

Untersuchungen zur Regulation der Basenfehlpaarungsreparatur und zur Zytostatikaresistenz in Säugerzellen

**Dissertation
Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz**

**vorgelegt von
Markus Christmann
geb. in Frankfurt a. M.**

Mainz, 2000

Tag der Prüfung: 15.02.2001

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abbildungen	VI
Verzeichnis der Tabellen	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Induktion von DNA-Schäden durch chemische Agenzien	1
1.1.1 Induktion spontaner Schäden	1
1.1.2 Induktion von DNA-Schäden durch alkylierende Agenzien	2
1.1.3 Prozessierung von O ⁶ -Methylguanin	3
1.2 O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase	4
1.2.1 Korrelation zwischen MGMT-Status und Resistenz	4
1.2.2 Regulation der MGMT	5
1.3 Basenfehlpaarungsreparatur	7
<i>1.3.1 Basenfehlpaarungsreparatur in Prokaryonten</i>	<i>7</i>
1.3.1.1 Strangspezifität der Basenfehlpaarungsreparatur bei Prokaryonten	8
1.3.1.2 Effektivität und Selektivität der Basenfehlpaarungsreparatur bei Prokaryonten	8
1.3.1.3 Mechanismus und Komponenten der Basenfehlpaarungsreparatur bei Prokaryonten	9
<i>1.3.2 Basenfehlpaarungsreparatur in Eukaryonten</i>	<i>11</i>
1.3.2.1 Strangspezifität und Effektivität der Basenfehlpaarungsreparatur bei Eukaryonten	11
1.3.2.2 Basenfehlpaarungsreparatur und HNPCC	12
1.3.2.3 Komponenten und Mechanismus der Basenfehlpaarungsreparatur bei Eukaryonten	13
1.3.2.4 Rolle der Basenfehlpaarungsreparatur als Sensor für genetische Schäden	15
1.3.2.5 "Toleranz Phänotyp"	15
1.3.2.6 ATP-Abhängigkeit der Basenfehlpaarungsreparatur	16
1.3.2.7 Regulation der Basenfehlpaarungsreparatur	18
1.4 Mechanismen des Kerntransports	19
1.4.1 NLS-Sequenzen	19
1.4.2 Mechanismus des NLS-vermittelten Kerntransports	20
1.4.3 Regeneration von Importin und Ran	22
1.4.4 Variationen des Kerntransports	23
1.5 Probleme und Zielsetzung der Arbeit	24

2. Material und Methoden	26
2.1 Geräte, Materialien und Bezugsquellen	26
2.1.1 Geräte	26
2.1.2 Bezugsquellen	26
2.1.3 Medienkomponenten für Bakterien- und Zellkultur	27
2.1.4 Zytostatika	27
2.2 Biologische Materialien	27
2.2.1 Bakterienstämme	27
2.2.2 Zelllinien	27
2.2.3 Vektoren	28
2.2.4 Primer	28
2.2.5 Antikörper	28
2.3 Puffer und Stammlösungen	29
2.4 Zellkultur	30
2.5 Herstellung von Proteinextrakten	31
2.5.1 Kernextrakte und Cytoplasmaextrakte für Western-Blot-Analyse	31
2.5.2 Kernextrakte für EMSA	31
2.5.3 Gesamtzellextrakte für Western-Blot-Analyse	31
2.5.4 Gesamtzell-, Kern- und Cytoplasmaextrakte für Immunpräzipitation	32
2.5.5 Gesamtzellextrakte für den Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Test	32
2.6. Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.6.1 Proteinbestimmung nach Lowry	32
2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford	32
2.7 DNA Isolierung	33
2.8 RNA Isolierung	33
2.9 Transfektion eukaryontischer Zellen	34
2.10 Gelretardationsexperiment (EMSA)	34
2.11 Klonierung von DNA	34
2.11.1 Restriktionsverdau der DNA	35
2.11.2 Gewinnung von DNA aus Agarosegelen	35
2.11.3 Auffüllreaktion („Endfilling“)	35
2.11.4 Ligation	36
2.11.5 Transformation von <i>E.coli</i>	36
2.12 Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Test	36

2.13 Gelelektrophorese	37
2.13.1 DNA-Gelelektrophorese	37
2.13.2 RNA-Gelelektrophorese	37
2.13.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.13.4 EMSA-Gelelektrophorese	38
2.14 Transfertechniken	38
2.14.1 Southern-Blot-Transfer	38
2.14.2 Northern-Blot-Transfer	38
2.14.3 Western-Blot-Transfer	39
2.15 Detektion von Proteinen mittels Antikörper	39
2.16 Radioaktive Markierung	39
2.16.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden zur Hybridisierung	39
2.16.2 Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden für EMSA	40
2.17 Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde	40
2.18 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
2.19 DNA-Sequenzierung	41
2.20 Koloniebildungstest	41
2.21 Immunfluoreszenz-Untersuchung	41
2.22 Immunpräzipitation	42
2.23 Messung der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase Aktivität	42
2.24 Phosphorylierungsversuche	43
2.21.1 <i>in vivo</i> Phosphorylierung	43
2.21.2 <i>in vitro</i> Phosphorylierung	43

3. Ergebnisse	44
3.1 Regulation der Expression von MMR-Proteinen nach Behandlung mit chemischen Agenzien	44
3.1.1 Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit alkylierenden Agenzien führt zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Zunahme der nukleären MSH2-Proteinmenge	44
3.1.2 Die Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit MNNG führt zur Induktion der GT-Bindungsaktivität	47
3.1.3 Die Zunahme des MSH2-Proteins beruht weder auf einer Induktion des Promotors, noch auf erhöhter Stabilität der mRNA und ist unabhängig von Protein <i>de-novo</i> Synthese	49
3.1.4 Die Zunahme des MSH2-Proteins beruht auf einer Translokation von MSH2 aus dem Cytoplasma in den Nukleus	53
3.1.5 Die nukleäre Translokation des MSH2-Proteins ist unabhängig vom p53-Status und erfolgt in verschiedenen Säugerzelllinien	54
3.1.6 Behandlung von HeLa-MR-Zellen, nicht aber von MSH6-defizienten DLD1-Zellen, mit MNNG führt zur Translokation von MSH2, MSH6 und PMS2	55
3.1.7 Die Translokation von MSH2 und MSH6 erfolgt als MutS α -Komplex	59
3.1.8 Charakterisierung unterschiedlicher HeLa-Zelllinien	60
3.1.9 Die MSH2-Translokation ist vom MGMT-Status abhängig	61
3.1.10 MNNG-Behandlung von HeLa-MR-Zellen führt zur Steigerung der O ⁶ GC und O ⁶ GT Bindungsaktivität	65
3.2 Post-translationale Modifikation des MutSα-Komplexes	66
3.2.1 MSH2 und MSH6 enthalten mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen	66
3.2.2 MSH2 und MSH6 werden <i>in vitro</i> durch PKC und CK2 phosphoryliert	68
3.2.3 MSH2 und MSH6 werden <i>in vivo</i> phosphoryliert	69
3.2.4 <i>In vivo</i> phosphoryliertes MSH2 und MSH6 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma detektierbar	71
3.2.5 Hemmung der PKC und CKII verhindert nicht die nukleäre MSH2-Translokation	72
3.2.6 In Abwesenheit von Phosphat kommt es weder zur nukleären MutS α -Translokation noch zur GT-Bindung	73
3.2.7 Dephosphorylierung von phosphoryliertem MutS α führt <i>in vitro</i> zu einer Verhinderung der GT-Bindung	75
3.3 Untersuchungen zur Resistenzentwicklung in humanen Melanomzellen	77
3.3.1 Untersuchung der Basenfehlpaarungsreparatur in resistenten Melanomzelllinien	77
3.3.2 Untersuchung verschiedener Resistenzfaktoren in resistenten Melanomzelllinien	79
3.3.3 Untersuchung der MGMT-Aktivität in unterschiedlich resistenten Melanomzelllinien	81
3.3.4 Die Reaktivierung der MGMT erfolgt nicht auf Transkriptions- und Translationsebene	83
3.3.5 In den Mex ⁺ Zellen kommt es nicht zur Amplifikation des MGMT-Gens	85
3.3.6 In den Mex ⁺ Zellen kommt es zur Hypermethylierung des MGMT-Gens	86
3.3.7 Die MGMT-Aktivität in den Fotemustin-resistenten MeWo-Zellen kann durch chronische Behandlung mit 5-Azacytidin reduziert werden	87

4. Diskussion	89
4.1 Regulationsmechanismen der Basenfehlpaarungsreparatur	89
<i>4.1.1 Behandlung von Zellen mit O⁶-MeG-generierenden Agenzien führt zur nukleären Translokation von MutSα aus dem Cytoplasma in den Zellkern</i>	89
4.1.1.1 Behandlung von Zellen mit O ⁶ -MeG-generierenden Verbindungen, nicht aber mit anderen mutagenen Agenzien führt zu einer Zunahme der nukleären MSH2-Proteinmenge	90
4.1.1.2 Ursachen der nukleären MSH2-Zunahme	91
4.1.1.3 Assoziation der nukleären Translokation von MSH2 und MSH6	92
4.1.1.4 Rolle von O ⁶ -MeG bei der nukleären Translokation von MutS α	93
4.1.1.5 Relevanz der nukleären Translokation von MutS α	94
4.1.1.6 Zelluläre Konsequenzen der nukleären Translokation von MutS α	96
4.1.1.7 Modelle der nukleären Translokation von MutS α	96
<i>4.1.2 Phosphorylierung der MMR-Proteine MSH2 und MSH6 ist mit der Stärke der GT-Fehlpaarungsbildung assoziiert</i>	99
4.2 Rolle von MMR-Proteinen und MGMT bei der Resistenzentwicklung von Melanomzellen	102
4.2.1 Die Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber Cisplatin, Vindesin und Etoposid ist mit einer verminderten MSH2- und MSH6-Expression assoziiert	103
4.2.2 Die Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber Cisplatin, Vindesin, Fotemustin und Etoposid ist mit einer erhöhten MDR1-Expression assoziiert	103
4.2.3 Die Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber Fotemustin ist mit einer verminderten ERCC1-Expression assoziiert	104
4.2.4 Die Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber Etoposid ist mit einer verminderten Topoisomerase II α -Expression assoziiert	104
4.2.6 Die Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber Zytostatika beruht nicht auf einer Expressionsänderung von an der Apoptose beteiligter Proteine	105
4.2.7 Die Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber Fotemustin beruht auf einer Reaktivierung des Reparaturproteins MGMT	106
5. Zusammenfassung	110
6. Literatur	112
Liste der Publikationen	124
Kongressteilnahme	125
Tabelarischer Lebenslauf	126

Verzeichnis der Abbildungen

Abb.1.1	Interaktionen zwischen Basenfehlpaarungsreparatur (MMR) und O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) bei der Reparatur von O ⁶ -Methylguanin	3
Abb.1.2	Vergleich der Basenfehlpaarungsreparatur bei Eukaryonten und Prokaryonten	7
Abb.1.3	Mechanismus des Kerntransports	21
Abb.3.1	Einfluß der Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit Mutagenen auf die MSH2-Expression	45
Abb.3.2	Zeit- und dosisabhängige Zunahme von nukleärem MSH2 als Folge der Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit MNNG	47
Abb.3.3	Einfluß der Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit alkylierenden Agenzien auf die Bindung eines spezifischen GT-Fehlpaarungs-Oligonukleotids	48
Abb.3.4.A	Vektorkarten der neu klonierten Vektoren pUC-MSH2.pro und pBl-MSH2.pro	49
Abb.3.4.B	Vergleich der Sequenz des klonierten MSH2-Promotors mit der veröffentlichten Sequenz und Darstellung der potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen	50
Abb.3.5	Einfluß der Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit alkylierenden Agenzien auf Promotoraktivität, mRNA-Stabilität und Protein <i>de novo</i> Synthese	52
Abb.3.6	Einfluß der Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit MNNG auf die intrazelluläre Verteilung von MSH2	53
Abb.3.7	Untersuchung der MNNG-induzierten Translokation von MSH2 in verschiedenen Säugerzelllinien	54
Abb.3.8	Einfluß der Behandlung von HeLa-MR und MSH6-defizienten DLD1-Zellen mit MNNG auf die Expression der MMR-Proteine	57
Abb.3.9	Untersuchungen zur Translokation von MSH2 und MSH6 mittels Immunfluoreszenz	58
Abb.3.10	Untersuchungen zur Bildung des MutS α -Komplexes	59
Abb.3.11	Resistenz der unterschiedlichen HeLa-Zelllinien gegenüber MNNG	61
Abb.3.12	Einfluß des MGMT-Status auf die nukleäre Translokation von MSH2	63
Abb.3.13	Einfluß des MGMT-Status auf die Bindung von MutS α an GT-Fehlpaarungs-Oligonukleotide in MGMT-profizienten und defizienten HeLa-Zellen nach MNNG-Behandlung	64
Abb.3.14	Einfluß der Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit MNNG auf die Bindung spezifischer O ⁶ GC- und O ⁶ GT-Fehlpaarungs-Oligonukleotide	65
Abb.3.15	<i>In vitro</i> Analysen zur Phosphorylierung von MSH2 und MSH6	68
Abb.3.16	<i>In vivo</i> Analysen zur Phosphorylierung von MSH2 und MSH6	69/70
Abb.3.17	<i>In vivo</i> Analysen zur Phosphorylierung von nukleärem und cytoplasmatischem MSH2 und MSH6	71
Abb.3.18	Einfluß der Behandlung mit Proteinkinase-Inhibitoren auf die nukleäre MSH2-Translokation	72
Abb.3.19	Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und nukleärer Translokation von MutS α	74

Abb.3.20	Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und GT-Bindung	76
Abb.3.21	Expression der MMR-Proteine MSH2, MSH6 und MLH1 und GT-Bindungsaktivität in MeWo-Zellen und deren Zytostatika-resistenten Abkömmlingen	78
Abb.3.22	Untersuchung der Expression verschiedener potentieller "Drug-Resistenzmarker" in MeWo-Zellen und den abgeleiteten resistenten Varianten	80
Abb.3.23	Rolle des MGMT-Status bei der Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika	82
Abb.3.24	Untersuchung der MGMT-Promotoraktivität, der Expression des MGMT-Proteins und der Expression der MGMT-mRNA in den Fotemustin-resistenten Zellen	84
Abb.3.25	Untersuchung einer potentiellen MGMT-Genamplifikation	85
Abb.3.26	Analyse des Methylierungsstatus der genomischen MGMT-DNA	86
Abb.3.27	Einfluß des Methylierungsstatus des MGMT-Gens auf die MGMT-Aktivität und die Resistenz der Zellen gegenüber Fotemustin	87
Abb.4.1	Modelle der nukleären Translokation von MutS α	98

Verzeichnis der Tabellen

Tab.3.1	Prognosen für die intrazelluläre Verteilung der humanen MMR-Proteine	56
Tab.3.2	MGMT-Status der verschiedenen HeLa-Zelllinien	61
Tab.3.3	Einfluß von O ⁶ -Benzylguanin auf die MGMT-Aktivität unterschiedlicher HeLa-Zelllinien	64
Tab.3.4	Darstellung der Aminosäure-Positionen potentieller post-translationaler Modifikationen der Proteine MSH2 und MSH6	67
Tab.3.5	Selektionsbedingungen der einzelnen resistenten Melanomzelllinien	77
Tab.3.6	MGMT-Aktivität der MeWo-Zellen und der abgeleiteten resistenten Varianten	81
Tab.4.1	Verwendete Zytostatika, Wirkungsweise und Hauptindikation	102

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A	Adenin
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
As	Aminosäure(n)
Bax	„Bcl-2 associated protein X“
Bcl-2	„B cell lymphoma 2“ / „B cell leukemia 2“
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	cirka
C	Cytosin
Ci	Curie
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERCC1	„excision repair cross-complementing 1“
ERK2	„extracellular signal receptor regulated kinase 2“
FCS	Foetales Kälberserum
f	femto
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC-oligo	GC-Oligonukleotid
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GT-oligo	GT-Oligonukleotid
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
ENU	N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff
g	Gramm
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HNPPC	„hereditary nonpolyposis colon cancer“
h	Stunde(n) oder human
J	Joule
k	kilo
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
mA	Miliamper
ml	Mililiter
min	Minute(n)
µl	Mikroliter
m	milli
M	Molar
MDR1	„multidrug resistance 1“

Abkürzungsverzeichnis

MGMT	O6-Methylguanosin-DNA-Methyltransferase
MLH1	„MutL homolog 1“
MMR	Mismatch Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
MNU	N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	„messenger“ RNA
MSH2	„MutS homolog 2“
MSH6	„MutS homolog 6“
n	nano
O ⁶ -BG	O ⁶ -Benzylguanin
O ⁶ -MeG	O ⁶ -Methylguanin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PMS2	„Postmeiotic segregation 2“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SSC	Standart-Salz-Citrat-Puffer
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
UVC	Ultraviolette Strahlung, Wellenlänge 200-280 nm
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celcius

1. Einleitung

Alle Organismen sind einer Vielzahl von schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt. Diese Einflüsse können zu Mutationen in der DNA führen und sind somit eine Hauptursache für Stoffwechselstörungen und die Entstehung von Tumoren. Man kann allgemein zwischen physikalischen Mutagenen (wie UV-Strahlung und ionisierender Strahlung) auf der einen Seite und chemischen Mutagenen auf der anderen Seite unterscheiden. Wichtige chemische Mutagene sind polyzyklische Kohlenwasserstoffe (wie Benzo(a)pyren), die im Zigarettenrauch vorkommen und alkylierende Agenzien (wie Nitrosamine), die im Magen-Darm-Trakt gebildet werden. Die Exposition mit Mutagenen führt zur Veränderung der DNA. Diese Veränderungen können, soweit sie nicht repariert werden, zur Entstehung von Gendefekten und zu malignen Tumoren führen. Die Stabilität der genetischen Information wird durch eine Vielzahl von Reparatursystemen gewährleistet, welche unterschiedliche Formen von genetischen Defekten erkennen und reparieren können.

1.1 Induktion von DNA-Schäden durch chemische Agenzien

DNA-Schäden können einerseits spontan entstehen oder sie werden ausgelöst, wenn ein Organismus Mutagenen ausgesetzt wird. Bei den entstehenden DNA-Schäden handelt es sich um Deletionen, Insertionen, Rasterschubmutationen oder Punktmutationen. Punktmutationen treten besonders häufig auf und können jedes beliebige Basenpaar betreffen. Man unterscheidet hierbei zwischen Transitionen, bei denen ein Pyrimidin durch ein Pyrimidin oder ein Purin durch ein Purin ersetzt wird und Transversionen, bei denen ein Pyrimidin durch ein Purin oder ein Purin durch ein Pyrimidin ersetzt wird.

