatte keine Unterschiede der Tumorraten bei MGMT-kompetenten und -inkompetenten Tieren gezeigt. Möglicherweise wurde das MGMT-Protein nicht vollständig oder nicht lange genug inhibiert, oder aber die MGMT-abhängige DNA-Reparatur hat in der Tat keinen signifikanten Einfluß auf die Tumorigenese. Der Inhibitor-Ansatz kann in keinem der beiden Fälle eine definitive Antwort geben, denn es kann nicht sichergestellt werden, daß bei allen Hepatozyten die MGMT-Funktion ausgeschaltet ist. Ebenso haben Untersuchungen an *MGMT*-„knockout“ Tieren, bei denen das *MGMT*-Gen in der Keimbahn und somit in allen somatischen Zellen inaktiviert wurde, unklare Ergebnisse geliefert (Iwakuma *et al.*, 1997). Ein signifikanter Unterschied der Tumorraten nach DMN-Behandlung konnte nur für weibliche Mäuse nachgewiesen werden. Möglicherweise war die DMN-Dosis gemessen an der höheren Suszeptibilität der Männchen zu hoch, so daß potentielle Unterschiede zwischen *MGMT*^{-/-} und den wt-Tieren nivelliert wurden. Zudem gibt die Analyse nur der Tumorraten keinen Aufschluß über die mögliche Bedeutung MGMT-vermittelter DNA-Reparatur bei der Tumorentstehung, die sich in der Zahl prä-maligner Foci pro Leber ausdrückt.

In bezug auf die Tumorigenese beim Menschen haben diese Untersuchungen vermutlich nur eine geringe Bedeutung, da bislang kein hereditärer *MGMT*-Gendefekt bekannt geworden ist. Bei der Analyse menschlicher Hirn-Tumoren hat sich gezeigt, daß an den Tumor angrenzendes Normalgewebe in 55 % - 75 % der Fälle (altersabhängig) keine *MGMT*-Aktivität aufwies (Silber *et al.*, 1996; Herfarth *et al.*, 1999). Aufgrund der dynamischen *MGMT*-Regulation (1.4.2), z.B. durch 5-Cytosin-Methylierung (Costello *et al.*, 1994b), könnten daher in allen Geweben Zellen vorhanden sein, die keine *MGMT*-Expression und deshalb ein erhöhtes Mutations- und Transformationsrisiko aufweisen. *In vitro*-Analysen der *MGMT*-Aktivität von aus humanen Tumoren abgeleiteten Zelllinien ergaben nur in etwa 20 % der Fälle eine vollständige *MGMT*-Negativität (Citron *et al.*, 1991). Die beobachtete große Varianz der *MGMT*-Aktivitäten über bis zu zwei Größenordnungen kann in der inhärenten genetischen Instabilität und großen phänotypischen Plastizität maligner Zellen, verstärkt noch unter Zellkulturbedingungen begründet sein. Hierzu passen auch Befunde, denen zufolge Reparatur-negative Primärzellen im Verlauf der Kultivierung *in vitro* Reparaturkompetent werden können (Huh & Rajewsky, 1988). Um klare Aussagen zur Bedeutung der *MGMT* für das zelluläre Transformationsrisiko nach Exposition gegenüber alkylierenden N-Nitroso-Kanzerogenen zu erhalten, scheint der zelltypspezifische konditionale Ansatz unumgänglich zu sein.

3.7 Ausblick

Im Anschluß an die vorliegenden Untersuchungen werden die Analysen am Modell der Hepatokarzinogenese *in vivo* fortgesetzt. In den Lebern der induzierten Tiere werden zu früheren und späteren Zeitpunkten nach der Kanzerogen-Exposition die Frequenzen prämaligner und maligner Foci bestimmt. Die Anteile *MGMT*-negativer bzw. positiver-Foci im Vergleich zu den entsprechenden Frequenzen für die Hepatozyten des normalen Lebergewebes werden Aufschluß darüber geben, ob prämaligne Foci präferentiell aus *MGMT*-negativen Hepatozyten entstehen und ob *MGMT*-negative und -positive Foci einer unterschiedlichen Selektion in Richtung der Expression maligner Phänotypen unterliegen.

Eine weitere Fragestellung, die mit diesem Tiermodell beantwortet werden könnte, ist: Warum finden sich keine *MGMT*-Defektmutationen beim Menschen? Sterben *MGMT*-negative Zellen ab, weil die DNA-Replikation durch O⁶-Alkylguanine verlangsamt oder blockiert wird? Hinweise hierzu kommen aus neueren Arbeiten, die eine Verbindung zwischen in der DNA persistierenden O⁶-Methylguaninen und der Zellzyklusarretierung bzw. Apoptose herstellen (Duckett *et al.*, 1999). Die O⁶-MeG:C und O⁶-MeG:T Basenpaare sind ein Substrat der MMR (1.1). Bei MMR-kompetenten Zellen führt dies in Abhängigkeit vom Niveau des DNA-Schadens entweder zu einer G₂-M Zellzyklusarretierung oder zu Apoptose (Tominaga *et al.*, 1997). *MGMT*-defekte Zellen sollten entsprechend diesen Ergebnissen nach exogener oder endogener Alkylierung vermehrt absterben. Sind sie zusätzlich auch MMR-negativ, so wird das MMR-abhängige Schadenssignal nicht geliefert und die Zellen erweisen sich als tolerant gegenüber O⁶-Methylguaninen in ihrer DNA, wie es für „knockout“

Mäuse (*MGMT*^{-/-}; *MLH 1*^{-/-}) nachgewiesen werden konnte (Kawate et al., 1998). Dies legt die Vermutung nahe, daß für *MGMT*-negative Zellen ein Selektionsdruck dahingehend besteht, zusätzlich auch MMR-Funktionen zu verlieren. Ob dieser Selektionsdruck im Organismus bereits im Falle der geringgradigen endogenen Alkylierung besteht, oder erst bei höheren DNA-Schadensniveaus aufgrund exogener Alkylierung greift, kann an dem vorliegenden Tiermodell untersucht werden. Dazu werden -analog zu den Untersuchungen zur DNA-Reparaturkapazität an Hepatozytensuspensionen (2.13)- Analysen durchzuführen sein, bei denen die MMR-Aktivität gemessen wird und mit dem *MGMT*-Genotyp der Zellen korreliert wird.

Auch in bezug auf die Krebs-Chemotherapie hat die zelluläre Reparaturkapazität für DNA-Alkylierungsprodukte erhebliche Bedeutung, da sie maßgeblich die Therapieempfindlichkeit bzw. -resistenz von Tumoren und kritischen Normalgeweben bestimmt. Von besonderem Interesse ist dabei, welche DNA-Reparatur „Pathways“ bei Anwendung unterschiedlicher DNA-reaktiver Chemotherapeutika beteiligt sind, denn durch gezielten Einsatz spezifischer DNA-Reparatur-Inhibitoren könnte die Effizienz der Therapie erhöht werden. Neben der *MGMT*-vermittelten Reparatur stellt auch die NER einen relevanten Reparatur-Mechanismus von DNA-Alkylierungsprodukten dar. Aufschluß über den relativen Anteil der NER an der Reparatur unterschiedlicher DNA-Alkylierungsprodukte können doppelt-negative (*MGMT*^{del/del}; *XPA*^{-/-}) Tiere und bei diesen induzierte Tumoren geben. Entsprechende Züchtungen befinden sich im Gange.

Die Konstruktion des Rekombinationsvektors für das AP-Endonuklease Gen (*APE*) sollte die Entkopplung der Endonuklease- von der Redox-Funktion ermöglichen. Somit könnte erstmals die Bedeutung dieser Multifunktionalität des Enzyms bereits bei homozygot *APE*-negativen ES-Zellen untersucht werden. Die entsprechenden ES-Zell-Klone werden zur Zeit kloniert. Die Etablierung konditional inaktivierbarer Maus-Linien ist vorgesehen.

Die *Cre*^{hCRP}-Mauslinie kann mit jedem beliebigen *loxP*-flankierten Gen kombiniert werden. Sie erweitert die Palette der bekannten *Cre*-Linien, da sie erstmals die induzierbare Gen-Inaktivierung zu einem beliebigen Zeitpunkt ausschließlich in Hepatozyten ermöglicht.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

4.1 Bakterien- und Phagenkulturen

4.1.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

E. coli Bakterien wurden bei 37°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden auf einem Vertikalschüttler (250 Upm) angezüchtet. Die Lagerung erfolgte auf Agarplatten bei 4°C oder als Flüssigkultur in 25 % Glycerin über mehrere Monate bei -70°C.

4.1.2 Transformation von *E. coli*

Bakterien wurden ausschließlich chemisch transformiert (Chung *et al.*, 1989).

4.1.3 Handhabung der Phagen-Bibliothek

Alle Arbeitsschritte zur Ausplattierung der Phagen wurden nach Angaben des Herstellers (Stratagene) durchgeführt.

4.2 Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren

4.2.1 Präparation von Phagen-DNA

Zur Isolation von ca. 100 µg Phagen-DNA wurde die „Plate-Lysate“ Methode angewendet. Die Lysate wurden mit Hilfe des „Lambda Maxi-Kits“ nach Angaben des Herstellers (Qiagen) aufgearbeitet.

4.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation kleiner Mengen (< 5 µg) von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse der *E. coli* Zellen aus 1,5 ml Kulturen (Birnboim & Doly, 1979). Große Mengen von Plasmid-DNA (> 100 µg bzw. > 500 µg) wurden mit Hilfe des „Plasmid Midi- oder Maxi-Kits“ nach Angaben des Herstellers (Qiagen) isoliert.

4.2.3 Präparation von hochmolekularer DNA

DNA-Präparationen aus ES-Zellklonen zur PCR Analyse wurden in Mikrotiterplatten mit kleinen Modifikationen nach vorgegebenem Protokoll (Ramirez-Solis *et al.*, 1992) durchgeführt. Konfluente ES-Zellen wurden zweimal mit PBS⁻ gewaschen und pro Well wurden 50 µl Mikrotiter-Extraktionslösung zugegeben. Die Platten wurden über Nacht bei 55°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten auf RT abgekühlt und pro Well 100 µl einer Präzipitationslösung (1,5 µl 5 M NaCl in 98,5 µl 96-prozentigem Ethanol [-20°C]) zugegeben. Die Präzipitation der DNA nach ~ 20 min bei RT wurde mit Hilfe eines Zellkulturmikroskops kontrolliert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA dreimal mit 70-prozentigem Ethanol gewaschen, wobei der Überstand jeweils verworfen wurde. Anschließend wurden die Platten zur Lufttrocknung für ~ 30 min schräg, mit der Öffnung nach unten, aufgestellt. Die getrocknete DNA wurde in 40 µl TE-Puffer solange auf- und abpipettiert, bis eine homogene Lösung abzunehmen war. Von dieser Lösung wurden jeweils 0,5 µl pro PCR-Ansatz, bzw. 20 µl pro Southern-Blot-Analyse verwendet.

Alle anderen DNA-Präparationen aus Kulturzellen, Geweben und Mausschwanz-Proben wurden mit kleinen Modifikationen nach der sogenannten „Hochsalz“-Methode (Miller *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1988) durchgeführt. Kulturzellen wurden zweimal mit PBS⁻ gewaschen. Die Zellen wurden dann direkt mit Hochsalz-Extraktionspuffer (3 ml / 6 cm Ø; 6 ml / 10 cm Ø) abgelöst und in 15 ml Plastikröhrchen überführt. Mausschwanz-Proben in einer Länge von höchstens 1 cm wurden in 500 µl Hochsalz-Extraktionspuffer aufgenommen. Gewebe wurden in Stücken von ca. 100 mg in 200 µl Hochsalz-Extraktionspuffer aufgenommen und mit Hilfe eines Plastikmörser in 1,5 ml-Plastikgefäßen homogenisiert. Dem Ansatz wurden anschließend weitere 300 µl Puffer zugegeben. Für alle Präparationen folgte eine Inkubation bei 55°C über Nacht unter ständigem Schütteln. Die Ansätze wurden auf RT abgekühlt und nach Zugabe von RNase A (150 µg/ml) 30 min lang bei 37°C inkubiert. Die Deproteinierung erfolgte durch Zugabe eines halben Volumens einer 4 M NaCl-Lösung und Mischen der Lösungen für 15 sek (Vortex). Die Proteine wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 1250 x g sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Zum Überstand wurde 1 Vol Isopropanol gegeben und das Gefäß solange über Kopf geschüttelt bis die DNA präzipitierte. Die präzipitierte DNA wurde dann mit Hilfe einer „gelben Spitze“ in ein neues Plastikgefäß überführt, in dem bereits TE-Puffer (1 / 10 Vol bezogen auf das Extraktionspuffervolumen) vorgelegt war. Die DNA wurde durch Inkubation bei 55°C für 10 min und anschließendes Pipettieren (10 x) mit einer Sterilfilterspitze gelöst. Das Verhältnis der optischen Dichten von 260 nm zu 280 nm als Maß der Reinheit der DNA war konstant ~1,8.

4.2.4 Präparation von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus frisch präpariertem oder bei -70°C gelagertem Gewebe wurde mit Hilfe des „Tri-Fast Kits“ nach den Angaben des Herstellers (PeqLab) isoliert.

4.2.5 Reinigung der DNA durch Ausfällung

Die Fällung der DNA aus einer wässrigen Phase erfolgte durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2 Vol EtOH (96 %). Nach 10-minütiger Inkubation bei -70°C wurde die ausgefällte DNA bei 4°C abzentrifugiert (12.000 x g; 20 min). Das resultierende DNA-Pellet wurde mit EtOH (70 %) gewaschen und dann in H₂O gelöst.

4.2.6 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit der präparierten Nukleinsäuren wurde nach (Sambrook *et al.*, 1989) photometrisch bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Für eine saubere DNA-Präparation war ein E_{260} / E_{280} Quotient von 1,8 - 2,0 gefordert, für RNA mußte dieser Quotient 2,1 betragen.

4.3 Klonierungen

Sämtliche zu klonierenden Fragmente wurden mit Restriktionsenzymen verdaut, über Gelektrophorese (4.5.2) getrennt und aus dem Gel ausgeschnitten. DNA wurde mit Hilfe des „QIAEX II-Kits“ nach Angaben des Herstellers (Qiagen) isoliert. Jeweils 20 – 50 ng Insert-DNA wurden mit Vektor-DNA im molaren Verhältnis von 1 (Vektor) / 3 (Insert) für 60 min bei RT mit 2 U T4-DNA Ligase inkubiert. Der Ansatz wurde für 10 min bei 75°C inaktiviert und transformiert.

4.3.1 Klonierung des *MGMT*-Rekombinationsvektors

Das 4,5 kB Eco RI Fragment des Phagen 8.12 (Abb. 12) wurde mit Bam HI und Xho I verdaut und das sich ergebende 0,6 kB Bam HI-Xho I Fragment in pBSSK II+ (Bam HI-, Xho I-geöffnet) kloniert, um das Plasmid p0,6 B/Xh-SK zu erhalten. Aus dem Plasmid pGEM 30 (Abb. 52) wurde die *loxP*-Sequenz als Xho I, Sal I-Fragment in das Plasmid p0,6 B/Xh-SK (Xho I-geöffnet) kloniert (entgegengesetzte Orientierungen der *loxP*-Sequenz und des Exons), um das Plasmid p0,6-*loxP*-SK zu erhalten. Aus p0,6-*loxP*-SK wurde ein 0,7 kB Bam HI-Sal I (partiell) Fragment gewonnen. Dieses Fragment wurde gleichzeitig mit dem 1,2 kB-Xho I(partiell)-Bam HI-Fragment aus dem Plasmid 4,5 Eco RI-SK (Abb. 13) in das Plasmid pBSSK II+ (Bam HI geöffnet) kloniert, um das Plasmid p1,9-SK zu erhalten. Zur Herstellung des Plasmids p1,9-tk-SK, wurde aus dem Plasmid pTV-O (Abb. 49) ein 1,8 kB Sal I-Hind III Fragment isoliert, partiell aufgefüllt (C,T) und mit dem partiell Bam HI verdauten Plasmid p1,9-SK ligiert, das zuvor partiell aufgefüllt (G,A) worden war. Das Ligat (6,6 kB) wurde dann nach einer „Blunt“-Reaktion zirkularisiert. Das Plasmid p3,3 Bam HI-SK wurde kloniert, indem aus dem Phagen 8.12 ein 3,3 kB Bam HI-Fragment isoliert und in das Plasmid pBSSK II+ (Bam HI-geöffnet) eingebracht wurde. Um das Plasmid pL2neo-2,8 zu

erhalten, wurde das Plasmid pL2neo (Abb. 51) partiell mit Sal I verdaut, zusammen mit dem Eco RI-Fragment aus dem Plasmid p3,3-SK einer „Blunt“-Reaktion unterzogen und ligiert. In einer Zwischenklonierung zum Plasmid 4,8-SK wurde ein 4,8 kB Eco RV-Eco RI-Fragment aus dem Phagen 8.12 in das Plasmid pBSSKII+ kloniert, das zuvor mit Xba I verdaut, aufgefüllt und dann mit Eco RI verdaut worden war. Dies war notwendig, um den Rekombinationsvektor mit Not I linearisieren zu können. Deshalb wurde ein 4,8 kB Not I-Xba I-Fragment aus dem Plasmid 4,8 SK mit Hilfe eines Eco RI-Xba I-Adapters in das Plasmid pBSSKII+ (Not I, Xba I) kloniert, um das Plasmid 4,8-Ad-SK zu erhalten. Bei der letzten Klonierung wurden gleichzeitig folgende drei Fragmente kloniert:

- 6,6 kB (Not I, Bam HI)-Fragment des Plasmids 1,9-tk-SK
- 4,2 kB (Xba I, Bam HI)-Fragment aus dem Plasmid pL2neo-2,8
- 4,8 kB (Not I, Xba I)-Fragment aus dem Plasmid 4,8 Ad-SK

Die erfolgreiche Klonierung des Vektors aus diesen drei Bestandteilen wurde mit Hilfe einer Restriktionsanalyse überprüft (Abb. 48).

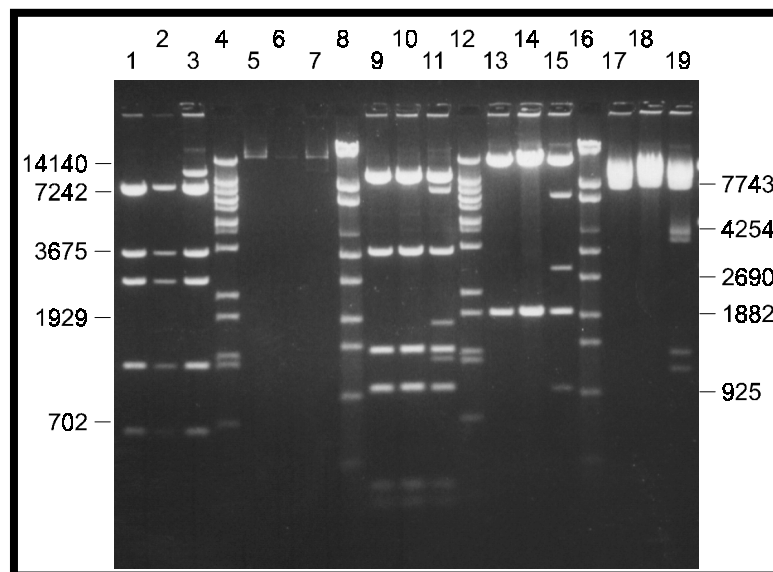


Abb. 48: **Restriktionskartierung des *MGMT*-Rekombinationsvektors.** Drei potentielle Klone für den Rekombinationsvektor wurden mit Hilfe verschiedener Restriktionen überprüft. Restriktionen: Xho I (1, 2, 3); Not I (5, 6, 7); Eco RI (9, 10, 11); Xba I (13, 14, 15); Hind III (17, 18, 19). Die Spurbelegung: Klon 7 (1,5, 9, 13, 17); Klon 17 (2, 6, 10, 14, 18); Klon 27 (3, 7, 11, 15, 19); Marker 15 (2, 12); Marker 16 (8, 16). An den Seitenrändern sind die Fragmentgrößen in Basenpaaren angegeben.

Restriktase	Sollgröße [kB]	Klon 7	Klon 17	Klon 27
Xho I	7,8 / 3,4 / 2,6 / 1,2 / 0,6	7,8 / 3,4 / 2,6 / 1,2 / 0,6	7,8 / 3,4 / 2,6 / 1,2 / 0,6	~11,0 / 7,8 / 3,4 / 2,6 / 1,2 / 0,6
Not I	15,5	15,5	15,5	15,5 / ~11,0
Eco RI	9,5 / 3,5 / 1,5 / 1,0 / 0,25 / 0,1	9,5 / 3,5 / 1,5 / 1,0 / 0,25 / 0,1	9,5 / 3,5 / 1,5 / 1,0 / 0,25 / 0,1	9,5 / 7,2 / 3,5 / 1,8 / 1,5 / 1,3 / 1,0 / 0,25 / 0,1
Xba I	13,6 / 1,9	13,6 / 1,9	13,6 / 1,9	13,6 / 6,3 / 3,0 / 1,9 / 1,0
Hind III	8,0 / 7,5	8,0 / 7,5	8,0 / 7,5	11,3 / 4,3 / 4,2 / 4,0 / 1,4 / 1,2

Tab. 6: Restriktionsfragmente des *MGMT*-Rekombinationsvektors

Die Klone 7 und 17 weisen die korrekten Bandenmuster auf. Der Klon 17 wurde in allen folgenden Experimenten als *MGMT*-Rekombinationsvektor verwendet.

4.3.2 Klonierung des zelltypspezifisch induzierbaren *Cre*-Expressionsvektors

Ausgehend vom Konstrukt 79 (Abb. 55) wurde in pBlueskript II ein 5 kB Bam HI-Cla I-Fragment (Pos. 10881 - 4900) subkloniert, das u.a. das *hCRP*-Gen enthielt. Durch einen Bgl II-Verdau (Pos. 1753 + 3978) wurden die 5' UTR (9 Bp nach Transkriptionsstart), die Exons 1 + 2, sowie die 3'-UTR (bis 32 Bp 5' der PolyA-Sequenz) deletiert. Die Fragment-Enden wurden mit Hilfe des Klenow Enzyms aufgefüllt und Pst I - Linker ligiert. In dieses Plasmid wurde zur Herstellung des Plasmids CSC ein 1,5 kB großes Pst I - Fragment aus dem Plasmid pIC-Cre (Torres & Kühn, 1997b) ligiert, das die komplette cDNA des *Cre* Gens und ein SV 40 Polyadenylierungssignal enthielt. Um in den Vektor die 3'-UTR und das Pseudogen des *hCRP*-Gens einzufügen, wurde das Plasmid CSC partiell mit Sal I verdaut (schneidet 5' des verbliebenen 3'-UTR), die Enden mit Hilfe des Klenow Enzyms aufgefüllt und anschließend partiell mit Xho I verdaut, so daß ein 6,2 kB großes Fragment isoliert werden konnte. In dieses 6,2 kB-Fragment wurde ein 5,2 kB-Fragment aus dem Konstrukt 79 (Abb. 55) einkloniert, das zuvor mit Nsi I (Pos. 2936) verdaut worden war. Nach einer „Blunt“-Reaktion wurde anschließend partiell mit Xho I (Pos. 7971) verdaut. Dieses Plasmid, *Cre*^{hCRP} (Abb. 27) stellte den fertigen *Cre*-Expressionsvektor dar. Die einzelnen Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierungen (5.2.8) bestätigt.

4.3.3 Klonierung des *Ape*-Rekombinationsvektors

Zunächst wurde das Plasmid 17-SK (Abb. 58) mit Hpa I und Xba I (partiell) verdaut und ein 3,7 kB-Fragment isoliert, das die Exons 1 - 3 enthielt. Dieses Fragment wurde in einen Xba I, Sma I-restringierten pBluescript Vektor kloniert, um das Plasmid 3,7 SK zu erhalten. Um eine *loxP*-Sequenz 3' vom dritten Exon zu inserieren, wurde das Plasmid 3,7 SK mit Eco RI und

Sal I geöffnet und die *loxP*-Sequenz aus dem Plasmid pGEM 30 (Abb. 52) als Eco RI, Sal I-Fragment einkloniert. Das erhaltene Plasmid wurde 3,7 *loxP*-SK genannt. Das Exon 4 wurde anschließend 3' von der *loxP*-Sequenz einkloniert. Dazu wurde das Plasmid 3,7 *loxP*-SK mit Sal I geöffnet, einer „Blunt“-Reaktion unterworfen und ein 0,5 kB-Fragment (Eco RI, Sal I ⇒ „Blunt“) aus dem Plasmid 15-SK einkloniert. Das resultierende Plasmid wurde als 3,7 *loxP* Ex4-SK bezeichnet. In einem zweiten Klonierungsweg wurden die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche des *Ape*-Gens in den Vektor I Neo I-tk (Abb. 57) eingebracht, der eine „floxed“ Neo-Kassette und eine *HSV-tk* Kassette enthält. Dazu wurde der direkt an das Exon 4 angrenzende 3'-Bereich als ein 1,8 kB Fragment (Eco RI-verdaut ⇒ „Blunt“) aus dem Plasmid 15-SK (Abb. 56) isoliert. Dieses Fragment wurde in den I Neo L-tk-Vektor (Sal I-verdaut ⇒ „Blunt“) kloniert, um das Plasmid tk 1,8 floxNeo zu erhalten. In das Xba I-geöffnete Plasmid wurde ein 2,7 kB Xba I-Fragment aus dem Plasmid 39-SK (Abb. 59) kloniert, das den 5'-Bereich des *Ape*-Gens enthielt. Das erhaltene Plasmid wurde tk 10 floxNeo genannt. Um die beiden Klonierungswege zu vereinen und die Exons 1 - 4 zwischen die flankierenden 5'- und 3'-Bereiche zu positionieren, wurde das Plasmid tk 10 floxNeo mit Xba I partiell verdaut und einer „Blunt“-Reaktion unterworfen. In das geöffnete Plasmid wurde ein 4,7 kB Fragment aus dem Plasmid 3,7 *loxP* Ex4-SK (Xho I, Xba I Partialverdau ⇒ „Blunt“) kloniert, um den *Ape*-Rekombinationsvektor herzustellen.