1.1.1 Induktion spontaner Schäden

Die häufigste Ursache für spontane Mutationen sind Fehler bei der Replikation der DNA. Hierbei kann es zu tautomeren Umlagerungen kommen, bei denen sich die Ladungsverteilungen der Basen vorübergehend ändern. Normalerweise liegen die Basen in der Ketoform vor. Kommt es jedoch zu einer Umwandlung in die Enolform, so kann diese Form zu Fehlpaarungen mit anderen Basen führen (Topal and Fresco, 1976). Eine weitere

Möglichkeit für die Entstehung von spontanen Mutationen sind Depurinierung und Desaminierung. Bei der Depurinierung kommt es durch Hydrolyse der Basen zu apurinen Stellen in der DNA, denen gegenüber eine beliebige Base eingebaut werden kann (Lindahl *et al.*, 1974; 1975). Bei der Desaminierung können exozyklische Aminogruppen entfernt werden. Hierdurch entsteht aus Cytosin die RNA-Base Uracil, und aus 5-Methylcytosin kann durch Desaminierung die Base Thymin entstehen (Duncan and Miller, 1980). Diese spontan entstehenden Schäden der DNA führen zur Bildung von Basenfehlpaarungen, die durch das Basenfehlpaarungsreparatursystem repariert werden (Brown *et al.*, 1987).

1.1.2 Induktion von DNA-Schäden durch alkylierende Agenzien

Mutagene können auf unterschiedliche Art und Weise zur Veränderung der DNA führen. Es kann sich bei den Mutagenen um Basenanaloga handeln, die in die DNA eingebaut werden; es können interkalierende Agenzien sein; oder es handelt sich um alkylierende Verbindungen, durch welche Alkylgruppen an die Basen angehängt werden. Bei den alkylierenden Verbindungen handelt es sich um elektrophile Substanzen, die vor allem die Ringstickstoff- und Ringsauerstoffatome der DNA-Basen, aber auch die Phosphatgruppen angreifen. Zu den alkylierenden Agenzien gehören Substanzen, die aufgrund ihrer starken zytotoxischen Wirkung in der Tumorthherapie eingesetzt werden (z.B. Streptozotozin, Procarbazin und Carmustin) und Substanzen, die in der Mutations- und Krebsforschung eingesetzt werden. Zu diesen alkylierenden Substanzen gehören methylierende Agenzien, wie N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG), N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU) und Methylmethansulfonat (MMS) und ethylierende Agenzien wie N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (ENU). Das Hauptreaktionsprodukt der methylierenden Agenzien ist das N⁷-Methylguanin und bei ENU kommt es hauptsächlich zur Bildung von Phosphotriestern. Am zweithäufigsten sind Methylierungen und Alkylierungen der N³-Position des Adenins. Wichtige Unterschiede zwischen den monoalkylierenden Agenzien ergeben sich in der Methylierung der O⁶-Position des Guanins, wodurch es zur Bildung von O⁶-Methylguanin (O⁶-MeG) kommt. Bei MNNG erfolgen 7% der Methylierung an dieser Position, bei MNU sind es zwischen 5,9% und 8,2%, bei MMS hingegen erfolgen nur 0,3% der Methylierung an der O⁶-Position des Guanins (Beranek, 1990). Bei O⁶-MeG handelt es sich um eine stark prämutagene und prätoxische Läsion, deren Entfernung aus der DNA eine entscheidende Rolle für das Überleben der Zelle und die Verhinderungen von Mutationen spielt (Kaina *et al.*, 1991).

1.1.3 Prozessierung von O⁶-MeG

Für die Reparatur von O⁶-MeG spielen zwei Reparaturmechanismen eine Rolle, welche in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben werden. Es handelt sich hierbei um die Basenfehlpaarungsreparatur (MMR) und eine Schadensreversion durch das Enzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Die Interaktion zwischen der MMR und der MGMT ist in Abb.1.1 dargestellt.

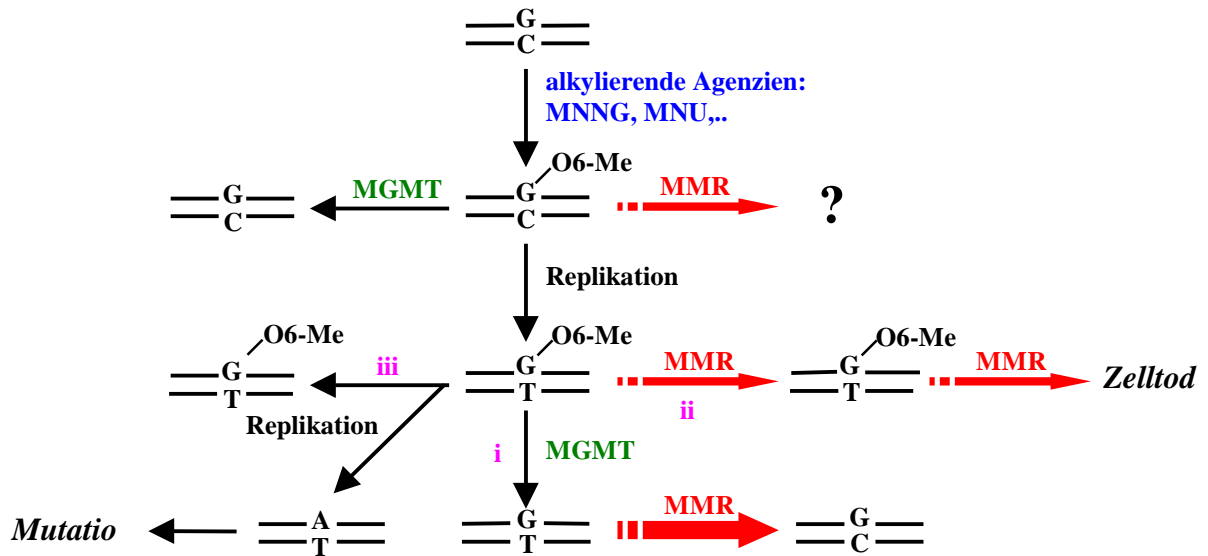


Abb.1.1 Interaktionen zwischen Basenfehlpaarungsreparatur (MMR) und O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) bei der Reparatur von O⁶-Methylguanin

Wie bereits erwähnt, führt die Methylierung von Guanosin zur Entstehung von O⁶-MeG. Von diesem kann die Methylgruppe durch die MGMT entfernt werden, wobei der Ausgangszustand wiederhergestellt wird. Erfolgt diese Reparatur nicht, kommt es nach der nächsten Replikationsrunde zur Bildung einer O⁶-MeGT Basenfehlpaarung. Diese Fehlpaarung kann auf drei unterschiedlichen Wegen prozessiert werden. (i) Im Normalfall kommt es zur Entfernung der Methylgruppe durch die MGMT, wodurch eine GT Fehlpaarung entsteht. Diese kann ihrerseits durch die MMR repariert werden, wodurch das ursprüngliche Basenpaar GC wiederhergestellt wird. (ii) Wird die Methylgruppe nicht entfernt, kommt es zur Reparatur der O⁶-MeGT Fehlpaarung durch die MMR. Diese Reparatur ist allerdings fehlerhaft, da gegenüber O⁶-MeG mit hoher Wahrscheinlichkeit wieder ein T eingebaut wird. Durch wiederholte Versuche der MMR diese Läsion zu reparieren, kommt es zu sekundären Schäden in der DNA, die den Tod der Zelle bewirken können (Karran and Bignami, 1992). (iii) Kommt es zu einem erneuten Replikationszyklus,

bevor die MMR oder die MGMT den Schaden prozessiert haben, persistiert die Läsion in einer der beiden Tochterzellen, während es in der anderen zu einer GC→AT Transition kommt (Loveless, 1969; Eadi *et al.*, 1984; Yarosh *et al.*, 1985).

1.2 O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

Das humane MGMT-Protein besteht aus 208 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 22 kDa (Tano *et al.*, 1990). Das Protein beinhaltet eine Region von 61 Aminosäuren, die eine 60 - 65 prozentige Ähnlichkeit mit dem Ada Protein von *Escherichia coli* aufweist. Die MGMT kann die Methylgruppe von O⁶-MeG und von O⁶-MeT in einer Ein-Schritt-Reaktion auf einen internen Cysteinrest im aktiven Zentrum übertragen (Pegg *et al.*, 1993; 1995). Hierbei kommt es zur Inaktivierung der MGMT, welche deshalb auch als Suizid-Enzym bezeichnet wird. Neben Methylgruppen kann das Enzym auch längerkettige Alkylgruppen von der O⁶-Position des Guanins auf sich selbst übertragen, wobei die Effizienz mit zunehmender Länge der Alkylgruppe abnimmt.

1.2.1 Korrelation zwischen MGMT-Status und Resistenz

Die MGMT-Aktivität wurde in einer Reihe von verschiedenen humanen Tumoren und den korrespondierenden Geweben aus Gehirn, Dickdarm, Ovar, Testis und Brust gemessen, wobei sich zeigte, daß es während der Tumorgenese oft zu einer Inaktivierung der MGMT kommt (Preuss *et al.*, 1995). MGMT-defiziente Zelllinien können O⁶-MeG nicht mehr reparieren und werden dadurch sensitiv gegenüber der Behandlung mit alkylierenden Agenzien. Man bezeichnet diesen Phänotyp als Mex⁻ im Gegensatz zu dem Phänotyp der profizienten Zellen, der als Mex⁺ bezeichnet wird (Day *et al.*, 1980; Yarosh *et al.*, 1983). Die Expression der MGMT ist stark mit der Entwicklung von Resistenzen gegenüber alkylierenden Verbindungen assoziiert. So führt die Überexpression der MGMT in Hautzellen der Maus zu einer Verminderung der Entwicklung von Hauttumoren nach der Behandlung mit ACNU (Becker *et al.*, 1997). *In vitro* zeigte sich, daß die MGMT einen protektiven Effekt auf die cytotoxische und rekombinogene Wirkung mehrerer antineoplastischer Agenzien besitzt. So sind Mex⁺ Zellen resistenter gegenüber der Behandlung mit ACNU (Nimustin; 1-(4-amino-2-methyl-pyrimidinyl)-methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureahydroxylchloride), BCNU (Carmustin; 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-

nitrosourea), CCNU (Lomustin; N-(2-chloroethyl)-N'-cyclohexyl-N-nitrosourea), HeCNU (N-hydroxyethyl-N-chloroethylnitrosourea) und Streptozotolin als die vergleichbaren Mex⁻ Zellen (Chen *et al.*, 1994; Kokkinakis *et al.*, 1997).

1.2.2 Regulation der MGMT

Die Regulation der MGMT kann auf mehreren Ebenen erfolgen, wobei bekannt ist, daß es in Mex⁻ Zellen nur in seltenen Fällen zur mutationsbedingten Inaktivierung kommt. Eine transkriptionelle Regulation der MGMT ist aus verschiedenen Spezies nach Behandlung mit einer Vielzahl von Agenzien bekannt. *In vivo* wurde die Induktion der MGMT nach γ -Bestrahlung in der Rattenleber beobachtet (Chan *et al.*, 1992) und *in vitro* führt die Behandlung von Ratten-Hepatoma-Zellen mit MNU, MNNG, MMS, UV-Licht und γ -Strahlung zu einer Zunahme der MGMT-mRNA, des MGMT-Proteins und der Enzymaktivität (Lefebvre *et al.*, 1986; Fritz *et al.*, 1991). In humanen Hepatoma-Zellen kommt es durch die Behandlung mit EMS, MMS und γ -Strahlung zu einer Induktion der MGMT (Lefebvre *et al.*, 1993). Auch das Hormon Dexamethason kann über Bindung an „glucocorticoid responsive elements“ des MGMT-Promotors zu einer Induktion des MGMT-Gens führen (Biswas *et al.*, 1999). Neben der Induktion kann die MGMT-Aktivität auch durch die Amplifikation des Gens (Tano *et al.*, 1997) und über ein „Enhancer“-Element reguliert werden. An dieses Element, das eine Größe von 59 Bp besitzt und für die Promotorfunktion unerlässlich ist, bindet ein als „MGMT enhancer binding protein“ (MEBP) bezeichneter Faktor, welcher nur im Kern von Mex⁺ Zellen gefunden wurde. In Mex⁻ Zellen kann MEBP nur im Cytoplasma detektiert werden (Chen *et al.*, 1997). Dieser Befund ist bisher allerdings von keiner anderen Arbeitsgruppe bestätigt worden.

Die Expression von MGMT ist stark vom Methylierungsstatus der korrespondierenden genomischen DNA abhängig. Hierbei kann man zwei verschiedene Möglichkeiten unterscheiden. Die Methylierung des Genkörpers, also des kodierenden Bereichs des Gens, führt zu einer Steigerung der MGMT-Aktivität. So wurde gezeigt, daß die chronische Behandlung von Tumoren mit 5-Azacytidin, einem Nukleosidanalogon, das in die DNA eingebaut wird, wo es im Gegensatz zu Cytidin nicht methyliert werden kann, zu einer Demethylierung des Genkörpers und einer damit verbundenen Reduktion der MGMT-mRNA führt (Pieper *et al.*, 1991). Ein Vergleich zwischen verschiedenen Mex⁺ und Mex⁻ Zelllinien zeigte, daß alle Mex⁺ Zelllinien aber keine der Mex⁻ Zelllinien eine starke Methylierung der MspI/HpaII Schnittstellen im Bereich der Exons aufweisen (Wang *et al.*,

1992). Die Methylierung des Promotors führt im Gegensatz zur Methylierung des Genkörpers zu einer Reduktion der MGMT-Aktivität. Der MGMT-Promotor besitzt mehrere extrem Guanin- und Cytosin- reiche Regionen, welche aus 10 Hexanukleotidmotiven (CCGCCC) bestehen. Diese CpG-Inseln sind für die Methylierung und damit für die Aktivität des Promotors verantwortlich (Harris *et al.*, 1991) und liegen im Bereich von -249 bis -103 und von +107 bis +196 (Qian *et al.*, 1997). Methylierung dieser Stellen führt in Mex⁻ Zellen zur Abschaltung des Promotors. Behandlung der Zellen mit 5-Azacytidin führt zur Demethylierung des Promotors und dadurch zur Steigerung der MGMT-Aktivität. Durch den Vergleich zwischen Mex⁺ and Mex⁻ Myelomzellen zeigte sich, daß die Hypermethylierung der CpG-Inseln in den Mex⁻ Zellen mit einer Heterochromatinisierung im Bereich des Transkriptionsstarts assoziiert ist (Watts *et al.*, 1997). In diesem Bereich liegt bei Mex⁺ Glioblastomzellen eine 250 Bp große nukleosomenfreie Transkriptionsfaktorbindestelle, die von 4 präzise positionierten Nukleosomen flankiert wird (Patel *et al.*, 1997). In Mex⁻ Zellen kommt es durch die Methylierung der CpG-Inseln zu einer Änderung dieser Struktur, wobei die Transkriptionsfaktorbindestelle von unregelmäßig positionierten Nukleosomen besetzt wird, und somit für die Transkriptionsfaktoren und die Polymerase nicht mehr zugänglich ist.

1.3 Basenfehlpaarungsreparatur

Die Existenz eines Reparatursystems, welches für die Reparatur von Basenfehlpaarungen, die während der Replikation entstehen, verantwortlich ist, wurde zum ersten Mal 1964 von Robin Holliday vorhergesagt (Holliday *et al.*, 1964). Das entsprechende System wird als Basenfehlpaarungsreparatur oder als „mismatch repair system“ (MMR) bezeichnet. Es korrigiert Basenfehlpaarungen nach dem Exzisionsprinzip, wobei längere DNA-Sequenzen ausgetauscht werden. Die Existenz der MMR wurde sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten nachgewiesen und wird in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben (zur Übersicht siehe Abb.1.2).

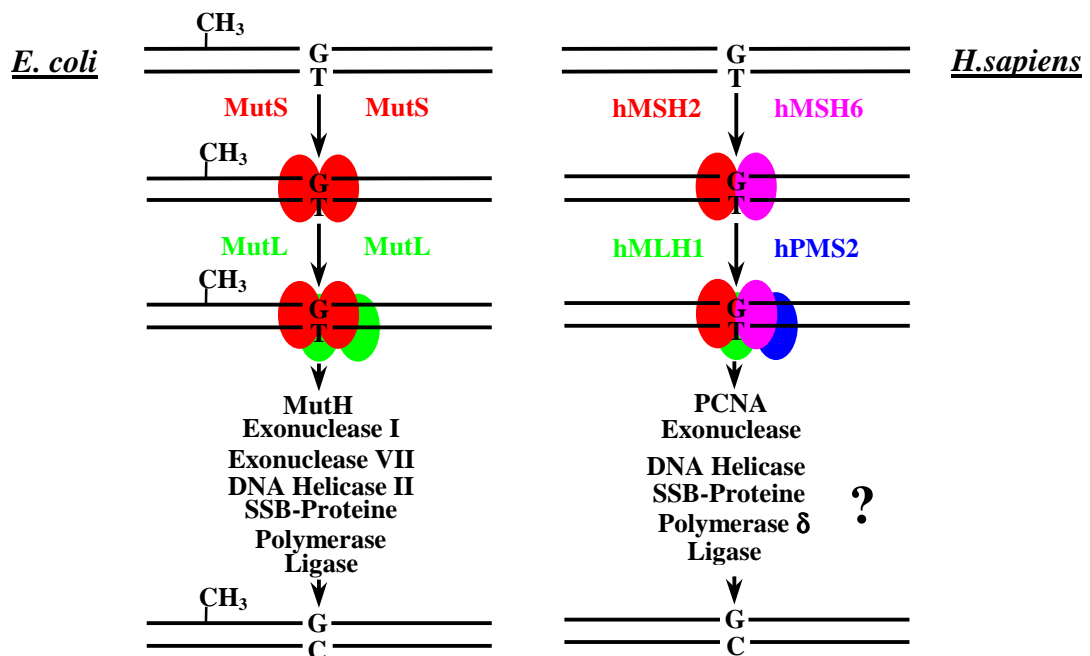


Abb.1.2 Vergleich der Basenfehlpaarungsreparatur bei Prokaryonten und Eukaryonten

1.3.1 Basenfehlpaarungsreparatur in Prokaryonten

Am besten untersucht ist das MMR-System in *E. coli*. Neben der Reparatur von Fehlpaarungen, welche während der Replikation entstehen, spielt die Fehlpaarungsreparatur auch eine wichtige Rolle bei der Prozessierung von Rekombinationsintermediaten (Feinstein and Low, 1986). Die Reparatur erfolgt aber auch unabhängig von der Rekombination und ist einer der wichtigsten Mechanismen, um die

genetische Stabilität aufrecht zu erhalten. Die Reparatur erfolgt in 5' → 3' Richtung und betrifft einen Bereich von ca. 3000 Nukleotiden (Wagner *et al.*, 1976).

1.3.1.1. Strangspezifität der Basenfehlpaarungsreparatur bei Prokaryonten

Damit bei der Rekombination spezifisch der neu replizierte Strang repariert wird, muß das MMR-System zwischen dem parentalen Strang und dem Tochterstrang unterscheiden können. Die Diskriminierung zwischen dem alten und dem neu synthetisierten Strang wird dabei durch die Untermethylierung der neu synthetisierten DNA vermittelt. Bei *E. coli* existieren spezielle Mutantenstämme (*dam*⁻-Stämme), welche defizient in der Methylierung der N⁶-Position von Adenin innerhalb von d(GATC)-Sequenzen sind und sich durch eine erhöhte Transitionsrate und Rasterschubmutationsrate auszeichnen (Herman *et al.*, 1981). Dieselben Effekte sind auch bei *E. coli* Stämmen, welche Defizienzen in der MMR aufweisen, zu beobachten (Glickman *et al.*, 1978; 1979; 1980). Durch Transfektion von *E. coli* mit Heteroduplex DNA konnte schließlich gezeigt werden, daß die Methylierung von d(GATC)-Sequenzen für die Strangspezifität verantwortlich ist. Durch die Verwendung von Heteroduplex, die *in vitro* durch die DNA-Adenin-Methylase methyliert wurden, konnte gezeigt werden, daß nur hemimethylierte Heteroduplexe, nicht aber komplett methylierte Heteroduplexe, repariert werden. Hierbei wird der Strang repariert, der die unmethylierte d(GATC)-Sequenz trägt (Pukkila *et al.*, 1983; Längle-Rouault *et al.*, 1987). Reparatur kann jedoch auch in Abwesenheit dieser Sequenz erfolgen, wenn die DNA einen Einzelstrangbruch enthält. In diesem Fall erfolgt die Reparatur auf dem Einzelstrangbruchtragenden Strang. Für eine effiziente Fehlpaarungsreparatur in Prokaryonten ist ein Einzelstrangbruch aber wahrscheinlich nicht nötig.

1.3.1.2. Effektivität und Selektivität der Basenfehlpaarungsreparatur bei Prokaryonten

Die d(GATC)-Sequenzen vermitteln nicht nur die Strangspezifität, sie beeinflussen auch die Effektivität der Basenfehlpaarungsreparatur. DNA Heteroduplexe, die vier d(GATC)-Sequenzen besitzen, werden *in vitro* effizienter repariert als DNA Heteroduplexe, die nur eine d(GATC)-Sequenz besitzen (Lahue *et al.*, 1987). Hierbei ist jedoch eine hemimethylierte d(GATC)-Sequenz ausreichend, um die Strangspezifität der Reparatur zu vermitteln.

Die Effektivität der Fehlpaarungsreparatur hängt allerdings nicht nur von dem Vorhandensein einer unmethylierten d(GATC)-Sequenz, sondern hauptsächlich von der

Art der Fehlpaarung ab. Von den acht möglichen Basenfehlpaarungen erfolgt *in vivo* die Reparatur von GT, AC Transitionen und von GG und AA Transversionen am effektivsten. Die Transversionen TT, CT und GA werden deutlich weniger effektiv repariert und CC Transversionen scheinen durch das Fehlpaarungssystem überhaupt nicht prozessiert zu werden (Kramer *et al.*, 1984; Jones *et al.*, 1987; Dohet *et al.*, 1986). Auch die nähere Umgebung um die Fehlpaarung herum beeinflusst die Effektivität der Reparatur. So steigt die Reparatureffizienz von Transversionen mit zunehmenden G:C-Gehalt in der benachbarten Sequenz an (Jones *et al.*, 1987). *In vitro* werden vom MMR alle acht möglichen Fehlpaarungen erkannt (Su *et al.*, 1987), wobei die Reparatur jedoch unterschiedlich effektiv ist. GT Fehlpaarungen werden am effizientesten repariert, während die Effizienz der Reparatur bei AC, CT, AA, TT und GG Fehlpaarungen nur 40-80% der von GT beträgt. CC Fehlpaarungen werden nur sehr schlecht repariert und die Reparatur von AG Fehlpaarung erfolgt unabhängig von der Basenfehlpaarungsreparatur. Die Reparatur aller Fehlpaarungen außer AG benötigt die Genprodukte von *mutH*, *mutL* und *mutS*, wobei innerhalb einer hemimethylierten DNA die Reparatur des Stranges, der eine unmethylierte d(GATC)-Sequenz enthält, effektiver ist als die Reparatur des Stranges mit der methylierten d(GATC)-Sequenz. Neben der Reparatur von Basenfehlpaarungen ist die Fehlpaarungsreparatur auch in der Lage, kleinere Insertions- und Deletions-Fehlpaarungen zu prozessieren (Dohet *et al.*, 1986).

1.3.1.3 Mechanismus und Komponenten der Basenfehlpaarungsreparatur bei Prokaryonten

Untersuchungen von Mutanten, die Defizienzen in der Fehlpaarungsreparatur aufweisen, zeigten, daß es sich bei der MMR um ein Multienzymssystem handelt (Abb.1.2). Die Untersuchung der Fehlpaarungsreparatur wurde durch die Etablierung eines *in vitro* Assays entscheidend erleichtert. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß die Reparatur von GT Fehlpaarungen auch *in vitro* abhängig von der Methylierung einer d(GATC) Sequenz ist und ATP und die Produkte der Gene *mutH*, *mutL*, *mutS* und *uvrE* benötigt (Lu *et al.*, 1983). Weitere Versuche zeigten, daß *in vitro* MutL, MutS, MutH, DNA-Helicase II, SSB-Moleküle, DNA Polymerase III, Exonuklease I, DNA Ligase, ATP und dNTPs ausreichend waren, um Basenfehlpaarungen zu reparieren (Lahue *et al.*, 1989).

In Prokaryonten erfolgt der erste Schritt der MMR, die Erkennung der Fehlpaarung, durch ein Homodimer aus zwei MutS-Proteinen. Das MutS-Protein besitzt ein Molekulargewicht

von 97 kDa und ist fähig, an Basenfehlpaarungen zu binden (Scheuermann *et al.*, 1984). Nachdem das MutS-Homodimer die Fehlpaarung erkannt und gebunden hat, kommt es zur Anlagerung eines weiteren Homodimers, welches aus zwei MutL-Proteinen besteht. Das MutL-Protein besitzt ein Molekulargewicht von 70 kDa und kann mit dem MutS-Homodimer einen Komplex bilden. Diese Komplexbildung ist abhängig von der Bindung von ATP an MutS, aber nicht von der Hydrolyse von ATP. MutL besitzt nicht die Fähigkeit, eine Fehlpaarung zu erkennen und zu binden (Grilley *et al.*, 1989).

Als nächstes erfolgt die Bindung von MutH, welches ein Molekulargewicht von 25 kDa und eine endonucleolytische Aktivität besitzt (Welch *et al.*, 1987). Mit dieser Mg^{2+} abhängigen Aktivität schneidet MutH 5' vor dem dG einer unmethylierten d(GATC)-Sequenz und führt so zur Bildung eines 5'-phosphoryl und eines 3'-hydroxyl Terminus. MutH ist für die Strangspezifität der MMR verantwortlich, denn es schneidet nur den unmethylierten Strang einer hemimethylierten DNA, wobei die Orientierung der d(GATC)-Sequenz keine Rolle spielt (Au *et al.*, 1992; Grilley *et al.*, 1993). Da MutH d(GATC)-Sequenzen schneidet, die mehrere hundert Basen entfernt von der Fehlpaarung liegen können, muß eine sterische Umlagerung erfolgen, damit die Fehlpaarung und d(GATC)-Sequenz in engen Kontakt kommen. Für die Reparatur der Heteroduplexe, die keine d(GATC)-Sequenz enthalten, bei denen die Strangspezifität aber über einen Einzelstrangbruch vermittelt wird, ist MutH nicht nötig.

Je nachdem, auf welcher Seite der Fehlpaarung die unmethylierte d(GATC)-Sequenz und damit die Schnittstelle von *mutH* liegt, werden verschiedene Enzyme benötigt, um die Fehlpaarung herauszuschneiden. Hierbei läuft die Exzision bidirektional ab (Cooper *et al.*, 1993). Liegt die unmethylierte d(GATC)-Sequenz 3' der Fehlpaarung, erfolgt die Exzision durch die 3'→5' Aktivität der Exonuklease I, liegt die unmethylierte d(GATC)-Sequenz 5' der Fehlpaarung, erfolgt die Exzision durch die 5'→3' Aktivität der Exonuklease VII oder der RecJ Exonuklease. Nach der Exzision kommt es zur Anlagerung des UvrD-Genprodukts (Maples *et al.*, 1982; Hickson *et al.*, 1983; Kumura *et al.*, 1984). Bei dem Produkt des *uvrD*-Gens handelt es sich um ein 75 kDa großes Protein, das mit der DNA-Helicase II (Richet *et al.*, 1976) und der DNA abhängigen ATPase I (Abdel-Monem *et al.*, 1977) identisch ist. Das Protein besitzt die Fähigkeit, doppelsträngige DNA zu entwinden, wobei in der DNA ein Einzelstrangbruch vorhanden sein muß. Die Entwindung der DNA benötigt ATP, welches von dem UvrD-Genprodukt zu ADP hydrolysiert wird und erfolgt unidirektional in 3'→5' Richtung auf dem Strang entlang (Matson *et al.*, 1986). Nach der

Entwindung der doppelsträngigen DNA wird der Einzelstrang durch SSB-Moleküle stabilisiert und der neue Strang durch die DNA-Polymerase II synthetisiert. Die freien DNA-Enden werden zum Schluß durch eine Ligase verbunden.

1.3.2 Basenfehlpaarungsreparatur in Eukaryonten

Die Basenfehlpaarungsreparatur erfolgt nicht nur in Prokaryonten, die beteiligten Komponenten konnten auch in Eukaryonten identifiziert werden. Die erste eukaryontische Spezies, in der die Basenfehlpaarungsreparatur beobachtet wurde, war die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Muster-Nassal und Kolodner, 1986). In kurzem zeitlichen Abstand erfolgte danach der Nachweis von MMR in höheren Organismen, wie in *Xenopus laevis* (Brooks *et al.*, 1989) in *Drosophila melanogaster* (Holmes *et al.*, 1990) und in verschiedenen Säugetieren.

1.3.2.1 Strangspezifität und Effektivität der Basenfehlpaarungsreparatur bei Eukaryonten

Die Frage nach der Tochterstrang-Spezifität der Basenfehlpaarungsreparatur konnte bis jetzt noch nicht vollständig geklärt werden. Im Gegensatz zu den Prokaryonten kommt es bei der Replikation in Eukaryonten nicht zu einer Methylierung von d(GATC)-Sequenzen. Die Fehlpaarungsreparatur kann hier also nicht methylierungsgerichtet ablaufen, obwohl auch hier eine Strangspezifität nachgewiesen wurde (Thomas *et al.*, 1991). Vielmehr wird die Strangspezifität in Eukaryonten über Strangbrüche vermittelt, wobei der geschnittene Strang präferenziell repariert wird. Die Effektivität der Reparatur ist bei den einzelnen Fehlpaarungen unterschiedlich hoch (GT>GG=AC>CC) und benötigt ATP und Mg²⁺. Zusätzlich wurde gezeigt, daß auch AA, AG, TT und CT Fehlpaarungen repariert werden und daß die Effektivität der Reparatur mit zunehmender Entfernung zwischen Fehlpaarung und Einzelstrangbruch abnimmt (Fang *et al.*, 1993). Die Abnahme der Reparatur ist dabei unabhängig von der Polarität des geschnittenen Stranges, was darauf hinweist, daß die MMR über einen bidirektionalen Mechanismus läuft. Die MMR spielt nicht nur bei der Erkennung von Basenfehlpaarungen, sondern auch bei der Reparatur von kleinen Insertions-Deletions-Fehlpaarungen (IDLs) eine Rolle, wobei IDLs, die kleiner als acht Nukleotide sind, durch das MMR-System erkannt und repariert werden (Parson *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995). Die obere Grenze von IDLs, die durch MMR repariert werden können, liegt bei 16 Nukleotiden (Umar *et al.*, 1994a). Eine Reparatur von größeren IDLs

von 27, 62 und 216 Nukleotiden konnte zwar auch beobachtet werden., diese erfolgt jedoch nicht durch das Fehlpaarungsreparatursystem (Littmann *et al.*, 1999).

1.3.2.2 Basenfehlpaarungsreparatur und HNPCC

Bei der Identifizierung der Komponenten der Basenfehlpaarungsreparatur spielten Zellen, die aus Tumoren des HNPCC („hereditary nonpolyposis colon cancer“, Lynch Syndrom)-Typs isoliert wurden, eine wichtige Rolle. HNPCC ist eine der häufigsten genetisch prädispositionierten Krebserkrankungen, welche 5 von 1000 Individuen betrifft (Holland *et al.*, 1997; Lynch *et al.*, 1993). Die betroffene Individuen entwickeln oft schon im Alter unter 50 Jahren Tumore in Dickdarm, Endometrium, Ovar und anderen Organen. In HNPCC-Zellen kommt es zu einer erhöhten Mutationsrate im HPRT-Locus, wobei 80% der Mutationen aus Transitionen bestehen. Zusätzlich erfolgen Insertions/Deletions-Fehlpaarungen innerhalb von Mononukleotidwiederholungen und es kommt zu Hypermutableität der (CA)_n Mikrosatelliten-DNA. Für diese Hypermutableität sind Replikationsfehler verantwortlich und der entsprechende Phänotyp wird als „replication error phenotype“ (RER⁺) oder auch als „microsatellite instability phenotype“ (MIN⁺) bezeichnet.

Die Erbllichkeit dieser Erkrankung wurde schon im Jahre 1966 nachgewiesen (Lynch *et al.*, 1966) und eine Prädisposition für HNPCC ist mit Markern in den Chromosomenbereichen 2p16 und 3p21 assoziiert (Peltomäki *et al.*, 1993; Aaltonen *et al.*, 1993). Es ist bekannt, daß in diesem Bereich Gene liegen, die für die MMR-Proteine kodieren. Die Mutation dieser Gene ist für die Entstehung von HNPCC verantwortlich. So sind Mutationen im *msh2* Gen für 50% (Leach *et al.*, 1993) und Mutationen im *mlh1* Gen für weiter 30% (Papadopoulos *et al.*, 1994) aller HNPCC-Erkrankungen verantwortlich. Für die restlichen 20% der HNPCC-Erkrankungen sind wahrscheinlich Mutationen im *msh6* und *pms2* Gen verantwortlich.

1.3.2.3 Komponenten und Mechanismus der Basenfehlpaarungsreparatur bei Eukaryonten

Bei Eukaryonten erfolgt der erste Schritt der Fehlpaarungsreparatur, die Erkennung der Fehlpaarung, durch den MutS α Komplex, welcher aus den beiden MutS-homologen Proteinen MSH2 und MSH6 besteht. Die Bindung von MutS α an die DNA erfolgt über die MSH6 Untereinheit. Dieser Komplex spielt nicht nur bei der Erkennung von Fehlpaarungen, sondern auch bei der Reparatur von kleinen IDLs eine Rolle. Es zeigte sich, daß das für MSH2 kodierende Gen auf dem Chromosomenabschnitt 2p22-21 liegt und ein 102 kDa großes Protein kodiert (Fishel *et al.*, 1993; Leach *et al.*, 1993). Mutationen im *msh2*-Gen vermitteln bei einer Reihe von HNPCC-Zellen den RER⁺ Phänotyp. So konnte gezeigt werden, daß die HNPCC-Zelllinie LoVo eine Mutation im *msh2*-Gen aufweist und weder Basenfehlpaarungen noch IDLs reparieren kann. Hierdurch kommt es zu einer Instabilität der Mono- und Dinukleotid-Mikrosatelliten-Repeats (Umar *et al.*, 1994a). Bei der Untersuchung der Basenfehlpaarungsreparatur konnte aus HeLa-Extrakten ein Komplex isoliert werden, der sowohl an GT Fehlpaarungen als auch an IDLs von ein und zwei Nukleotiden bindet und in LoVo-Zellen die Fehlpaarungsreparatur wiederherstellt (Palombo *et al.*, 1995; Drummond *et al.*, 1995). Dieser, als MutS α bezeichneter Komplex, besteht aus MSH2 und einem weiteren 160 kDa großen Protein, welches als „GT-binding protein“ (GTBP) oder MSH6 bezeichnet wurde. Das *msh6*-Gen befindet sich auf dem Chromosom 2p16 in unmittelbarer Nähe des *msh2*-Gens, was dafür spricht, daß beide Gene durch Duplikation eines gemeinsamen Vorläufergens entstanden sind (Papadopoulos *et al.*, 1995). Auch Mutationen im *msh6*-Gen vermitteln in einigen HNPCC-Zelllinien, wie der Zelllinien DLD1, den RER⁺ Phänotyp. Diese Zelllinien können ebenfalls keine Basenfehlpaarungen reparieren, jedoch erfolgt noch eine Reparatur von IDLs, wodurch es nur zur Instabilität der Mononukleotid-Mikrosatelliten-Repeats kommt. Diese Befunde führten zur Identifizierung eines zweiten Komplexes, MutS β , welcher aus MSH2 und einem weiteren MutS-homologen Protein, MSH3 (127 kDa) besteht. Dieser Komplex bindet nur noch an IDLs von 1-4 Nukleotiden, jedoch nicht an Basenfehlpaarungen (Palombo *et al.*, 1996). Unter normalen Bedingungen werden alle drei MutS-Homologe exprimiert, wobei MSH2 jedoch präferentiell Komplexe mit MSH6 bildet und MSH3 ohne die Stabilisierung durch MSH2 degradiert. Im Fall der MSH6-Defizienz kommt es hingegen zur Komplexbildung zwischen MSH2 und MSH3 wodurch die Degradation von MSH3 verhindert wird. MSH3 erfüllt somit eine „Backup“-Funktion für

MSH6. Im Falle der MSH6-Defizienz häufen die Zellen hierdurch zwar Punktmutationen an, jedoch würde es zu keinen „slippage errors“ und damit zu keiner Bildung von Rasterschubmutationen kommen (Genschel *et al.*, 1998; Marra *et al.*, 1998). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß MSH3 in bestimmten Zelltypen einer komplexen Regulation unterworfen ist und hier auch unter normalen Bedingungen eine wichtige Rolle spielt. Die Komplexbildung zwischen MSH2 und MSH3 oder MSH6 erfolgt über zwei spezifische Bindungsdomänen (Guerette *et al.*, 1998). Die erste Domäne liegt bei MSH2 zwischen den Aminosäuren (As) 378-625 und interagiert mit der Domäne im Bereich der As 126-250 bei MSH3 und im Bereich der As 326-575 bei MSH6. Die zweite Bindungsdomäne von MSH2 liegt zwischen den Aminosäuren 875- 934 und interagiert mit der Domäne im Bereich der As 1050-1128 bei MSH3 und der Domäne im Bereich der As 1302-1360 bei MSH6. Viele in HNPCC-Zellen beobachteten Mutationen liegen im Bereich dieser Bindungsdomänen.