4.4 Markierung der DNA

4.4.1 „Random-Primed-Markierung“ von DNA-Fragmenten mit α -[³²P]-dCTP

Die radioaktive Markierung von DNA wurde nach der „Random-Primed-Methode“ durchgeführt (Feinberg & Vogelstein, 1983). Dazu wurden 25 ng eines linearisierten und denaturierten DNA-Fragmentes für 20 min in 50 μ l Hexanukleotid/Puffer-Gemisch, 40 μ Ci α -[³²P]-dCTP (spez. Akt. 3.000 Ci/mmol), je 0,1 mM dATP, dGTP, dTTP und das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (2 U) bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte über „Bio-Spin 6“-Chromatographie Säulen nach Herstellerangaben (Bio-Rad).

Zur Detektion eines Einzelkopie-Gens durch Southern-Blot-Analyse (4.5.3) war eine Markierungsausbeute von $> 5 \times 10^8$ cpm / μ g DNA erforderlich.

4.4.2 Markierung von Oligonukleotiden durch 5'-Phosphorylierung mit γ -[³²P]-ATP

Zur Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden wurden 10 pmol Oligonukleotid in 10 μ l PNK-Puffer (5.4.6.1) mit 40 μ Ci γ -[³²P]-ATP (spez. Akt. > 5.000 Ci/mmol) und 20 U T4-Polynukleotid-Kinase für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 90 μ l TE-Puffer gestoppt und nicht eingebautes ATP über „Bio-Spin 6“-Chromatographie-Säulen nach der Herstellerangaben (Bio-Rad) abgetrennt.

4.5 Nukleinsäure-Analyse

4.5.1 DNA-Restriktionen

Ein Mikrogramm Plasmid-DNA wurde mit 1 U Restriktionsenzym geschnitten. Zur Restriktion von 1 µg hochmolekularer (genomischer) DNA wurden 4 U Restriktionsenzym eingesetzt. Die Inkubation erfolgte unter ständigem Schütteln über Nacht. Die Inkubationsbedingungen wurden nach den Herstellerangaben (MBI Fermentas) gewählt.

Restriktionsansätze zur Linearisierung von Rekombinationsvektoren wurden mit 1 Volumen Chloroform ausgeschüttelt, und zur Phasentrennung 1 min lang bei 3000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die DNA präzipitiert, gewaschen (4.2.5), in sterilem H₂O bidest. aufgenommen und photometrisch vermessen.

4.5.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von 0,2 - 20 kB großen DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese bei 40 - 80 V in 0,6 - 1,2-prozentigen Agarose-Gelen mit Ethidiumbromid [0,5 mg/l] in TAE-Puffer (5.4.6.1). DNA-Proben wurden mit 0,2 Vol Blaumarker (0,1 % Bromphenolblau in 50 % Glycerin) versetzt. Als DNA-Längenstandard wurde der „DNA MW Marker III“ verwendet.

Die Auftrennung von PCR-Produkten (< 500 bp) erfolgte elektrophoretisch in 3,5-prozentigen TAE-Agarose-Gelen („NuSieve 3:1 Agarose“). Als DNA-Längenstandard diente der „PCR MW Marker“.

4.5.3 Southern-Blot-Analyse der DNA

Die Southern-Blot-Analyse zum Nachweis der Fragmentgrößen spezifischer Einzelkopie-Gene wurde unter Standardbedingungen durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Je 15 µg mit Restriktionsenzym(en) verdauter genomischer DNA wurden in einem TAE-Agarose-Gel (4.5.2) bei 2 V / cm für 16 h aufgetrennt, denaturiert und mit Hilfe eines Kapillarblots in alkalischem Milieu auf eine „Hybond N+“-Membran übertragen. Die Membran wurde mit 0,5 M Tris-HCL (pH 7,5) neutralisiert und prähybridisiert (2 h in 5 x SSC-Puffer (5.4.6.1), 1 % „Blocking-Reagent“, 5 x Denhardt's-Lösung (5.4.6.1), 10 % Dextranulphat, 0,5 % SDS, 100 µg fragmentierte und frisch denaturierte Heringsspermien-DNA/ml; 68°C). Die Hybridisierung der DNA mit Sequenz-spezifischen α-[³²P]-markierten DNA-Sonden (4.4.1) erfolgte im gleichen Puffer bei 68°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran zur Elimination unspezifisch gebundener Sonden-DNA gewaschen (2 x 100 ml 2 x SSC; 2 x 100 ml 0,2 SSC jeweils 15 min bei 68°C) und zum Nachweis radioaktiver Signale auf Röntgenfilm bzw. Imager-Folie exponiert.

4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.6.1 PCR-Bedingungen

Zur Vermeidung von PCR-Kreuzkontaminationen wurde der Ansatz der PCR-Reaktionen und die eigentliche PCR-Amplifikation sowie die weitere Analyse der PCR-Produkte in getrennten Räumen mit separaten Lüftungs- und Unterdrucksystemen durchgeführt. Für den Ansatz der PCR-Reaktionen wurden durch γ -Bestrahlung sterilisierte Pipettenspitzen mit einem Filtereinsatz („Sterilfilter-Tips“) verwendet.

4.6.2 *In situ*-PCR

In situ-PCR-Analysen wurden ausschließlich an Paraffinschnitten (5 μ m) (4.13.4) durchgeführt. Die Vorbehandlungen erfolgten in Küvetten (150 ml). Die Polymerase-Reaktionen wurden in einem MJ Research PTC200 Multicycler durchgeführt.

Deparaffinierung	30 min	Xylol	37°C
	10 min	Xylol	RT
	5 min	96% EtOH	RT
	5 min	96% EtOH	RT
	2 min	75% EtOH	RT
	2 min	50% EtOH	RT
	2 min	Aqua bidest.	RT
Vorbehandlung	10 min	0,02 M HCL	RT
	2 min	PBS	RT
	3 min	PBS, 0,01% Triton X-100	RT
	2 min	PBS	RT
	5 min	Proteinase K Puffer (100 mM Tris 7,5; 5 mM EDTA)	37°C
	30 min	2 μ g/ml Proteinase K in Prot. K Puffer	37°C
	5 min	2 x SSC	80°C
	10 min	0,25% Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin	RT
	15 sek	20% Essigsäure	0°C
	2 min	Aqua bidest.	RT
	Dehydrieren	2 min	50% EtOH
2 min		75% EtOH	RT
2 min		96% EtOH	RT
2 min		100% EtOH	RT
		Lufttrocknung	

Auf die luftgetrockneten Objektträger wurden jeweils der PCR-Ansatz in einer 1:1 Verdünnung mit „Self-Seal Reagent“ (MJ Research) als Austrocknungsschutz aufgegeben (40 µl). Die Objektträger wurden eingedeckt und die PCR mit folgenden Konzentrationen, Zyklen und Temperaturen durchgeführt:

Konzentrationen:

1	x	Biotherm Puffer (Genecraft)
10	U/100µl	Biotherm Polymerase (Genecraft)
200	µM	dNTP
1	µM	Primer
2,5	mM	MgCl ₂

Zyklen:

1	x	94°C	5	min
1	x	55°C	90	sek
35	x	94°C	30	sek
		55°C	90	sek
		20°C	∞	

Anschließend wurden die Objektträger für 15 min in 2 x SSC (RT) inkubiert, um die Deckgläser abzuspülen. Überschüssige Primer wurden durch zwei Spülgänge in 2 x SSC (45°C) verdünnt. Zur Detektion DIG-markierter Primer wurde die unspezifische Bindung des Anti-DIG-AP Konjugats (Roche) durch 30-minütige Inkubation (RT) in 1% Trockenmilch in 100 mM Tris 7,5; 150 mM NaCl unterdrückt. Auf die Objektträger wurde anschließend für 30 min das Anti-DIG-AP Konjugat für 30 min in diesem Blockpuffer (1:150) gegeben (feuchte Kammer) und danach 2 x 15 min in 100 mM Tris 7,5; 150 mM NaCl gewaschen. Zur Detektion wurde für bis zu 1 h eine NBT / BCIP Entwicklungslösung (Applied Biosystems) zugegeben (feuchte Kammer). Nach ausreichender Signalentwicklung wurde die Farbreaktion durch Inkubation in TE-Puffer (5 min) gestoppt und die Präparate eingedeckt.

4.7 Proteinextrakte

Bei -70°C gelagerte oder frisch präparierte Gewebestücke (~100 mg) wurden in 3 ml eiskaltem Protein-Extraktions-Puffer aufgenommen und sofort mit Hilfe eines Ultrathorax bei 18000 Upm für etwa 30 sek homogenisiert. Zellen in Kultur wurden trypsiniert (4.12.1), mit PBS gewaschen und pro 5×10^7 Zellen in 1 ml Protein-Extraktions-Puffer aufgenommen. Alle weiteren Behandlungen der Proteinextrakte erfolgten bei 0°C. Der Zell-Aufschluß erfolgte für 4 x 10 sek mit einem Ultraschall-Desintegrator mit Mikrospritze bei maximaler Leistung. Nach

Homogenisierung auf einem Vortex-Mixer wurden Aliquots zur DNA- und Protein-Konzentrationsbestimmung abgenommen. Die groben Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 min vom Rohextrakt abgetrennt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt erfolgte mit Hilfe des „Bio-Rad-Protein-Assays“ nach Angabe des Herstellers (Bio-Rad). DNA-Konzentrationsbestimmungen erfolgten nach RNase A Behandlung (100 µg / ml, 37°C, 30 min) unter Anwendung des „Sybr Green Assays“ nach Angaben des Herstellers (Molecular Probes). Die Rohextrakte wurden bei -70°C gelagert.

4.8 „Western-Blot“ Analyse

Es wurden ausschließlich denaturierende Polyacrylamid-Gele verwendet (Laemmli, 1970). Bei dieser Elektrophorese wird das eigentliche Trenngel mit einem Sammelgel von niedrigerem Vernetzungsgrad als das eigentliche Trenngel überschichtet. Da die beiden Gele unterschiedliche pH-Werte aufweisen, baut sich bei Stromfluß ein Spannungsfeld auf, so daß Proteine aufgrund ihrer Ladung an der Grenzlinie zwischen Sammel- und Trenngel fokussiert werden und unabhängig von ihrem Molekulargewicht in das Trenngel wandern. Die Zusammensetzung der Gele war wie folgt:

Gelkomponenten	Sammelgel (4 %)	Trenngel (17,5 %)
H ₂ O dest.	9,05 ml	2,3 ml
1,5 M Tris-HCL, pH 8,8	-	3,75 ml
0,5 M Tris-HCL, pH 6,8	3,75 ml	-
10 % SDS-Lösung	150 µl	150 µl
Acrylamid- / Bisacrylamid-Lösung (30 % / 0,8 %)	2,0 ml	8,75 ml
10 % APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Jeweils 25 µg Proteinextrakt, bzw. 10 µl Standard-Lösung wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und 2 min auf Eis gekühlt. Die Auftrennungen erfolgten in einer Mini-Protean II Elektrophorese Kammer (Bio-Rad) bei 10 mA / 0,75 mm Geldicke in 1 x Elektrophorese-Puffer bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Gelrand erreicht hatte. Nach der Auftrennung erfolgte der Proteintransfer in einer „Semi-Dry-Blot“ Apparatur (Bio-Rad) bei 0,8 mA / cm² für 60 min. Dazu wurde das Gel, auf Gelgröße zurechtgeschnittene Whatman-Papiere und eine zuvor für 10 sek mit Methanol benetzte dann luftgetrocknete Immobilon P-Membran (Millipore) in „Semi-Dry Blot-Puffer“ getaucht und in der Transfer-Apparatur wie folgt aufeinandergelegt: 3 x Whatman ⇒ Gel ⇒ Immobilon P-Membran ⇒ 3 x Whatman (Richtung: Kathode ⇒ Anode). Anschließend wurde die Membran 3 x 10 sek in H₂O gewaschen, 10 sek in Methanol getaucht und luftgetrocknet.

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der Antikörper erfolgte durch einstündige Inkubation in Western-Block Puffer bei 52°C. Zur immunologischen Detektion des MGMT-Proteins wurde die Membran mit den Antiseren MF-1, bzw. MF-4 [4 µg / ml] in Western-Block Puffer bei 4°C über Nacht inkubiert, 3 x 5 min im gleichen Puffer bei RT gewaschen und mit einem anti-Kaninchen-Peroxidase Konjugat für 30 min bei RT in Western-Puffer inkubiert. Die Detektion gebundener Peroxidase-Konjugate durch Chemilumineszenz-Entwicklung erfolgte mit Hilfe des „ECL-Kits“ nach Angaben des Herstellers (Amersham).

4.9 MGMT-Aktivitätstest

Die Bestimmung der MGMT-Aktivität (Elimination von O⁶-Guanin-gebundenen Alkylresten aus [³H]-markierter, alkylierter Kalbsthymus-DNA) in Rohextrakten erfolgte nach Nakabeppu et al. (1985). Das Verfahren basiert auf der Übertragung [³H]-markierter Methyl-Gruppen von Guaninen in Kalbsthymus-DNA auf Cystein-149 im aktiven Zentrum des MGMT-Proteins. Diese Übertragung ist spezifisch für das MGMT-Protein und ermöglicht aufgrund der 1 : 1 Reaktionsstöchiometrie die direkte Quantifizierung der MGMT-Aktivität. Die Proteinextrakte (4.7) wurden zuvor mit [³H]-MeNU (13,4 Ci / mmol) alkylierter Kalbsthymus-DNA in Aktivitätspuffer (5.4.6.1) für 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden Protein und DNA mit TCA präzipitiert, die DNA für 15 min bei 90°C hydrolysiert und der Ansatz zentrifugiert (15 min, 13000 Upm). Das Präzipitat (Protein) wurde zweimal mit 5 % TCA gewaschen, in 0,1 N NaOH resuspendiert und die ³H-Aktivität mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillations-Spektrometers gemessen. Als Negativkontrolle wurde eine 15-minütige Vorinkubation der Extrakte mit dem MGMT-Inhibitor O⁶-Benzylguanin [25 µM] (5.4.1.2) bei 37°C durchgeführt. Der Meßwert der Negativkontrolle wurde allen Proben als Hintergrundwert abgezogen. Als Positivkontrolle diente gereinigte, rekombinante humane MGMT (Bender et al., 1996) aus der eigenen Arbeitsgruppe. Es wurden jeweils mindestens zwei unabhängige Bestimmungen vorgenommen und die Meßwerte gemittelt.

4.10 Quantifizierung von O⁶-Alkylguaninen in der gesamten genomischen DNA mit Hilfe des Immuno-Slot-Blot-Verfahrens

Das molare O⁶-Alkylguanin / Guanin-Verhältnis in isolierter genomischer DNA wurde mit Hilfe eines modifizierten Immuno-Slot-Blot-Verfahrens (Nehls et al., 1984) bestimmt. Das Verfahren basiert auf der spezifischen Bindung eines MAK an ein definiertes Alkylierungsprodukt in Einzelstrang-DNA, die zuvor auf einer Nylon-Membran immobilisiert wurde. Die Detektion des gebundenen MAK kann über Enzym-gekoppelte oder radioaktiv-markierte Sekundärantikörper erfolgen. Aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit (Nachweisgrenze z.B. für O⁶-EtGua in 3 µg DNA bei einem molaren O⁶-EtGua / Gua $\geq 2 \times 10^7$) eignet sich das ISB-Verfahren besonders gut zur Quantifizierung kleiner Mengen definierter O-Alkylierungsprodukte in der genomischen DNA.

4.10.1 DNA-Denaturierung und -Immobilisierung

Hochmolekulare genomische DNA wurde mit *EcoRI* verdaut und nach der Reinigung auf eine Endkonzentration von 30 µg / ml TE-Puffer verdünnt. Nach DNA-Denaturierung durch Erhitzen auf 100°C (5 min) und sofortigem Abkühlen auf Eis wurde 1 Vol eiskaltes 2 M Ammoniumazetat zugegeben. Mit Hilfe einer Slot-Blot-Apparatur wurden 3 µg DNA pro Slot auf einer in 1 M Ammoniumacetat äquilibrierten Nylonmembran („NY13N“) immobilisiert. Als Kalibrierungs-Standard wurde auf jeder Membran eine serielle Verdünnungsreihe einer Kalbsthymus-DNA (30 µg / ml TE-Puffer) mit definiertem O⁶-Alkylguaniningehalt mitgeführt. Nach Waschen der Membran in 5 x SSC-Puffer wurde die DNA durch UV-Licht (302 nm, 3 min) fixiert.

4.10.2 Detektion DNA-gebundener MAK durch Enzym-gekoppelte Zweitantikörper

Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurde die Membran für 12 h bei 4°C in Block-Puffer (5.4.6.1) inkubiert. Die Reaktion mit dem FPLC-gereinigten (5.4.4) Alkylierungsprodukt-spezifischen MAK (Erstantikörper) erfolgte im gleichen Puffersystem für 1 h bei RT nach folgenden Bedingungen:

Inkubationsbedingungen für den Erstantikörper:

Spezifität der MAK	MAK ⁽¹⁾	C _{MAK} (µg/ml)	C _{NaCl} ⁽²⁾ (mM)
Anti-(O ⁶ -EtGua)	EM-21	1,00	140
Anti-(O ⁶ -MeGua)	EM-2-3	0,02	600

(1) Charakteristika der MAK siehe 5.4.4. (2) NaCl-Konzentration im Block-Puffer

Anschließend wurde die Membran dreimal kurz in H₂O und einmal für 5 min in PBS-Puffer (5.4.6) bei RT gewaschen. Nach Bindung des Erstantikörpers erfolgte eine Inkubation mit einem 1:500-verdünnten Anti-Maus Ig-Biotin-Konjugat für 60 min und anschließend eine Umsetzung mit 1:333-verdünntem [³⁵S]-Streptavidin für 15 min. Die Membran wurden nach jedem Schritt für 3 x 10 min mit PBS-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Membran bei RT getrocknet und bei -70°C auf Imager-Folie exponiert. Mit Hilfe eines Image-Scanners wurden die radioaktiven Signale quantifiziert.

4.11 Nachweis von O⁶-Ethylguanin in der Kern-DNA einzelner Zellen mit Hilfe der immunzytologischen Analyse (ICA)

Der Nachweis von O⁶-EtGua in der Kern-DNA individueller Zellen erfolgte mit Hilfe eines immunzytologischen Analyseverfahrens (ICA) (Adamkiewicz *et al.*, 1985; Seiler *et al.*, 1993; Thomale *et al.*, 1996; Thomale *et al.*, 1996). Es basiert auf der Bindung von MAK an spezifische Kanzerogen-induzierte Modifikationen in der (partiell denaturierten) Kern-DNA fixierter Einzelzellen oder Zellen in Gewebe-Gefrierschnitten. Gebundene MAK werden durch Fluoreszenz-markierte Zweitantikörper visualisiert und mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung elektronisch-verstärkter Fluoreszenzsignale quantifiziert.

Frisch präparierte Maus Hepatozyten-Einzelzellsuspensionen (4.13.1) wurden entweder direkt oder nach FACS-Trennung in einer 25 %-igen Stärkelösung auf Objektträger aufgebracht, über Nacht bei RT getrocknet und dann der Standardprozedur unterzogen. Der Nachweis von O⁶-MeGua erfolgte mit Hilfe des (O⁶-MeGua)-spezifischen MAK EM-2-3 (0,2 µg/ml) und eines Rhodamin-Isothiocyanat (TRITC)-markierten Zweitantikörpers (2 µg/ml). Im Falle von O⁶-EtGua wurde der (O⁶-EtGua)-spezifische MAK EM-21 (1 µg/ml) und der gleiche (TRITC)-markierte Zweitantikörper verwendet.

4.12 Zellkultur

4.12.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Die Kultivierung der ES-Zellen und primären, embryonalen Fibroblasten erfolgte weitgehend nach vorgegebenen Protokollen (Wurst & Joyner, 1993).

Cryopraeservierung der Zellen: Die Zellen wurden mit PBS⁻ gewaschen, 5 min bei 37°C in Trypsin / EDTA-Lösung inkubiert und durch mehrfaches Pipettieren vereinzelt. Anschließend wurden sie 5 min bei 270 x g sedimentiert und jeweils 1 x 10⁷ Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, zunächst für einen Tag bei -70°C gelagert und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Zellen in Mikrotiterplatten wurden mit PBS⁻ gewaschen, durch Zugabe von 25 µl Trypsin / EDTA-Lösung 5 min bei 37°C trypsinisiert und mit Hilfe einer Multipette vereinzelt. Dann wurden pro Well 25 µl FKS, 40 µl DMEM und 10 µl DMSO zugegeben, gemischt, die Mikrotiterplatten in Klarsichtfolie eingepackt und nicht länger als 3 Wochen bei -70°C gelagert.

Inkubationsbedingung: 37°C; 5 % CO₂; 97 % Luftfeuchtigkeit.

Mediumwechsel: Standardmedien wurden alle 2 Tage, Medien mit Selektionszusätzen täglich gewechselt. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und frisches, auf 33°C vorgewärmtes Medium, an den Schalenrand pipettiert, zugegeben.

Mykoplasmentest: Mykoplasmen können bei Säugerzellen chromosomale Aberrationen hervorrufen, die Falle von ES-Zellen zu einem Verlust der Pluripotenz führen können. Alle Zellkulturen wurden deshalb mit Hilfe des „Mycoplasma Detection Kits“ regelmäßig auf Mykoplasmen-Infektion überprüft. Die Reinigung infizierter Zelllinien erfolgte mit Hilfe des „BM-Cyclin-Kits“ nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim).

Passagieren von Monolayer-Kulturen: Adhärenente Zellen wurden einmal mit PBS⁻ gewaschen. Anschließend wurde eine vorgewärmte (33°C) Trypsin / EDTA-Lösung zugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Trypsin wurde durch Zugabe von Serumhaltigem Medium inhibiert, die Zellen durch auf- und abpipettieren (10 x) vereinzelt, gezählt und in den angegebenen Konzentrationen ausgesät.

Serum: Die verwendeten fötalen Kälberseren (FKS) wurden vor dem Routinegebrauch auf Toxizität, sowie die Beeinflussung von Ausplattierungseffizienz und Proliferation getestet. Als Vergleichsserum diente eine bereits getestete Charge (Nr.: 147139, Boehringer Mannheim), die uns freundlicherweise von Dr. R. Kühn (Institut für Genetik, Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt wurde. Für den Test wurden jeweils 1000 ES-Zellen auf „Feeder“-Zellen in 35 mm (Ø) Kulturschalen ausgesät und mit 10 %, 15 % und 30 % fötalem Kälberserum in ES-Medium inkubiert. Nach 7 Tagen wurde die Morphologie der Zellen beurteilt, und die Anzahl der Klone nach Methylenblau-Färbung gezählt. Serumchargen, die auch bei 30-prozentigem Serumgehalt eine Plattierungseffizienz von ca. 50 % ermöglichten und keine morphologischen Veränderungen der Zellen verursachten, wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Proliferation der ES-Zellen unter Standardbedingungen überprüft. Dazu wurde die Proliferation der ES-Zellen eine Wachstumskurve von ES-Zellen bei einem Serumgehalt von 15 % über den Zeitraum von fünf Passagen aufgenommen. Die optimale Zellzahl-Verdopplungszeit während der exponentiellen Wachstumsphase lag bei etwa 9 h (2.8.3.1).

Volumina:

Schalen-Durchmesser [cm]	Fläche [cm ²]	Mediumvolumen [ml]	Trypsin-/EDTA-Lösung [ml]
14	150	25	2,5
9	63	8	1,0
6	20	5	0,5
48 Well-Schale	1	0,5	0,1
96 Well-Schale	0,35	0,1	0,05

Waschen der Monolayer-Kulturen: Bei adhärenenten Zellen wurde das Medium abgesaugt und PBS⁻, gegen den Schalenrand pipettiert, zugegeben.

4.12.2 Embryonale Fibroblasten (EF-Zellen)

Primäre embryonale Fibroblasten wurden aus Maus-Embryonen des Stammes C57BL / 6J gewonnen. Primäre embryonale Geneticin-resistente Fibroblasten (*neo^R*-EF-Zellen) entstammten der „IL-4 knockout“ Maus-Linie (Kühn *et al.*, 1991), die u.a. ein bakterielles *Neomycin* Transgen trägt. Die Präparation der Fibroblasten wurde für beide Stämme in gleicher Weise durchgeführt:

Gravide Weibchen (Pränataltag 15) durch zervikale Dislokation getötet, das Abdomen mit 70 % Ethanol desinfiziert und die Haut durch einen 0,5 cm langen Schnitt geöffnet. Die Haut wurde entlang der Längsachse des Tieres auseinandergezogen und das Peritoneum eröffnet. Der Uterus wurde ausgeschnitten, in einer Petrischale mit PBS⁻ geöffnet und die Embryonen in eine weitere Petrischale mit PBS⁻ überführt. Nach Abtrennung der Köpfe und Entfernen der inneren Organe wurde noch zweimal mit je 50 ml PBS⁻ gespült, um das Blut zu entfernen. Die Dissoziation kleiner (ca. 3 mm Ø) Gewebefragmente erfolgte in einem Erlenmeyerkolben (250 ml), in dem 50 ml Trypsin / EDTA-Lösung und 20 ml Glaskugeln (4 mm Ø) vorgelegt waren, unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer bei 37°C für 30 min. Zur Verringerung der Viskosität wurden dann 6000 Einheiten DNase I zugefügt und für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurden noch zweimal je 50 ml Trypsin / EDTA-Lösung zugegeben und für jeweils 30 min inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 270 x g für 5 min pelletiert, zweimal mit EF-Medium gewaschen und gezählt. Unter diesen Bedingungen konnten aus 8 Embryonen 2 x 10⁸ Zellen isoliert werden. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5 x 10⁶ Zellen pro 15 cm Zellkulturschale ausgesät. Um Zelltrümmer zu entfernen wurde nach 24 h das Medium gewechselt. Zur Expansion der Kulturen wurden konfluente Fibroblasten gewaschen, trypsiniert und um den Faktor 5 verdünnt wieder ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden diese Sekundärkulturen trypsiniert und in 1 ml Einfriermedium cryopraeserviert.