Der weitere Mechanismus der Fehlpaarungsreparatur ist in eukaryontischen Zellen noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Nach der Erkennung und Bindung der Fehlpaarung durch MutS α kommt es zur Assoziation eines Heterodimers, welches als MutL α bezeichnet wird. Dieser Komplex besteht aus den beiden MutL-homologen Proteinen MLH1 und PMS2. Das *mlh1*-Gen liegt auf dem Chromosom 3p21 und kodiert für ein 85 kDa großes Protein; das *pms2*-Gen liegt auf dem Chromosom 7p und kodiert für ein 100 kDa großes Protein (Nicolaidis *et al.*, 1994; Papadopoulos *et al.*, 1994). Bei der Assoziation zwischen MutS α und MutL α ist eine direkte Bindung zwischen den Komplexen noch nicht nachgewiesen worden. Auch die Funktion von MutL α ist noch nicht geklärt. Mutationen im *mlh1*- und im *pms2*-Gen vermitteln ebenfalls bei einer Reihe von HNPCC-Zellen den RER⁺ Phänotyp. So kann die HNPCC-Zelllinie H6, die eine Mutation im *mlh1*-Gen aufweist, weder Basenfehlpaarungen noch IDLs reparieren (Parson *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, daß MLH1-defiziente HCT116-Zellen keine Basenfehlpaarungen, wohl aber IDLs von 2 bis 4 Nukleotiden reparieren können (Umar *et al.*, 1994b). Nach der Assoziation zwischen MutS α und MutL α kommt es zur Exzision der Basenfehlpaarung, wobei der geschnittene Strang präferenziell repariert wird. Über die an der Exzision beteiligten Exonukleasen sind bis jetzt nur bei Hefen einige Daten bekannt. Hier spielen scheinbar die Genprodukte des *exoI* und des *rthI* Gens eine Rolle, welche für 5'→3' Exonukleasen kodieren (Szankasi *et al.*, 1995; Turchi *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1995). Eine noch nicht weiter geklärte Rolle bei

der Fehlpaarungsreparatur spielt das „Proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA). Es bildet bei der Replikation in eukaryontischen Zellen als Homodimer eine Klammer um die DNA, welche die Prozessivität der Polymerase δ und ϵ erhöht (Krishna *et al.*, 1994). In der Hefe konnte gezeigt werden, daß PCNA sowohl mit MLH1 als auch mit MSH2 interagieren kann (Johnson *et al.*, 1996; Umar *et al.*, 1996). Als für die Fehlpaarungsreparatur verantwortliche DNA-Polymerase konnte die Polymerase δ identifiziert werden. Von mehreren Arbeitsgruppen wurde unabhängig gezeigt, daß die Fehlpaarungsreparatur durch Aphidicolin (inhibiert DNA-Polymerase α , δ und ϵ), nicht aber durch ddTTP (inhibiert Polymerase β) inhibiert wird (Holmes *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1991; Fang *et al.*, 1993). Zusätzlich wurde gezeigt, daß Extrakte, in welchen die Polymerase δ depletiert wurde, defizient in der Fehlpaarungsreparatur sind (Longley *et al.*, 1997).

1.3.2.4 Rolle der Basenfehlpaarungsreparatur als Sensor für genetische Schäden

Die wichtigste Rolle der Fehlpaarungsreparatur ist sicherlich die Reparatur von Fehlpaarungen, die während der Replikation entstehen. Zusätzlich werden durch die MMR auch replikationsunabhängige Veränderungen in der DNA erkannt und repariert, die auf der DNA-schädigenden Wirkung von chemischen Agenzien beruhen. Wie bereits erwähnt induzieren die alkylierenden Agenzien MNNG und MNU die Bildung von O⁶-Methylguanin, die hierbei entstehenden O⁶-MeGT Basenfehlpaarungen, wie auch andere durch alkylierende Agenzien erzeugte Fehlpaarungen (O⁶-MeGC, O⁴-MeTA und O⁴-MeTG) können von MutS α erkannt und durch die MMR prozessiert werden (Duckett *et al.*, 1996; 1999). Neben den durch alkylierende Agenzien erzeugten Basenfehlpaarungen können auch andere genetische Schäden prozessiert werden. Hierzu gehören durch Cisplatin erzeugte 1,2-Intrastrang d(GpG) „cross-link“ Produkte, die ebenfalls von MutS α erkannt werden (Yamada *et al.*, 1997).

1.3.2.5 „Toleranz-Phänotyp“

Ein Phänomen, das ebenfalls mit der MMR zusammenhängt, ist der „Toleranz-Phänotyp“ (Goldmacher *et al.*, 1986). Dieser zeichnet sich dadurch aus, daß Zellen Toleranz gegenüber der Zytotoxizität von O⁶-MeG in der DNA und damit gegenüber methylierenden Agenzien gewinnen, ohne daß es zu einer Aktivitätssteigerung der MGMT kommt. Diese Zellen sind also sowohl Mex⁻ als auch MNNG-resistent. Durch die Behandlung mit methylierenden Agenzien kommt es zur Bildung von O⁶-MeG; nach der nächsten

Replikationsrunde, während der gegenüber O⁶-MeG präferentiell Thymin eingebaut wird, kommt es dann zur Bildung einer O⁶-MeGT Basenfehlpaarung. Diese Fehlpaarung wird durch die MMR prozessiert, wobei gegenüber O⁶-MeG erneut T eingebaut wird. Es wird angenommen, daß es durch wiederholte Versuche der MMR, diese Läsion zu reparieren, im 2. Zellzyklus zur Entstehung von Strangbrüchen und zum Tod der Zelle kommt (Karran and Bignami 1992; Kaina *et al.* 1997). Fällt nun das MMR-System durch Mutationen in einem der beteiligten Gene aus und erfolgt somit keine Reparatur an der O⁶-MeGT Basenfehlpaarung, kommt es zwar zu GC →AT Transitionen nicht aber zum Tod der Zelle. Daß der Ausfall der MMR die Ursache des Toleranz-Phänotyps ist, zeigt zum Beispiel die Tatsache, daß Extrakte aus toleranten Säugerzellen nicht die Fähigkeit zur Bindung an GT-Fehlpaarungen besitzen (Branch *et al.*, 1993; Dosch *et al.*, 1998).

1.3.2.6 ATP-Abhängigkeit der Basenfehlpaarungsreparatur

Kontrovers diskutiert wird die Frage nach der Rolle von ATP/ADP bei der MMR. In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, daß MutS α ATP-abhängig Komplexe mit GT-Fehlpaarungen bildet. Auch die Komplexbildung zwischen MutS α und dem MLH1-PMS1 Komplex erfolgt nur in Gegenwart von ATP, die Hydrolyse von ATP ist hierbei nicht nötig (Habraken *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu bindet der Komplex aus MSH2 und MSH3 nur an IDLs, und zwar unabhängig von ATP (Habraken *et al.*, 1996). Im humanen System konnte gezeigt werden, daß nur MutS α , nicht aber aufgereinigtes MSH2 oder MSH6 an die GT-Fehlpaarung binden können. Sowohl MutS, γ MSH2, hMSH2 als auch γ MSH6 besitzen ATP-Bindestellen, deren Mutation jedoch nicht zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit an GT-Fehlpaarungen, aber zu einem Verlust der MMR-Aktivität führt. Für die Erkennung und Bindung der Basenfehlpaarung ist dementsprechend die Gegenwart von ATP nicht nötig, vielmehr führt die Inkubation mit ATP zu einem Verlust der Effektivität der Bindung. Nach der Bindung an die Fehlpaarung erfolgt die Bindung von ATP und dessen Hydrolyse zu ADP. Die Hydrolyse könnte zu Konformationsänderungen führen und somit die Bindung der anderen MMR-Proteine ermöglichen. Andererseits benötigt die Dissoziation von MutS α von der DNA ATP-Bindung, aber keine ATP-Hydrolyse (Alani *et al.*, 1997; Iccarino *et al.*, 1998). Aus der Untersuchung der prokaryontischen MMR ist bekannt, daß die Bindung von ATP nötig ist, damit es zu einer Interaktion zwischen MutS und MutL kommt. Es wird angenommen, daß die Hydrolyse von ATP hierbei für die

Aktivierung von MutH wichtig ist (Au *et al.*, 1992). Es existieren zwei verschiedene Modelle, welche die Rolle von ATP in eukaryontischen Zellen erklären sollen.

a) Das Translokationsmodell: Hierbei wird angenommen, daß MutS α die bei der Hydrolyse von ATP gewonnene Energie dazu verwendet, um sich entlang der DNA zu bewegen. Hierdurch wandert MutS α von der Stelle der Fehlpaarung zu der Stelle, die für die Strangspezifität verantwortlich ist, wo es durch die Anlagerung von MutL α zum Aufbau des Exzisionskomplexes kommt. Diese Hypothese basiert auf elektronenmikroskopischen Beobachtungen an Extrakten von *E. coli*, die zeigen, daß es bei der Reparatur von GT-Fehlpaarungen zur ATP-abhängigen Bildung einer DNA-Schleife kommt (Allen *et al.*, 1997). Unterstützt wird dieses Modell durch vergleichende Messungen der ATPase-Aktivität und der MMR-Aktivität. Diese zeigten, daß beide ihr Maximum bei 130 mM KCl besitzen, was darauf hinweist, daß die Maximierung der ATPase auch zu einer Maximierung der MMR-Aktivität führt (Blackwell *et al.*, 1998a). Die ATP-abhängige Dissoziation von MutS α von kleinen GT-Heteroduplexen kann durch physikalische Barrieren am Ende der DNA blockiert werden. Dies zeigt, daß die Dissoziation von der DNA eine Translokation entlang der DNA beinhalten muß (Blackwell *et al.*, 1998b). Diese Ergebnisse führten zu einer Verfeinerung des Translokationsmodells. Man geht davon aus, daß es auf jeder MutS α -Untereinheit zwei verschiedene Stellen gibt. Eine L-Stelle, welche in Assoziation mit ATP geschlossen ist und die DNA blockiert sowie eine D-Stelle, durch die die DNA frei diffundieren kann. Hierdurch würden sich beim Entlangwandern des MutS α -Komplexes über die DNA zu beiden Seiten einzelsträngige DNA Schleifen bilden, was die Exzision erleichtern würde.

b) Das „molecular switch“-Modell: In dem zweiten Modell wird ein wesentlich einfacherer Vorgang angenommen, indem die ATPase-Aktivität als molekularer Schalter wirkt. Hierbei ist der MutS α -ADP-Komplex für die Erkennung der Fehlpaarung verantwortlich („active state“). Der MutS α -ATP-Komplex vermittelt die Dissoziation von der DNA („inactive state“) (Gradia *et al.*, 1997).

1.3.2.7 Regulation der Basenfehlpaarungsreparatur

Zur Regulation der MMR sind bis heute nur wenige Daten verfügbar, die unter anderem auf eine zellzyklusabhängige Regulation von MSH2 hinweisen (Marra *et al.*, 1996). So konnte MSH2-Protein in proliferierenden als auch in nicht-proliferierenden Lymphozyten nachgewiesen werden, wobei die Proteinmenge in den proliferierenden Zellen vier-mal höher war. Bei HeLa-S3-Zellen konnte gezeigt werden, daß sich die MSH2-Proteinmenge beim Eintritt in den Zellzyklus erhöht und nach Beendigung des Zellzyklus wieder absinkt. Im Gegensatz dazu ändert sich die MSH2-Expression während des Zellzyklus nur geringfügig. Sie fällt am Übergang von G1 zur S-Phase ab und steigt während der replikativen und postreplikativen Phase wieder an. Über die Regulation der MMR nach Behandlung mit Mutagenen ist bis jetzt nur eine Veröffentlichung verfügbar. In dieser Veröffentlichung wurde gezeigt, daß es in differenzierten Neuroblastomzellen nach einer Behandlung mit Doxorubicin zu einer Zunahme von MSH2- und MSH6-Protein im Kern kommt (Belloni *et al.*, 1999). Die Ursachen hierfür konnten die Autoren jedoch nicht aufklären.

1.4 Mechanismen des Kerntransports

Für alle zellulären Proteine ist es entscheidend, daß sie an den Ort gelangen, an dem sie ihre Funktion erfüllen können. DNA-Reparaturproteine müssen mit der DNA in Wechselwirkung treten. Hierzu ist es nötig, daß die Reparaturproteine in den Zellkern gelangen. Der Transport von Proteinen aus dem Cytoplasma in den Zellkern ist unter anderem von der Größe des Proteins abhängig. Die Kernpore (NPC, „nuclear pore complex“) besteht aus 60-100 verschiedenen Proteinen und besitzt ein Molekulargewicht von 120 Mio Dalton (dies entspricht einer Gesamtmenge von ca 1000 Proteine). Kleine Proteine mit einem Molekulargewicht unter 60 kDa können durch den ständig geöffneten zentralen 90 Å großen inneren Kanal in den Nucleus diffundieren. Bei größeren Proteinen ist das Vorhandensein eines Kernsignals, der NLS („nuclear location sequence“; „nuclear localization signal“) für den Transport entscheidend. Proteine, die solche NLS besitzen, können an NPC-Proteine (Nucleoporine) binden und verursachen eine Konformationsänderung der Kernpore, durch die sich die Porengröße auf 260 Å erhöht. Der genaue Ablauf des NLS-vermittelten Kerntransports wird in den folgenden Abschnitten genauer erklärt und ist in Abbildung 1.3 graphisch dargestellt.

1.4.1 NLS-Sequenzen

NLS-Sequenzen weisen bei den einzelnen Proteinen nur wenige konservierte Merkmale auf und lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Es handelt sich hierbei um kurze Sequenzen von 4 bis 7 basischen Aminosäuren und um längere „bipartite“ Sequenzen. Zu der ersten Gruppe gehört das NLS des SV40 T-Antigens, mit der Sequenz PKKKRKKV (Kalderon *et al.*, 1984) und die NLS des Polyoma „large T-antigen“ mit der Sequenz VSKRPRP (Colledge *et al.*, 1986). Die „bipartite“ Sequenz wurde erstmals im Xenopus Nucleoplasmin entdeckt (Robbins *et al.*, 1991) und besteht aus zwei Bereichen von basischen Aminosäuren (Lysin und/oder Arginin), die durch zehn weniger konservierte Aminosäuren getrennt werden (KR-10-KKKK).

Der Transport dieser NLS-Proteine aus dem Cytoplasma in den Kern läßt sich in zwei Phasen unterteilen (Newmeyer and Forbes, 1988). In der ersten Phase, der stationären Phase, kommt es zur Bindung der NLS-Proteine an den NPC. Es zeigte sich, daß die NLS-Proteine nicht direkt an Nucleoporine binden, sondern daß ein cytoplasmatischer NLS-Rezeptorkomplex existiert, der die Bindung an Nucleoporine vermittelt (Newmeyer and

Forbes, 1990; Adam *et al.*, 1990). Bei diesem Rezeptorkomplex handelt es sich um ein, als Importin bezeichnetes Heterodimer. Die Bindung von Importin an NLS-Proteine kann durch NEM (N-Ethyl-Maleimid) verhindert werden. In der zweiten, der aktiven Phase, kommt es unter Vermittlung einer Reihe von Transportfaktoren zum ATP-abhängigen Transport durch die Kernpore (Adam *et al.*, 1991). Das zentrale Protein, das diese aktive Phase vermittelt, ist die GTPase Ran („Ras-related nuclear protein“; Moore *et al.*, 1993). Neben Importin und Ran werden noch die Proteine p97 und pp15 für den Kerntransport benötigt (Abb.1.3.A).

1.4.2 Mechanismus des NLS-vermittelten Kerntransports

Der Kerntransport beginnt mit der Bindung des NLS-Proteins an Importin, einem Komplex, der aus den beiden Proteinen Importin α und Importin β besteht (Radu *et al.*, 1995a; Görlich *et al.*, 1995a). Die Bildung von Importin erfolgt über eine 42 As große Domäne (IBB, „importin-beta binding domain“) am N-Terminus von Importin α (Görlich *et al.*, 1996a). Auch die Erkennung und Bindung des NLS-Proteins erfolgt über Importin α (Kap 60, Karyopherin α), ein Protein, welches zuerst aus *Xenopus*-Oocyten isoliert wurde und homolog zu dem humanen Protein Rch1 und dem Hefeprotein SRP1p ist (Görlich *et al.*, 1994). Die Stärke der Bindung zwischen NLS-Protein und Importin α wird durch ein als p97 bezeichnetes Protein erhöht (Adam *et al.*, 1994). Die Bindung des NLS-Rezeptor/NLS-Protein-Komplexes an Nucleopore wird von Importin β (Kap 95, Karyopherin β) vermittelt (Abb.1.3.B).

Als nächstes erfolgt die Komplexbindung zwischen Importin und der GTPase Ran, welche im Cytoplasma im GDP-gebundenen Zustand vorliegt. Ran-GDP kann alleine den Kerntransport nur ineffizient bewirken; zum effizienten Transport muß Ran-GDP im Komplex mit einem Homodimer, dem „Ran-interacting protein p10“ („placental protein p15“, pp15) vorliegen (Moore *et al.*, 1994; Abb.1.3.C). Nach dem Aufbau des NLS-Protein-Importin-Ran-GDP Komplexes kommt es über die Interaktion von Importin β und Ran-GDP, mit den FXFG-Sequenzen verschiedener Nucleopore (z.B. RanBP2), zu einer Konformationsänderung des NPC, durch die sich der Durchmesser des NPC vergrößert (Abb.1.3.D).