Für die ES-Zellkultur auf Fibroblasten-„Feeder-Layers“ wurden embryonale Fibroblasten bei 37°C aufgetaut, mit EF-Medium gewaschen und auf 15 cm (Ø) Zellkulturschalen ausplattiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen auf fünf 15 cm (Ø) Zellkulturschalen aufgeteilt und wiederum bis zur Konfluenz kultiviert. In diesem Stadium galten die EF-Zellen als expandiert. Expandierte Fibroblasten wurden arretiert, um die weitere Proliferation zu unterbinden. Zur Arretierung wurde dem Medium Mitomycin C (10 µg / ml) zugegeben, die Zellen für 2 h inkubiert, gewaschen und trypsiniert. Anschließend wurden sie in einer Dichte von 3 x 10⁴ Zellen / cm² ausgesät und zum Anheften für mindestens 3 h inkubiert. So behandelte Fibroblasten wurden bis zu 8 Tagen als „Feeder“-Zellen benutzt. Die ES-Zellen wurden dann in einer Dichte von 1 x 10⁵ Zellen / cm² auf die „Feeder“-Zellen ausgesät.

4.12.3 Buffalo-Rattenleber (BRL)-Zellen

Die BRL-Zellen sind eine stabile Ratten-Hepatomlinie, die einen Dedifferenzierungsfaktor (LIF) für ES-Zellen der Maus sezernieren (Smith & Hooper, 1987). Um Medium für die

ES-Zell Kultur zu konditionieren, wurden BRL-Zellen auf 15 cm (\varnothing) Kulturschalen bis zur Konfluenz in BRL-Medium mit 10 % FKS propagiert. Die eigentliche Konditionierung des Mediums erfolgte durch Kultivierung der BRL-Zellen in serumfreien BRL-Medium. Dazu wurden jeweils 4 x 30 ml Medium für jeweils 3 Tage zugegeben, das Medium abgenommen, sterilfiltriert und bei -20°C eingefroren. Die BRL-Zellen wurden anschließend verworfen.

4.12.4 ES-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die ES-Zell-Linie E14-1 der Maus (Kühn *et al.*, 1991) kultiviert, zum einen, um diese ES-Zellen der homologen Rekombination zu unterziehen und anschließend chimäre Mäuse zu generieren, zum anderen, um sie für *in vitro*-Analysen des DNA-Reparaturstatus dieser Zellen zu verwenden. Vor allem die Erzeugung chimärer Mäuse erfordert die Erhaltung der Pluripotenz der ES-Zellen, damit sie in den chimären Tieren zur Bildung aller Gewebe, einschließlich der Keimbahn, beitragen können. Der Verlust der Pluripotenz durch Differenzierung kann verhindert werden, indem ES-Zellen in Gegenwart eines Dedifferenzierungsfaktors, des Leukämie-Inhibitionsfaktors „LIF“, kultiviert werden (Smith *et al.*, 1988). Dieser Faktor kann dem Medium direkt bzw. in Form eines konditionierten Mediums (Smith & Hooper, 1987) zugegeben werden, oder aber von embryonalen Fibroblasten als „Feeder“-Zellen produziert werden (Doetschman *et al.*, 1985). In der vorliegenden Arbeit wurden ES-Zellen ausschließlich in BRL-Zell konditioniertem Medium kultiviert. ES-Zellen zur Generierung chimärer Tiere wurden ausschließlich auf primären embryonalen „Feeder“-Zellen der Maus kultiviert.

Ein sehr wichtiger Aspekt bei der ES-Zell-Kultivierung besteht in der Verhinderung des Überwucherns der Zellpopulation durch einzelne Subklone, die möglicherweise veränderte Charakteristiken bzw. einen Verlust der Pluripotenz aufweisen könnten. Dazu wurden die ES-Zellen konsequent in hoher Zelldichte ausgesät (1×10^5 Zellen / cm^2) und an jedem zweiten Tag passagiert.

Da die Ausgangs ES-Zell-Linie E14-1 mit Mycoplasmen infiziert war, wurde sie gereinigt (4.12.1) und für alle nachfolgenden Experimente ausschließlich die gereinigten Zellen verwendet.

4.12.5 Transfektion des Rekombinationsvektors

Die zur Transfektion vorgesehenen ES-Zellen wurden nach dem Auftauen zumindest dreimal passagiert und auf 10 cm (\varnothing) Kulturschalen bis zu ca. 60 % Konfluenz expandiert. Die Zellen wurden dann trypsinisiert, mit PBS^- gewaschen und in einer Dichte von 1×10^7 Zellen pro ml in eisgekühltem Transfektionspuffer resuspendiert. Davon wurden 0,8 ml in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und mit 4 pmol (40 μg) linearisiertem Rekombinationsvektor in 200 μl Transfektionspuffer vermischt. Der Strompuls erfolgte bei 240 V und 500 μF mit Hilfe eines Elektroporators (Bio-Rad). Um die Aufnahme des Vektors durch die Zellen zu erhöhen, wurden die Zellen in der Küvette noch 10 min lang auf Eis

inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in ES-Medium aufgenommen und auf zehn 10 cm (\varnothing)-Zellkulturschalen mit EF-Zellen ausplattiert. Nach 48 h wurden die Zellen in Selektionsbedingungen überführt. Dazu wurde dem ES-Medium G 418 (180 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aktive Substanz) und 2 μM Ganciclovir zugegeben. Die zur Selektion notwendige Konzentration von G 418 wurde zuvor als diejenige ermittelt, die bei unbehandelten ES-Zellen innerhalb von 5 Tagen zu 100 % Zelltod führt. Die Selektion wurde für 6 Tage (Ganciclovir), bzw. 8 Tage (G418) fortgeführt. Nach Ablauf der Selektion wurden die zu diesem Zeitpunkt eben sichtbaren Klone noch 3 Tage in ES-Medium expandiert. Zur Isolation einzelner Klone wurden die Kulturschalen mit PBS⁻ gewaschen und 15 ml PBS⁻ pro Schale vorgelegt. Die Übertragung der Klone in 96-Well-Mikrotiterplatten erfolgte durch Ablösen der Klone mit Hilfe einer Sterilfilterspitze (200 μl) auf einer Pipette unter gleichzeitigem Aufsaugen. Die Klone wurden in ca. 30 μl PBS⁻ zu bereits vorgelegten 25 μl Trypsin / EDTA-Lösung gegeben. Nach jeweils 36 Klonen wurden die Mikrotiterplatten für 5 min bei 37°C inkubiert, die Zellen mit Hilfe einer Multipipette vereinzelt und in eine neue Mikrotiterplatte auf EF-Zellen ausplattiert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen passagiert und in zwei Mikrotiterplatten auf EF-Zellen ausplattiert. Drei Tage später wurde eine Platte eingefroren 4.12.1, die zweite zur DNA-Präparation verwendet (4.2.3).

4.12.6 Transiente Transfektion eines Cre-Expressionsvektors in rekombinante ES-Zellen

Die zur transienten Transfektion vorgesehenen ES-Zellen wurden nach dem Auftauen zumindest dreimal passagiert und auf 10 cm (\varnothing)-Zellkulturschalen bis zu ca. 60 % Konfluenz expandiert. Die Zellen wurden trypsiniert, mit PBS⁻ gewaschen und in einer Dichte von 1×10^7 Zellen pro ml in eisgekühltem Transfektionspuffer resuspendiert. Davon wurden 0,8 ml in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und mit 10 pmol (40 μg) des Plasmids pCre-EGFP (Abb. 54) in 200 μl Transfektionspuffer vermischt. Der Strompuls erfolgte bei 240 V und 500 μF mit Hilfe eines Elektroporators (Bio-Rad). Um die Aufnahme des Vektors durch die Zellen zu erhöhen, wurden die Zellen in der Küvette zusätzlich noch für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in ES-Medium aufgenommen und in einer Dichte von 10^4 Zellen pro Kulturschale (10 cm (\varnothing)) auf EF-Zellen ausplattiert. Nach 48 h wurden einzelne Klone auf 96-Well-Mikrotiterplatten übertragen (4.12.1). Waren diese Klone nahezu konfluent, so wurden sie auf zwei neue Mikrotiterplatten mit *neo*^R-EF-Zellen ausplattiert.

Um ES-Klone zu identifizieren, bei denen aufgrund der Cre-Expression die *neo*-Kassette deletiert vorlag, wurde eine der zwei Parallelplatten für 7 Tage mit G 418-haltigem ES-Medium (180 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt. Von den unbehandelten Parallelklonen der G 418-empfindlichen Klone, wurde aus Zell-Aliquots DNA präpariert und mit Hilfe von Southern-Blots untersucht.

4.12.7 Eliminationskinetiken

Die Kinetik der Elimination von O⁶-Alkylguanin aus der DNA von ES-Zelllinien mit unterschiedlichen *MGMT*-Genotypen wurde mit oder ohne Inhibition der *MGMT* durch O⁶-Benzylguanin (5.4.1.2) gemessen. Dazu wurden die Zelllinien kurzzeitig mit einem N-Alkyl-N-Nitrosoharnstoff behandelt und die DNA dann zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Exposition isoliert. Das molare O⁶-Alkylguanin / Guanin-Verhältnis in isolierter genomischer DNA wurde mit Hilfe des Immuno-Slot-Blot-Verfahrens (4.10) bestimmt.

Die Zelllinien wurden nach dem Auftauen zumindest dreimal passagiert (4.12.1) und 24 h vor der Alkylierung in einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro 6 cm (\emptyset)-Kulturschale ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit PBS⁻ gewaschen, in 5 ml 37°C warmem Alkylierungspuffer (5.4.6.1) aufgenommen und für 20 min bei 37°C inkubiert. Der N-Alkyl-N-Nitrosoharnstoff wurde zuvor dem Alkylierungspuffer nach einer Vorverdünnung (ca. 50 fach) in Kohlensäure-saurem vorgewärmten Medium zugegeben (MeNU [50 µg/ml]; EtNU [100 µg/ml]). Die „unbehandelten“ Kontrollen erhielten Alkylierungspuffer mit DMSO. O⁶-Benzylguanin (5.4.1.2)-Inkubationen erfolgten 1 h vor, während und nach der Alkylierung kontinuierlich in einer Konzentration von 25 µM. Anschließend wurden die Zellen einmal mit ES-Medium gewaschen (Zeitpunkt t_0) und in 5 ml ES-Medium aufgenommen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und die DNA mit Hilfe der „Hochsalzmethode“ (4.2.3) isoliert.

4.13 Gewebe und Primärzellen

4.13.1 *In situ*-Perfusion

Nach Töten der Mäuse durch zervikale Dislokation und Öffnen des Brustraums wurde eine Kanüle (23 Gauge) mit angeschlossenem Plastikschlauch in die linke Herzkammer eingeführt. In die rechte Herzkammer wurde ein Schnitt zur Drainage gesetzt. Die Perfusions-Spül-Lösung (auf 37° C vorgewärmt; 5.4.6.1) wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe mit einer Flußrate von 10 ml/min in das Herz gepumpt. Der Spülvorgang wurde etwa 4 min lang fortgesetzt, bis die gesamte Leber blaß-grau erschien. Zum Wechsel des Schlauches in das Vorratsgefäß mit der Perfusionslösung (5.4.6.1) wurde die Pumpe kurz abgestellt, um keine Luft anzusaugen. Die Perfusionslösung (37° C) wurde dann nochmals etwa 5 min lang mit einer Flußrate von 10 ml/min in das Herz gepumpt, bis das Perfundat aus den Leberlappen diffundierte, dann für weitere 5 min mit einer Flußrate von 5 ml/min fortgesetzt. Danach wurden die zu- und abführenden Gefäße der Leber durchtrennt und die Leber in eine Petrischale überführt. Die Gallenblase wurde entfernt und die Leber in eine neue Petrischale mit 20 ml kaltem Färbepuffer (4° C) (5.4.6.1) überführt, zerkleinert und die Gewebestücke dann durch Auf- und Abpipettieren suspendiert und über Passage durch Nylon-Gaze in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gebracht. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei

4° C in einem „Swing-out“ Rotor mit 50 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellsediment in 40 ml kaltem Färbepuffer aufgenommen und durch Schütteln suspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das Sediment in 3 ml Färbepuffer aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 1 ml Percoll-Lösung unterschichtet (9 Vol. Percoll + 1 Vol. 10 x PBS; dann 1 : 1 mit 1 x PBS verdünnt) und für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden als „Layer“ auf dem Percoll-Gradienten abgenommen und zweimal mit Färbepuffer gewaschen. Anschließend wurde die Zellkonzentration auf 10^7 Zellen/ml eingestellt.

4.13.2 FACS-Gal-Färbung

Die Färbung mit Fluoreszein-Digalaktosid (FDG) erfolgte nach Angaben des Herstellers (Molecular Probes). FDG wurde mit Aqua bidest. auf 2 mM verdünnt und auf 37°C erwärmt. Von der Hepatozyten-Suspension wurden 50 µl Aliquots abgenommen und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der FDG-Verdünnung zugefügt, gemischt und die Suspension für 1 min bei 37°C inkubiert. Durch diesen hypotonischen Schock kann der Farbstoff die Zellmembran passieren. Unmittelbar anschließend wurden die Zellen in 2 ml Färbepuffer aufgenommen und für 1 - 2 h auf Eis zur Produktentwicklung inkubiert.

4.13.3 Gewebefixierung

Aus einzelnen Leberlappen wurden ca. 2 x 2 x 0,5 cm große Stücke geschnitten. Die Stücke wurden kurz in PBS⁻ (4° C) gespült und für 30 min in frisch angesetzter, 4%-iger Paraformaldehyd / PBS-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Gewebestücke in PBS gespült (2 x 2 min) und in 0,5 M Sukrose überführt. Nach 4 h wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Dazu wurde das Gewebe jeweils dreimal für je 20 min in 50 %, 70 %, 90 % und 100 % Ethanol inkubiert. Das Ethanol wurde gegen Xylol gewechselt und anschließend zweimal für jeweils 10 min bei RT inkubiert. Die Gewebestücke wurden dann mit einem Skalpell verkleinert (~0,1 cm³) und in Paraffin eingebettet.

4.13.4 Paraffin-Einbettung

Die fixierten Gewebe (s.o.) wurden in 5 ml Xylol aufgenommen, jeweils 5 ml flüssiges Paraffin (vorgewärmt auf 60°C) zugegeben und die Ansätze vermischt. Nachdem das Paraffin ausgehärtet war, wurde die Paraffin/Xylol-Mischung bei 60° C geschmolzen und dekantiert, um dann durch frisch geschmolzenes Paraffin ersetzt zu werden. Die Gewebe wurden dann für 1 h bei 60° C inkubiert, nochmals jeweils zweimal in frischem, flüssigem Paraffin aufgenommen und für 1 h bei 60° C inkubiert. Anschließend wurden sie in Paraffinblöcken ausgehärtet, um Schnitte anfertigen zu können.

4.13.5 Glukose-6-Phosphat-Färbung

Die Darstellung der Glukose-6-Phosphatase-Aktivität erfolgt nach einem Protokoll von Dr. A. Temme (Institut für Immunologie, TU Dresden) auf Grundlage der Bleisalzmethode (Wachstein & Meisel, 1957). Die Methode beruht auf dem indirektem Nachweis von Phosphat, das bei einem pH-Optimum von 6,5 enzymatisch aus Glukose-6-Phosphat abgespalten wird. Das freigesetzte Phosphat wird mit Blei-Ionen umgesetzt und als Pyromorphit ausgefällt. Durch Umfällen mit Ammoniumsulfid entsteht schwarz-braunes, unlösliches Bleisulfid. Im einzelnen wurden die luftgetrockneten Kryostatschnitte (8 µM) wie folgt inkubiert:

30	min	Glukose-6-Phosphat / Bleinitrat-Lösung (37°C)
5	sek	fließendes Leitungswasser
60	sek	7,5 % Ammoniumsulfid-Lösung
10	sek	fließendes Leitungswasser
5	min	5 % Glutaraldehyd / 5 % Essigsäure
1	min	Mayer´s Haemalaun-Lösung (Kernfärbung)

Einbettung in 9 Vol. Glyzerin / 1 Vol. PBS

4.14 Tierhaltung

Die in der Versuchstier-Anlage des IFZ gehaltenen Mäuse erhielten täglich „Zuchthaltungsfutter Maus-Ratte 10 H 10“ (Eggersmann) und Trinkwasser ad libitum, zusätzlich einmal wöchentlich Haferflocken. Ein definierter Tag- / Nacht-Rhythmus wurde über eine Dunkelphase von 18.00 - 6.00 Uhr eingehalten. Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen gehalten. In halbjährlichen Abständen wurden je 2 Tiere jedes Stammes auf pathogene Mikroorganismen untersucht.

4.14.1 Genotypisierung

Zur Genotypisierung von Mäusen wurden ausschließlich Schwanzbiopsie-DNA-Extrakte hergestellt. Den Tieren wurde im Alter von 3 - 4 Wochen ein 0,7 - 1 cm langes Stück der Schwanzspitze entnommen und die Wunde mit Gewebekleber versorgt. Die Schwanzspitzen-Proben wurden in 0,5 ml Hochsalz-Extraktionspuffer (5.4.6.1) für 3 h bis über Nacht bei 55 °C inkubiert. Die weitere Reinigung erfolgte wie unter 4.2.3 beschrieben. Die DNA-Analysen wurden anschließend mit Hilfe der PCR oder der „Southern-Blot“ Technik durchgeführt.

5 ANHANG

5.1 Abkürzungen

A	Adenin
<i>ada</i>	<i>MGMT</i> -homologes bakterielles Gen
APE	AP-Endonuklease der Säuger
<i>APEX</i>	AP-Endonuklease der Maus
APRE	Akute Phase Antwort-Element
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BER	Basen-Exzisionsreparatur
<i>bla</i>	Beta-Laktamase-Gen
bp	Basenpaar
BRL-Zellen	Buffalo-Rattenleberzellen
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	Doppelsträngige DNA-Kopie einer mRNA
Ci	Curie
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
DEN	N, N-Diethylnitrosamin
dGTP	Desoxyguanin-5'-triphosphat
DMN	N, N-Dimethylnitrosamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Äquimolares Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
∅	Durchmesser
E	Enhancer
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> cet <u>a</u> t
EGFP	„Enhanced Green Fluorescent Protein“
ES-Zelle	<u>E</u> mbryonale <u>S</u> tammzelle
EtNU	N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
G 418	Geneticin
h	Stunde(n)
hCG	humanes choriones Gonadotropin
ICA	<u>I</u> mmuncytologische <u>A</u> nalyse
IFZ	Institut für Zellbiologie (Tumorforschung)
ISB	Immuno-Slot-Blot

k_A	Antikörper-Affinitätskonstante (L / mol)
Kan	Kanamycin
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton(s) (molare Masse)
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ1
<i>lacZ</i>	Beta-Galaktosidase Gen (E.coli)
LIF	Leukämie-Inhibitionsfaktor
♂	Männchen
MAK	Monoklonale(r) Antikörper
MeNU	N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff
<i>MGMT</i>	O ⁶ -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase-Gen von Säugerzellen
μF	Mikrofarad
μM	mikromolar
min	Minute(n)
mM	millimolar
MMR	„Mismatch“-Reparatur
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansäure
mRNA	„messenger“ RNA
<i>neo</i>	Neomycin-Phosphotransferase-Gen
nm	Nanometer
O ⁶ -EtGua	O ⁶ -Ethylguanin
O ⁶ -MeGua	O ⁶ -Methylguanin
OD	Optische Dichte
Ori	Replikationsursprung
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSG	Gonadotropin aus dem Serum gravider Stuten
PNK	Polynukleotidkinase
PolyA	Polyadenylierungssequenz
Pos.	Position
P _R	Promoter
RIA	kompetitiver Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SPF	spezifisch Pathogen-frei
SSC	Salzlösung
T	Thymidin
TCA	Trichloroessigsäure
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Tris-Base	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Relative Enzymeinheit
UTR	Nicht translatierte Region
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
♀	Weibchen

5.2 DNA Sequenzen

5.2.1 Teilsequenz des Plasmids p0,6 B/Xh-SK (*MGMT*-Gen)

„Reverse Primer-Sequenzierung“. Das 0,6 kB Bam HI-Xho I-Fragment beinhaltet das Exon 5. Sequenz startet ca. 200 Bp 5' von Exon 5. 317 Bp des 5'-Bereichs:

```

1   GGATCCCAGG AATNCCATA TCCCACACAC ACCTCAGAGC AGGTGTTCCCT TCTCCCCGCC
61  CCGGAGGATA CCCTCAAGGC AACCAACCGG CATCGCCACT GGGCCCGCAG CCTGCTAACT
121 GCAGAGCTAC CTGGTGGTGC CGGACAGTCG CGGTAAGACC TTGCCTGTAG CACAGAAACC
181 TCCGCCCAGA TCCAGACTGA CAGCGACACC CCTGTTTTTCC AGGTCCCCAT CCTCATCCCC
241 TGCCACAGGG TGGTTCGCAG TGACGGTGCC ATCGGCCATT ACTCCGGAGG AGGGCAGGCT
301 GTGAAGGAGT GGCTTCT

```

5.2.2 Teilsequenzen des Plasmids p3,3-SK (*MGMT*-Gen)

„Reverse Primer-Sequenzierung“. Das 3,3 kB Bam HI-Fragment liegt zwischen Exon 4 und Exon 5. 371 Bp des 5'-Bereichs:

```

1   GGATCCGGGG TATTGGACAA ATTAGATTTT ACAGCATGAA GATTTCAATG AAGCTGCAAT
61  ACCATGGGCT CCTTGTGTAT CGATAGCAAT CGCATCGCAT GTAGCAGGGG CTCTCAAGAA
121 GAGGGCAGCA ATGATACAGG TCCTTCAGAT ATGGTCATGG GGCCCAGTAA ATCTTATGTC
181 TACATACCTA CTGCTAACCT GACGTGAAGC AGGGCCCAT TTTAAAGGTG AGTGTGTGAG
241 CAAGTCACTG GTCCACAGTG CATTCTGAGC CAACGTCCTC AACACAGCAC TAATCACAGA
301 GGGAACAGGG AGAGRTGTGC ATGCTACTCA CTCTTAGAAT TCCATATTCC ATTAAAAGGG
361 AGAAAGAGTC A

```

„Universal Primer-Sequenzierung“. 204 Bp des 3'-Bereichs:

```

1   GCTGCAAACC CTCCGCCATG GTTTGCTAAC CCCTTAGGTG AACTGTGCCT GTTGTATCC
61  TTGAAGATTC TAGCTACAGC TTAGCGATGA CAGAGAAAAT TGTTTCCTGT ATAGAGCTCA
121 GAAATGATGT TTTTCCTTCA GGAGGTGAAC TTGATAAATC ACTTCCCAGG TGCAATCAGG
181 CATCTTCCTC CTAAACCTGG ATCC

```

5.2.3 Teilsequenzen des Plasmids p0,8-B/Xh-SK (*MGMT*-Gen)

„Universal Primer-Sequenzierung“. Das 0,8 kB Bam HI - Xho I-Fragment liegt am 3'-Ende des 4,5 kB Eco RI-Fragments. 359 Bp des 5'-Bereichs:

```

1   CTCGAGGACC AGGAACCTGT AAAGGTCCCA GCAGCCCATG TTGGATCTCA TGCATTGAAG
61  GTTATACTAT GACTCAGCAC ATGCTGCCAC CAGCGCTGGA GACTGTCTCC AGATCTGCCA
121 TAAGGCACCA CACGATGCTT CACAATTACA TCATCCTCCC ACCTTCAGAG TCGACTGTTC
181 CCAAAAAGGG AGAGGAGACT CAGCCAGGTG CATGGCTAGG TAAAACAGCA TACGATTGGA
241 GGAACGAGCC ACCAACCGTG CAGCGGAGAG CTTGGTTTTTA TGGTGGCTCT CTGACAGCAG
301 GTGCCACTCA TGGCATCATG GAATCATGGC CTCTACAGAA CCCTCATACT GCATGCTAC

```

„Reverse Primer-Sequenzierung“. Das Fragment liegt am 3'-Ende des 4,5 kB Eco RI-Fragments. 312 Bp des 3'-Bereichs:

```

1   CCACACTTTC TGAATTTGGT TTCACCTATC ATCAMAGRGC AAGGTGGGTC TCATTTATGT
61  GAGCCCCATA ACTCATAAGT TTTCAGGACA GGGCTGGGCA TGCACCCTGG CACCCTCCCA
121 TCTGGCCTCG CCAGGGTGTT TTCTGCTCAT TTCATCTCTC TCTGACATGG CCAGCAAGAC
181 CCATGGAAAAG GGCTGGGGTA ATTGTATCAG AGTAACGCCA CACTGGTATC TCTCCAGCAC
241 CAGGAAATCA CTGTATGATG TTTTTTTCCT CTGCCTGAAG AGAGCAGAAT TCCCTGCAGC
301 CCSGGGGGAT CC

```

5.2.4 Teilsequenzen des Plasmids p1,8-X/B-SK (*MGMT*-Gen)

„Reverse Primer-Sequenzierung“. Das 1,8 kB Xba I - Bam HI-Fragment liegt zwischen den Exons 4 und 5. 406 Bp des 5'-Bereichs:

```

1   ACGCCAAGCG CGCAATTAAC CCTCACTAAA GGGAACAAAA GCTGGAGCTC TGTGGGCTGC
61  TGGCACCACA GTGGCTGCGT GTTTCCTCCY TTTATCCTCT AGTTAAAGCT GTCTCAGGAA
121 ATGCCCGTTG GGATCTCAGG GCAAAAATGT CCATTGAATC CACAGCATTC TCTGTAGCAG
181 GCACATAAGG ATGCCCTTGC CAGGGCAGAT GTGCAACCAT TCCTGCCAGG CTGAGTACAG
241 TCATACTCTG ACACTGTTGC CCCGGGAGAG AAATGAGGCG AGTCCATGTG GCTGCAGGCA
301 CTGTGGGTTC CTGAAGGTTT CATGGGGATG TCCGTCTTTT TCTGCCCATG CTATGAACCA
361 GTGAGGATTA AAGGTACAAG GATGAACACT AGATTGGAGG AGATGG

```

„Universal Primer-Sequenzierung“. Das Fragment liegt zwischen den Exons 4 und 5. 313 Bp des 3'-Bereichs:

```

1   GGCAACTAGG GAGTATTTTG TGCCATCACA AACCAACCAC ATGTATAGCT AAAGGCATGC
61  TAGTGTCCAA ATAAAACTTT ATTTAAAAAA AAAGTGCAGA AGGTAGGCGG CTGCAAACCC
121 TCCGCCATGG TTTGCTAACC CCTTAGGTGA ACTGTGCCTG TTGTTATCCT TGAAGATTCT
181 AGCTACAGCT TAGCGATGAC AGAGAAAATT GTTTCCTGTA TAGAGCTCAG AAATGATGTT

```


241 TTTCTTCAG GAGGTGAACT TGATAAATCA CTTCCCAGGT GCAATCAGGC ATCTTCCTCC
 301 TAAACCTGGA TCC

5.2.5 Teilsequenzen des Plasmids p4,5 Eco RI-SK (*MGMT*-Gen)

„Reverse Primer-Sequenzierung“. 228 Bp des 3'-Endes des 4,5 kB Eco RI-Fragments.