Der genaue Mechanismus mittels dem dieser Komplex durch die Kernpore gelangt ist nicht bekannt. Im Mittelpunkt steht jedoch die GTPase Ran, die unter anderem auch bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielt. Es wird angenommen, daß ein Ran-GDP /

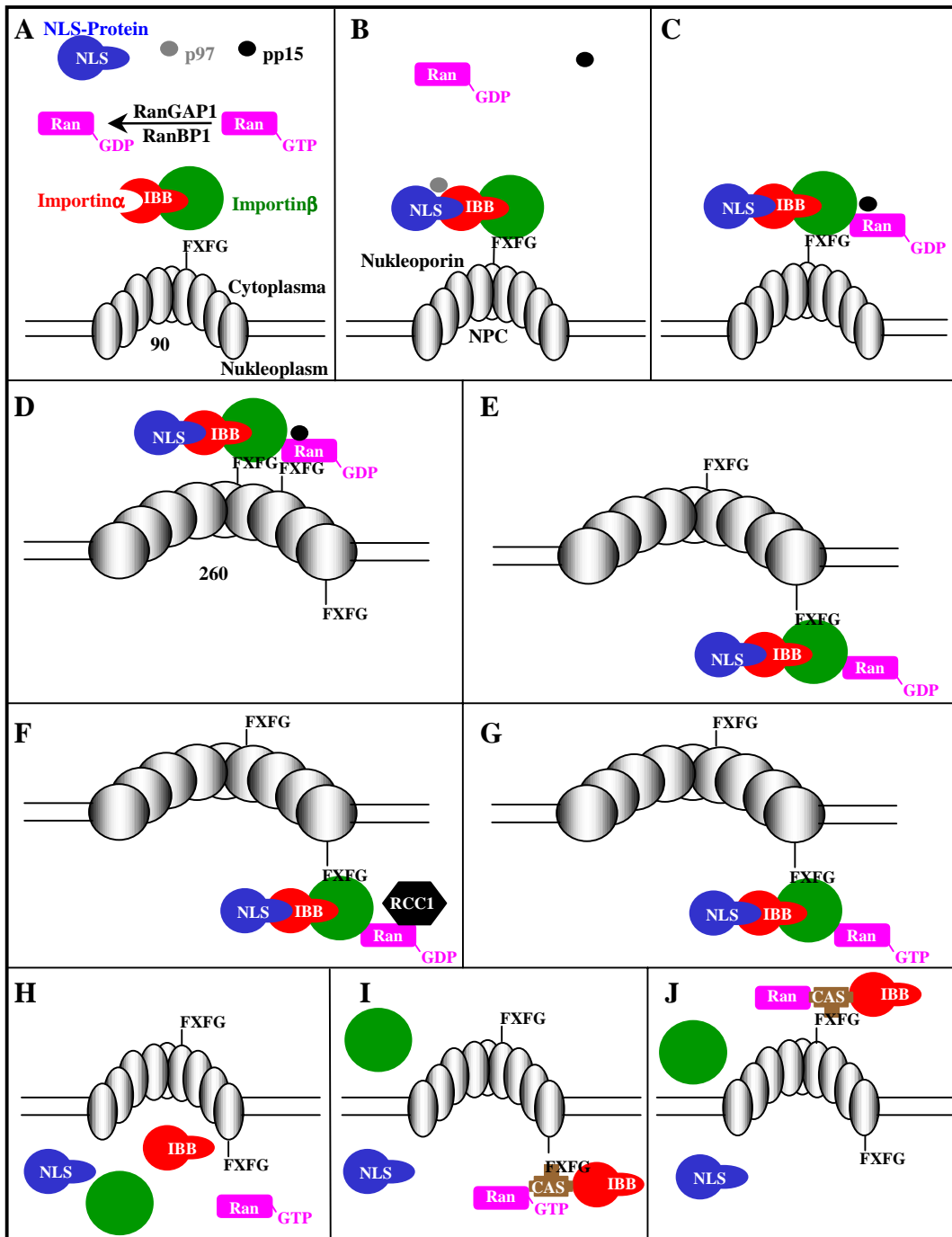


Abb.1.3 Mechanismus des Kerntransports

NLS : nuclear localization signal

NPC : nuclear pore complex

IBB : importin-beta binding domain

Ran : Ras related-nuclear protein

pp15 : Ran-interacting protein p10

GDP : Guanosine diphosphate

RanBP1 : Ran binding protein 1

RCC1 : nucleotide exchange factor

RanGap1 : Ran GTPase-activating protein1

CAS : cellular apoptosis susceptibility gene

GTP : Guanosine triphosphate

Ran-GTP Gradient, der zwischen dem Cytoplasma und dem Zellkern aufgebaut wird, eine entscheidende Rolle für den Kerntransport der NLS-Proteine spielt. Bei Ran handelt es sich um eine sehr schwache GTPase; die GTPase-Aktivität wird durch das Protein Ran-GAP1 stimuliert (Bischoff *et al.*, 1995). Ran-GAP1 liegt über SUMO-1 an RanBP2 gebunden vor, bei dem es sich um ein cytoplasmatisches Nucleoporin handelt (Mahajan *et al.*, 1997; Yokoyama *et al.*, 1995). Im Cytoplasma erfolgt nun, unter Mitwirkung von RanBP1 und RanGAP1, die Hydrolyse von GTP, wodurch es zur Anhäufung von Ran-GDP kommt (Bischoff *et al.*, 1994). Andererseits wird Ran durch ein nukleäres, chromatinassoziiertes Protein RCC1 („Regulator of chromosome condensation“) reguliert (Klebe *et al.*, 1995; Bischoff *et al.*, 1991a; 1991b). Bei diesem Protein handelt es sich um einen „nucleotide exchange factor“, durch den im Zellkern Ran-GTP regeneriert wird, welches sich im Zellkern anreichert.

Es scheint, daß der Kertransport über ständige Ablösung, Diffusion und Neubindung von Importin β an FXFG und GLFG Sequenzen unterschiedlicher Nucleoporine vermittelt wird, denn Importin β konnte nicht nur im Cytoplasma sondern auch im Zellkern an Nucleoporine gebunden nachgewiesen werden (Görlich *et al.*, 1995b., Abb.1.3.E). Die Bindung von Importin β an einige Nucleoporine (Nup98) wird dabei Ran-abhängig aufgelöst (Radu *et al.*, 1995b), während die Bindung an andere Nucleoporine (Nup1p) zur Dissoziation des NLS-Proteins führt. Im Zellkern kommt es zur Umwandlung von Ran-GDP durch RCC1 in Ran-GTP (Abb.1.3.F-G), das an Importin β gebunden zur Auflösung des NLS-Rezeptor/NLS-Protein-Komplexes und zur Auflösung der Bindung zwischen Importin β und dem NPC führt (Rexach *et al.*, 1995; Görlich *et al.*, 1996b; Abb.1.3.H).

Nicht genauer geklärt ist die Rolle von NTF2 („nuclear transport factor 2“). Dieses Trägerprotein bindet im Cytoplasma sowohl Ran-GDP als auch Importin β (Ribbeck *et al.*, 1998; Percipalle *et al.*, 1997) und kann diese über Wechselwirkung mit Nucleoporinen wie dem p62 Protein in den Zellkern transportieren. Hier erfolgt über RCC1 der Austausch von GDP durch GTP. NTF2 besitzt keine Bindungsaffinität für Ran-GTP, weshalb dieses von NTF2 freigesetzt wird.

1.4.3 Regeneration von Importin und Ran

Nach dem Transport der NLS-Proteine in den Kern müssen sowohl Ran-GTP als auch die Importine wieder aus dem Zellkern in das Cytoplasma gelangen. Bei Importin α erfolgt dieser Transport im Komplex mit einem Trägerprotein. Dieses Trägerprotein, CAS

(„cellular apoptosis susceptibility gene“) bindet kooperativ Ran-GTP und Importin α und transportiert beide Faktoren über Wechselwirkung mit dem NPC aus dem Zellkern in das Cytoplasma (Abb.1.3.I-J). Hier erfolgt durch RanGAP1 und RanBP1 die Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP, wodurch es zur Freisetzung von Importin α und Ran-GDP kommt (Kutay *et al.*, 1997; Abb.1.3.A). Es wird angenommen, daß auch Importin β und Transportin an Ran-GTP gebunden in das Cytoplasma zurück transportiert werden (Izaurralde *et al.*, 1997).

1.4.4 Variationen des Kerntransports

Es zeigte sich mehrfach, daß dieses Modell für den Kerntransport nicht bei allen NLS-Proteinen zutrifft. So ist z.B. der Kerntransport des Cyclin B1-Cdc2 nur abhängig von Importin β , nicht aber von Importin α oder Ran (Takizawa *et al.*, 1999).

Es existieren auch mehrere Importin β -homologe Proteine, die die Funktion von Importin α und/oder β übernehmen können. So erfolgt der Kerntransport von Histon H1 im Komplex mit Importin β und einem dem Importin β -homologen Protein, Importin 7 (Jäkel *et al.*, 1999). Zu der Importin β -Familie gehören auch weitere Proteine, wie RanBP7 und RanBP8. Diese können mit Importin β , Ran und Nucleoporinen binden und sollen beim Transport von Proteinen, die ein untypisches NLS tragen eine Rolle spielen (Görlich *et al.*, 1997). Es wurde auch gezeigt, daß einige Proteine der Importin β -Familie, Transportin, RanBP5 und RanBP7, eine Rolle beim Kerntransport ribosomaler Proteine spielen. Die Bindung der ribosomalen Proteine erfolgt dabei über eine untypische NLS, die als BIB („beta like import receptor binding domain“) bezeichnet wird (Jäkel *et al.*, 1998).

Der Kerntransport von Proteinen, die keine oder eine untypische NLS besitzen, erfolgt auf unterschiedliche Weise. Manche Proteine wie beta-Catenin (Fagotto *et al.*, 1998) können direkt an Nucleoporin binden und unter Mitwirkung von Ran in den Zellkern gelangen.

Transportin (Pollard *et al.*, 1996) ist für den Kerntransport von hnRNP („heterogenous nuclear ribonucleoprotein“) verantwortlich. Hierbei übernimmt eine 38 As große M9 Domäne sowohl die Rolle des NLS als auch der NES („nuclear export signal“; Siomi *et al.*, 1997; Michael *et al.*, 1995). Der Transport von Transportin durch die Kernpore ist unabhängig von Ran-GDP. Lediglich nukleäres Ran-GTP ist nötig, um die Bindung zwischen den transportierten Proteinen und Transportin aufzulösen und um Transportin wieder in das Cytoplasma zurück zu transportieren (Ribbeck *et al.*, 1999).

1.5 Probleme und Zielsetzung der Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen Untersuchungen zur Regulation von DNA-Reparatursystemen als Antwort auf verschiedene externe Stimuli. Wie bereits erwähnt, können Mutagene auf unterschiedliche Art und Weise zur Veränderung der DNA führen. Diese DNA-Schäden werden durch unterschiedliche Reparatursysteme erkannt und repariert. Es ist bekannt, daß Behandlung von Zellen mit mutagenen Agenzien zu einer Steigerung der Reparaturaktivität führen kann. Beispiele hierfür sind die Reparaturproteine MGMT und die apurine/apyrimidine Endonuklease. So führt die Behandlung von Zellen mit Röntgenstrahlen, UV-Licht oder alkylierenden Agenzien (MNNG, MNU, MMS) zu einer Steigerung der MGMT-Proteinmenge (Fritz *et al.*, 1991) und die Behandlung mit oxidativen Agenzien (NaOCl, H₂O₂) führt zur Steigerung der Proteinmenge der apurinen/apyrimidinen Endonuklease (Grösch *et al.*, 1998). Die Steigerung der Proteinmenge beruht in beiden Fällen auf einer Geninduktion, die über eine Verstärkung der Promotoraktivität der entsprechenden Gene vermittelt wird. Veränderungen in der Regulation dieser Systeme können weitreichende Folgen haben. Eine verminderte Reparatur kann einerseits zur Sensitivität (bei MGMT) oder andererseits zur Toleranz (im Falle der MMR) gegenüber mutagenen Agenzien führen. Eine erhöhte Reparatur führt meistens zu einer Resistenzsteigerung. Dies kann praktische Konsequenzen haben, zB. negative Auswirkungen auf eine Chemotherapie.

Im ersten Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob und auf welche Weise die MMR durch Behandlung von Zellen mit mutagenen Agenzien induziert wird. Die MMR prozessiert neben Replikationsfehlern auch Fehlpaarungen, die durch die Wirkung methylierender Agenzien entstehen, vor allem Fehlpaarungen zwischen O⁶-Methylguanin und Thymin. Aus diesem Grund soll untersucht werden, ob es nach einer Behandlung von humanen Zellen mit alkylierenden Agenzien zu einer Induktion der MMR kommt. Hierzu soll die Expression des MMR-Proteins MSH2 auf Proteinebene und auf RNA-Ebene untersucht werden. Zur Untersuchung der Induzierbarkeit des Promotors soll zusätzlich der humane MSH2-Promotor kloniert werden. Nach der Untersuchung von MSH2 sollen die Untersuchungen auf die übrigen MMR-Proteine MLH1, PMS2 und MSH6 ausgeweitet werden, und es soll versucht werden die Signalkette aufzuklären, die der Regulation zugrunde liegt. Bei der Untersuchung der Signalkette soll besonders der Einfluß der MGMT auf die Regulation der MMR berücksichtigt werden. Da bei der Chemotherapie

häufig alkylierende Zytostatika (Streptozotozin, BCNU, Temozolomid, Procarbazin) eingesetzt werden, kann die Aufklärung der Regulation der MMR einerseits bei der Optimierung der Chemotherapie und andererseits bei der Verhinderung der Entstehung von Chemotherapie-induzierten Sekundärtumoren eine wichtige Rolle spielen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen potentielle post-translationale Modifikationen der MMR-Proteine identifiziert und untersucht werden. Es ist bekannt, daß viele Proteine über post-translationale Modifikationen reguliert werden. Zu diesen Modifikationen gehören unter anderem Phosphorylierung, Glykosylierung, Ribosylierung und Acetylierung. Die post-translationale Modifikation kann zum Beispiel die Aktivität, die intrazelluläre Verteilung, oder die Spezifität eines Proteins regulieren. In diesem Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob die MMR-Proteine MSH2 und MSH6 einer post-translationalen Modifikation unterliegen. Kann bei diesen Untersuchungen eine post-translationale Modifikation identifiziert werden, so soll im weiteren Verlauf der Arbeit versucht werden, die Funktion dieser Modifikation aufzuklären. Hierbei soll vor allem geprüft werden, ob die Modifikation in einem Zusammenhang mit der im ersten Teil der Arbeit untersuchten Regulation der MMR-Proteine durch alkylierende Agenzien steht.

Im dritten Teil der Arbeit soll untersucht werden, auf welche Art und Weise es zur Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber verschiedenen Zytostatika kommt. In Ergänzung zum ersten Teil der Arbeit, in dem die Regulation der MMR-Proteine als Konsequenz einer einmaligen Behandlung mit alkylierenden Agenzien untersucht wurde, soll im dritten Teil der Arbeit untersucht werden, ob eine chronische Behandlung von Zellen mit Zytostatika zu einer Änderung der Expression der MMR-Proteine führt. Hierzu diene eine Melanomzelllinie als Testsystem, die durch chronische Exposition mit unterschiedlichen Chemotherapeutika Resistenzen gegenüber den entsprechenden Agenzien entwickelt hat (Kern *et al.*, 1997). Neben der Untersuchung der Expression der MMR-Proteine soll der molekulare Mechanismus identifiziert und analysiert werden, über den in diesen Zelllinien die Resistenzentwicklung vermittelt wird. Hierzu sollen neben den MMR-Proteinen auch die Rolle anderer an der Tumorgenese beteiligter Proteine und Reparatursysteme, insbesondere die der MGMT, untersucht werden. Durch diese Arbeit sollen Mechanismen identifiziert werden, durch welche bei der Tumorthherapie Resistenzen entstehen. Die Ergebnisse könnten Ansatzpunkte für eine eventuelle Modifikation der Tumorthherapie liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte, Materialien und Bezugsquellen

Enzyme und Reaktionssysteme wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen GIBCO BRL Life Technologies (Eggstein), La Roche (Mannheim), Stratagene Cloning Systems (Heidelberg) und Pharmacia Biotech GmbH (Freiburg) geliefert. Alle Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Riedel-de Haan (Seelze), Sigma (München) und Merck (Darmstadt) geliefert.

2.1.1 Geräte

Bakterien-Brutschrank	Heraeus, München
Blot-Kammer, Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank (B5060 EK/CO ₂)	Heraeus, München
Elektrophoreseapparaturen	Bio-Rad, München
Feinwaage	Satorius, Göttingen
Geltrockner	Bio-Rad, München
Hybridisierungsöfen	Appligen, Heidelberg
Mikroskop BX 50	Olympus, Hamburg
Schüttelinkubator	Braun Biotech. Int., Melsungen
Spannungsquelle 200/2.0	Bio-Rad, München
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad, München
Spektralphotometer Titertek Multiscan Plus	Labsystems, Finnland
Sterilbank CLASSII A/B3, NUAIR	Zapf, Sarstedt
Szintillationsmeßgerät	Kontron, Gosheim
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Transilluminator	Bachhofer, Reutlingen
Ultraschallstab 250	Branson, Danbury, USA
Vakuumpumpe	Brandt, Wertheim
Zentrifuge Megafuge 1.0, Rotor3360	Heraeus, München

2.1.2 Bezugsquellen

APS	Merck, Darmstadt
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
CAT ELISA Kit	La Roche, Mannheim
Comassie Blue G250	Bio-Rad, München
DMSO	Fluka, Neu Ulm
ECL- und ECL-Plus-Kit	Amersham, Braunschweig
ECL-Filme	Amersham, Braunschweig
High Pure RNA Isolation Kit	La Roche, Mannheim
Hypobond-N+ Membran	Amersham, Braunschweig
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Reformhaus, Mainz
Nitrozellulosemembran (Protran)	Schleicher & Schüll, Dassel
Nonidet P40	Fluka, Neu Ulm
Proteinmarker Dalton VII, 14-70 kDa	Sigma, München
Proteinmarker High Molec. Weight, 29-205 kDa	Sigma, München

QIAamp Blood Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Radioaktive Nukleotide	NEN, Dupont
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	Kodak, USA
Whatman 3 MM Filterpapier	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen

2.1.3 Medienkomponenten für Bakterien- und Zellkultur

Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit
Dulbecco`s MEM mit GlutaMAX	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Dulbecco`s MEM ohne Phosphat	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Dulbecco`s MEM / Ham`s F12	Gibco Life Technologies, Eggenstein
RPMI	Gibco Life Technologies, Eggenstein
FCS	Gibco Life Technologies, Eggenstein

2.1.4 Zytostatika

N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG)	Sigma, München
N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU)	Sigma, München
N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (ENU)	Sigma, München
Melphalan	Sigma, München
Methylmethansulfonat (MMS)	Sigma, München
Streptozotozin	Calbiochem, Cambridge
Fotemusutin	Les Laboratoires Servier, Gidy

2.2 Biologische Materialien

2.2.1 Bakterienstämme

E.coli RRI Δ M15

Δ (gpt-pro)62 / leuB6 / tho-1 / lacY1 / hsdS_B20 / rpsL20 / (Str^r) / ara-14 / galK2 / xyl-5 / mtl-1 / supE44 / mcrB_B

2.2.2 Zelllinien

HeLa-MR	humane Zelllinie eines Gebärmutterkarzinoms (Mex ⁻)
HeLa-S3	humane Zelllinie eines Gebärmutterkarzinoms (Mex ⁺)
HeLa-MR-adaC3	HeLa-MR-Zelllinie, <i>ada</i> transfiziert
HeLa-MR-hMGMT	HeLa-MR-Zelllinie, MGMT transfiziert
HeLa-MR-neo	HeLa-MR-Zelllinie, <i>neo</i> transfiziert
BK4	p53 profiziente fibroblastoide Zellen der Maus
E	p53 defiziente fibroblastoide Zellen der Maus
DLD1*	humane HNPCC Zelllinie, MSH6-defizient
H5	p53 defiziente Hepatomzellen der Ratte
H4IIE	p53 profiziente Hepatomzellen der Ratte

* Die Zelllinie DLD1 wurde von Dr. Kleinert (Mainz) zur Verfügung gestellt.