1 CCCATAACTC ATAAGTTTTT AGGACAGGGC TGGGCATGCA CCCTGGCACC CTCCCATCTG
 61 GCCTCGCCAG GGTGTTTTTCT GCTCATTTCA TCTCTCTCTG ACATGGCCAG CAAGACCCAT
 181 GGAAAGGGCT GGGTAATTG TATCAGAGTA ACGCCACACT GGTATCTCTC CAGCACCAGG
 241 AAATCACTGT ATGATGTTTT TTTCCTCTGC CTGAAGAGAG CAGAATTC

„Universal Primer-Sequenzierung“. 211 Bp des 5'-Endes des 4,5 kB Eco RI-Fragments.

1 GAATTCCACT TCTCATCCCA TGCAGCTCCT GTCTGTAGAG TCAGCTCTCT CCTTCCTGGT
 61 CTTTCATGGCG GTTGTCTTTA AAATTACTCA TAGACCACAT CTGTACTTGT CATGGTGATA
 121 GACAAACTTG GAGTCAAAGC AGGGTAGTGT CTGTGAAGTT GGAAGTCATG TCTCCACCTC
 181 CCAAGCAGTG ATCCACAGGT CCACAGAGTCC

Sequenzier-Primer, komplementär zum kodierenden Strang von Exon 5 des *MGMT*-Gens. Sequenz aus dem Exon 5 in Richtung des 3'-Terminus. 329 Bp des 3'-Bereichs des Eco RI 4,5 kB-Fragments. Der 3' untranslatierte Bereich beginnt an Position 47.

1 GTCATCCTTC GAGTCGACCA GCTCTGAGCC GTCTGGCCGA AATTGAGTAA CCGTTTGAAT
 61 GACACATAGA TGTAACGCCG TGTTCCGGAAG CGGATGTGTG GTGGCACCAC TATATTAATA
 181 GAGCTGCAAG TGTCTGGGG GACGTGATGT GGCTGCCCTT TCTTGTCTCT ACATTTTACA
 241 GCAGAATGAG TTCAGACGAC CCACCTCGAG TGTGTCATCA GTTCCCTCCT CTGACATGGT
 301 TATTGTTCTA TTTTAAATGC CCATTAATAA GGGGGTGAGC GAGGAAGGCY TGATGAGCCT
 361 TAGGGCCCYT TTKTATGAGG GAGACACAT

5.2.6 Teilsequenzen des Plasmids p8,5 Eco RI-SK (*MGMT*-Gen)

„Universal Primer-Sequenzierung“. 287 Bp des 5'-Endes des 8,5 kB Eco RI-Fragments.

1 GAATTCTGGG TTGTCAGTGC CTTTCCTTCA GTGTGGTGAA AATGCTGCTC TGCCCTGGCA
 61 TCTCTCATAG AAACCCGTGG CTGTTCATAT CACTGCCAC TATAGAATGA GTTCTTTCTC
 121 CTCAGGCTCC TTCTCTGTTT TTAGCTTTCA GCAGCCTGGG TAGGGTCTAC TTGAGCAGGG
 181 CTTCTCGAAG TKGWACACA BTTTGAGTT TACTCTGCTC CTTGAAAGCT GTTCTTTAAA
 241 ACTCTTTTCC AWTCCACTCA TCCTCTCCTC CTAMTGGTGA TCGGCAC

„Reverse Primer-Sequenzierung“. 399 Bp des 3'-Endes des 8,5 kB Eco RI-Fragments.

```

1   TTTGTGAGAC AATCTATGGT TGGAAGTTTA TAGCAGTGAG AAAGGCTGTG TGAGTGATGA
61  TCCGGTATTG ACAAATTAGA TTTCACAGCA TGAAGATTTT AATGAAGCTG CAATACCATG
121 GGCTCCTTGT GTATCGATAG CAATCGCATC SCATGTAGCA GGGGCTCTCA AGAAGAGGGC
181 AGCAATGATA CAGGTCCTTC AGATATGGTC ATGKGGYCCA GTAAATCTTA TGTCTACATA
241 CCTACTGCTA ACCTGRCGTG AAGCAGGGCC CATTTTTAAA GGTGAGTGTG TGAGCAAGTC
301 ACTGGTCTCA CAGTGCATTC TGAGCCAACG TCCTCAACAC AGCACTAATC CACAGAGGGA
361 AACAGGGAGA GGTGTGCATG CTA CTACTCACTC TTAGAATTC

```

5.2.7 Teilsequenzen des Plasmids p3,3-PCR-SK (*MGMT*-Gen)

„Reverse Primer-Sequenzierung“. 443 Bp des 5'-Endes des 3,3 kB Eco RI-Fragments.

```

1   GAATTCTCAA AGAGCCGTGT ATGTGTGTGT TCCAACAGAG GGCACGTGTG CTGCAGTGTG
61  CTGGGGAGAC CCCAGCCTCC ACTCTGCCTT CAGAGGAGTT GGAAGGTGGG CATCAGGGTC
121 GAAGTCAACT GGTTCGAGC AGGTCCTCCA CCCC GCCGTG TGGGCCGTCA GACCAGTGCC
181 TTGTACATAG GCCTCCTGTG CCTGGGTGGC CTATGTAATG GGAGCTTTCC TTGTGATCTC
241 TGCACTTCCA AATAGATCCA GGCTCTTAAG AGGAGCCTGG GGCTGTACAG ACATCCACGG
301 CCGAACCCCC AGCATGGGAC AGCCACATGC GGCCAGGACG CCAACCCATC AAAGCCACAA
361 GGGCAACCTG GCAGTTCAG GTAGCCTGGA ATGATGAGTG GACGTGCTTG GGCCTSCCCT
421 TGGAGCGATG CGAAAVMGTG TCT

```

„Universal Primer-Sequenzierung“. 332 Bp des 3'-Endes des 3,3 kB Eco RI-Fragments.

```

1   GAATTCCCTG TCCACTCTGA CAACGTCGAG GTCTGAGCTG GGACCAAGAC CTCTAGAGCC
61  AATTTGTTCT TGAGGACTAG ATTCAGGGTC CCAGTGAAAT CCGTGCAGTA TTTTACCTAG
121 TTGCCACTGA CTGCAAGATT CTATTCTGGA GATGGTTTGA AACCCCTCCA CAGCTCCTGA
181 CAACACCAGG TGTGAGTTTT GTATGGGAAG GCTATCCTGA TAATGCCTAC GTCTCAGTAT
241 GCCTGTATCA ATGATAGGCA AACTAGGSCC CTTTTAAAAA GGGGGRCTTG GGGCAAAAGG
301 GAGTAGTTAT CTATAGACCT HTTGCAAGAG AG

```

5.2.8 Teilsequenzen des *Cre*^{hCRP} Konstrukts

Sequenz (1701 Bp) zusammengesetzt aus verschiedenen, überlappenden Einzelsequenzen. Position 1 - 81 umfaßt die *hCRP*-Promotersequenz (Lei *et al.*, 1985). Position 94 - 1125 umfaßt die gesamte *Cre* cDNA-Sequenz. Das ATG-Kodon der *Cre* cDNA ist unterstrichen (Pos. 94). Ein Restfragment des *Neo*-Gens (3'-Ende) reicht von Pos. 1436 bis Pos. 1598, die SV40 pA-Sequenz von Pos. 1599 bis Pos. 1664. Am 3'-Ende der Sequenz beginnt die 3'-UTR des *hCRP*-Gens (Pos. 1669 -1701).

```

1   TTATTTACAT AGTGGCGCAA ACTCCCTTAC TGCTTTGGAT ATAAATCCAG GCAGGAGGCG
61  GTAGCTCTAA GGCAAGAGAT CGCTGCAGCC GATATGTCCA ATTTACTGAC CGTACACCAA
121 AATTTGCCTG CATTACCGGT CGATGCAACG AGTGATGAGG TTCGCAAGAA CCTGATGGAC
181 ATGTTTCAGG ATCGCCAGGC GTTTTCTGAG CATACTTGA AAATGCTTCT GTCCGTTTGC
241 CGGTTCGTGG CGGCATGGTG CAAGTTGAAT AACC GGAAAT GGTTCCTCCG AGAACCTGAA
301 GATGTTTCGCG ATTATCTTCT ATATCTTTCAG GCGCGCGGTC TGGCAGTAAA AACTATCCAG
361 CAACATTTGG GCCAGCTAAA CATGCTTTCAT CGTCGGTCCG GGCTGCCACG ACCAAGTGAC
421 AGCAATGCTG TTCACTGGT TATGCGGCGG ATCCGAAAAG AAAACGTTGA TGCCGGTGAA
481 CGTGCAAAAC AGGCTCTAGC GTTCGAACGC ACTGATTTTC ACCAGGTTTC TTTACTCATG
541 GAAAAATAGCG ATCGCTGCCA GGATATACGT AATCTGGCAT TTCTGGGGAT TGCTTATAAC
601 ACCCTGTTAC GTATAGCCGA AATTGCCAGG ATCAGGGTTA AAGATATCTC ACGTACTGAC
661 GGTGGGAGAA TGTTAATCCA TATTGGCAGA ACGAAAACGC TGGTTAGCAC CGCAGGTGTA
721 GAGAAGGCAC TTAGCTGGG GGTAACTAAA CTGGTCGAGC GATGGATTTT CGTCTCTGGT
781 GTAGCTGATG ATCCGAATAA CTACCTGTTT TGCCGGGTCA GAAAAAATGG TGTTGCCGCG
841 CCATCTGCCA CCAGCCAGCT ATCAACTCGC GCCCTGGAAG GGATTTTTTGA AGCAACTCAT
901 CGATTGATTT ACGGCGCTAA GGATGACTCT GTTCAGAGAT ACCTGGCCTG GTCTGGACAC
961 AGTGCCCGTG TCGGAGCCGC GCGAGATATG GCCCGCGCTG GAGTTTCAAT ACCGGAGATC
1021 ATGCAAGCTG GTGGCTGGAC CAATGTAAT AATTGTCATGA ACTATATCCG TAACCTGGAT
1081 AGTGAAAACAG GGGCAATGGT GCGCCTGCTG GAAGATGGCG ATTAGCATTG ACGCGTAAAT
1141 GATTGCTATA ATTATTTGAT ATTTATGGTG ACATATGAGA AAGGATTTCA ACATCGACGG
1201 AAAATATGTA GTGCTGTCTG TAAGCACTAA TATTCAGTCG CCAGCCGTCA TTGTCACTGT
1261 AAAGCTGAGC GATAGAATGC CTGATATTGA CTCAATATCC CGTTGCGTTT CCTGTCAAAA
1321 GTATGCGTAG TGCTGAACAT TTCGTGATGA ATGCCACCGA GGAAGAAGCA CGGCGCGGTT
1381 TTGCTAAAGT GATGTCTGAG TTTGGCGAAC TCTTGGGTAA GGTGGAATT GTGAGGCTG
1441 GGTGTGGCGG ACCGCTATCA GGACATAGCG TTGGCTACCC GTGATATTGC TGAAGAGCTT
1501 GGCGCAATG GGCTGACCGC TTCCTCGTGC TTTACGGTAT CGCCGCTCCC GATTGCGCAGC
1561 GCATCGCCTT CTATCGCCTT CTTGACGAGT TCTTCTGAGG GGATCGGCAA TAAAAAGACA
1621 GAATAAAACG CACGGGTGTT GGGTCGTTT TTCGCATCCG TCGATTGCAG GCCTGCTCCA
1681 CCCTCCTCAG CGCCTGAGAA T

```

5.2.9 Teilsequenz des Plasmids 15-SK (Ape-Gen)

„Reverse Primer-Sequenzierung“. 729 BP des 3'-Endes von Fragment 15.

```

1   ACCTTCTCAA ATCTTAGCCT GTGATGAGGC TGGTAAGAGG TTTGCATTGA GGCTACTCAC
61  AGCAAGGCCA GTGCAGTGAC TGCCAAGAGT AAACCAAGCA AGAAGCAGCA AATACATCTC
121  TTCCTAGGAT ATCGTCTCCC AATAGATGAC CTGTGGGGAG CCAATAGAAA CTGATATTTG
181  GAATAGCCCT GTTGATTTTA TGCCACCCAC CACCCAGTCA CCAGTACAAT CCCTAACCCAC
241  TTACTACTTT CTGCAGTGAG GGCATCGTGC CAAGGTTCCG TCTGTGAATT CTGTCCACTA
301  TGGAAAAAGA AGAACAGCCA TAGAAAAGAAG GTTCTCCTCC ATGAGAACCC GAAAGCAGGG
361  GGGAGGAGGA AATTCTTTTC AGGATTTACT ACTATTCCTA GTACTTGCCCT CCTCCAGGGT
421  TTCCCAATAT CCCTCCTCAC CAGAAACGTG TTCTTGCAAT GTCCACAGAT GACCCTGACA
481  CCCATTGGCT GTGGCTCTGG ACTCAGAGGT CCTGGATGCA CAGGCCCTAG GTTGATGATT
541  CTTTTGCTAT ACAGGGGGAA AAGTATGTTT TTTAAATTTCT TAGTTCTATT TGGATCTGAT
601  GACACACTGC ATCCCAGCAC TTAGGAGGTG TAGGCAGGAT GACTAGACAT TCAAGGTGCT
661  ACTACACAGG CCTTCCTGCC TCCGCTTCTC AGGTGCTGGG ATTGAACACA GGCATGCACC
721  ACCTTGCCC

```

„Universal Primer-Sequenzierung“. 506 BP des 5'-Endes von Fragment 15. Die Sequenz stimmt mit der Region 1290 - 1795 der veröffentlichten *Ape*-Sequenz überein (Takiguchi & Chen, 1994).

```

1   TCTAGACTGG TTGCCCCCCC CCCCCCGCT TTTGGGTTAC TTAGCATATC CTCAATCCCA
61  GTAACACTT  AAGATCCAAA TGGGAGCGAG CGTTCAGCAG TTGACAGCAC ATTGTACTTC
121 CAAAGGTTCC AGTTAGGTTT CCAGCACCCC AGTCAGGTGA CTAACGGACA CTCACTCACA
181 TACAAGATTT GTTTATATTC TGCTGCTCGA ATGCCTTCTG TGTATAGCAT GTAGCACATA
241 AAATTTTAAT TTTCCACATT TCCATT CAGT GGGTAAAGGA AGAAGCACCA GATATCTTGT
301 GCCTCCAAGA GACCAAGTGC TCGGAGAACA AACTCCC GGC TGAAC TGCAA GAGCTGCCTG
361 GACTCACCCA TCAGTACTGG TCAGTCCCGT CAGACAAAGA AGGATACAGT GGTGTGGGCC
421 TACTTTCCCG CCAGTGCCCG CTAAGTCT CTTATGGCAT TGGTGAGACC TTAATGACAT
481 TCATGTCTGA ATGTTCTTCA CAAAGT

```

5.2.10 Teilsequenz des Plasmids 17-SK (*Ape*-Gen)

„Reverse Primer-Sequenzierung“. 617 BP des 3'-Endes von Fragment 17. Die Sequenz stimmt mit veröffentlichten Daten *Ape*-Gen der Maus auf ganzer Länge überein (Pos. 3105 - 3723 in D38077).

```

1   CCCAGGAGCG CCAAGGTTTT GGGAACTGCT ACAAGCTGTA CCATTGGCTG ACAGCATCCG
61  GCATCTCTAC CCCAACACAC TTTMGCTTAC ACTTCTGRA CTTACATGAT GAATGCCCGC
121 TCTAAGAATG TTGGTTGGCG CCAAGAATAM ATTTTGCTTT CCCACTCTCT TTTACCTGCA
181 TTGTGTGACA GCAAGATCCG GTCCAAGGCT CTTGGCAGTG ACCACTGTCC CATCACCCTT
241 TACCTAGCAC TGTGATACCC TCCTGCAGTA GCTTCCTGCC TGGGAGATGG CTCTCTCTGC
301 AGAAGTCTGG TGTTTTAGCC TTCAGGTGTT TGGTTTTGTA TGTGCTCCCT CATTTTAAAC
361 ATTA AACCA ACTTCTGGTT TCCTTTAGAC AATCCAAGAG AAATAAAGG CCCTACTTTC
421 AGCTTGCTT TCTTTGTCCC TTTGTGAAAA CTACATATTC CCTTTTTTCAT ACACAAAAGT
481 TGTTAAATGG GAAAGGTTAG AGTCATGACA TTATTTATTT ACAAGCACAG ATGAGTCCCT
541 AACCTCTCCC AAGACAGTGA CCCTACCTCA GCCCAGTTCA ATACTGCAAC TGGAAGTAAA
601 GTCGGAAGGA GGAATTC

```

„Universal Primer-Sequenzierung“. 648 BP des 5'-Endes von Fragment 17. Der Bereich 1-215 BP stimmt mit der Sequenz eines subklonierten Hind III-Fragments (5.2.11) (1770-1210; Abb. 46) aus dem Plasmid 39-SK überein.

```

1   GAATTCTCAC CTGAGGAATA CCGAATGGCT AAGAAGCACC TGAAAAAATG TTCAGAATCC
61  TTAATCATCA GAGAAATGCA AATCAAAATA ACCCTGAGAT TCCATCTCAC ACCAGTCAGA
121 ATGGCTAAGA TCAAAAATTC AGGTGACAGC AGATGCTGGC AAGGATGTGG AGAAAGAGGA
181 ACACCTCTCC ATTGTTGGTG GGATTGCAAG CTTGTACAAC CACTCTGGAA ATCAGTCTGG
241 CGGTTCTCTA GAAAATGGA CATAGTATAG TWTAGTACTA CTGGGGGATC CCGCAATACC
301 TCTCCTGGGC ATATATCCAG AAGATGTCCC AACCGGTAAG AAGGACACAT GCTCCACTAT
361 GTTCATAGCA GCCTTATTTG TAATGGCCAG AAGATGGAAA GAACCCAGAT GCCCTCAACA
421 GAGGAATGGA TACAAAAATG TGGTACATTT ACACAGGGAG TACTACTCAG CTATTTAAAG

```

```

481  AATGATTTTT TGAWTTCCTA GGCAAATGGT TGGACCTGGA GGGCATCATC CTGAGTGAGG
541  TAACACAATC ACAAAGAAC TCAAATGATA TGTACTCACT GATAAGTGGA TATTAGCTTA
601  GAAACTTAGT ATACCCGATA TATAAGGTAC ATTTTGAAAA CACATGAA

```

5.2.11 Teilsequenzen des Plasmids 39-SK. (Ape-Gen)

„Universal Primer-Sequenzierung des 3'-Endes von Fragment 39 (735 BP).

```

1      GGGTACGGGC CCCCCTCGA GGTCGACGGT ATCGATAAGC TTGATATCGA ATTCCTGCAG
61     CCCGGGGGAT CCACTAGTTC TAGAGCTCGC GGCCGCGACG TCTAATACGA CTCACTATAG
121    GCGCTCGACT CGATCAAGTA AACGATCTAA CAGTCCCATA TCCCCTAAAG AAATAGAAGC
181    AGTCATTAAT AGTCTCCCAG CCAAAAAAAG CCCAGGACCA GATGGGTTTA GTGCAGAGTT
241    CTATCAGACT TTCAAAGAAG ATCTAATTCC AGTTCTGCAC AAATATTTCC ACAAATAGA
301    AGTAGAAGGT ACTCTACCCA ACTCATTATA TGAAGCCACA ATTACTCTGA TACCTAAAGC
361    ACAGAAAGAT CCAACAAAGA TAGAAAATT CAGACCAATT TCTCTTATGA ATATCGATGC
421    AAAAAATCCTT AATAAAATTC TCGCTAACCG AATTCAAGAA CACATTAAG CAATCATCCA
481    TCCTGACCAA GTAGGTTTTA TTCCAGGGAT GCAGGGATGG TTTAATATAC GGAAATCCAT
541    CAACGTAAATC CATTATATAA ACAAATCAA AGACAAAACC ACATGATCAT CTCGTTAGAT
601    GTGGAAAAAAG CATTGACAA GATCCAACAC CCATTCATGA TAAAAGTCTT GGAAAGATCA
661    GGATTCAGGC CCATACTAAA CATGATAAAA GCATCTACAG CAAACAGTAG CCACATCAAG
721    GTAATGGTGA GAAGCTGGAA GCAATTCAC TAA

```

„Reverse Primer-Sequenzierung“ eines subklonierten Hind III-Fragments (1770-2120; Abb. 46).

```

1      AAGCTTCTTC AAGGCAAAAG ACACTGTCAA TAAGACAAAA AGGCCACCAA CAGATTGGGA
61     AAGGATCTTT ACCTATCCTA AATCAGATAG GGGACTAATA TCCAACATAT ATAAAGAACT
121    CAAGAAGGTG GACTCCAGAA AGCCAAATGA CCCCATTAAG AAATGGGGCT CAGAGCCAAA
181    CAAAGAATTC TCACCTGAGG AATACCGAAT GGCTAAGAAG CACCTGAAAA AATGTTTCTG
241    ATCCTTAATC ATCAGAGAAA TGCAAATCAA AATAACCTTG AGATTCATC TCACACCAGT
301    CAGAATGGCT AAGATCAAAA ATTCAGGTGA CAGCAGATGC TGGCAAGGAT GTGGAGAAAG
361    AGGAACACTC CTCCATTGTT GGTGGGATTG CAAGCTT

```

5.3 Plasmidkarten

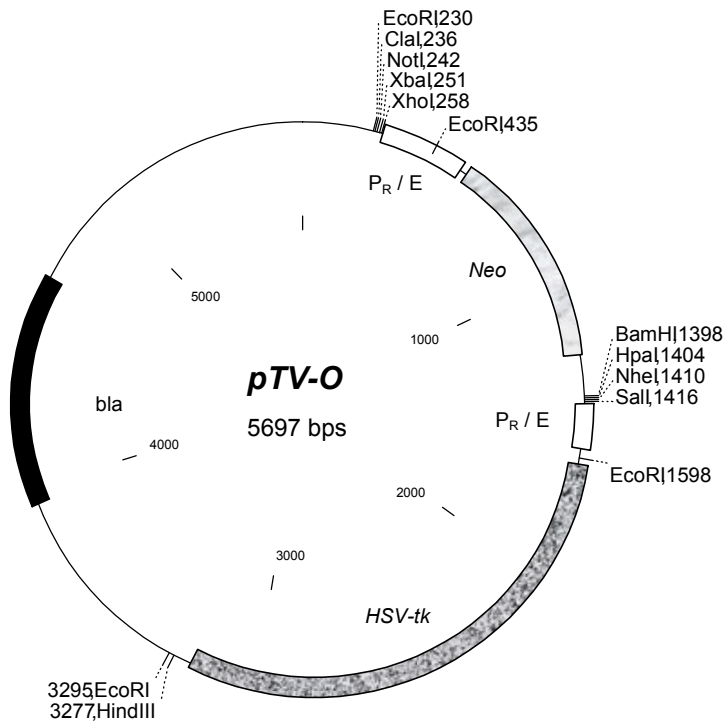


Abb. 49: **Plasmidkarte des Vektors pTV-O.** Das Plasmid enthält eine *neo*- und eine *HSV-tk1*-Kassette zur Positiv- und Negativ-Selektion von Eukaryontenzellen. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. R. Kühn (Institut für Genetik, Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt.

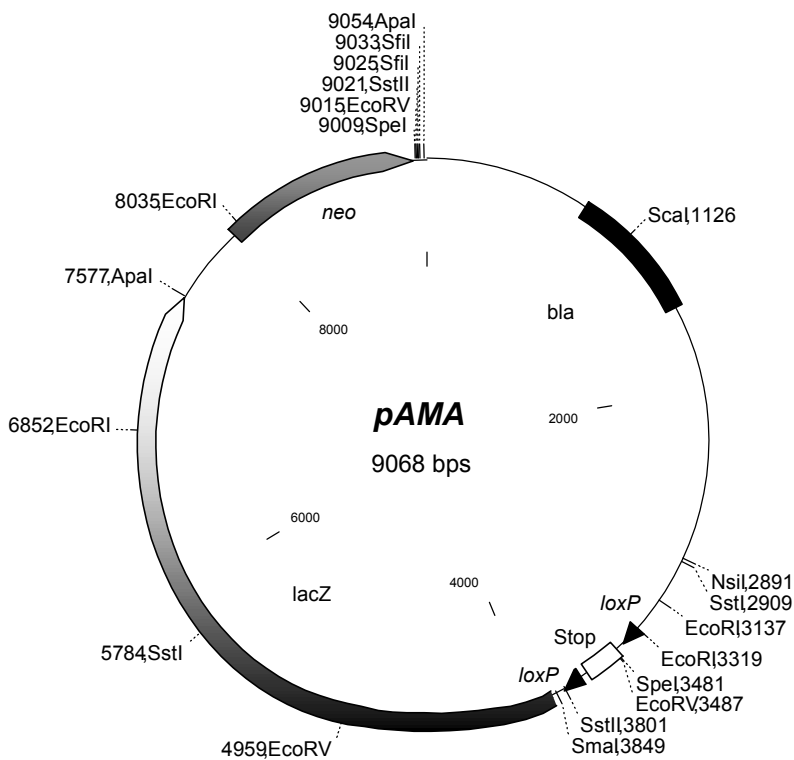


Abb. 50: **Vektorkarte des Plasmids pAMA.** Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. F. Sablitzky (University College, London) zur Verfügung gestellt (Zhang *et al.*, 1996).

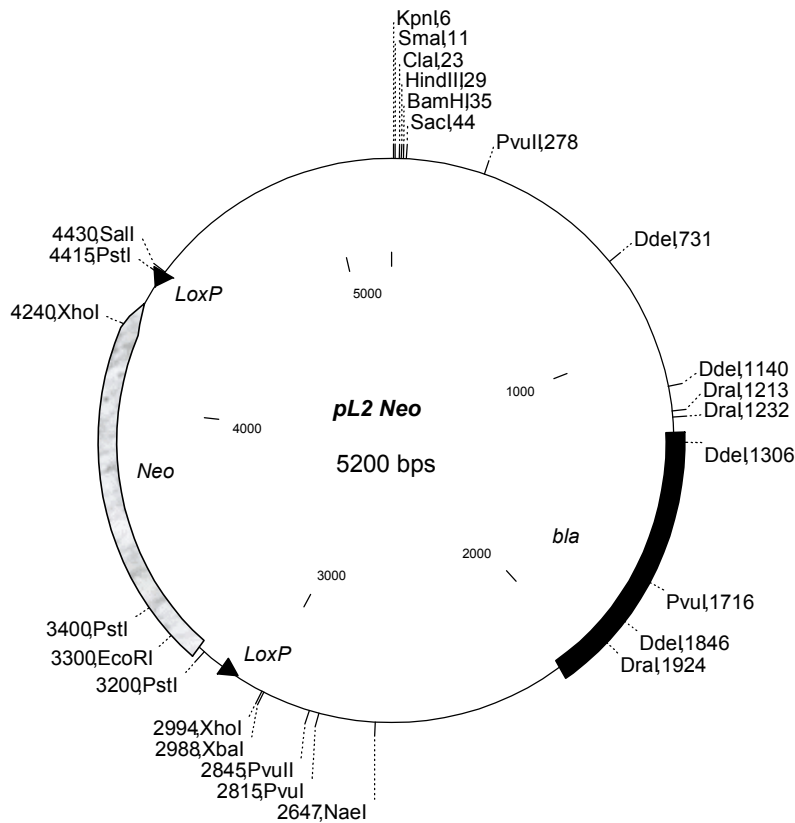


Abb. 51: **Vektorkarte des Plasmids pL2-Neo**. Das Plasmid enthält eine *neo*-Kassette mit dem *HSV-tk1* Promoter, dem Polyoma Enhancer, sowie einer SV 40 pA-Sequenz, flankiert von zwei *loxP*-Sequenzen. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. R. Kühn (Institut für Genetik, Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt.

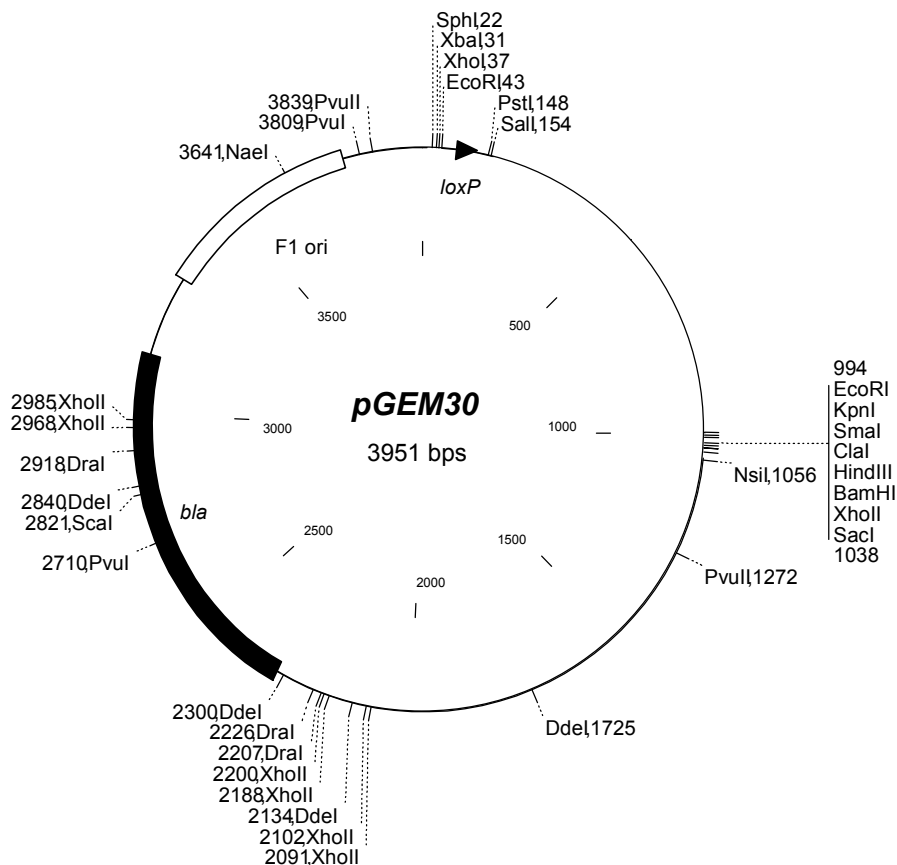


Abb. 52: **Vektorkarte des Plasmids pGEM30**. In diesem Plasmid ist eine *loxP*-Sequenz enthalten. Es wurde freundlicherweise von Dr. R. Kühn (Institut für Genetik, Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt.

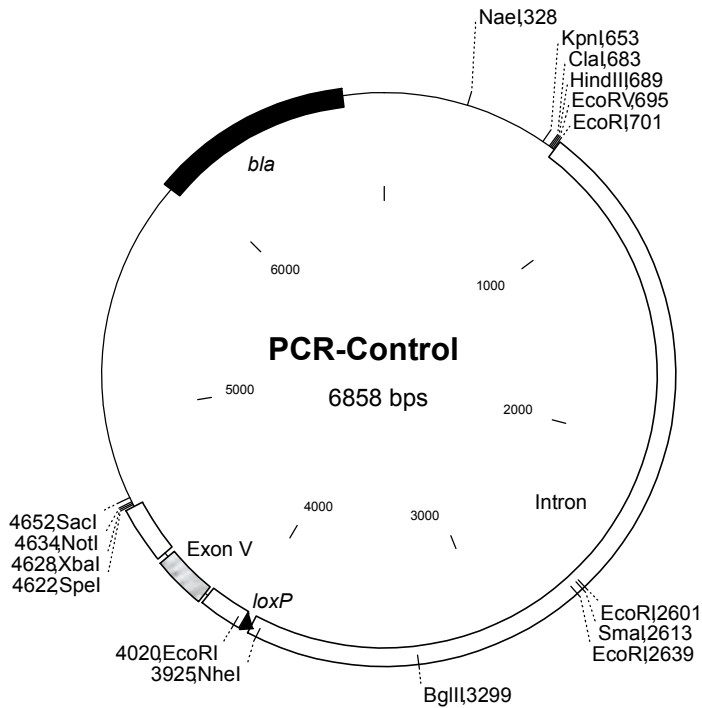


Abb. 53: **PCR Kontroll-Vektor.** Dieses Plasmid dient als Positivkontrolle für die Suche nach 3'-homolog rekombinanten ES-Zell-Klonen mit Hilfe der PCR; d. h. hier liegt der *MGMT*-Locus so wie nach erfolgter Rekombination vor. Dazu wurde ein 1,9 kB-Eco RI Fragment aus dem Phagen 8.12, das 3' vom 4,5 kB Eco RI Fragments (Abb. 12) liegt, in den Vektor 1,9-SK (4.3.1) kloniert (Sma I, Cla I).

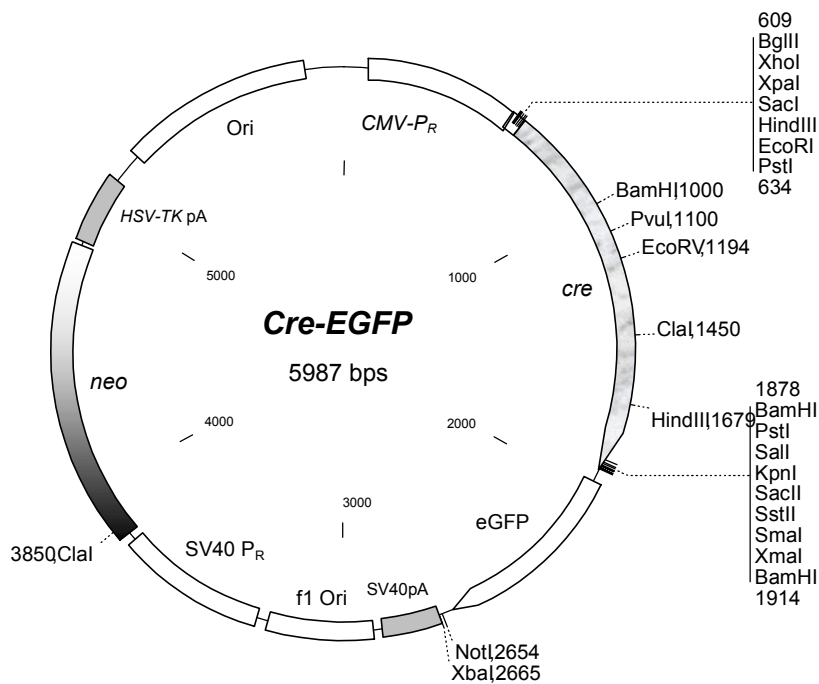


Abb. 54: **Vektorkarte des Plasmids pCre-EGFP.** Expressionsvektor für die Cre-Rekombinase. Die Cre-kodierende Sequenz wurde aus dem Plasmid pIC-Cre (Torres & Kühn, 1997b) als Pst I Fragment in die Pst I-Stelle im Leseraster des Plasmids pEGFP-N1 (Stratagene) kloniert. Im Plasmid pEGFP-N1 wird die Transkription von dem humanen CMV-Promoter kontrolliert. Dadurch wird eine stärkere Cre Expression erreicht als durch den *HSV-tk1*-Promoter des Plasmids pIC-Cre.

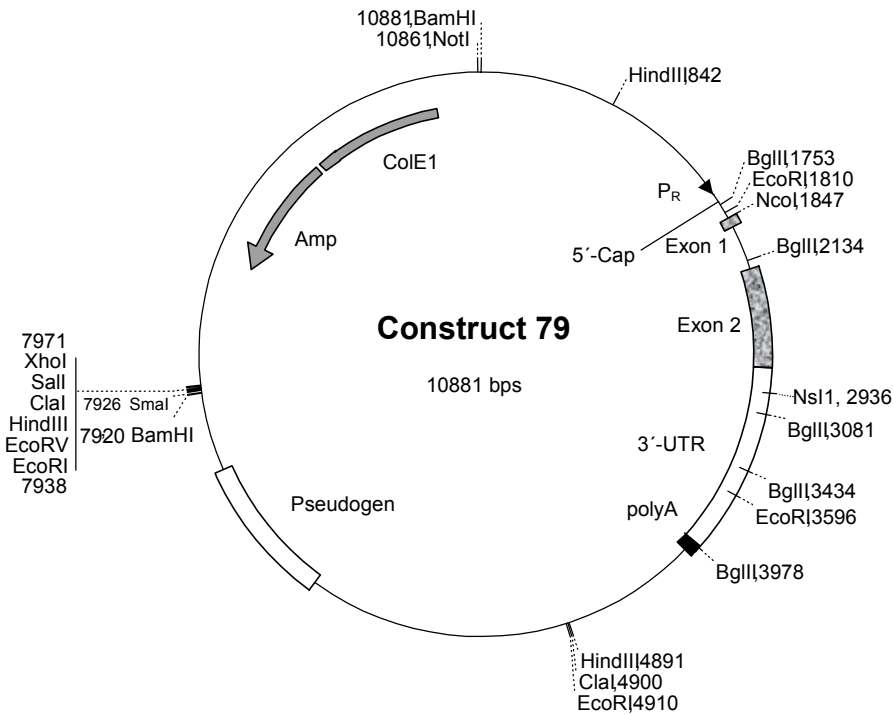


Abb. 55: **Plasmidkarte von Konstrukt 79.** Das Plasmid enthält ein 1,7 kB großes 5'-Fragment und ein 3,8 kB großes 3'-Fragment des *hCRP* Gens, sowie das *hCRP* Gen (Murphy et al., 1995). Es wurde freundlicherweise von Prof. U. Rütter (Zentrum Laboratoriumsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

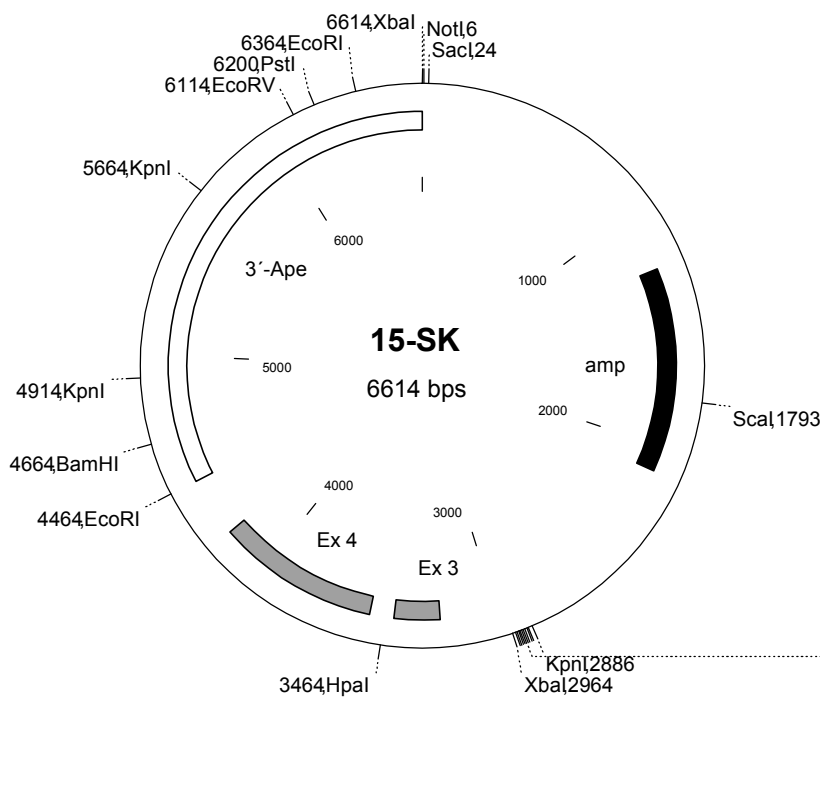


Abb. 56: **Vektorkarte des Plasmids 15-SK:** Das Plasmid enthält ein 3,6 kB Xba I-Fragment des *Ape*-Gens. Es umfasst die Exons 3 und 4 (grau) und einen 2,5 kB großen, nicht kodierenden 3'-Bereich.

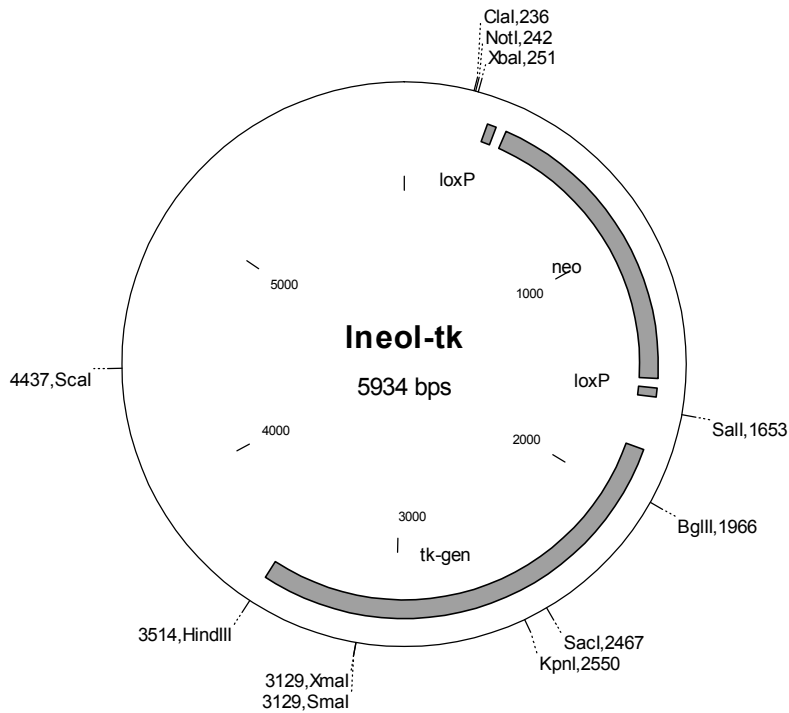


Abb. 57: **Vektorkarte des Plasmids I Neo I-tk.** Zur Klonierung dieses Plasmid wurde aus dem Plasmid pTVO (Abb. 49) die *Neo*-Kassette entfernt (Xba I, Sal I) und durch die „floxed“ *Neo*-Kassette aus dem Plasmid pL2Neo (Abb. 51) ersetzt.

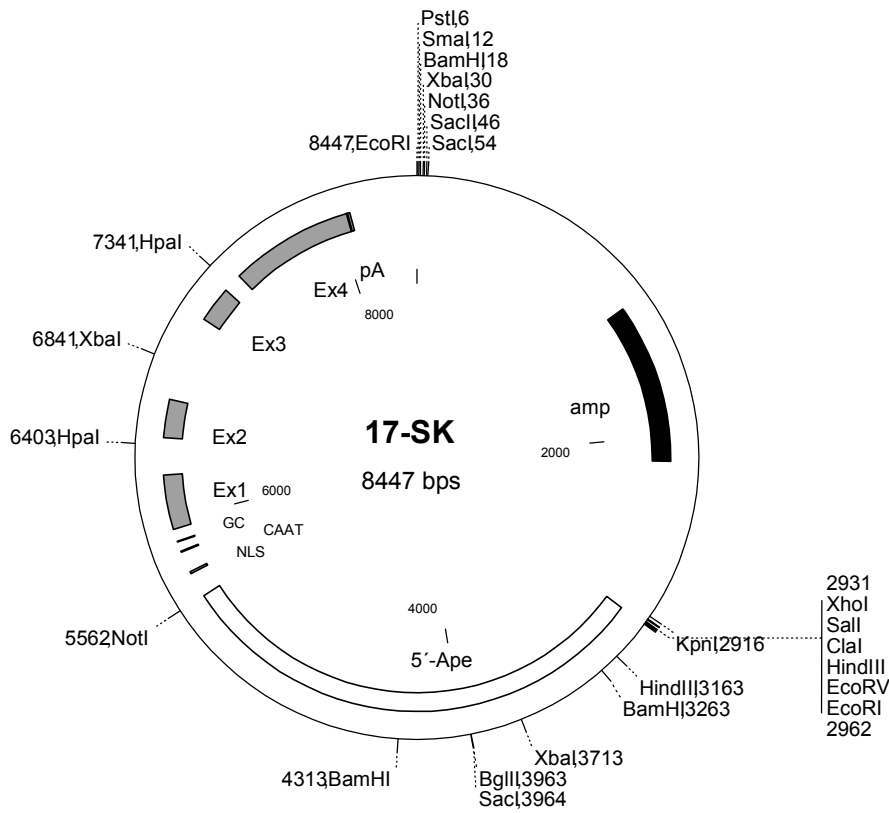


Abb. 58: **Vektorkarte des Plasmids 17-SK.** Das Plasmid enthält ein 5,5 kB Eco RI-Fragment des *Ape*-Gens der Maus. Das Fragment umfaßt einen 2,5 kB großen 5'-Bereich sowie die komplette kodierende Region einschließlich der Polyadenylierungssequenz. Die Exons sind grau unterlegt. GC, GC-reiche Region. CAAT, CAAT-Sequenzmotiv. NLS, Kernlokalisations-Signal.

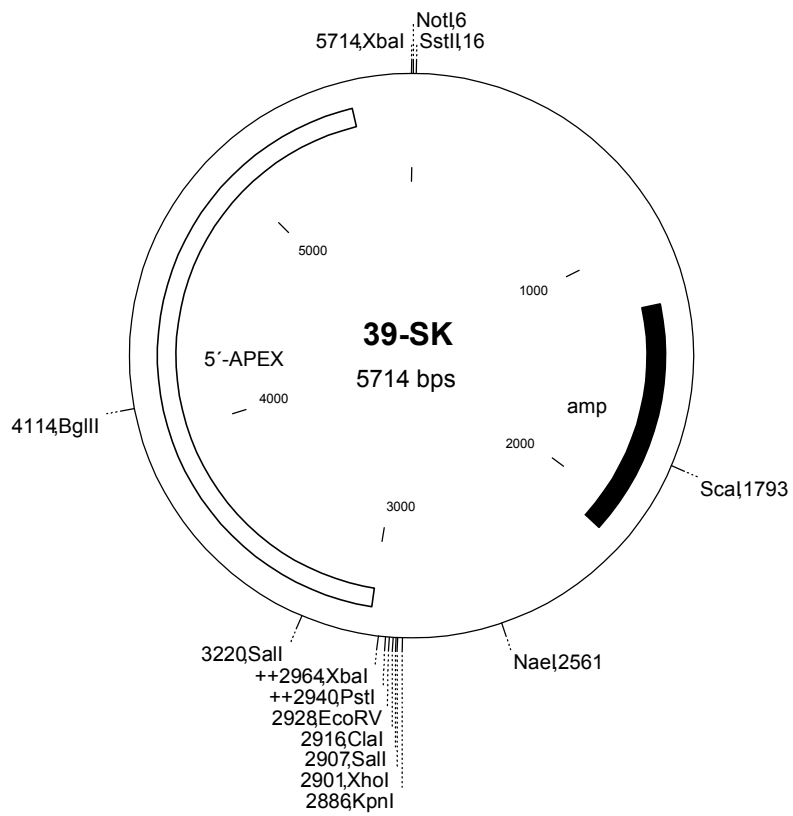


Abb. 59: **Vektorkarte des Plasmids 39-SK.** Das Plasmid enthält ein 2,5 kB großes Xba I-Fragment aus dem 5'-Bereich des Ape-Gens.

5.4 Material

5.4.1 Chemikalien

Chemikalien (\geq p.a. Grad) wurden von der Firma Merck bezogen, mit Ausnahme von:

Ammoniumsulfid (Sigma)
Aprotinin (Boehringer-Mannheim)
„Blocking-Reagent“ (Boehringer-Mannheim)
Chloroform (Baker)
dATP, dCTP, dGTP, dTTP bzw. dNTP-Gemisch (Pharmacia)
N, N-Diethylnitrosamin (Sigma)
N, N-Dimethylnitrosamin (Sigma)
DNA-Agarose (Biozym)
Ethidiumbromid (Serva)
Fluoreszein Digalaktosid (Molecular Probes)
Ganciclovir („Cymeven“; Syntex)
Geneticin („G 418“; Sigma)
Glukose-6-Phosphat (Sigma)
Glutardialdehyd (Sigma)
Hexanukleotidgemisch / Puffer (Boehringer-Mannheim)
2-Methyl-2-Butanol (Sigma-Aldrich)
N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (Serva)
N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (Serva)
„NuSieve 3:1“-Agarose (Biozym)
Paraffinöl („Embryo getestet“) (Sigma)
Pefabloc (Boehringer-Mannheim)
Perfusionslösung (Gibco)
O⁶-Benzylguanin (synthetisiert von Dipl.-Ing. W. Drosdziok, IFZ, Essen)
„Rad-Free Blockier-Reagenz“ (Schleicher & Schuell)
Rinder-Serumalbumin (BSA; DNase-frei; Boehringer-Mannheim)
„RNAGuard“ (Pharmacia)
TEMED (Bio-Rad)
[2,2,2]-Tribromethanol (Sigma-Aldrich)

5.4.1.1 Alkylierende Agenzien

N-Alkyl-N-Nitrosoharnstoffe wurden zur Reinigung dreimal umkristallisiert (Dipl.-Ing. W. Drosdziok, IFZ, Essen) und anschließend in wasserfreiem DMSO gelöst. Die Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt (**EtNU**: $\epsilon_{236 \text{ nm}} = 6400 \text{ cm}^3 / \text{Mol}$; $M_W = 117,1 \text{ g} / \text{L}$ [CAS: 759-73-9]; **MeNU**: $\epsilon_{231 \text{ nm}} = 7280 \text{ cm}^3 / \text{mol}$; $M_W = 103 \text{ g} / \text{L}$ [CAS: 684-93-5]). Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

Die Dialkylnitrosamine N, N-Diethylnitrosamin und N, N-Dimethylnitrosamin wurden in PBS gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. (**DEN**: $\epsilon_{230\text{ nm}} = 6534,4$; $M_W = 102,1\text{ g / L}$ [CAS: 55-18-5]; **DMN**: $\epsilon_{230\text{ nm}} = 7780,5$; $M_W = 74,1\text{ g / L}$ [CAS: 62-75-9]). Die Stammlösungen wurden bei 4°C gelagert.

5.4.1.2 O⁶-Benzylguanin

O⁶-Benzylguanin wurde von Dipl.-Ing. W. Drosdziok (IFZ, Essen) synthetisiert und bei -20°C in wasserfreiem DMSO gelagert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt ($\epsilon_{281\text{ nm}} = 8315$; $M_W = 241,3\text{ g / L}$).

5.4.2 Radiochemikalien

[³²P]-markierte Verbindungen

α -[³²P]-dATP (spez. Akt. 3.000 Ci/mmol; Amersham)

γ -[³²P]-ATP (spez. Akt. > 5.000 Ci/mmol; Amersham)

[³⁵S]-markierte Verbindungen

[³⁵S]-Streptavidin (200 - 2.000 Ci/mmol; Amersham)

[³H]-markierte Kalbsthymus DNA

Wurde von Dr. J. Engelbergs (Arbeitsgruppe I des IFZ) zur Verfügung gestellt.

5.4.3 Enzyme

„Shrimp“ alkalische Phosphatase (Boehringer-Mannheim); „Ampli Taq“ (Rekombinante Taq-DNA-Polymerase; Perkin-Elmer); Pfu-Polymerase (Stratagene); Restriktionsenzyme (MBI Fermentas); DNase I („FPLC pure“; Pharmacia); Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Boehringer-Mannheim); M-MLV Reverse Transkriptase (Gibco BRL); Phosphodiesterase (Boehringer-Mannheim); Proteinase K (Merck); RNase A (Boehringer-Mannheim); RNase T1 (Boehringer-Mannheim); T4-Polynukleotid-Kinase (Boehringer-Mannheim); Kollagenase („Hepatocyte qualified“) (Gibco).

5.4.4 Antikörper

Anti-Maus Ig (Schaf) - Biotin-Konjugat (Amersham); Anti-Maus IgG [F(ab)₂]-Fragment (Ziege) - Rhodamin [TRITC]-Konjugat [F(ab)₂] (Dianova); Anti-Kaninchen Ig – Peroxidase Konjugat (New England Biolabs); Anti-Cre IgG (Maus) (Babco), Anti-β-Galaktosidase (Maus) (Boehringer-Mannheim); Anti-FITC [F(ab)₂]-Fragment (Kaninchen) – Alexa 488 Konjugat (Molecular Probes); Anti-Maus (Ziege) Alexa 488 Konjugat (Molecular Probes); Anti-Kaninchen (Ziege) Alexa 488 Konjugat (Molecular Probes); MF-1, affinitätsgereinigtes, polyklonales Antiserum gegen MGMT N-Terminus der Maus (Kaninchen) (Kawate *et al.*, 1995). Die Antikörper wurden freundlicherweise von Prof. M. Sekiguchi (Fukuoka Dental College, Fukuoka, Japan) zur Verfügung gestellt.