2.2.3 Vektoren

pUC18: Der Plasmidvektor pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) ist von dem Vektor pBR322 abgeleitet worden. Er trägt ein Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker und erlaubt durch sein *lacZ'*-Gen über α -Komplementation eine Blau-Weiß-Selektion.

pBLCAT5: Der Plasmidvektor pBLCAT5 (Jonat *et al.*, 1990) ist von dem Vektor pBLCAT3 abgeleitet worden und trägt ein Ampicillingen als Selektionsmarker. Zusätzlich trägt er die cDNA für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), vor die ein zu untersuchender Promotor kloniert werden kann.

pSV2neo: Der Plasmidvektor pSV2neo (Southern and Berg, 1982) trägt ein Neomycin-Resistenzgen als Selektionsmarker und erlaubt in eukaryontischen Zellen die Expression klonierter cDNAs unter der Kontrolle des SV40-Promotors.

pSV2MGMT: Expressionsvektor pSV2neo, in den die humane MGMT-cDNA kloniert wurde (Kaina *et al.*, 1991). Bei der Klonierung wurde das Neomycinresistenzgen deletiert.

pUC-MSH2.pro: Plasmidvektor pUC18, in dessen SmaI Schnittstelle der humane MSH2-Promotor einkloniert wurde.

PBI-MSH2.pro: Plasmidvektor pBLCAT5, in den der humane MSH2-Promotor aus pUC-MSH2.pro einkloniert wurde.

2.2.4 Primer

Die verwendeten Primer wurden von Genterprise (Mainz) und Eurogentec (Belgien) käuflich erworben.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
G-oligo	5'-TCTAGATGATCGTCGACGTCGAGCTCGGG-3'	EMSA
C-oligo	5'-GGGAGATCTACTAGCAGCTGCAGCTCGAG-3'	EMSA
T-oligo	5'-GGGAGATCTACTAGTAGCTGCAGCTCGAG-3'	EMSA
O6G-oligo	5'-TCTAGATGATCGTC(O ₆ -G)ACGTCGAGCTCGGG-3'	EMSA
MSH2-prom-5'	5'-GGCGTGAACATAGCTGACGGCA-3'	genomische PCR
MSH2-prom-3'	5'-GACGAAACCTCCTCACCTCCTG-3'	genomische PCR

2.2.5 Antikörper

anti hMSH2	Oncogene, Cambridge	NA27
anti hMSH6	Transduction Laboratories, Lexington	G70220
anti hMLH1	Pharmingen, Lexington	13271A
anti hPMS2	Pharmingen, Lexington	65861A
anti hMDR1	Oncogene, Cambridge	PC03
anti hBcl2	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc492
anti hBax	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc493
anti hFas	Transduction Laboratories, Lexington	F22120
anti hMGMT	Prof. Kaina, Institut für Toxikologie	
anti hERCC1	Neomarkers, Fremont	MS671
anti hTopoII α	Neomarkers, Fremont	MS293
anti hERK2	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc154

anti Kaninchen IgG (HRP konjugiert)	Amersham, Braunschweig	NA934
anti Maus IgG (HRP konjugiert)	Amersham, Braunschweig	NA931
anti Maus IgG (Rhodamin konjugiert)	DAKO, Hamburg	

2.3 Puffer und Stammlösungen

Agar-Platten	15 g Agar-Agar ad 1000 ml L-Medium
Amp-Platten	+ Ampicillin (100 µg/ml)
X-Gal-Platten	+ IPTG (0,2 mM) + X-Gal (0,05 %)
DNA-Stop-Puffer (5x)	4 M Harnstoff 50 % Saccharose 0,1 M Na ₂ EDTA 0,1 % Bromphenolblau
Hybridisierungsmedium	6x SSC 0,5 % SDS
L-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml A.bidest
Prähybridisierungsmedium	6x SSC 5x Denhardt's Reagenz 0,5 % SDS 100 µg/ml „salmon sperm DNA“
Protein-Transfer-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM Glycin 25 % Methanol
RNA „Loading“Puffer	500 µl Formamid 100 µl 10x MOPS-Puffer 150 µl Formaldehyd (filtriert)
RNA-Stop-Puffer (10x)	50% Glycerin 1mM EDTA (pH 8,0) 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylen-Cyanol FF
SDS-Trenngel (12 %) (10 %) (7,5%)	2,4 (2) (1,5) ml Acrylamid 2 ml 1,5 MTris-HCl (pH. 8,8) 3,44 (3,84) (4,34) ml A. bidest 80 µl 10 % SDS 40 µl 10% APS 4 ml TEMED
SDS-Sammelgel (5%)	0,76 ml Acrylamid 0,76 ml 1 MTris-HCl (pH. 6,8) 4,44 ml A. bidest 60 µl 10 % SDS 60 µl 10% APS 6 ml TEMED
SDS-Laufpuffer	57,6 g Glycin 12 g Tris

	10 ml 20% SDS ad 2000 ml A.bidest
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA
TELT-Puffer	62.8 mM Na ₂ EDTA 4 % Triton X-100 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 2,5 M LiCl
10x MOPS-Laufpuffer	0,2 M 3(n-morpholin)Propan Sulfonsäure (pH 7,0) 80 mM Na-Acetat 10 mM EDTA (pH 8,0)
10x SSC (Standard-Saline-Citrat-Puffer)	1,5 M NaCl 150 mM Na-Citrat PH 7,0
10x TBE (Tris-Borat-EDTA)	900 mM Tris-HCl (pH 8,2) 900 mM Borsäure 12,5 mM Na ₂ EDTA
50x Denhardt's Reagenz	1 % Ficoll (Type 400) 1 % Polyvinylpyrrolidon 1 % BSA (Fraction V)

2.4 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Plastikkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37° C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei einem CO₂-Gehalt von 7%. HeLa-Zellen wurden mit Dulbecco's MEM-F12 Nährmedium mit 5% FCS kultiviert. Alle Melanomzellen wurden mit RPMI Nährmedium und 5% FCS kultiviert. Die humanen DLD1, sowie die murinen BK4- und E-Zellen und die Rattenhepatomzellen H4IIE und H5 (Grombacher *et al.*, 1998) wurden mit Dulbecco's Medium mit 10% FCS kultiviert. Die Zellen wurden zwei mal wöchentlich passagiert. Hierzu wurde zunächst das auf den Zellen befindliche Medium abgenommen und die Zellen mit Trypsin (0,25%) inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem, 37° C warmen Medium aufgenommen, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und entsprechend verdünnt ausgesät. Zum Einfrieren wurden exponentiell wachsende Zellen einer Plastikkulturschale geerntet, in Medium aufgenommen und bei 1000 Upm abzentrifugiert. Das Medium wurde entfernt, das verbleibende Zellpellet wurde in Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nach einer Verweildauer von 5 min bei 4° C wurden die Röhrchen in Zellstoff verpackt und in einer Styroporbox bei -80° C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Die tiefgefrorenen Zellen wurden bei 37° C in einem Wasserbad aufgetaut und anschliessend mit Kulturmedium gewaschen, um das verbleibende DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt. Die Behandlung von Zellen mit MNNG, MMS, MNU, ENU, Fotemustin und Streptozotozin erfolgte durch Zugabe einer konzentrierten Stammlösung, die gegebenenfalls verdünnt, und in das Zellkulturmedium hinzugegeben wurde. Alle Stammlösungen wurden bei -80° C aufbewahrt. Streptozotozin wurde in Abwandlung dazu stets frisch angesetzt.

2.5 Herstellung von Proteinextrakten

Zur Isolation von Proteinextrakten wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml eiskaltem PBS und einem Gummischaber abgeschabt. Die Zellen wurden nun in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation bei 1000 Upm und 4° C für 1 min sedimentiert. Je nach Verwendung konnten die Zellen nun weiter aufgearbeitet werden.

2.5.1 Kernextrakte und Cytoplasmaextrakte für Western-Blot-Analyse

Zur Extraktion von Kernextrakten wurden die Zellen in 1 ml Lysispuffer I (10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM DDT, 2 mM PMSF) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl 10 %igem NP40 wurden die Zellmembranen durch eine 5 minütige Inkubation aufgebrochen. Nach einer Zentrifugation bei 3200 Upm und 4° C für 5 min wurde die Zellen erneut in 1 ml Lysispuffer I resuspendiert, um Reste des Cytoplasmas zu entfernen. Durch eine Zentrifugation bei 3200 Upm und 4° C für 5 min wurden die Zellkerne sedimentiert und anschließend in 100 µl „map-Kinase-Puffer“ [20 mM Tris-HCl (pH7,4), 40 mM Na₄P₂O₇, 5 mM MgCl₂, 50 mM NaF, 100 µM Na₃VO₄, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% SDS] resuspendiert. Die Kernmembran wurde nun durch Ultraschall aufgebrochen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 14000 Upm und 4° C für 15 min abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration der Proteine mittels der Methode nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951) bestimmt. Zur Isolation von Cytoplasmaextrakten wurden die Zellen in 500 µl Lysispuffer I resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 25 µl 10 %igem NP40 wurden die Cytoplasmamembranen durch eine 2 minütige Inkubation aufgebrochen. Nach einer Zentrifugation bei 14000 Upm und 4° C für 2 min wurde der Überstand entnommen und ein zweites mal zentrifugiert, um die restlichen Kerne zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration der Proteine mittels der Methode nach Lowry bestimmt.

2.5.2 Kernextrakte für EMSA

Die Zellen wurden in 1 ml Lysispuffer I [10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DDT, 2 mM PMSF, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)] resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl 10 %igem NP40 wurden die Zellmembranen durch eine 5 minütige Inkubation aufgebrochen. Nach einer Zentrifugation bei 3200 Upm und 4° C für 5 min wurden die Zellkerne in 1 ml Lysispuffer I resuspendiert, um Reste des Cytoplasmas zu entfernen. Durch erneute Zentrifugation bei 3200 Upm und 4° C für 5 min wurden die Zellkerne sedimentiert, anschließend in 2 Vol hypotonem Kernlysispuffer [0,2 mM EDTA, 20 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 1 mM DDT, 2 mM PMSF] mit 600 mM KCl resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Anschliessend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 14000 Upm. Der Überstand, welcher die gelösten Kernproteine enthält wurde abgenommen, mit 1 Vol Kernextraktionspuffer ohne KCl verdünnt, auf 20% Glycerin eingestellt und bei -80° C eingefroren. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford.

2.5.3 Gesamtzellextrakte für Western-Blot-Analyse

Die Zellen wurden in 200 µl Lysispuffer (1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoethanol, 5% Glycerin, 20 mM Tris/HCl, pH 8,5) resuspendiert und die Membranen durch Ultraschall aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 14000 Upm und 4° C für 15 min abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration der Proteine mittels der Methode nach Bradford bestimmt.

2.5.4 Gesamtzell-, Kern- und Cytoplasmaextrakte für Immunpräzipitation

Zur Isolation der Gesamtzellextrakte wurden die Zellen in 1 ml RIPA-Puffer [140 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0,1% SDS, 1 mM Na-ortho-vanadat, 1 mM PMSF, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)] resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 14000 Upm und 4°C für 15 min wurde der Überstand entnommen und zur Immunpräzipitation eingesetzt. Zur Isolation von Kernextrakten wurden die Zellen in 1 ml Lysispuffer I resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl 10 %igem NP40 wurden die Zellmembranen durch eine 5 minütige Inkubation aufgebrochen. Nach einer Zentrifugation bei 3200 Upm und 4° C für 5 min wurde die Zellen erneut in Lysispuffer I resuspendiert, um Reste des Cytoplasmas zu entfernen. Durch eine Zentrifugation bei 3200 Upm und 4° C für 5 min wurden die Zellkerne sedimentiert und anschließend in 1 ml RIPA-Puffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 14000 wurde der Überstand entnommen und zur Immunpräzipitation eingesetzt. Die Isolation der cytoplasmatischen Extrakte erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben.

2.5.5 Gesamtzellextrakte für den Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Test

Transient mit einem Promotor-Cat-Konstrukt transfizierte Zellen wurden in 150 µl 250 mM Tris/HCl (pH 7,8) resuspendiert. Die Membranen wurden durch dreimaliges Einfrieren der Zellen in N₂ und anschließendes Auftauen in einem 37° C warmen Wasserbad aufgebrochen. Der Extrakt wird nun 5 min bei 65° C inkubiert, um zelleigene Enzyme zu inaktivieren (das bakterielle CAT-Enzym bleibt während der Hitzebehandlung stabil). Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 14000 Upm wurde der Überstand entnommen und die Konzentration der Proteine mittels der Methode nach Bradford bestimmt.

2.6. Bestimmung der Proteinkonzentration

2.6.1 Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry beruht auf einer chemischen Reaktion, wobei die reaktiven Gruppen der Proteine unter alkalischen Bedingungen Cu²⁺- zu Cu⁺-Ionen reduzieren. Die Cu⁺-Ionen wiederum reagieren mit Na-K-Tartrat zu einem blau gefärbten Komplex, dessen Absorption bei 600 nm per Photometer bestimmt werden kann. Zuerst wurde eine Eichkurve durch Verdünnungen einer BSA-Lösung hergestellt. Anschliessend wurde Lowry I-Lösung (2% Na₂CO₃, 0,1 M NaOH) zu einem Endvolumen von 150 µl zugesetzt. Zur Proteinbestimmung der Versuchsproben wurden je 10 µl Kernproteinlösung oder 20 µl Cytoplasmaproteinlösung mit 140 µl Lowry I-Lösung gemischt. Zu allen Proben wurden nun 250 µl Lowry IV-Lösung (2% Na₂CO₃, 0,1 M NaOH, 0,02% Na-K-Tartrat, 0,01% CuSO₄) und danach 30 µl 50% Folin-Reagenz gegeben. Nach 30 min Inkubation in Dunkelheit und bei RT wurden je 100 µl in Doppelwerten in eine Mikrotiterplatte pipettiert und im Photometer bei 600 nm vermessen. Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde anhand der Eichkurve bestimmt.

2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der Bindung von Comassie Blue G250 an die Aminogruppe der Proteine. Hierbei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs in phosphosaurer Lösung von 465 nm nach 595 nm. Zuerst wurde auch hier eine Eichkurve mittels BSA erstellt und auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200 µl Bradfordlösung (8,5% Phosphorsäure, 4,75% Ethanol, 1% Comassie blue G250) versetzt. Für die Proteinbestimmung der Versuchsproben wurden je 2 µl der Proteinextrakte mit 200

µl Bradfordlösung versetzt. Nach 15 min Inkubation bei Dunkelheit wurde die Messung der Absorption in einem Photometer bei 600 nm vorgenommen. Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde anhand der Eichkurve bestimmt.

2.7 DNA Isolierung

Zur schnellen Überprüfung von Kolonien nach einer Transformation wurde die Plasmid-DNA nach der TELT-Methode (He *et al.*, 1990) isoliert. Zuerst wurden 4 ml L-Medium und 40 µl Ampicillin (10 mg/ml) mit einer Bakterienkolonie beimpft und bei 37° C über Nacht inkubiert. Aus 1,5 ml der Übernachtskultur wurden die Bakterien durch 10 minütige Zentrifugation bei 14000 Upm und 4° C sedimentiert und in 100 µl TELT-Puffer resuspendiert. Der TELT-Puffer enthält unter anderem EDTA, welches Ca²⁺ chelatisiert, und das nicht ionische Detergenz Triton-X-100, welches die Cytoplasmamembran aufbricht und die Proteine denaturiert. Bei der anschließenden Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) sammelten sich die Zelltrümmer von *E.coli* in der Interphase und konnten somit von der Plasmid-DNA in der oberen Phase abgetrennt werden. Da es sich bei dieser Methode um eine „milde Lyse“ handelt, blieb die *E.coli*-DNA an die Zelltrümmer gebunden und konnte somit aus dem Ansatz entfernt werden. Die Plasmid-DNA wurde zum Abschluß mit 2,5 Vol abs. Ethanol aus dem Überstand gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl A.bidest gelöst.

Eine zur Transfektion und Sequenzierung geeignete Plasmid-DNA wurde mittels des „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ von Qiagen nach Angaben der Herstellerfirma isoliert.

Eine zur Amplifikation und für Southern-Blot-Analysen geeignete genomische DNA wurde mittels des „QIAamp Blood Kit“ von Qiagen nach Angaben der Herstellerfirma isoliert.

Die Bestimmung der DNA-Menge erfolgte bei allen Methoden durch Spektroskopie.

2.8 RNA Isolierung

Eine für Northern-Blot-Analyse geeignete poly-A⁺-RNA wurde wie folgt isoliert: Zunächst wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend 5 ml STE-Puffer [20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 300 µg Proteinase K pro ml STE und 25 µl 20% SDS pro ml STE] in die Zellkulturschale zugegeben. Durch die Inkubation mit STE-Puffer für 5 min kommt es zu einer Auflösung der Zellmembran und zur Freisetzung der Zellbestandteile. Die Suspension wurde nun mehrmals mit einer Spritze und einer dünnen Kanüle aufgesaugt, um die DNA zu scheren und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation für 20-60 min bei 37° C, während der die Proteine durch die Proteinase verdaut wurden, erfolgten zwei Extraktionen mit Phenol-Chloroform, wobei die Phasen durch Zentrifugation bei 4000 Upm für 10 min getrennt wurden. Die NaCl-Konzentration der wässrigen Phase wurde nun auf 0,5 M eingestellt. Danach erfolgte die Zugabe von 100 mg oligo-dT Zellulose (La Roche, Mannheim) pro Probe. Die Proben wurden nun über Nacht bei RT geschüttelt und die oligo-dT Zellulose wurde mitsamt der gebundenen poly-A⁺-mRNA durch Zentrifugation bei 2000 Upm für 2 min sedimentiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellulose in 10 ml HSB-Puffer [10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 % SDS] wurde die poly-A⁺-mRNA mit 2,5 Vol abs. Ethanol, 10 µg/ml tRNA und 0,3 M Na-Acetat ausgefällt, in 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in A.bidest gelöst.

Eine für Northern-Blot-Analyse geeignete Gesamt-RNA wurde mittels „High-Pure-RNA-Isolation-Kit“ von La Roche (Mannheim) nach Angaben der Herstellerfirma isoliert. Die Bestimmung der RNA-Menge erfolgte bei allen Methoden durch Spektroskopie.