MAK mit hoher Affinität und Spezifität für definierte Alkylierungsprodukte in einzel- oder doppelsträngiger DNA wurden seit 1978 am IFZ entwickelt (Rajewsky *et al.*, 1980; Adamkiewicz *et al.*, 1982; Adamkiewicz *et al.*, 1985) und in folgenden immunanalytischen Verfahren eingesetzt (Übersicht bei (Thomale *et al.*, 1996)):

Methode ⁽¹⁾	Alkylierte Base	MAK ⁽²⁾	MAK-Affinitäts-Konstante ⁽³⁾	Nachweisgrenze ⁽⁴⁾
ISB	O ⁶ -Ethylguanin	EM-21 (EM-2-3)	2,4 x 10 ¹⁰ (1,1x10 ¹⁰)	~ 3 x 10 ⁻⁷
	O ⁶ -Methylguanin	EM-2-3 (EM-21)	4,0 x 10 ⁸ (1,1x10 ⁹)	~ 2 x 10 ⁻⁶
ICA	O ⁶ -Ethylguanin	EM-2-3	1,1 x 10 ¹⁰	n.b.

ISB (Nehls *et al.*, 1984): Nachweis der Basenmodifikation in isolierter einzelsträngiger DNA; ICA (Adamkiewicz, 1985; Adamkiewicz *et al.*, 1985; Seiler *et al.*, 1993): Nachweis der Basenmodifikation in der partiell denaturierten Kern-DNA individueller Zellen; **(2)** Zur Herstellung, Nomenklatur und Charakterisierung der Anti-Alkyl-Desoxynukleosid MAK siehe z.B. (Eberle, 1989). **(3)** Mit Hilfe des kompetitiven RIA bestimmte Affinitätskonstante (k_A , l/Mol) für die MAK-Bindung an das entsprechende Alkyl-Desoxynukleosid (hier: O⁶-Methyl-2'-Desoxyguanosin, O⁶-MedGuo; O⁶-Ethyl-2'-Desoxyguanosin, O⁶-EtdGuo). **(4)** Nachweisgrenze für die entsprechende Basenmodifikation (molares Verhältnis modifizierte Base / normale Base). Die angegebenen Nachweisgrenzen entsprechen in dieser Arbeit gemessenen Werten. n.b., nicht bestimmt.

5.4.5 DNA Größen- bzw. Proteinmolekulargewichts-Standards

- DNA-Standard M 15: Fragmentgrößen (Bp): 14140, 8453, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702. (MBI Fermentas).
- DNA-Standard M 16: Fragmentgrößen (Bp): 19329, 7743, 6223, 4254, 3472, 2690, 1882, 1489, 925, 421. (MBI Fermentas).
- DNA-Standard 1 kB: Fragmentgrößen (Bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 (MBI Fermentas)
- Protein-Standard: Molare Massen (kDa): 6,5 / 14,2 / 20,1 / 45
(Low Range Color Marker, Sigma)

5.4.6 Puffer und Lösungen

5.4.6.1 Puffer und Lösungen für die Biochemie

Puffer	pH	Zusammensetzung
Alkylierungs-	7,3	25 mM Hepes in PBS ⁺⁺
Block-	7,5	1 % (w/v) „Rad Free Blockier-Reagenz“ in PBS-Puffer (s.u.)
APS-		10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in H ₂ O dest.
Erststrang-	8,3	50 mM Tris-HCl; 75 mM KCl; 10 mM DTT; 3 mM MgCl ₂
Färbelösung	7,3	PBS ⁻ ; 10 mM Hepes; 4 % Kälberserum
G6Phosphat, Bleinitrat-	6,5	100 mM Tris-Maleat (pH 6,5 mit NaOH); 0,5 mg / ml Glukose-6-Phosphat; 0,13 % Bleinitrat-Lösung (tropfenweise 2%ige Lösung zugeben)
Ligations-	7,5	50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 0,5 mM ATP
Kinase-	7,6	10 mM Tris-HCl; 2 mM ATP; 5 mM DTT; 10 mM MgCl ₂
Klenow-	7,2	50 mM Tris-HCl; 10 mM MgSO ₄ ; 0,1 mM DTT; 0,05 mg/ml BSA
PBS ⁻	7,2	8,1 mM Na ₂ PO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl
Perfusions- lösung	7,35	L15 Leibovitz; 100 U / ml Collagenase H (Gibco); 10 mM Hepes; 0,55 g / L CaCl ₂
Perfusions-Spül- Lösung	7,2	Gibco (No. 17701) + 10 U / ml Heparin
PCR-		Jeweiliger Herstellerpuffer
PNK-	8,0	50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 5 mM DTT; 0,5 mg/ml BSA
Semi-Dry Blot-	8,3	0,3 % (w / v) Tris-Base; 1,44 % (w / v) Glycin; 15 % (v / v) Methanol
SSC-	7,2	0,015 M Tri-Natriumcitrat; 0,15 mM NaCl
TAE-	7,8	40 mM Tris-HCl; 10 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA
TBS-	7,5	10 mM Tris-HCl; 140 mM NaCl
TE-	7,5	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA
Transfektions-	7,0	20 mM Hepes, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na ₂ HPO ₄ , 6 mM Dextrose, 0,1 mM β-Mercaptoethanol (Thomas & Capecchi, 1987).

Lösungen	pH	Zusammensetzung
Denhardt's-		1 % (w/v) Ficoll; 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon; 1 % (w/v) BSA
Hochsalz- Extraktions-	8,2	10 mM Tris-HCL; 400 mM NaCl; 0,5 % SDS, 2 mM EDTA; 150 µg/ml Proteinase K (DNase frei)
MGMT-Aktivitäts-	7,8	70 mM Hepes-KOH, 1 mM DTT, 5 mM EDTA
Mikrotiter- Extraktions	7,5	10 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5 % Sarcosyl, 1 mg/ml Proteinase K (Dnase frei)
Protein- Extraktions-	8,5	20 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, 5 % Glycerin, 1 µg / ml Aprotinin, 4 mM Pefabloc
Western-	8,0	50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl
Western-Block-	7,5	10 mM Tris-HCL, 0,9 % NaCl, 0,05 % Tween 20, 5 % BSA

5.4.6.2 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Lösungen	pH	Zusammensetzung
100 x Vitamine für konditioniertes Medium	7,4	280 µg/ml Cholinchlorid; 280 µg/ml Folsäure; 504 µg/ml Inosit; 280 µg/ml Nicotinamid; 280 µg/ml Pantothersäure; 28 µg/ml Riboflavin; 280 µg/ml Thiamin in PBS ⁻
5 x ATV-Trypsin-	7,6	8 g/L NaCl; 400 mg/L KCL; 1 g/L Glukose; 580 mg/L NaHCO ₃ ; 200 mg/L Na ₂ EDTA; 500 mg/L Trypsin (Sigma Typ XI, Nr.: T 1005) in H ₂ O.
EDTA / Saline	7,2	8 g/L NaCl; 1,15 g/L Na ₂ HPO ₄ ; 0,2 g/L EDTA; 0,2 g/L KCL; 0,2 g/L KH ₂ PO ₄ ; 0,2 g/L Glukose; 0,01 g/l Phenolrot
Trypsin / EDTA	7,2	1 Vol. 5 x ATV-Trypsin + 4 Vol. EDTA / Saline
Gelatine		0,1 % (w/v) in H ₂ O, Sigma Typ I (Nr. G-2500); autoklaviert
BRL-Medium	7,2	DMEM ohne FKS; 50 µM β-Mercaptoethanol; 1 mM NaPyruvat; 2 mM L-Glutamin; 50 µg/ml Penicillin und Streptomycin
EF-Medium	7,2	DMEM (4,5 g/L Glukose), 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Penicillin und Streptomycin
Einfriermedium	7,2	65 % DMEM, 25 % FKS, 10 % DMSO
PB-1	7,2	9 g/L NaCl, 11,48 g/L KCl, 55,1 g/L Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O, 20,96 g/L KH ₂ PO ₄ , 11,62 g/L CaCl ₂ ·2 H ₂ O, 31,31 g/L MgCl ₂ , 0,2 g/l Na-Pyruvat, 50 µg/ml Penicillin, 1 g/L Glukose, 0,001% Phenolrot, 10 % FKS
ES-Medium	7,2	60 % BRL-konditioniertes Medium; 0,1 mM Nicht ess. Aminosäuren; 2 mM L-Glutamin; 1 x Vitamin-Lösung; 25 % DMEM (4,5 g/L Glukose); 12,5 % FKS; 50 µM β-Mercaptoethanol; 1 mM NaPyruvat; 50 µg/ml Penicillin und Streptomycin

5.4.7 Kits

- „Lambda Fix II Library (Nr. 946308) (Stratagene)
- „Lambda Maxi Kit“ (Qiagen)
- „Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen)
- „Bio-Rad Protein Assay“ (Bio-Rad)
- „BM-Cyclin-Kit“ (Boehringer-Mannheim)
- „Mycoplasma Detection Kit“ (Boehringer-Mannheim)
- „QIAEX II Kit“ (Qiagen)
- „QIAquick PCR Purification Kits“ (Qiagen)
- „RNeasy Total RNA Kit“ (Qiagen)

„SybrGreen-Assay“ (Molecular Probes)

„Tri-Fast Kit“ (PeqLab)

5.4.8 Geräte und technisches Zubehör

5.4.8.1 Geräte

DNA-Sequenziergerät „Automated Laser Fluorescent (A.L.F.)™ DNA Sequencer“ (Pharmacia);

„DNA Thermal Cycler 2400“ (Perkin-Elmer);

Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer „Liquid Scintillation Counter Wallac 1410“ (Pharmacia);

„Image Plate Reader“ BAS 1500 (Fujitsu);

Mikrotom „2800 Frigocut“ (Reichert-Jung);

„Multicyler PTC 200“ (MJ Research);

Multipette Biohit Proline 250;

Semi-Dry Blotter (Bio-Rad);

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);

„Slot Blot“-Apparatur „Minifold II Mehrfachfiltrations-Gerät“ (Schleicher & Schuell);

Spektralphotometer „Modell 150-20“ (Hitachi);

Überkopfschüttler „Rotator Drive STR4“ (Stuart Scientific);

Ultraschall-Desintegrator „B 12“ (Branson);

Ultraturrax T 25 (Janke & Kunkel)

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)

5.4.8.2 Technisches Zubehör

„BA85“-Nitrozellulose (NC) -Membran (Porengröße: 0,45 µm; Schleicher & Schuell);

„Chemolumineszenz-Substratsheets“ („Rad-Free“; Schleicher & Schuell);

Chromatographie Säulen „Bio-Spin 6“ und „Bio-Spin 30“ (Bio-Rad);

Filterpapier „3MM“ (Whatman)

Glaskugeln (NeoLab)

Immobilon P (PVDF) -Membran (Millipore)

Mikrotiterplatten (Nunc)

Nylonmembran „Hybond N+“ (Amersham);

Nylonmembran „NY13N“; Porengröße 0,45 µm² (Schleicher & Schuell);

Röntgenfilme für die [³⁵S]-Detektion: „Biomax MR1“ (Kodak);

Röntgenfilme für die [³²P]-Detektion: „New RX Medical X-Ray Film (Fuji).
 „Sterilfilter-Tips“ (Biozym);
 Zellkulturschalen („Primaria“; Falcon);

5.4.9 PC-Programme

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung von Meßdaten wurde das PC-Programm „Sigma Plot“ (Version 1.01; Jandel Scientific) verwendet. DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des PC-Programms „Clone“ (Version 4; Scientific & Educational Software) bzw. DNASIS (Version 7.0) analysiert. Die Auswahl von PCR-Primern und Hybridisierungs-Oligonukleotiden erfolgte über das Programm „Oligo“ (Version 4.1; National Biosciences). Die Quantifizierung radioaktiver Signale erfolgte mit Hilfe des Programms „TINA“ (Version 2.09; Raytest).

5.4.10 Bakterienstämme

Sämtliche Bakterienstämme wurden von Stratagene bezogen. Plasmide mit mehr als einer *LoxP*-Stelle konnten effizient nur in „SURE“ kloniert werden, da dieser Stamm keine homologe Rekombination durchführt. Im einzelnen:

Bezeichnung	Verwendung	Genotyp
XL1-MRA (P2)	Phagen-Amplifikation und -Klonierung	$\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdMR-mrr})173$, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>
XL1-Blue	Plasmid-Amplifikation und -Klonierung	<i>RecA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyr96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [<i>F'</i> proAB, <i>lacI</i> ^q ZDM15, Tn10 (<i>tet</i> ^r)]
SURE	Klonierung aller Vektoren mit <i>loxP</i> -Stellen, sowie deren Amplifikation	<i>e14-(mcrA)</i> , $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})171$, <i>sbcC</i> , <i>recB</i> , <i>recJ</i> , <i>umuC::Tn5 (kan^r)</i> , <i>uvrC</i> , <i>supE44</i> , <i>lac</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>endA1</i> , [<i>F'</i> proAB, <i>lacI</i> ^q ZDM15, Tn10, (<i>tet</i> ^r)]

5.4.10.1 Nährmedium zur Plasmid-Amplifikation

Flüssigmedium zur Anzucht von *E. coli*: 0,5 % Hefe-Extrakt, 1 % NaCl, 1 % Trypton. Für die Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme auf Antibiotikaresistenz wurde Ampicillin [60 µg / ml] bzw. Kanamycin [25 µg / ml] eingesetzt.

5.4.11 Zelllinien

Maus ES-Zelllinie E 14-1: Die verwendete ES-Zelllinie E 14-1 der Maus (Kühn *et al.*, 1991) ist eine Sublinie der Linie E 14 (Hooper *et al.*, 1987) mit dem Genotyp 129 / Ola. Sie wurde

freundlicherweise von Dr. R. Kühn (Institut für Genetik, Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt.

BRL-Zellen: Die „Buffalo rat liver“ Zelllinie ist eine Hepatomlinie der Ratte, die einen Dedifferenzierungsfaktor sezerniert, den sog. Leukämie Inhibitionsfaktor (LIF), der bei murinen ES-Zellen den Verlust der Pluripotenz durch Differenzierung verhindert (Smith & Hooper, 1987). Die Zell-Linie wurde von der „American Type Culture Collection“ bezogen (ATTC-Nr.: CRL-1442).

5.4.12 Versuchstierstämme

Die „knockout“ Maus-Linie IL-4 (Kühn et al., 1991) wurde freundlicherweise von Dr. R. Kühn (Institut für Genetik, Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt. Alle anderen Stämme wurden von der Firma Harlan-Winkelmann bezogen.

5.4.13 Nukleotid-Sequenzen

Die Sequenzen wurden, wenn nicht selbst durch Sequenzierung ermittelt, der „National Center for Biotechnology Information (NCBI) Nucleotide Database“ der National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA) mit Hilfe des „NCBI WWW-Entrez Browser“ (Internet-Adresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/nucleotide.html>) entnommen.

5.4.14 DNA Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech bezogen.

5.4.14.1 PCR „Primer“ zur DNA Amplifikation

Gen	Primer	Lage	Sequenz (5' - → - 3')	Beschreibung
<i>MGMT</i>	Bam 3,3 kB-5'	77-101 (p3,3-SK; 5.2.7)	GTA TCG ATA GCA ATC GCA TCG CAT G	Nachweis des deletierten Allels
<i>MGMT</i>	Intron V AGT 2	289-264 (p4,5 Eco RI-SK; 5.2.5)	GCC TTC CTC GCT CAC CCC CAT TTT AA	
<i>MGMT</i>	DIG-Intron V	289-264 (p4,5 Eco RI-SK; 5.2.5)	DIG -GCC TTC CTC GCT CAC CCC CAT TTT AA	Nachweis des deletierten Allels (<i>in situ</i>).
<i>MGMT</i>	DIG-Bam 3,3 kB	77-101 (p3,3-SK; 5.2.7)	DIG -GTA TCG ATA GCA ATC GCA TCG CAT G	
<i>MGMT</i>	Ex5 Invers	574-599 (M84524)	AAG GGC TTG GGT CTG ACT GGG ACC TG	Nachweis des „floxed“ Allels.
<i>MGMT</i>	Intron V AGT 2	289-264 (p4,5 Eco RI-SK; 5.2.5)	GCC TTC CTC GCT CAC CCC CAT TTT AA	
<i>MGMT</i>	DIG Invers	574-599 (M84524)	DIG -AAG GGC TTG GGT CTG ACT GGG ACC TG	Nachweis des „floxed“ Allels (<i>in situ</i>)
<i>MGMT</i>	DIG-Intron V	289-264 (p4,5 Eco RI-SK; 5.2.5)	DIG -GCC TTC CTC GCT CAC CCC CAT TTT AA	
<i>Cre</i>	Cre-anti	1024-1001 (X03453)	CTA GGA CCG TTA AAG CCG ATA TGC	Nachweis des Cre ^{hCRP} -Transgens
<i>hCRP</i>	hCRP-Prom.	74-97 (M11880)	CCC CAA CAA GCA ATG TTG GAA AAT	
<i>β-Aktin</i>	DIG-Aktin-anti	497-472 (M12481)	DIG -TCT TCA TGA GGT AGT CCG TCA GGT C	Positiv-Kontrolle für die <i>in situ</i> PCR
<i>β-Aktin</i>	DIG-Aktin-sense	154-178 (M12481)	DIG -AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAG ATC T	
<i>lacZ</i>	β-Gal2-anti	2884-2860 (V00296)	AGC GGC TGA TGT TGA ACT GGA AGT C	Nachweis des <i>lacZ</i> -Transgens
<i>lacZ</i>	βGal2-sense	2751-2775 (V00296)	CTG GGA TCT GCC ATT GTC AGA CAT G	
<i>lacZ</i>	β-Gal2-anti	2884-2860 (V00296)	AGC GGC TGA TGT TGA ACT GGA AGT C	Nachweis der „floxed“ bzw. deletierten „Stop-Kassette“ des Reporter-Gens
<i>HSV-tk Prom.</i>	tk-Prom.	321-345 (J02224)	ATT GGC GAA TTC GAA CAC GCA GAT G	

Tab. 7: PCR „Primer“. Die „Primer“ dienen ausschließlich der Amplifikation genomischer DNA. Digoxigenin (DIG)-markierte „Primer“ wurden bei der *in situ* PCR verwendet.

5.4.14.2 Oligonukleotide zur Hybridisierung

Gen	Primer	Lage	Sequenz (5' - → - 3')
<i>MGMT</i>	Sac 1,8 kB-3'	1721-1697 (p3,3-SK; 5.2.7)	GAC ATT TTT GCC CTG AGA TCC CAA C
<i>MGMT</i>	Exon 2	134-110 (M84524)	TTT GGG GTC TTC CCA CTG AGC AAC C
<i>MGMT</i>	Exon 3	275-301 (M84524)	CTC TCC ATC ACC CTG TGT TCC AGC AAG
<i>MGMT</i>	Exon 4	366-391 (M84524)	TTA CCA GCA ATT AGC AGC CCT GGC AG
<i>MGMT</i>	Exon 5	544-519 (M84524)	CAT GGG CCA GAA GCC ACT CCT TCA CA

Tab. 8: Hybridisierungs-Oligodesoxynukleotide.

6 LITERATUR

- Abott, P. J. & Saffhill, R. (1979) DNA synthesis with methylated poly(dC-dG) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O⁶-methylguanine. *Biochim. Biophys. Acta*, **562**, 51-61.
- Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M. K., Vilpo, J. A., Moncollin, V., Podust, V. N., Protic, M., Hubscher, U., Egly, J. M. & Wood, R. D. (1995) Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell*, **80**, 859-868.
- Adamkiewicz, J. (1985) Nachweis von Alkyl-Desoxynukleotiden in der DNS von Säugerzellen mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Dissertation, Universität-Gesamthochschule Essen.
- Adamkiewicz, J., Drosdziok, W., Eberhardt, W., Langenberg, U. & Rajewsky, M. F. (1982) High-affinity monoclonal antibodies specific for DNA components structurally modified by alkylating agents. In: Bridges, B. A., Butterworth, B. E., & Weinstein, I. B. (eds.): *Indicators of Genotoxic Exposure*. Branbury Report 13, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 265-276.
- 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.
- Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., van, d. V., Giovannini, M., Strauss, M. & Berns, A. (1997) Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 1766-1773.
- Akiyama, J., Seki, S., Oshida, T. & Yoshida, M. (1994) Structure, promoter analysis and chromosomal assignment of the human *APEX* gene. *Biochim. Biophys. Acta*, **1219**, 15-25.
- Akiyama, K., Nagao, K., Oshida, T., Tsutsui, K., Yoshida, M. C. & Seki, S. (1995) Cloning, sequence analysis, and chromosomal assignment of the mouse *Apex* gene. *Genomics*, **26**, 63-69.
- Allay, E., Reese, J. S., McGuire, E. A., Koc, O. N., Sedransk, N. & Gerson, S. L. (1997) Potentiation of lymphomagenesis by methylnitrosourea in mice transgenic for LMO1 is blocked by O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Oncogene*, **15**, 2127-2132.
- Arcone, R., Gualandi, G. & Ciliberto, G. (1988) Identification of sequences responsible for acute-phase induction of human C-reactive protein. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 3195-3207.
- Armitage, P. & Doll, R. (1954) The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br. J. Cancer*, **8**, 1-12.
- Badawi, A. F., Cooper, D. P., Mostafa, M. H., Aboul-Azm, T., Barnard, R., Margison, G. P. & O'Connor, P. J. (1994) O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in schistosomiasis-associated human bladder cancer. *Eur. J. Cancer*, **30A**, 1314-1319.
- Ballou, S. P. & Lozanski, G. (1992) Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine.*, **4**, 361-368.

- Barlow, C., Schroeder, M., Lekstrom-Himes, J., Kylefjord, H., Deng, C. X., Wynshaw-Boris, A., Spiegelman, B. M. & Xanthopoulos, K. G. (1997) Targeted expression of Cre recombinase to adipose tissue of transgenic mice directs adipose-specific excision of loxP-flanked gene segments [a published erratum appeared in *Nucleic Acids Res.* **25**, 4429, 1997]. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2543-2545.
- Barrows, L. R. & Magee, P. N. (1982) Nonenzymatic methylation of DNA by S-adenosylmethionine in vitro. *Carcinogenesis*, **3**, 349-351.
- Bartsch, H. & Montesano, R. (1984) Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis*, **5**, 1381-1393.
- Barzilay, G., Walker, L. J., Robson, C. N. & Hickson, I. D. (1995) Site-directed mutagenesis of the human DNA repair enzyme HAP1: Identification of residues important for AP-endonuclease and RNase H activity. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 1544-1550.
- Becker, K., Dosch, J., Gregel, C. M., Martin, B. A. & Kaina, B. (1996) Targeted expression of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis. *Cancer Res.*, **56**, 3244-3249.
- Bender, K., Federwisch, M., Loggen, U., Nehls, P. & Rajewsky, M. F. (1996) Binding and repair of O⁶-ethylguanine in double-stranded oligodeoxynucleotides by recombinant human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase do not exhibit significant dependence on sequence context. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2087-2094.
- Bennett, R. A., Wilson, D. M., Wong, D. & Demple, B. (1997) Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 7166-7169.
- Beranek, D. T. (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.*, **231**, 11-30.
- Betz, U. A., Vosshenrich, C. A., Rajewsky, K. & Muller, W. (1996) Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. *Curr. Biol.*, **6**, 1307-1316.
- Biade, S., Sobol, R. W., Wilson, S. H. & Matsumoto, Y. (1998) Impairment of proliferating cell nuclear antigen-dependent apurinic/aprimidinic site repair on linear DNA. *J. Biol. Chem.*, **273**, 898-902.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1523-
- Bocker, T., Ruschoff, J. & Fishel, R. (1999) Molecular diagnostics of cancer predisposition: hereditary non-polyposis colorectal carcinoma and mismatch repair defects. *Biochim. Biophys. Acta*, **1423**, O1-O10.
- Bohr, V. A., Smith, C. A., Okumoto, D. S. & Hanawalt, P. C. (1985) DNA repair in an active gene: Removal of pyrimidine dimers from the *DHFR* gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*, **40**, 359-369.
- Boulikas, T. (1996) Xeroderma pigmentosum and molecular cloning of DNA repair genes. *Anticancer Res.*, **16**, 693-708.

- Bradley, A., Evans, M. J., Kaufman, M. H. & Robertson, E. J. (1984) Formation of germ line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, **309**, 255-256.
- Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J. L., Chambon, P. & Metzger, D. (1997) Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 14559-14563.
- Bronstein, S. M., Hooth, M. J., Swenberg, J. A. & Skopek, T. R. (1992a) Modulation of ethylnitrosourea-induced toxicity and mutagenicity in human cells by O⁶-benzylguanine. *Cancer Res.*, **52**, 3851-3856.
- Bronstein, S. M., Skopek, T. R. & Swenberg, J. A. (1992b) Efficient repair of O⁶-ethylguanine, but not O⁴-ethylthymine or O²-ethylthymine, is dependent upon O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase and nucleotide excision repair activities in human cells. *Cancer Res.*, **52**, 2008-2011.
- Buchholz, F., Angrand, P. O. & Stewart, A. F. (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis [see comments]. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 657-662.
- Buchholz, F., Ringrose, L., Angrand, P. O., Rossi, F. & Stewart, A. F. (1996) Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: Implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4256-4262.
- Buchmann, A., Bock, K. W. & Schwarz, M. (1992) Enzyme and immunohistochemical phenotyping of diethylnitrosamine-induced liver lesions of male C3H/He, B6C3F1 and C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*, **13**, 691-697.
- Cairns-Smith, S. & Karran, P. (1992) Epigenetic silencing of the DNA repair enzyme O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in Mex- human cells. *Cancer Res.*, **52**, 5257-5263.
- Capecchi, M. R. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science*, **244**, 1288-1292.
- Cariani, E., Dubois, N., Lassere, C., Briand, P. & Brechot, C. (1991) Insulin-like growth factor II (IGF II) mRNA expression during hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *J. Hepatol.*, **13**, 220-226.
- Chen, D. S., Herman, T. & Demple, B. (1991) Two distinct human DNA diesterases that hydrolyze 3'-blocking deoxyribose fragments from oxidized DNA. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5907-5914.
- Chen, J. M., Zhang, Y. P., Wang, C., Sun, Y., Fujimoto, J. & Ikenaga, M. (1992) O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity in human tumors. *Carcinogenesis*, **13**, 1503-1507.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 2172-2175.
- Ciliberto, G., Arcone, R., Wagner, E. F. & Rütger, U. (1987) Inducible and tissue-specific expression of human C-reactive protein in transgenic mice. *EMBO J.*, **6**, 4017-4022.