2.9 Transfektion eukaryontischer Zellen (Graham and van der Eb, 1973)

Um eukaryontische Zellen mit fremder DNA zu transfizieren, wurden 1×10^6 Zellen pro 10 cm Kulturschale eingesät und für 24 h bei 37° C inkubiert. 10 µg der zu transfizierenden Plasmid DNA wurden in 500 µl 250 mM CaCl₂ gelöst. Anschließend wurden zu der DNA 500 µl 2x HSB-Puffer (10 mM KCl, 275 mM NaCl, 1,4 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1 mM Glucose, 21 mM Hepes, pH 7,05) tropfenweise zugegeben und die Lösung für 20 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe des Ca-Phosphat-DNA-Präzipitats in die Kulturschale, wobei die Lösung ebenfalls tropfenweise zugesetzt wurde. Nach 12 h Inkubation der Zellen bei 37° C wurde 5 ml DMSO (30% in eiskaltem Kulturmedium) zugegeben und die Zellen für 10 min bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit frischem Medium gewaschen. Danach wurden 10 ml frisches Medium in die Kulturschalen hinzugegeben und die Zellen weitere 12-24 h bei 37° C kultiviert. Bei transienten Transfektionen erfolgte nach dieser Zeit die Behandlung mit den entsprechenden Agenzien. Zur Selektion stabil transfizierter Zellen wurden die Zellen 1:5 verdünnt in G418-haltiges (1,5 mg/ml) Medium umgesetzt und weiterkultiviert, bis Einzelkolonien sichtbar wurden, welche in Kultur genommen und auf den Erfolg der Transfektion überprüft wurden.

2.10 Gelretardationsexperiment (EMSA)

Die Bestimmung der Bindungsaktivität von Proteinen beruht auf einer Bindung des zu detektierenden Proteins an ein definiertes, radioaktiv markiertes Oligonukleotid. Hierzu wurden Kernextrakte isoliert (Kapitel 2.5.2), von denen 3-6 µg in einem 1 ml Reaktionsgefäß mit 15 µl Reaktionsmix [10 % Glycerin, 10 mM Hepes-KOH (pH.7,9), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 4 mM Tris/HCl, 0,5 mM EDTA, 0,005 % BSA, 0,005 % poly (dI-dC)] gemischt wurden. Anschließend wurden 25 fmol des radioaktiv markierten Oligonukleotids (Kapitel 2.16.2) zugegeben, der Ansatz mit A.bidest auf 20 µl aufgefüllt und für 30 min bei RT inkubiert. Zum Abschluß wurden die Proben neben einen Laufmarker (Bromphenolblau / Xylen-Cyanol FF) auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen und die Gelelektrophorese (Kapitel 2.13.4) durchgeführt.

2.11 Klonierung von DNA

Bei der Klonierung wurden Fragmente mit kompatiblen Enden, die durch einen Restriktionsverdau entstanden sind, in eine entsprechende Restriktionsschnittstelle der multiple Klonierungsstelle (MCS; „multiple cloning site“) eines Vektors ligiert. Nicht kompatible Enden von Restriktionsfragmenten und PCR-Produkte wurden mit Hilfe des „Klenow-Fragments“ der DNA-Polymerase I zu glatten Enden aufgefüllt („Endfilling“) und in die Hinc II Restriktionsschnittstelle des Vektors pUC18 ligiert. Mit diesen Ligationsansätzen wurden kompetente Zellen transformiert und die entstandenen weißen Kolonien mittels der TELT-Plasmidisolierung überprüft. Für die Klonierung des MSH2-

Promotors wurde der Plasmidvektor pUC18 verwendet. Dieser enthält u.a. eine MCS und einen Teil des β -Galactosidase-Gens (*lac Z'*-Gen), welcher den Amino-terminalen Teil der β -Galactosidase kodiert. Die Wirtsbakterien enthalten ein defektes *lac Z*-Gen, welches den Carboxy-terminalen Teil der β -Galactosidase bildet. In dem *lac Z'*-Gen des Vektors liegt die Polylinkerregion. Erfolgt kein Einbau der Fremd-DNA, wird der Amino-terminale Teil des β -Galactosidase-Proteins gebildet. Auf Proteinebene kommt es zur sogenannten „ α -Komplementation“, dem Zusammenlagern des Amino-terminalen Teils der β -Galactosidase, der vom Vektor kodiert wird und des Carboxy-terminalen Teils der β -Galactosidase, welcher vom Genom des Wirtsbakteriums kodiert wird. Durch diesen Vorgang entsteht ein funktionsfähiges β -Galactosidase Protein, welches X-Gal in 5-Brom-4-Chlor-Indigo spaltet, wodurch sich die Kolonie blau färbt. Ist die Fremd-DNA in den Vektor eingebaut worden, so liefert sie entweder ein Stop-Codon, durch welches die Translation des β -Galactosidase-Gens unterbrochen wird oder sie führt zu einer Leserasterverschiebung, wodurch ein falsches Protein gebildet wird. Es kann also zu keiner α -Komplementation kommen und es wird keine funktionsfähige β -Galactosidase gebildet, so daß die Kolonien weiß bleiben. Die α -Komplementation erfolgt jedoch nur zu ca 80 %., zu 20 % wird sie dadurch verhindert, daß nach einem Restriktionsverdau die Vektorenden verändert werden können. So ist es möglich, daß überhängende Nukleotide entfernt oder die Enden aufgefüllt werden, wodurch es ebenfalls zu Leserasterverschiebungen kommen kann. Hierdurch treten auch viele weiße Kolonien auf, die allerdings keine Fremd-DNA tragen. Da X-Gal anstelle von Lactose als Substrat vorliegt, fehlt der Induktor welcher den *lac I*-Repressor inaktiviert. Im Normalfall wird dieser Induktor durch Isomerisierung von Lactose in Allolactose gebildet. Die Rolle des Induktors übernimmt das den Platten zugesetzte IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid).

2.11.1 Restriktionsverdau der DNA

Standardmäßig wurde der Restriktionsverdau in einem Reaktionsansatz von 20 μ l durchgeführt. Die DNA sollte möglichst frei von Salzen oder Alkohol sein, da sonst die enzymatische Reaktion gehemmt würde. Für die Restriktion wurden ca. 0,5 μ g DNA eingesetzt, die mit 2 μ l 10 x Restriktionspuffer und 5 - 10 U des entsprechenden Enzyms gemischt und mit A.bidest auf 20 μ l aufgefüllt wurde. Die Puffer für die jeweiligen Restriktionsenzyme wurden nach den Angaben des Herstellers ausgewählt. Bei Restriktionsverdau von durch die QIAGEN-Methode gewonnener DNA konnte von der Verwendung von RNase A abgesehen werden. Bei durch andere Verfahren gewonnener DNA wurde jeweils 1/20 Vol RNase A (10 mg/ml) zugesetzt. Die Restriktion erfolgte während einer 2-stündigen Inkubation bei 37° C.

2.11.2 Gewinnung von DNA aus Agarosegelen

Die Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels des „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen nach den Angaben der Herstellerfirma.

2.11.3 Auffüllreaktion („Endfilling“)

Die Taq Polymerase hat die Eigenschaft, am 3' Ende der synthetisierten Stränge zusätzliche Nukleotide anzuhängen (zumeist ein A), die nicht von der Matrize kodiert werden. Diese Überhänge müssen für die Klonierung der PCR-Produkte zu einer glatten Vektorschnittstelle aufgefüllt werden. Dasselbe trifft für verdaute DNA mit nicht kompatiblen Enden zu. Bei diesem als „Endfilling“ bezeichneten Verfahren werden durch das Klenow-Fragment 5'-überhängende Enden aufgefüllt und 3'-überhängende Enden abgedaut. Hierzu wurden 4/5 der amplifizierten DNA mit abs. Ethanol gefällt, gewaschen

und in 13,5 µl A.bidest gelöst. Nach der Zugabe von 1,5 µl Klenow-Puffer, 1 µl dNTP (0,2 mM) und 1 µl Klenow-Enzym wurde der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert.

2.11.4 Ligation

Unter einer Ligation versteht man die Verknüpfung zwischen dem 3'-OH und dem 5'-Phosphatende freier DNA-Moleküle. Hierbei kann es sich entweder um überhängende oder um glatte, nicht überhängende Enden handeln. Die T4-DNA-Ligase schließt die entstehenden Lücken im Phosphat-Rückgrat bei überhängenden Enden und ligiert auch glatte, nicht überhängende Enden in der zu ligierenden DNA. Das molare Verhältnis zwischen „Insert“ und Vektor-DNA sollte zwischen 2:1 und 5:1 betragen. Die zu ligierende DNA (250 ng/µl) wurde in 11,5 µl A.bidest gelöst und mit 1,5 µl 10x Ligasepuffer, 1 µl Vektor-DNA (50 - 100 ng/µl) und 1U T4-DNA-Ligase gemischt. Der Ligationsansatz wurde anschließend über Nacht bei RT inkubiert und zum Schluß mit A.bidest auf 100 µl aufgefüllt.

2.11.5 Transformation von *E. coli* (Mandel und Higa, 1970)

Um ein Plasmid in eine Bakterienzelle zu schleußen, muß die Zelle vorher für die Aufnahme vorbereitet werden, sie muß „kompetent“ gemacht werden. Hierzu wurde eine Übernachtskultur der zu transformierenden *E.coli*-Zellen angesetzt. Aus dieser Kultur wurde 1 ml entnommen, mit 9 ml L-Medium gemischt und für 100 min bei 37° C inkubiert. Danach wurde die Kultur für 5 min bei 5000 Upm und 4° C zentrifugiert, um die Bakterien zu sedimentieren. Die Bakterien wurden nun in 10 ml eiskaltem 10 mM NaCl resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 10 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis und der anschließenden Zentrifugation für 30 min war die Kompetenz der Bakterien an einem sogenannten „Heiligenscheinpellet“ zu erkennen. Die kompetenten Zellen wurden nun in 2 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Bei der eigentlichen Transformation wurden 200 µl der kompetenten Zellen mit 50 µl Ligationsansatz gemischt und 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der „heat shock“, d.h. eine Inkubation für 3 min bei 42° C und die Zugabe von 1,5 ml L-Medium. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37° C wurden 150 µl der transformierten Zellen auf Ampicillin und IPTG/X-Gal-haltigen Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.12 Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Test

Zur Bestimmung der Aktivität des MSH2-Promotors wurde dieser in den pBLCAT5-Vektor kloniert, wo er die Expression des Vektor-kodierten CAT-Enzyms reguliert. Die Aktivierung des Promotors führt zur Expression dieses Enzyms, das durch ein, auf dem Prinzip des ELISA beruhendes Testsystem gemessen werden kann. Proteinextrakte wurden hierzu wie unter 2.5.5 beschrieben hergestellt. Der eigentliche Test wurde mit dem „CAT ELISA“ Kit von La Roche (Mannheim) durchgeführt. Hierbei wurden 100 µg Proteinextrakt auf, mit anti-CAT-Antikörper beschichtete, Mikrotiterplatten pipettiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37° C wurde der Proteinextrakt entfernt und die Platten dreimal mit Waschpuffer gespült. Als nächstes erfolgte die Zugabe eines Digoxigenin-konjugierter anti-CAT-Antikörpers und eine Inkubation für 1h bei 37 °C. Nach erneutem Spülen der Platte mit Waschpuffer wurde ein Peroxidase-konjugierter anti-Digoxigenin-Antikörper zugesetzt und für 1 h bei 37° C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift erfolgte die Zugabe eines Peroxidase-Substrats (ABTS) welches durch die Peroxidase umgesetzt und bei 405 nm mit einem Spektralphotometer detektiert wurde.

2.13 Gelelektrophorese

2.13.1 DNA-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge aufzutrennen und zu analysieren, wurden Agarosegele verwendet. Die DNA wandert hierbei mit einer Geschwindigkeit durch die Agarose-Matrix, die proportional zum negativen Logarithmus der Länge des DNA-Fragments ist. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte auf 1,0 prozentigen Agarosegelen. Die Agarosegele wurden mit 1x TBE-Puffer angesetzt, wobei dieser Puffer auch als Laufpuffer verwendet wurde. Vor dem Auftragen der Proben auf das Agarosegel wurden die Proben mit 1/5 Vol. 5x DNA-Stop-Puffer versetzt. Der Puffer enthielt Saccharose, welche die Dichte der DNA-Proben erhöhte, so daß diese in den Taschen nach unten sanken. Außerdem enthielt der DNA-Stop-Puffer Bromphenolblau (ein Farbstoff, der abhängig von der Agarosekonzentration einer Fragmentgröße zwischen 100 und 300 Bp entspricht), um die Wanderungsgeschwindigkeit einschätzen zu können. Als Molekulargewichtsstandard wurde EcoRI/HindIII geschnittene λ -Phagen-DNA verwendet. Die Färbung der elektrophoretisch aufgetrennten DNA erfolgte durch Ethidiumbromid (5 $\mu\text{g/ml}$). Ethidiumbromid ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der sich zwischen die Basen der DNA-Doppelhelix einlagert und unter UV-Licht eine rötliche Fluoreszenz zeigt. Die Proben wurden auf das Agarosegel aufgetragen und bei 100 mV elektrophoretisch getrennt.

2.13.2 RNA-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese der RNA erfolgte nach demselben Prinzip wie die der DNA. Es mußten jedoch andere Lösungen eingesetzt werden, um eine Degradation der RNA zu verhindern. Bei den Gelen handelte es sich 1,2-prozentige denaturierende Agarosegele, welche mit 1x MOPS-Puffer angesetzt wurden, der auch als Laufpuffer diente. Zusätzlich wurden die Gellösungen mit filtriertem, 37 prozentigem Formaldehyd versetzt, welches die Renaturierung der RNA verhindert. Die RNA-Proben wurden mit 1 μl Ethidiumbromid (5 mg/ml) und 3 Vol „Loading“-Puffer gemischt, 5 min bei 60° C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt, um ein Renaturieren zu verhindern. Nach der Zugabe von 1/10 Vol RNA-Laufpuffer wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und bei 30 mA elektrophoretisch getrennt.

2.13.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte wie beschrieben (Laemmli, 1970). Bei den verwendeten Polyacrylamidgelen handelte es sich um denaturierende Gele, die aus einem 7,5, 10 oder 12% igem Trenngel und einem 5% igem Sammelgel bestehen. Das Trenngel wurde zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit A.bidest. überschichtet, da Sauerstoff die Polymerisation des Gels hemmt. Die Polymerisation war nach ca. 30 min abgeschlossen. Nach Entfernen des A.bidest. wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zu Aussparung von Taschen eingesteckt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit A.bidest nachgespült. Die aufzutragenden Proben wurden wie folgt behandelt. Pro Spur wurden 25 μg Protein mit 1/4 Volumen Ladepuffer (Sigma) versetzt, 5 min bei 95° C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 30 mA. Die Proteine werden anschließend mittels Western-Blot-Transfer (Kapitel 2.14.3) aus dem Gel auf einen Nitrozellulosefilter übertragen und der Filter mit Antikörper inkubiert (Kapitel 2.15).

2.13.4 EMSA-Gelelektrophorese

Bei den verwendeten Polyacrylamidgelen handelte es sich im Gegensatz zu der SDS-PAGE um native Gele. Die Gelkammer wurde nach dem Zusammenbau mit 1% „low-melting“-Agarose abgedichtet, ein 4%iges Polyacrylamidgel zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm zu Aussparung von Taschen eingesteckt. Nach der Polymerisierung des Gels wurde es in eine spezielle Kammer eingespannt und erneut mit Agarose abgedichtet. Das Gel wurde durch einen einstündigen Vorlauf bei 100 mV äquilibriert, als Laufpuffer diente hierbei 0,25 % TBE-Puffer. Die fertigen Proben wurden auf das Gel aufgetragen; der Gellauf erfolgte bei 100 mV, bis die Lauffront eines separat aufgetragenen Bromphenolblau markers ca. 1-2 cm vor dem Auslaufen war. Danach wurde das Gel abgebaut, bei +80° C und Unterdruck getrocknet und in einer Röntgenkassette mit Verstärkungsfilter mit einem Röntgenfilm belegt und über Nacht bei -80° C exponiert.

2.14 Transfertechniken

2.14.1 Southern-Blot-Transfer

Zur Übertragung der DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter wurde das von Southern entwickelte Verfahren verwendet (Southern, 1975). Hierbei wurde die DNA zuerst durch Inkubation des Agarosegels für 15 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) denaturiert. Die anschließende Neutralisierung erfolgte durch Inkubation in Neutralisierungslösung [1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 7,4)] für 30 min. Zur Übertragung der DNA auf Nitrozellulosefilter wurde eine Transfereinrichtung aufgebaut. Dazu wurde das Gel so auf eine Kunststoffplatte gelegt, daß es keinen Kontakt mit dem es umgebenden 20x SSC bekommt. Zwischen der Kunststoffplatte und dem Gel befanden sich drei Lagen mit 20x SSC getränktes 3-MM-Papier, welche die Platte überlappten und in das 20x SSC eintauchten. Auf das Gel wurde der Nitrozellulosefilter gelegt, der zuvor mit 2x SSC getränkt worden war und auf diesen Filter wurden 3 in 2x SSC getränkte 3-MM-Papiere und zwei trockene 3-MM-Papiere gelegt. Den Abschluß bildete eine dicke Lage von trockenem Papier, welches auf das 3-MM-Papier gelegt wurde. Der Blot wurde mit einem Gewicht von etwa 500 g beschwert und über Nacht bei RT stehen gelassen. Während dieser Zeit wurde das 20x SSC aufgrund der Kapillarkräfte durch das Gel gesogen. Bei diesem Vorgang wanderte die DNA mit dem Flüssigkeitsstrom aus dem Gel heraus und wurde so auf den Nitrozellulosefilter übertragen. Zum Schluß wurde die DNA durch einstündige Inkubation bei 80° C auf dem Filter fixiert, wobei sich kovalente Bindungen zwischen DNA und Nitrozellulose ausbildeten. Auf dem trockenen Nitrozellulose-Filter wurden unter UV-Licht die Probenaschen und der Marker nachgezeichnet. Der trockene Filter wurde in 3-MM-Papier und Alufolie verpackt im Kühlschrank gelagert. Die anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Probe erfolgte wie im Kapitel 2.17 beschrieben.

2.14.2 Northern-Blot-Transfer

Die Übertragung von RNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulose erfolgte durch ein spezielles Verfahren, das in Analogie zu dem von Southern entwickelten Verfahren als Northern-Blot-Hybridisierung bezeichnet wird. Hierbei wurde das RNA-Gel für 30 min in 10x SSC inkubiert. Anschließend wurde ebenfalls eine Transfereinrichtung aufgebaut, wobei als Laufpuffer jedoch kein 20x SSC, sondern 10x SSC verwendet wurde. Die Übertragung der RNA auf den Nitrozellulosefilter erfolgte aufgrund desselben Effekts wie bei der Southern-Blot-Hybridisierung. Die RNA wurde zum Schluß ebenfalls durch

einstündige Inkubation bei 80° C auf dem Filter fixiert. Die anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Probe erfolgte wie im Kapitel 2.17 beschrieben.