- Citron, M., Decker, R., Chen, S., Schneider, S., Graver, M., Kleynerman, L., Kahn, L. B., White, A., Schoenhaus, M. & Yarosh, D. (1991) O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human normal and tumor tissue from brain, lung, and ovary. *Cancer Res.*, **51**, 4131-4134.
- Clarke, L. & Carbon, J. (1976) A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. *Cell*, **9**, 91-
- Costello, J. F., Futscher, B. W., Kroes, R. A. & Pieper, R. O. (1994a) Methylation-related chromatin structure is associated with exclusion of transcription factors from and suppressed expression of the O⁶-methylguanine DNA methyltransferase gene in human glioma cell lines. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 6515-6521.
- Costello, J. F., Futscher, B. W., Tano, K., Graunke, D. M. & Pieper, R. O. (1994b) Graded methylation in the promoter and body of the O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 17228-17237.
- Craddock, V. M. (1975) Effect of a single treatment with the alkylating carcinogens dimethylnitrosamine, diethylnitrosamine and methyl methanesulphonate, on liver regenerating after partial hepatectomy. II. Alkylation of DNA and inhibition of DNA replication. *Chem. Biol. Interact.*, **10**, 323-332.
- Danielian, P. S., Muccino, D., Rowitch, D. H., Michael, S. K. & McMahon, A. P. (1998) Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr. Biol.*, **8**, 1323-1326.
- Dass, S. B., Hammons, G. J., Bucci, T. J., Heflich, R. H. & Casiano, D. A. (1998) Susceptibility of C57BL/6 mice to tumorigenicity induced by dimethylnitrosamine and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine in the neonatal bioassay. *Cancer Lett.*, **124**, 105-110.
- Day, R. S., Ziolkowski, C. H. J., Scudiero, D. A., Meyer, S. A. & Mattern, M. R. (1980) Human tumor cell strains defective in the repair of alkylation damage. *Carcinogenesis*, **1**, 21-32.
- Demple, B., Herman, T. & Chen, 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. U. S. A.*, **88**, 11450-11454.
- Deng, C. & Capecchi, M. R. (1992) Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 3365-3371.
- Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W. & Kemler, R. (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **87**, 27-45.
- Dolan, M. E., Pegg, A. E., Dumenco, L. L., Moschel, R. C. & Gerson, S. L. (1991) Comparison of the inactivation of mammalian and bacterial O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferases by O⁶-benzylguanine and O⁶-methylguanine. *Carcinogenesis*, **12**, 2305-2309.
- Dragan, Y. P., Fahey, S., Street, K., Vaughan, J., Jordan, V. C. & Pitot, H. C. (1994) Studies of tamoxifen as a promoter of hepatocarcinogenesis in female Fischer F344 rats. *Breast Cancer Res. Treat.*, **31**, 11-25.

- Druckrey, H. (1967a) Quantitative aspects in chemical carcinogenesis. UICC Monogr. Ser., **7**, 60-78.
- Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S. & Schmähl, D. (1967b) Organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. Z. Krebsforschung, **69**, 103-210.
- Duckett, D. R., Bronstein, S. M., Taya, Y. & Modrich, P. (1999) hMutS α - and hMutL α -dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **96**, 12384-12388.
- Duckett, D. R., Drummond, J. T., Murchie, A. I., Reardon, J. T., Sancar, A., Lilley, D. M. & Modrich, P. (1996) Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O⁶-methylguanine, O⁴-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **93**, 6443-6447.
- DuClos, T., Mold, C. & Stump, R. F. (1990) Identification of a polypeptide sequence that mediates nuclear localization of the acute phase protein C-reactive protein. J. Immunol., **145**, 3869-3875.
- Duguid, J. R., Eble, J. N., Wilson, T. M. & Kelley, M. R. (1995) Differential cellular and subcellular expression of the human multifunctional apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/ref-1) DNA repair enzyme. Cancer Res., **55**, 6097-6102.
- Dumenco, L. L., Allay, E., Norton, K. & Gerson, S. L. (1993) The prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. Science, **259**, 219-222.
- Eberle, G. (1989) Monoklonale Antikörper gegen Kanzerogen-DNA Addukte., Dissertation, Universität-Gesamthochschule Essen.
- Edara, S., Kanugula, S. & Pegg, A. E. (1999) Expression of the inactive C145A mutant human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in *E.coli* increases cell killing and mutations by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Carcinogenesis, **20**, 103-108.
- Engelbergs, J. (1998a) Zelltyp-spezifische Kanzerogenese durch N-Nitroso-Verbindungen., Dissertation, Universität-Gesamthochschule Essen.
- Engelbergs, J., Thomale, J., Galhoff, A. & Rajewsky, M. F. (1998b) Fast repair of O⁶-ethylguanine, but not O⁶-methylguanine, in transcribed genes prevents mutation of H-ras in rat mammary tumorigenesis induced by ethylnitrosourea in place of methylnitrosourea. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **95**, 1635-1640.
- Esteller, M., Hamilton, S. R., Burger, P. C., Baylin, S. B. & Herman, J. G. (1999) Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. Cancer Res., **59**, 793-797.
- Evans, M. J. & Kaufman, M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. Nature, **292**, 154-159.
- Fearon, E. R. & Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, **61**, 759-767.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem., **132**, 6-13.

- Fleck, O., Lehmann, E., Schär, P. & Kohli, J. (1999) Involvement of nucleotide-excision repair in *msh2 pms1*-independent mismatch repair. *Nature Gen.*, **21**, 314-317.
- Friedberg, E. C. & Meira, L. B. (1999) Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting cellular responses to DNA damage: Version 3. *Mutat. Res.*, **433**, 69-87.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C. & Siede, W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM, Washington, D.C.
- Frith, C. H. & Ward, J. M. (1980) A morphologic classification of proliferative and neoplastic lesions in mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **3**, 329-351.
- Fritz, G., Tano, K., Mitra, S. & Kaina, B. (1991) Inducibility of the DNA repair gene encoding O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 4660-4668.
- Gerchman, L. L. & Ludlum, D. B. (1973) The properties of O⁶-methylguanine in templates for RNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta*, **308**, 310-316.
- Gerson, S. L., Trey, J. E., Miller, K. & Berger, N. A. (1986) Comparison of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis*, **7**, 745-749.
- Glassner, B. J., Weeda, G., Allan, J. M., Broekhof, J. L., Carls, N. H., Donker, I., Engelward, B. P., Hampson, R. J., Hersmus, R., Hickman, M. J., Roth, R. B., Warren, H. B., Wu, M. M., Hoeijmakers, J. H. & Samson, L. D. (1999) DNA repair methyltransferase (Mgmt) knockout mice are sensitive to the lethal effects of chemotherapeutic alkylating agents. *Mutagenesis*, **14**, 339-347.
- Gold, L. S., Slone, T. B., Manley, N. B. & Bernstein, L. (1991) Target organs in chronic bioassays of 533 chemical carcinogens. *Environ. Health Perspect.*, **93**, 233-246.
- Goldfarb, S. A., Vesselinovich, S. D., Pugh, T. D., Mihailovich, N., Koen, H. & He, Y. (1981) Tumor progression during diethylnitrosamine (DEN) induced mouse hepatocarcinogenesis. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **22**, 491-497.
- Goodtzova, K., Crone, T. & Pegg, A. E. (1994) Activation of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase by DNA. *Biochemistry*, **33**, 8385-8390.
- Gossen, M. & Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. & Bujard, H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, **268**, 1766-1769.
- Goth, R. & Rajewsky, M. F. (1974a) Molecular and cellular mechanisms associated with pulse-carcinogenesis in the rat nervous system by ethylnitrosourea: ethylation of nucleic acids and elimination rates of ethylated bases from the DNA of different tissues. *Z. Krebsforsch. Klin. Onkol. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **82**, 37-64.
- Goth, R. & Rajewsky, M. F. (1974b) Persistence of O⁶-ethylguanine in rat brain DNA: Correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 639-643.

- Grisham, J. W. (1996) Interspecies comparison of liver carcinogenesis: Implications for cancer risk assessment. *Carcinogenesis*, **18**, 59-81.
- Grombacher, T., Eichhorn, U. & Kaina, B. (1998) p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. *Oncogene*, **17**, 845-851.
- Grombacher, T., Mitra, S. & Kaina, B. (1996) Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes. *Carcinogenesis*, **17**, 2329-2336.
- Grösch, S., Fritz, G. & Kaina, B. (1998) Apurinic endonuclease (Ref-1) is induced in mammalian cells by oxidative stress and involved in clastogenic adaptation. *Cancer Res.*, **58**, 4410-4416.
- Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., Mossmann, H. & Rajewsky, K. (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting [see comments]. *Science*, **265**, 103-106.
- Gu, H., Zou, Y. R. & Rajewsky, K. (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell*, **73**, 1155-1164.
- Guo, F., Gopaul, D. N. & Van, D. G. (1997) Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*, **389**, 40-46.
- Hacker, H. J., Mtiro, H., Bannasch, P. & Vesselinovitch, S. D. (1991) Histochemical profile of mouse hepatocellular adenomas and carcinomas induced by a single dose of diethylnitrosamine. *Cancer Res.*, **51**, 1952-1958.
- Hakura, A., Morimoto, K., Sofuni, T. & Nohmi, T. (1991) Cloning and characterization of the *Salmonella thyphimurium ada* gene, which encodes O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *J. Bacteriol.*, **173**, 3663-3672.
- Hallahan, D. E., Gius, D., Kuchibhotla, J., Sukhatme, V., Kufe, D. W. & Weichselbaum, R. R. (1993) Radiation signaling mediated by Jun activation following dissociation from a cell type-specific repressor. *J. Biol. Chem.*, **268**, 4903-4907.
- Harrison, L., Ascione, A. G., Takiguchi, Y., Wilson, D. M., Chen, D. J. & Demple, B. (1997) Comparison of the promoters of the mouse (APEX) and human (APE) apurinic endonuclease genes. *Mutat. Res.*, **385**, 159-172.
- Harrison, L., Ascione, A. G., Wilson III, D. M. & Demple, B. (1995) Characterization of the promoter region of the human apurinic endonuclease gene (APE). *J. Biol. Chem.*, **270**, 5556-5564.
- Harrison, L., Ascione, G., Menninger, J. C., Ward, D. C. & Demple, B. (1992) Human apurinic endonuclease gene (APE): Structure and genomic mapping (chromosome 14q11.2-12). *Hum. Mol. Genet.*, **1**, 677-680.
- Hasty, P. & Bradley, A. (1993) Gene targeting vectors for mammalian cells. In: Joyner, A. L. (ed.): *Gene Targeting: A Practical Approach*. The practical approach series, Oxford University Press, New York, pp. 1-31.
- He, X. Y., Smith, G. J., Enno, A. & Nicholson, R. C. (1994) Short-term diethylnitrosamine-induced oval cell responses in three strains of mice. *Pathology*, **26**, 154-160.

- Hecht, S. S. & Hoffmann, D. (1989) The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. *Cancer Surv.*, **8**, 273-294.
- Herfarth, K. K., Brent, T. P., Danam, R. P., Remack, J. S., Kodner, I. J., Wells, S. A. J. & Goodfellow, P. J. (1999) A specific CpG methylation pattern of the MGMT promoter region associated with reduced MGMT expression in primary colorectal cancers [In Process Citation]. *Mol. Carcinog.*, **24**, 90-98.
- Hoeijmakers, J. H. (1994) Human nucleotide excision repair syndromes: Molecular clues to unexpected intricacies. *Eur. J. Cancer*, **30A**, 1912-1921.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S. & Monk, M. (1987) HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*, **326**, 292-295.
- Hotchkiss, J. H. (1989) Preformed N-nitroso compounds in foods and beverages. *Cancer Surv.*, **8**, 295-321.
- Huang, J.-C., Hsu, D. S., Kazantsev, A. & Sancar, A. (1994) Substrate spectrum of human xinclease: Repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 12213-12217.
- Huff, J., Cirvello, J., Haseman & Bucher, J. (1991) Chemicals associated with site-specific neoplasin in 1394 long-term carcinogenesis experiments in laboratory rodents. *Environ. Health Perspect.*, **93**, 247-270.
- Huh, N. & Rajewsky, M. F. (1986) Enzymatic elimination of O⁶-ethylguanine and stability of O⁴-ethylthymine in the DNA of malignant neural cell lines exposed to N-ethyl-N-nitrosourea in culture. *Carcinogenesis*, **7**, 435-439.
- Huh, N. H. & Rajewsky, M. F. (1988) Enzymatic elimination of O⁶-ethylguanine from the DNA of ethylnitrosourea-exposed normal and malignant rat brain cells grown under cell culture versus in vivo conditions. *Int. J. Cancer*, **41**, 762-766.
- Huh, N. H., Satoh, M. S., Shiga, J., Rajewsky, M. F. & Kuroki, T. (1989) Immunoanalytical detection of O⁴-ethylthymine in liver DNA of individuals with or without malignant tumors. *Cancer Res.*, **49**, 93-97.
- Isowa, G., Ishizaki, K., Sadamoto, T., Tanaka, K., Yamaoka, Y., Ozawa, K. & Ikenaga, M. (1991) O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity in human liver tumors. *Carcinogenesis*, **12**, 1313-1317.
- Itze, L., Vesselinovitich, S. D. & Rao, K. V. N. (1976) Inter and intra diurnal variations of DNA, RNA and protein synthetic activity in newborn, infant and young adult mouse livers. *Physiologia Bohemoslovaca*, **25**, 289-293.
- Iwakuma, T., Sakumi, K., Nakatsuru, Y., Kawate, H., Igarashi, H., Shiraishi, A., Tsuzuki, T., Ishikawa, T. & Sekiguchi, M. (1997) High incidence of nitrosamine-induced tumorigenesis in mice lacking DNA repair methyltransferase. *Carcinogenesis*, **18**, 1631-1635.
- Iwakuma, T., Shiraishi, A., Fukuhara, M., Kawate, H. & Sekiguchi, M. (1996) Organization and expression of the mouse gene for DNA repair methyltransferase. *DNA Cell Biol.*, **15**, 863-872.

- Izumi, T., Henner, W. D. & Mitra, S. (1996) Negative regulation of the major human AP-endonuclease, a multifunctional protein. *Biochemistry*, **35**, 14679-14683.
- Jaenisch, R. (1997) DNA methylation and imprinting: why bother? [see comments]. *Trends Genet.*, **13**, 323-329.
- Jayaraman, L., Murthy, K. G., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S. & Prives, C. (1997) Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev.*, **11**, 558-570.
- Jelinsky, S. A. & Samson, L. D. (1999) Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 1486-1491.
- Jiricny, J. (1998) Eukaryotic mismatch repair: An update. *Mutat. Res.*, **409**, 107-121.
- Kakolyris, S., Kaklamanis, L., Engels, K., Turley, H., Hickson, I. D., Gatter, K. C. & Harris, A. L. (1997) Human apurinic endonuclease 1 expression in a colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Cancer Res.*, **57**, 1794-1797.
- Karran, P. & Bignami, M. (1992) Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2933-2940.
- Karran, P. & Bignami, M. (1994) DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bioessays*, **16**, 833-839.
- Kawate, H., Ihara, K., Kohda, K., Sakumi, K. & Sekiguchi, M. (1995) Mouse methyltransferase for repair of O⁶-methylguanine and O⁴-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. U. S. A.*, **95**, 5116-5120.
- Kellendonk, C., Troche, F., Casanova, E., Anlag, K., Opherk, C. & Schütz, G. (1999) Inducible site-specific recombination in the brain. *J. Mol. Biol.*, **285**, 175-182.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H. & Bujard, H. (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 10933-10938.
- Klungland, A., Höss, M., Gunz, D., Constantinou, A., Clarkson, S. G., Doetsch, P. W., Bolton, P. H., Wood, R. D. & Lindahl, T. (1999) Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XP-G protein. *Mol. Cell*, **3**, 33-42.
- Kodama, M. & Saito, H. (1980) Formation of methylurea from methylamine and carbamyl phosphate: a possible environmental hazard. *Cancer Lett.*, **10**, 319-324.
- Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, **44**, 283-292.
- Kraemer, K. H. (1997) Sunlight and skin cancer: Another link revealed [comment]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 11-14.

- Kroes, R. A. & Erickson, L. C. (1995) The role of mRNA stability and transcription in O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) expression in Mer⁺ human tumor cells. *Carcinogenesis*, **16**, 2255-2257.
- Kumar, R. & Hemminki, K. (1996) Separation of 7-methyl and 7-(2-hydroxyethyl)-guanine adducts in human DNA samples using a combination of TLC and HPLC. *Carcinogenesis*, **17**, 485-492.
- Kushner, I. & Feldmann, G. (1978) Control of the acute phase response. Demonstration of C-reactive protein synthesis and secretion by hepatocytes during acute inflammation in the rabbit. *J. Exp. Med.*, **148**, 466-477.
- Kühn, R., Rajewsky, K. & Müller, W. (1991) Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*, **254**, 707-710.
- Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M. & Rajewsky, K. (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science*, **269**, 1427-1429.
- Kyrtopoulos, S. A. (1998) DNA adducts in humans after exposure to methylating agents. *Mutat. Res.*, **405**, 135-143.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laird, P. W. & Jaenisch, R. (1994) DNA methylation and cancer. *Hum. Mol. Genet.*, **3 Spec No:1487-95**, 1487-1495.
- Lakso, M., Pichel, J. G., Gorman, J. R., Sauer, B., Okamoto, Y., Lee, E., Alt, F. W. & Westphal, H. (1996) Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 5860-5865.
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B. J., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L. & Westphal, H. (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 6232-6236.
- Lawley, P. D. (1984) Carcinogenesis by alkylating agents. In: Searle, C. E. (ed.): *Chemical Carcinogens, Vol.1, ACS Monograph 182.*, American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 326-484.
- Leaf, C. D., Wishnok, J. & Tannenbaum, S. R. (1989) Mechanisms of endogenous nitrosation. *Cancer Surv.*, **8**, 323-334.
- Lee, G. H., Nomura, K., Kusakabe, M., Yoshiki, A., Sakakura, T. & Kitagawa, T. (1991) Strain specific sensitivity to dimethylnitrosamine-induced carcinogenesis is maintained in hepatocytes of C3H/HeN in equilibrium with C57BL/6 chimeric mice. *Cancer Res.*, **51**, 3257-3260.
- Lee, Y. H., Sauer, B., Johnson, P. F. & Gonzalez, F. J. (1997) Disruption of the c/ebp alpha gene in adult mouse liver. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 6014-6022.
- Lefebvre, P., Zak, P. & Laval, F. (1993) Induction of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase and N³-methyladenine-DNA-glycosylase in human cells exposed to DNA-damaging agents. *DNA Cell Biol.*, **12**, 233-241.
- Lei, K.-J., Liu, T., Zon, G., Soravia, E., Liu, T.-Y. & Goldman, N. D. (1985) Genomic DNA sequence for human C-reactive protein. *J. Biol. Chem.*, **260**, 13377-13383.

- Lewandoski, M. & Martin, G. R. (1997a) Cre-mediated chromosome loss in mice. *Nat. Genet.*, **17**, 223-225.
- Lewandoski, M., Wassarman, K. M. & Martin, G. R. (1997b) Zp3-cre, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line. *Curr. Biol.*, **7**, 148-151.
- Li, S. P. & Goldman, N. D. (1996) Regulation of human C-reactive protein gene expression by two synergistic IL-6 responsive elements. *Biochemistry*, **35**, 9060-9068.
- Lijinsky, W., Pegg, A. E., Anver, M. R. & Moschel, R. C. (1994) Effects of inhibition of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in rats on carcinogenesis by methylnitrosourea and ethylnitrosourea. *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 226-230.
- Lin, F.-L., Sperle, K. & Sternberg, N. (1985) Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 1391-1395.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA [see comments]. *Nature*, **362**, 709-715.
- Lindahl, T., Sedgwick, B., Sekiguchi, M. & Nakabeppu, Y. (1988) Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 133-157.
- Liu, L., Lee, K., Wasan, E. & Gerson, S. L. (1996) Differential sensitivity of human and mouse alkyltransferase to O⁶-benzylguanine using a transgenic model. *Cancer Res.*, **56**, 1880-1885.
- Liu, L., Qin, X. & Gerson, S. L. (1999) Reduced lung tumorigenesis in human methylguanine DNA--methyltransferase transgenic mice achieved by expression of transgene within the target cell. *Carcinogenesis*, **20**, 279-284.
- Loeb, L. A. (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.*, **51**, 3075-3079.
- Loeb, L. A. & Christians, F. C. (1996) Multiple mutations in human cancers. *Mutat. Res.*, **350**, 279-286.
- Loechler, E. L., Green, C. L. & Essigmann, J. (1984) *In vivo* mutagenesis by O⁶-methylguanine built into a unique site in a viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 6271-6275.
- Ludlum, D. B. (1970) The properties of 7-methylguanine-containing templates for ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 477-482.
- Ludwig, D. L., MacInnes, M. A., Takiguchi, Y., Purtymun, P. E., Henrie, M., Flannery, M., Meneses, J., Pedersen, R. A. & Chen, D. J. (1998) A murine AP-endonuclease gene-targeted deficiency with post-implantation embryonic progression and ionizing radiation sensitivity. *Mutat. Res.*, **409**, 17-29.
- MacGregor, G. R., Nolan, G. P., Fiering, S., Roederer, M. & Herzenberg, L. A. (1991) Use of *E. coli lacZ* (β -Galactosidase) as a reporter gene. In: Murray, E. J. (ed.): *Gene Transfer and Expression Protocols*. Methods in Molecular Biology (Vol.7), Humana Press, Clifton, NJ, pp. 217-236.

- Macintyre, S., Samols, D. & Dailey, P. (1994) Two carboxylesterases bind C-reactive protein within the endoplasmic reticulum and regulate its secretion during the acute phase response. *J. Biol. Chem.*, **269**, 24496-24503.
- Mansour, S. L., Thomas, K. R. & Capecchi, M. R. (1988) Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: A general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, **336**, 348-352.
- Margison, G. P., Capps, M. J. & O'Connor, P. J. (1973) Loss of 7-methylguanine from rat liver DNA after methylation *in vivo* with methyl methanesulfonate or dimethylnitrosamine. *Chem. Biol. Interact.*, **6**, 119-124.
- Marletta, M. A. (1988) Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide and N-nitrosating agents. *Chem. Res. Toxicol.*, **1**, 249-257.
- Maronpot, R. R., Fox, T., Malarkey, D. E. & Goldworthy, T. L. (1995) Mutations in the *ras* proto-oncogene: Clues to etiology and molecular pathogenesis of mouse liver tumors. *Toxicology*, **101**, 125-156.
- Martin, G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 7634-7638.
- Maru, G. B., Margison, G. P., Chu, Y.-H. & O'Connor, P. J. (1982) Effects of carcinogen and partial hepatectomy upon the hepatic O⁶-methylguanine repair system in mice. *Carcinogenesis*, **3**, 1247-1254.
- Meikrantz, W., Bergom, A., Memisoglu, A. & Samson, L. (1997) O⁶-Alkylguanine DNA lesions trigger apoptosis. *Carcinogenesis*, **19**, 369-372.
- Meira, L. B., Cheo, D. L., Hammer, R. E., Burns, D. K., Reis, A. & Friedberg, E. C. (1997) Genetic interactions between *HAP1/REF-1* and *p53*. *Nat. Genet.*, **17**, 145-
- Mellon, I., Bohr, V. A., Smith, C. A. & Hanawalt, P. C. (1986) Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 8878-8882.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 1215-
- Montesano, R., Hall, J., Hollstein, M., Mironov, N. & Wild, C. P. (1990) Alkylation repair in human tissues. In: Sutherland, B. M. & Woodhead, A. D. (eds.): *DNA Damage and Repair in Human Tissues.*, Plenum Press, New York, pp. 437-452.
- Montoliu, L., Blendy, J. A., Cole, T. J. & Schütz, G. (1995) Analysis of perinatal gene expression: Hormone response elements mediate activation of a *lacZ* reporter gene in liver of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 4244-4248.
- Moore, M. R., Drinkwater, N. R., Miller, E. C., Miller, J. A. & Pitot, H. C. (1981) Quantitative analysis of the time-dependent development of glucose-6-phosphate-deficient foci in the livers of mice treated neonatally with diethylnitrosamine. *Cancer Res.*, **41**, 1585-1593.
- Morohoshi, F., Hayashi, K. & Munakata, N. (1989) *Bacillus subtilis* gene coding for constitutive O⁶-methylguanine-DNA alkyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 6531-6543.

- Mortensen, R. M., Zubiaur, M., Neer, E. J. & Seidman, J. G. (1991) Embryonic stem cells lacking a functional inhibitory G-protein subunit (alpha i2) produced by gene targeting of both alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 7036-7040.
- Murphy, C., Becker, J. & Rüther, U. (1995) Regulation of the human C-reactive protein gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, **270**, 704-708.
- Müller, R. & Rajewsky, M. F. (1983) Enzymatic removal of O⁶-ethylguanine versus stability of O⁴-ethylthymine in the DNA of rat tissues exposed to the carcinogen ethylnitrosourea: possible interference of guanine-O⁶ alkylation with 5-cytosine methylation in the DNA of replicating target cells. *Z. Naturforsch. [C.]*, **38**, 1023-1029.
- Nakabeppu, Y., Kondo, H., Kawabata, S., Iwanaga, S. & Sekiguchi, M. (1985) Purification and structure of the intact Ada regulatory protein of *Escherichia coli* K12, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 7281-7288.
- Nakamura, J. & Swenberg, J. A. (1999) Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. *Cancer Res.*, **59**, 2522-2526.
- Nakatsu, Y., Hattori, K., Hayakawa, H., Shimizu, K. & Sekiguchi, M. (1993) Organization and expression of the human gene for O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *Mutat. Res.*, **293**, 119-132.
- Nakatsuru, Y., Matsukuma, S., Nemoto, N., Sugano, H., Sekiguchi, M. & Ishikawa, T. (1993) O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase protects against nitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 6468-6472.
- Nehls, P., Adamkiewicz, J. & Rajewsky, M. F. (1984) Immuno-slot-blot: A highly sensitive immunoassay for the quantitation of carcinogen-modified nucleosides in DNA. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **108**, 23-29.
- O'Connor, P. J., Boiteux, S. & Laval, F. (1988) Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to in vitro DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 5879-5894.
- O'Connor, T. R. (1993) Purification and characterization of human 3-methyl-adenine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5569-
- O'Connor, T. R. & Laval, J. (1991) Human cDNA expressing a functional DNA glycosylase excising 3-methyladenine and 7-methylguanine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 1170-1177.
- O'Gorman, S., Dagenais, N. A., Qian, M. & Marchuk, Y. (1997) Protamine-Cre recombinase transgenes efficiently recombine target sequences in the male germ line of mice, but not in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 14602-14607.
- Olkowski, Z. L. (1998) Mutant AP endonuclease in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport.*, **9**, 239-242.
- Olsson, M. & Lindahl, T. (1980) Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*: Methyl group transfer from O⁶-methylguanine to a protein cysteine residue. *J. Biol. Chem.*, **255**, 10569-10571.
- Orban, P. C., Chui, D. & Marth, J. D. (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 6861-6865.

- Papaiouannou, V. & Johnson, R. (1993) Production of chimeras and genetically defined offspring from targeted ES cells. In: Joyner, A. L. (ed.): *Gene Targeting: A Practical Approach*, 2nd Ed. The Practical Approach Series, Oxford University Press, pp. 107-146.
- Pegg, A. E. (1990) Mammalian O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.*, **50**, 6119-6129.
- Pegg, A. E., Boosalis, M., Samson, L., Moschel, R. C., Byers, T. L., Swenn, K. & Dolan, M. E. (1993) Mechanism of inactivation of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase by O⁶-benzylguanine. *Biochemistry*, **32**, 11998-12006.
- Pieper, R. O. (1998) Cellular responses to methylation damage. In: Nickoloff, J. A. & Hoekstra, M. F. (eds.): *DNA Damage and Repair, Vol. II: DNA Repair in Higher Eukaryotes.*, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 33-49.
- Pignatelli, B., Malaveille, C., Rogatko, A., Hautefeuille, A., Thuillier, P., Munoz, N., Moulinier, C., Berger, F., Dementclos, H., Lambert, R., Correa, P., Ruiz, B., Sobala, G. M., Schorah, C. J., Axon, A. T. R. & Bartsch, H. (1993) Mutagens, N-nitroso compounds and their precursors in gastric juice from patients with and without precancerous lesions of the stomach. *Eur. J. Cancer*, **29A**, 2031-2039.
- Pinz, K. G. & Bogenhagen, D. F. (1998) Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 1257-1265.
- Popoff, S. C., Spira, A. I., Johnson, A. W. & Demple, B. (1990) Yeast structural gene (APN1) for the major apurinic endonuclease: Homology to Escherichia coli endonuclease IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 4193-4197.
- Postic, C., Shiota, M., Niswender, K. D., Jetton, T. L., Chen, Y., Moates, J. M., Shelton, K. D., Lindner, J., Cherrington, A. D. & Magnuson, M. A. (1999) Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 305-315.
- Potter, P. M., Rafferty, J. A., Cawkwell, L., Wilkinson, M. C., Cooper, D. P., O'Connor, P. J. & Margison, G. P. (1991) Isolation and cDNA cloning of a rat O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene, molecular analysis of expression in rat liver. *Carcinogenesis*, **12**, 727-733.
- Potter, P. M., Wilkinson, M. C., Fitton, J., Carr, F. J., Brennand, J., Cooper, D. P. & Margison, G. P. (1987) Characterization and nucleotide sequence of *ogt*, the O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 9177-9193.
- Prakash, L. & Strauss, B. (1970) Repair of alkylation damage: Stability of methyl groups in *Bacillus subtilis* with methyl methanesulphonate. *J. Bacteriol.*, **102**, 760-766.
- Preston, B. D., Singer, B. & Loeb, L. A. (1986) Mutagenic potential of O⁴-methylthymine in vivo determined by an enzymatic approach to site-specific mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 8501-8505.
- Preuss, I., Haas, S., Eichhorn, U., Eberhagen, I., Kaufmann, M., Beck, T., Eibl, R. H., Dall, P., Bauknecht, T., Hengstler, J., Wittig, B. M., Dippold, W. & Kaina, B. (1996) Activity of the DNA repair protein O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human tumor and corresponding normal tissue. *Cancer Detect. Prev.*, **20**, 130-136.

- Rafferty, J. A., Clarke, A. R., Sellappan, D., Santibanez Koref, S., Frayling, I. M. & Margison, G. P. (1996) Induction of murine O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase in response to ionising radiation is p53 gene dose dependent. *Oncogene*, **12**, 693-697.
- Rafferty, J. A., Elder, R. H., Watson, A. J., Cawkwell, L., Potter, P. M. & Margison, G. P. (1992) Isolation and partial characterization of a Chinese hamster O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase cDNA. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1891-1895.
- Rajewsky, M. F., Müller, R., Adamkiewicz, J. & Drosdzioł, W. (1980) Immunological detection and quantification of DNA components structurally modified by alkylating carcinogens (etylhnitrosourea). In: Pullman, B., Ts'ao, P. O. P., & Gelboin, H. (eds.): *Carcinogenesis: Fundamental Mechanisms and Environmental Effects.*, Reidel, Dordrecht, Boston, pp. 207-218.
- Ramana, C. V., Boldogh, I., Izumi, T. & Mitra, S. (1998) Activation of apurinic/apyrimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 5061-5066.
- Ramirez-Solis, R., Rivera-Perez, J., Wallace, J. D., Wims, M., Zheng, H. & Bradley, A. (1992) Genomic DNA microextraction: A method to screen numerous samples. *Anal. Biochem.*, **201**, 331-335.
- Ray, M. K., Fagan, S. P., Moldovan, S., DeMayo, F. J. & Brunicardi, F. C. (1999) Beta cell-specific ablation of target gene using Cre-loxP system in transgenic mice. *J. Surg. Res.*, **84**, 199-203.
- Rebeck, G. W. & Samson, L. (1991) Increased spontaneous mutation and alkylation sensitivity of Escherichia coli strains lacking the ogt O⁶-methylguanine DNA repair methyltransferase. *J. Bacteriol.*, **173**, 2068-2076.
- Robson, C. N. & Hickson, I. D. (1991) Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/apyrimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in E. coli xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5519-5523.
- Robson, C. N., Hochhauser, D., Craig, R., Rack, K., Buckle, V. J. & Hickson, I. D. (1992) Structure of the human DNA repair gene HAP1 and its localisation to chromosome 14q 11.2-12. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4417-4421.
- Rohmann, A., Gotthardt, M., Willnow, T. E., Hammer, R. E. & Herz, J. (1996) Sustained somatic gene inactivation by viral transfer of Cre recombinase [see comments]. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1562-1565.
- Roy, S. K., Moschel, R. C. & Dolan, M. E. (1996) Pharmacokinetics and metabolism in rats of 2,4-diamino-6-benzyloxy-5-nitrosopyrimidine, an inactivator of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Drug. Metab. Dispos.*, **24**, 1205-1211.
- Rubinstein, M., Japon, M. A. & Low, M. J. (1993) Introduction of a point mutation into the mouse genome by homologous recombination in embryonic stem cells using a replacement type vector with a selectable marker. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2613-2617.
- Rüther, U., Woodroffe, C., Fattori, E. & Ciliberto, G. (1993) Inducible formation of liver tumors in transgenic mice. *Oncogene*, **8**, 87-93.

- Rydberg, B. & Lindahl, T. (1982) Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction. *EMBO J.*, **1**, 211-216.
- Rydberg, B., Spurr, N. & Karran, P. (1990) cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase: cDNA expression in *Escherichia coli* and gene expression in human cells. *J. Biol. Chem.*, **265**, 9563-9569.
- Saffhill, R., Badawi, A. F. & Hall, C. N. (1995) Detection of O⁶-methyl-guanine in human DNA In: Bartsch, H., Hemminki, K., & O'Neill, I. K. (eds.): *Methods for Detecting DNA Damaging Agents in Humans: Application in Cancer Epidemiology and Prevention.*, IARC Scientific Publications, No. 89, Lyon, pp. 301-305.
- Sagher, D., Karrison, T., Schwartz, J. L., Larson, R. A. & Strauss, B. (1989) Heterogeneity of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in peripheral blood lymphocytes: Relationship between this activity in lymphocytes and in lymphoblastoid lines from normal controls and from patients with Hodgkin's disease or non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.*, **49**, 5339-5344.
- Sakumi, K., Shiraishi, A., Hayakawa, H. & Sekiguchi, M. (1991) Cloning and expression of cDNA for rat O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5597-5601.
- Sakumi, K., Shiraishi, A., Shimizu, S., Tsuzuki, T., Ishikawa, T. & Sekiguchi, M. (1997) Methylnitrosourea-induced tumorigenesis in MGMT gene knockout mice. *Cancer Res.*, **57**, 2415-2418.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samson, L., Derfler, B. & Waldstein, E. A. (1986) Suppression of human DNA alkylating-repair defects by *Escherichia coli* DNA repair genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 5607-5610.
- Samson, L., Han, S., Marquis, J. C. & Rasmussen, L. J. (1997) Mammalian DNA repair methyltransferases shield O⁴MeT from nucleotide excision repair. *Carcinogenesis*, **18**, 919-924.
- Samson, L., Thomale, J. & Rajewsky, M. F. (1988) Alternative pathways for the in vivo repair of O⁶-alkylguanine and O⁴-alkylthymine in *Escherichia coli*: The adaptive response and nucleotide excision repair. *EMBO J.*, **7**, 2261-2267.
- Sancar, A. (1996) DNA excision repair [published erratum appears in *Annu Rev Biochem* 1997;66:VII]. *Annu. Rev. Biochem.*, **65:43-81**, 43-81.
- Sauer, B. & Henderson, N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 5166-5170.
- Schreck, R., Albermann, K. & Baeuerle, P. A. (1992) Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic. Res. Commun.*, **17**, 221-237.
- Schweer, T. & Rajewsky, M. F. (1998) Conditional liver-specific "knock-out" of the murine genes encoding O⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase (AGT) and AP-Endonuclease (APE). *J. Biomol. Struct. Dynamics*, **16**, 180-181.

- Schwenk, F., Kühn, R., Angrand, P. O., Rajewsky, K. & Stewart, A. F. (1998) Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1427-1432.
- 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*, **14**, 1907-1913.
- Seki, S., Ikeda, S., Watanabe, S., Hatsushika, M., Tsutsui, K., Akiyama, K. & Zhang, B. (1991) A mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) having exonuclease and apurinic/apyrimidinic endonuclease activities: Purification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1079**, 57-64.
- Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y., Sakumi, K. & Tuzuki, T. (1996) DNA-repair methyltransferase as a molecular device for preventing mutation and cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **122**, 199-206.
- Shiraishi, A., Sakumi, K., Nakatsu, Y., Hayakawa, H. & Sekiguchi, M. (1992) Isolation and characterization of cDNA and genomic sequences for mouse O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *Carcinogenesis*, **13**, 289-296.
- Silber, J. R., Blank, A., Bobola, M. S., Mueller, B. A., Kolstoe, D. D., Ojemann, G. A. & Berger, M. S. (1996) Lack of the DNA repair protein O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in histologically normal brain adjacent to primary human brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 6941-6946.
- Silber, J. R., Bobola, M. S., Ghatan, S., Blank, A., Kolstoe, D. D. & Berger, M. S. (1998) O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity in adult gliomas: relation to patient and tumor characteristics. *Cancer Res.*, **58**, 1068-1073.
- Silber, J. R., Mueller, B. A., Ewers, T. G. & Berger, M. S. (1993) Comparison of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity in brain tumors and adjacent normal brain. *Cancer Res.*, **53**, 3416-3420.
- Singer, B. (1975) The chemical effects of nucleic acid alkylation and their relationship to mutagenesis and carcinogenesis. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.*, **15**, 219-284.
- Singer, B. & Brent, T. P. (1981) Human lymphoblasts contain DNA glycosylase activity excising N-3 and N-7 methyl and ethyl purines but not O⁶-alkylguanines or 1-alkyladenines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 856-860.
- Singer, B. & Dosanjh, M. K. (1990) Site-directed mutagenesis for quantitation of base-base interactions at defined sites. *Mutat. Res.*, **233**, 45-51.
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M. & Rogers, D. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, **336**, 688-690.
- Smith, A. G. & Hooper, M. L. (1987) Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev. Biol.*, **121**, 1-9.
- Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A. & Kucherlapati, R. S. (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, **317**, 230-234.

- Spiegelhalter, B. & Preussmann, R. (1984) In-vivo formation of N-nitrosodimethylamine in humans after amidopyrine intake. IARC. Sci. Publ., 179-183.
- St-Onge, L., Furth, P. A. & Gruss, P. (1996) Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3875-3877.
- Suh, D., Wilson, D. M. & Povirk, L. F. (1997) 3'-phosphodiesterase activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease at DNA double-strand break ends. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2495-2500.
- Sukumar, S., Notario, V., Martin-Zanka, D. & Barbacid, M. (1983) Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of *Ha-ras-1* locus by single point mutations. *Nature*, **306**, 658-661.
- Szalai, A. J., van Ginkel, F. W., Dalrymple, S. A., Murray, R., McGhee, J. R. & Volanakis, J. E. (1998) Testosterone and IL-6 requirements for human C-reactive protein gene expression in transgenic mice. *J. Immunol.*, **160**, 5294-5299.
- Takeshita, M. & Eisenberg, W. (1994) Mechanism of mutation on DNA templates containing synthetic abasic sites: Study with a double strand vector. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1902-
- Takiguchi, Y. & Chen, D. J. (1994) Genomic structure of the mouse apurinic/apyrimidinic endonuclease gene. *Mamm. Genome*, **5**, 717-722.
- Tan, Y., Nakagawa, Y., Akiyama, K., Wakabayashi, H., Sarker, A. H. & Seki, S. (1996) cDNA cloning of rat major AP endonuclease (APEX nuclease) and analyses of its mRNA expression in rat tissues. *Acta Med. Okayama.*, **50**, 53-60.
- Tannenbaum, S. R. (1980) A model for estimation of human exposure to endogenous N-nitrosodimethylamine. *Oncology*, **37**, 232-235.
- Tano, K., Shiota, S., Collier, J., Foote, R. S. & Mitra, S. (1990) Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O⁶-alkylguanine [published erratum appeared in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990, **87**, 3253]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 686-690.
- Tell, G., Scaloni, A., Pellizzari, L., Formisano, S., Pucillo, C. & Damante, G. (1998) Redox potential controls the structure and DNA binding activity of the paired domain. *J. Biol. Chem.*, **273**, 25062-25072.
- Thomale, J., Engelbergs, J., Seiler, F. & Rajewsky, M. F. (1996) Monoclonal antibody-based quantification and repair analysis of specific alkylation products in DNA. In: Pfeiffer, G. P. (ed.): *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations.*, Plenum, New York, pp. 87-101.
- Thomale, J., Huh, N. H., Nehls, P., Eberle, G. & Rajewsky, M. F. (1990) Repair of O⁶-ethylguanine in DNA protects rat 208F cells from tumorigenic conversion by N-ethyl-N-nitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 9883-9887.
- Thomas, K. R. & Capecchi, M. R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, **51**, 503-512.
- Thomas, K. R., Folger, K. R. & Capecchi, M. R. (1986) High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, **44**, 419-428.

- Thompson, S., Clarke, A. R., Pow, A. M., Hooper, M. L. & Melton, D. W. (1989) Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell*, **56**, 313-321.
- Tominaga, Y., Tsuzuki, T., Shiraishi, A., Kawate, H. & Sekiguchi, M. (1997) Alkylation-induced apoptosis of embryonic stem cells in which the gene for DNA-repair, methyltransferase, had been disrupted by gene targeting. *Carcinogenesis*, **18**, 889-896.
- Toniatti, C., Demartis, A., Monaci, P., Nicosia, A. & Ciliberto, G. (1990) Synergistic trans-activation of the human C-reactive protein promoter by transcription factor HNF-1 binding at two distinct sites. *EMBO J.*, **9**, 4467-4475.
- Torres, M. & Kühn, R. (1997) Gene targeting vectors - considerations and use of loxP. In: *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*, Oxford University Press, New York, pp. 14-17.
- Torres, M. & Kühn, R. (1997b) *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*. Oxford University Press, New York.
- Tsien, J. Z., Chen, D. F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E. H., Anderson, D. J., Mayford, M., Kandel, E. R. & Tonegawa, S. (1996) Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*, **87**, 1317-1326.
- Tsuzuki, T., Sakumi, K., Shiraishi, A., Kawate, H., Igarashi, H., Iwakuma, T., Tominaga, Y., Zhang, S., Shimizu, S., Ishikawa, T., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M. & Sekiguchi, M. (1996) Targeted disruption of the DNA repair methyltransferase gene renders mice hypersensitive to alkylating agent. *Carcinogenesis*, **17**, 1215-1220.
- Umar, A., Buermeier, A. B., Simon, J. A., Thomas, D. C., Clark, A. B., Liskay, R. M. & Kunkel, T. A. (1996) Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell*, **87**, 65-73.
- Vardimon, L., Renz, D. & Doerfler, W. (1983) Can DNA methylation regulate gene expression? *Recent Results. Cancer Res.*, **84:90-102**, 90-102.
- Vesselinovitch, S. D. (1969) The sex-dependent difference in the development of liver tumors in mice administered dimethylnitrosamine. *Cancer Res.*, **29**, 1024-1027.
- Vesselinovitch, S. D. (1980) Infant mouse as a sensitive bioassay system for carcinogenicity in N-nitroso compounds. In: *N-Nitroso Compounds: Analysis, Formation, and Occurrence*. Sci. Publ., IARC Scientific Publ., No.31, pp. 645-655, Lyon: International Research on Cancer.
- Vesselinovitch, S. D. (1987) Certain aspects of hepatocarcinogenesis in the infant mouse model. *Toxicol. Pathol.*, **15**, 221-228.
- Vesselinovitch, S. D., Hacker, H. J. & Bannasch, P. (1985) Histochemical characterization of focal hepatic lesions induced by single diethylnitrosamine treatment in infant mice. *Cancer Res.*, **45**, 2774-2780.
- Vesselinovitch, S. D., Itze, L., Mihailovich, N. & Rao, K. V. (1980) Modifying role of partial hepatectomy and gonadectomy in ethylnitrosourea-induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, **40**, 1538-1542.

- Vesselinovitch, S. D., Koka, M., Mihailovich, N. & Rao, K. V. N. (1984) Carcinogenicity of diethylnitrosamine in newborn, infant, and adult mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **108**, 60-65.
- Vesselinovitch, S. D. & Mihailovich, N. (1983) Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. *Cancer Res.*, **43**, 4253-4259.
- Voigt, J. M. & Topal, M. D. (1995) O⁶-Methylguanine-induced replication blocks. *Carcinogenesis*, **16**, 1775-1782.
- Wachstein, M. & Meisel, E. (1957) Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH. *Am. J. Clin. Pathol.*, **27**, 13-23.
- Wagner, K. U., Wall, R. J., St-Onge, L., Gruss, P., Wynshaw-Boris, A., Garrett, L., Li, M., Furth, P. A. & Hennighausen, L. (1997) Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4323-4330.
- Wang, Y., Krushel, L. A. & Edelman, G. M. (1996) Targeted DNA recombination in vivo using an adenovirus carrying the cre recombinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 3932-3936.
- Whitehead, A. S., Bruns, G. A., Markham, A. F., Colten, H. R. & Woods, D. E. (1983) Isolation of human C-reactive protein complementary DNA and localization of the gene to chromosome 1. *Science*, **221**, 69-71.
- Wilson, R. E., Hoey, B. & Margison, G. P. (1993) Ionizing radiation induces O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase mRNA and activity in mouse tissues. *Carcinogenesis*, **14**, 679-683.
- Wilson, R. E., Hoyes, K. P., Morris, I. D., Sharma, H. L., Hendry, J. H. & Margison, G. P. (1994) In vivo induction of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in response to indium-114m. *Radiat. Res.*, **138**, 26-33.
- Wilson, T. M., Carney, J. P. & Kelley, M. R. (1994) Cloning of the multifunctional rat apurinic/apyrimidinic endonuclease (rAPEN)/redox factor from an immature T cell line. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 530-531.
- Wilson, T. M., Rivkees, S. A., Deutsch, W. A. & Kelley, M. R. (1996) Differential expression of the apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE/ref-1) multifunctional DNA base excision repair gene during fetal development and in adult rat brain and testis. *Mutat. Res.*, **362**, 237-248.
- Wiseman, R. W., Drinkwater, N. R., Miller, J. A., Miller, E. C. & Blomquist, J. C. (1986) Apurinic/apyrimidinic site induction in supercoiled DNA and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA100 by 1'-acetoxysafrole and related electrophilic alkenylbenzene derivatives. *Carcinogenesis*, **7**, 2089-2093.
- Wood, R. D. (1996) DNA repair in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**:135-67, 135-167.
- Wurst, W. & Joyner, A. L. (1993) Production of targeted embryonic stem cells In: Joyner, A. L. (ed.): *Gene Targeting: A Practical Approach*, 2nd Ed. The Practical Approach Series, Oxford University Press, New York, pp. 33-61.
- Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y. C. & Curran, T. (1992) Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.*, **11**, 3323-3335.

- Xanthoudakis, S., Miao, G. G. & Curran, T. (1994) The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 23-27.
- Xanthoudakis, S., Smeyne, R. J., Wallace, J. D. & Curran, T. (1996) The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 8919-8923.
- Xiao, W., Derfler, B., Chen, J. & Samson, L. (1991) Primary sequence and biological functions of a *Saccharomyces cerevisiae* O⁶-methylguanine/O⁴-methylthymine DNA repair methyltransferase gene. *EMBO J.*, **10**, 2179-2186.
- Xiao, W. & Samson, L. (1993) In vivo evidence for endogenous DNA alkylation damage as a source of spontaneous mutation in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 2117-2121.
- Yacoub, A., Kelley, M. R. & Deutsch, W. A. (1997) The DNA repair activity of human redox/repair protein APE/Ref-1 is inactivated by phosphorylation. *Cancer Res.*, **57**, 5457-5459.
- Yager, J. D. & Shi, Y. E. (1991) Synthetic estrogens and tamoxifen as promoters of hepatocarcinogenesis. *Prev. Med.*, **20**, 27-37.
- Yao, K. S., Clayton, M. & O'Dwyer, P. J. (1995) Apoptosis in human adenocarcinoma HT29 cells induced by exposure to hypoxia. *J. Natl. Cancer Inst.*, **87**, 117-122.
- Yoo, J. S. H., Ishizaki, H. & Yang, C. S. (1990) Roles of cytochrome P450IIE1 in the dealkylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, **11**, 2239-2243.
- Zaidi, N. H., Pretlow, T. P., O'Riordan, M. A., Dumenco, L. L., Allay, E. & Gerson, S. L. (1995) Transgenic expression of human MGMT protects against azoxymethane-induced aberrant crypt foci and G to A mutations in the K-ras oncogene of mouse colon. *Carcinogenesis*, **16**, 451-456.
- Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A. M., Sablitzky, F., Littlewood, T. D. & Reth, M. (1996) Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 543-548.
- Zhukovskaya, N., Branch, P., Aquilina, G. & Karran, P. (1994) DNA replication arrest and tolerance to DNA methylation damage. *Carcinogenesis*, **15**, 2189-2194.
- Zynik, D. L., Mercer, E. H., Harris, E., Anderson, D. J. & Joyner, A. L. (1998) Fate mapping of the mouse midbrain-hindbrain constriction using site-specific recombination system. *Curr. Biol.*, **8**, 665-668.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M.F. Rajewsky danke ich für die Leitung und großzügige Förderung dieser Arbeit sowie der steten Diskussionsbereitschaft und seinem fortwährendem Interesse am Fortschritt dieses Projekts;

Mein besonderer Dank gilt Frau B. Rickert (IFZ) für ihre Hilfe zur Etablierung der ES-Zelllinien sowie Frau I. Gores (IFZ), Frau A. Odersky (IFZ), Frau U. Michel (IFZ) und Frau B. Spans (IFZ) für die fortwährende praktische Unterstützung dieser Arbeit;

Herrn Priv. Doz. Dr. J. Thomale danke ich für die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie die kreativen Anregungen;

Herrn Dr. J. Engelbergs (IFZ) möchte ich für viele praktische Tips, die Reinigung monoklonaler Antikörper sowie steter Diskussionsbereitschaft danken;

Den (ehemaligen) Mitarbeitern des IFZ danke ich für hilfreiche Diskussionen und praktische Unterstützung, insbesondere Dr. K. Bender, Dipl.-Biol. B. Böhm, T. Civela, Dipl.-Ing. W. Drosdziok, A. Galhoff, T. Haberland, K. Heise, Dipl.-Ing. K. Lennartz, Dipl.-Chem. B. Liedert, Dr. C. Lutze, Dipl.-Biol. C. Papewalis, Priv. Doz. P. Pfeiffer, P. Plessow;

Frau Dipl.-Biol. Angela Egert (Universität zu Köln) möchte ich für die ES-Zell Injektionen zur Etablierung der *MGMT*-Maus-Linie danken;

Herrn Dr. B. Zevnic (IFZ) danke ich für die Mikroinjektionsarbeiten zur Etablierung der *Cre^{hCRP}*-Maus-Linie;

Herrn Dr. H. Stumpf danke ich für die Unterstützung der Klonierungsarbeiten zum Cre-Expressionsvektor;

Herrn Prof. Dr. M. Sekiguchi (Fukuoka Dental College, Fukuoka, Japan) für die Überlassung der Anti-*MGMT* Anti-Seren sowie für den sehr lehrreichen Aufenthalt in seinem Labor;

Herrn Dr. R. Kühn (Universität zu Köln) für die Überlassung der Plasmide *pIC-Cre*, *pL2neo*, *pTV-0*, *pGEM 30* und einer IL-4-„knockout“-Maus;

Herrn Prof. Dr. U. Rütter (Zentrum Laboratoriumsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover) für die Überlassung des Plasmids *Konstukt-79*;

Herrn Dr. F. Sablitzky (University College, London) für die Überlassung eines Zuchtpaares β -Galaktosidase-transgener „Reporter“-Mäuse;