2.14.3 Western-Blot-Transfer

Nach der Auftrennung der Proteine durch eine SDS-PAGE wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Polyacrylamidgel wurde zuerst in Protein Transfer Puffer überführt und auf eine Nitrozellulosemembran gelegt, welche dann zwischen je eine Doppellage in Puffer getränktes 3 MM-Papier gelegt wurde. Anschließend wurde das Gel in einem, mit zwei angefeuchteten Schwämmen versehenen, Gelhalter fixiert und vertikal in eine mit Blottingpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt, so daß der Nitrozellulosefilter zur Anode hin orientiert war. Die Überführung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 180 mA über Nacht. Nach Beendigung des Transfers erfolgte eine Überprüfung der Beladung und der Proteinübertragung durch Färbung des Filters mit Ponceau's-Lösung. Anschliessend wurde der Nitrozellulosefilter mit PBS gespült, um die Färbelösung abzuwaschen und wie im Kapitel 2.15 beschrieben mit Antikörpern inkubiert.

2.15 Detektion von Proteinen mittels Antikörper

Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindung wurde der Nitrozellulosefilter für 3h in Blockierungslösung (PBS mit 5% Magermilchpulver und 0,1% Tween 20) inkubiert. Der Filter wurde nun mit dem primären Antikörper (1:750 in Blockierungslösung) für 2h inkubiert und 3x10 min mit PBS / 0,1 Tween-20 gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschliessend wurde die Membran mit einem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:4000 in Blockierungslösung) für 1h inkubiert und erneut gewaschen. Die Sichtbarmachung des gebundenen Antikörpers erfolgte mittels des ECL-Kits von Amersham und die Detektion erfolgte mit „High performance chemiluminescence film“ von Amersham. Um für eine weitere Inkubation die Antikörper von dem Filter abzuwaschen, wurde der Filter 2x10 min in 100 mM Glycin-Lösung (pH 2,8) und danach 2x10 min in PBS gewaschen.

2.16 Radioaktive Markierung

2.16.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden zur Hybridisierung

Die Markierung der DNA-Sonden, die für die radioaktive Hybridisierung verwendet wurden, erfolgte radioaktiv durch „random primed oligo labeling“ (Feinberg und Vogelstein, 1983). Dabei wurde an die denaturierte DNA ein Gemisch von statistischen Hexanukleotidprimern hybridisiert, die dem Klenow-Fragment als Startpunkte für die Synthese eines zur Matrize komplementären Stranges dienen. Die Markierung wurde in einem Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 30 µl durchgeführt. Hierbei wurden 0,1-1 µg DNA eingesetzt, welche durch Erhitzen auf 94° C für 10 min denaturiert und sofort auf Eis gekühlt wurde, um eine Renaturierung zu verhindern. Zu der DNA wurden 6 µl dNTP und 6 µl 5x Puffer aus dem „Random Primer Plus Extension Labeling System“ der Firma NEN hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30-80 µCi des markierten Nukleotids $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (>3000 Ci / mMol) und 1U Klenow Enzym. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die radioaktiv markierte DNA mit A.bidest auf 200 µl aufgefüllt und mit 3 Vol abs. Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 200 µl TE gelöst.

Vor der Hybridisierung wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 95° C denaturiert und danach in 7 ml Hybridisierungslösung überführt.

2.16.2 Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden für EMSA

Zur Herstellung der Fehlpaarungsoligonukleotide wurden 250 pmol G-oligo mit 250 pmol C-oligo oder 250 pmol T-oligo gemischt und auf 40 µl mit A.bidest aufgefüllt. Die Oligonukleotide wurden in 1 ml Reaktionsgefäßen in einem Schwimmer plaziert und in 1 l Wassers bei 80° C denaturiert. Die Proben blieben im Wasser, bis dieses sich auf auf 20° C abgekühlt hatte. In dieser Zeit erfolgte die Hybridisierung der Oligonukleotide. Zum Schluß wurden die Ansätze mit A.bidest auf 100 µl aufgefüllt. Um die Sonde radioaktiv zu markieren, wurden 1,4 µl (3,5 pmol) des Oligonukleotids mit 1 µl 10x Poly-Nucleotid-Kinase-Puffer und 3 µl $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP, und 1 µl PNK (Polynukleotidkinase) gemischt und der Reaktionsansatz mit A. bidest auf 10 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation bei 37° C für 60 min erfolgte die Zugabe von 90 µl A.bidest. Anschließend wurde die DNA durch die Zugabe von 250 µl abs. Ethanol über Nacht bei -20° C gefällt. Die DNA wurde für 30 min bei 14000 Upm und 4° C abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, in 100 µl A.bidest gelöst und erneut mit 2,5 Vol abs. Ethanol gefällt. Nach einer Inkubation bei -20° C über Nacht wurde die DNA für 30 min bei 14000 Upm und 4° C abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl A. bidest gelöst.

2.17 Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde

Die durch unterschiedliche Verfahren (Northern-Blot, Southern-Blot) hergestellten Nitrozellulosefilter wurden bei 60° C für 3-6 h in 50 ml Prähybridisierungslösung präinkubiert um eine unspezifische Bindung der radioaktiven Probe an die Filter zu verhindern. Anschließend wurden die Nitrozellulosefilter mit 7 ml Hybridisierungslösung und der radioaktiv markierten DNA-Sonde aus Kapitel 2.16.1 über Nacht in einer Hybridisierungsröhre inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Nitrozellulosefilter 3x 15 min bei 60° C mit 2x SSC / 0,1% SDS gewaschen. Nach erneutem Waschen in 2x SSC wurden die Filter in einen Gefrierbeutel eingeschweißt, ein Kodak XAR Röntgenfilm und Verstärkerfolie wurden auf die Filter gelegt und diese bei -80° C für unterschiedliche Zeiten exponiert. Zur Rehybridisierung mit einer zweiten Sonde wurden die Filter für 30 min bei 60° C in 2x SSC inkubiert und anschließend erneut prähybridisiert.

2.18 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986; Mullis, 1990) besteht in einer mehrfachen Replikation eines DNA-Fragments, welche durch eine Denaturierung der neu entstandenen Doppelstränge beliebig oft wiederholt werden kann. Bei der PCR verwendet man Primer, die auf verschiedenen Strängen der DNA binden und mit ihren 3'-Enden aufeinanderzuweisen. Diese Primer werden durch die thermostabile Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* verlängert, wodurch die dazwischenliegenden Sequenzen vervielfältigt werden. Die neu synthetisierten Stränge dienen im nächsten Zyklus wieder als Vorlage („Template“), an welche die Primer hybridisieren können. Dadurch wächst die Anzahl an DNA-Fragmenten exponentiell an. Ein Zyklus zur Amplifikation aus genomischer DNA lief folgendermaßen ab: Denaturierung: 1 min 94° C / Anealing: 2 min 62° C / Elongation: 2 min 72° C / 32 Zyklen. Für die PCR wurden 200 ng genomische DNA mit 1x Taq-Puffer, je 500 ng Primer, 0,2 mM dNTP und 2,5 U Taq-Polymerase in

einem 50 µl Ansatz amplifiziert. Es wurde eine sog. „Hot-Start-PCR“ durchgeführt, wobei man den Taq-Puffer, A.bidest und die DNA-Template in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettierte und den Ansatz für 1 min bei 94° C denaturierte. Danach wurde der Ansatz sofort auf Eis abgekühlt, um eine Renaturierung zu verhindern. Anschließend wurden die Primer, die dNTPs und die Taq-Polymerase hinzugegeben und das Programm des Thermocyclers gestartet. Nach der Amplifikation wurde 1/5 Vol der Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt, um diese zu überprüfen. War die Amplifikation positiv, wurden die restlichen 4/5 Vol zur Klonierung verwendet.

2.19 DNA-Sequenzierung

Die enzymatische Sequenzierung beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierung erfolgte im „Institut für Molekulargenetik, gentechnische Sicherheitsforschung und Beratung“ der Universität Mainz am 373A DNA Sequencer der Firma ABI (Weiterstadt) oder wurde von der Firma Genterprise (Mainz) kommerziell durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden in einem Sequenzieransatz 0,5 µmol DNA, 3,2 pmol Primer und 8 µl Reaktionsmix (dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs, Taq-Polymerase, Puffer) mit A.bidest auf 20 µl aufgefüllt. Die eigentliche Sequenzierreaktion wurde hier als eine „Cycle-Sequenzierung“ durchgeführt. Sie entspricht einer linearen PCR-Reaktion, die nur mit einem Primer durchgeführt wird. Bei den verwendeten Primern handelte es sich um „universal“ bzw. „reverse“ Primer, die links und rechts der Klonierungsstelle an die pUC18 Vektor-DNA hybridisieren.

2.20 Koloniebildungstest

Pro 5 cm Schale wurden 400 Zellen ausgesät und 12 h bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Schalen mit den zu untersuchenden Agenzien für 1 h behandelt. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel, nachdem die HeLa-Zellen für 7 d und die Melanomzellen für 10 d bei 37° C inkubiert wurden. Nach dieser Zeit wurde das Medium abgenommen und die bis dahin gewachsenen Zellkolonien mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellkolonien für 5 min mit Methanol inkubiert und anschließend getrocknet. Die Klone wurden 5 min mit 1,25% Giemsa / 0,125% Kristalviolett angefärbt und danach mit Leitungswasser abgespült. Nach dem Trocknen der Platten wurden die Kolonien auf den Platten ausgezählt. Die Anzahl der Kolonien in den behandelten Ansätzen wird als prozentualer Anteil der unbehandelten Kontrolle angegeben und graphisch in einer Überlebenskurve nach der halblogarithmischen Funktion $N = N_0 \times D^{ek}$ dargestellt.

2.21 Immunfluoreszenz-Untersuchung

Zur Untersuchung der Immunfluoreszenz wurden 5×10^5 Zellen auf beschichteten Glasplättchen in einer 5 cm Schale ausgesät und für 24 h bei 37° C kultiviert. Nach der Mutagenbehandlung wurden die Glasplättchen 3x mit kaltem PBS gewaschen und die Zellen anschließend für 20 min mit 4 % Formaldehyd und 0,2 % Triton X-100 fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Glasplättchen erneut 3x mit PBS gewaschen und für 30 min in PBS mit 1% BSA inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Nach erneuten Waschen erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:500) für 2 h bei 4° C und nach weiterem Waschen die Inkubation mit Rhodamin-konjugiertem anti-mouse IgG (DAKO). Die Glasplättchen wurden zum Abschluß 3x mit PBS gespült, mit den Zellen nach unten in einem Tropfen Einbettmedium gelegt und unter UV-Anregung bei 400-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.22 Immunpräzipitation

Um aus Zellen spezifische Proteine zu isolieren, wurden entweder Gesamt-, Kern- oder Cytoplasmaextrakte isoliert (Kapitel 2.5.4). Zu den isolierten Extrakten (Volumen pro Probe :1 ml) wurden 10 µl Protein G hinzugegeben und auf einem Überkopfschüttler 30 min bei 4° C inkubiert. Durch eine Zentrifugation für 1 min bei 10000 Upm und 4° C wurde das Protein G sedimentiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Hierdurch werden Proteine aus der Probe zu entfernen, die unspezifisch an Protein G binden. Zur eigentlichen Immunpräzipitation wurden 10 µl des spezifischen Antikörpers hinzugegeben und auf einem Überkopfschüttler 2 h bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde 25 µl Protein G hinzugegeben und erneut 2 h bei 4° C inkubiert. Der Komplex aus Protein G, Antikörper und zu immunpräzipitierendes Protein wurde anschließend durch Zentrifugation für 5 min bei 2500 Upm und 4° C sedimentiert und in 1 ml RIPA-basic Puffer [140 mM NaCl, 1 mM Na-ortho-vanadat, 1 mM PMSF, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)] resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde 4x wiederholt um Verunreinigungen durch andere Proteine auszuschließen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 40 µl A.bidest aufgenommen und zur SDS-Gelelektrophorese eingesetzt (Kapitel 2.13.3).

2.23 Messung der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase Aktivität (MGMT-Test)

Das Prinzip beruht auf der Übertragung der radioaktiv markierten Methylgruppe von Kalbsthymus-DNA, welche zuvor durch [³H]-Methyl-N-Nitrosoharnstoff methyliert wurde, auf das MGMT-Protein im Zellextrakt. Die DNA wird anschließend durch die Behandlung mit Trichloressigsäure (TCA) hydrolysiert und die zellulären Proteine ausgefällt. Die Radioaktivität, die von der DNA auf das MGMT-Protein übertragen wurde, ist ein Maß für die Methyltransferaseaktivität im Zellextrakt. Zur Aktivitätsmessung wurden 200 µg Gesamtprotein und 40 µl [H³]-DNA (ca. 80000 cpm) in 200 µl Reaktionspuffer [70 mM Hepes-KOH (pH 7,8), 1 mM DDT, 5 mM EDTA] aufgenommen. Nach einer Inkubation für 90 min bei 37° C erfolgte die Zugabe von 400 µl TCA (13%) und von 100 µg BSA. Durch das Aufkochen der Probe für 15 min bei 95° C wurde die DNA hydrolysiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis abgekühlt, wobei die Proteine gefällt wurden. Durch eine Zentrifugation für 10 min bei 14000 Upm wurden die Proteine sedimentiert und anschließend dreimal mit 400 µl TCA (5%) gewaschen und zum Abschluß in 300 µl 0,2 N NaOH hydrolysiert. Die gebundene Radioaktivität wurde nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler bestimmt.

2.24 Phosphorylierungsversuche

2.24.1 *in vivo* Phosphorylierung

Um zu untersuchen, ob ein spezielles Protein *in vivo* phosphoryliert wird, wurden 1×10^6 Zellen in eine 5-cm Schale ausgesät und für 36 h in 5 ml phosphatfreiem Medium (Dulbecco's MEM w/o Phosphate, supplementiert mit 0,5% Glucose, 0,5 % Serum, 0,5 % Na-Pyruvat) kultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,2 mCi ^{32}P -Phosphorsäure pro ml Medium und eine Inkubation bei 37° C für 6 h. Die Zellen wurden anschließend mittels Inkubation in Trypsin von der Platte gelöst, in 10 ml kaltem PBS gelöst und durch eine Zentrifugation für 5 min bei 1000 Upm und 4° C sedimentiert. Die Isolation der Extrakte erfolgte wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben. Nach der Extrakterstellung wurden die zu untersuchenden Proteine mittels spezifischer Antikörper immunpräzipitiert (Kapitel 2.22) und zur SDS-Gelelektrophorese eingesetzt (Kapitel 2.13.3). Die Proteine wurden mittels Western-Blot-Transfer (Kapitel 2.14.3) auf einen Nitrozellulosefilter übertragen und die Radioaktivität mittels Röntgenfilm detektiert. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde der Filter anschließend mit Antikörper gegen die immunpräzipitierten Proteine inkubiert (Kapitel 2.15).

2.24.2 *in vitro* Phosphorylierung

Für die Untersuchungen zur *in vitro* Phosphorylierung von MSH2 und MSH6 wurde gereinigtes MutS α (von Prof. Jiricny Zürich, zur Verfügung gestellt) eingesetzt. Hierzu wurden 0,5 μg MutS α mit 10 μCi $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP, 1 U der zu untersuchenden Proteinkinase (PKC, CKII oder PKA) und 10 μl des entsprechenden 5x Puffers gemischt und mit A.bidest auf 50 μl aufgefüllt. Nach einer Inkubation für 60 min bei 37° C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μl 4x SDS Ladepuffer gestoppt und die Extrakte zur SDS-Gelelektrophorese eingesetzt.

PKC-Puffer: 25 mM Tris/HCl (pH.7,4), 6,25 mM MgCl₂, 125 μM CaCl₂, 250 μM ATP, 0,03% Triton-X-100, 300 $\mu\text{g/ml}$ L- α -Phosphatidyl-L-serine und 100 $\mu\text{g/ml}$ 1,2-dileolyl-rac-glycerol

PKA-Puffer: 100 mM Tris/HCl (pH.7,4), 50 mM MgCl₂, 10 μM cAMP, 1,5 mM CaCl₂, 250 μM ATP

CKII-Puffer: 100 mM Tris/HCl (pH.7,4), 50 mM MgCl₂, 25 mM DDT, 250 mM KCl, 250 μM ATP

3. Ergebnisse

3.1 Regulation der Expression von MMR-Proteinen nach Behandlung von Zellen mit chemischen Agenzien

Die Behandlung von Säugerzellen mit DNA-schädigenden Agenzien führt zur Induktion einer Reihe von Prozessen, zu denen auch die transkriptionelle Aktivierung einiger an der DNA-Reparatur beteiligter Proteine (MGMT, AP-Endonuklease, MPG) gehört. Für die MMR ist jedoch nicht bekannt, ob und wie dieses Reparatursystem durch DNA-schädigende Agenzien in der Expression beeinflusst wird. Da die MMR auch an der Reparatur von Fehlpaarungen beteiligt ist, die durch methylierende Karzinogene und Tumor-Chemotherapeutika induziert werden, hat die Regulation der MMR eine direkte Implikation in der Tumorgenese und Tumortherapie. Es ist deshalb von großem Interesse herauszufinden, welche intrazelluläre Prozesse während der Chemotherapie mit alkylierenden Agenzien ausgelöst werden. Der größte Teil der vorliegenden Untersuchungen wurden an humanen HeLa-MR-Zellen durchgeführt. Um die Bedeutung der MGMT bei der Regulation der MMR durch genotoxischen Stress mit zu untersuchen, wurden bei einigen Experimenten sowohl MGMT-defiziente HeLa-MR-Zellen als auch MGMT-profiziente HeLa-S3-Zellen verwendet.

3.1.1 Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit alkylierenden Agenzien führt zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Zunahme der nukleären MSH2-Proteinmenge

Zu Beginn stellte sich die grundlegende Frage, ob die MMR nach der Behandlung von Zellen mit mutagenen Agenzien überhaupt einer veränderten Expression unterliegt. Die Tatsache, daß es bei einigen anderen Reparatursystemen zu einer transkriptionellen Aktivierung kommt, ließ dies zwar vermuten, konkrete Hinweise waren jedoch nicht verfügbar. Es wurde deshalb zunächst untersucht, ob nach der Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit verschiedenen mutagenen Agenzien eine Änderung der Expression des MMR-Proteins MSH2 zu beobachten ist. Hierzu wurden die Zellen für 6 h mit unterschiedlichen alkylierenden Agenzien (ENU, MNU, MNNG oder MMS) oder mit nicht alkylierenden Agenzien (UV, Gamma-Strahlung oder Melphalan) behandelt. Nur bei der Behandlung mit den alkylierenden Agenzien ENU, MNU und MNNG, nicht aber bei MMS, zeigte sich eine Steigerung der nukleären MSH2-Proteinmenge (Abb.3.1.A). Im Gegensatz dazu führte die

Behandlung mit UV-C Licht, Gamma-Strahlung und Melphalan nicht zu einer Änderung der Expression der nukleären MSH2-Proteinmenge. Vergleicht man den Effekt dieser drei alkylierenden Agenzien, so war die stärkste Zunahme des MSH2-Proteins nach einer 6-stündigen Behandlung mit 25 μ M MNNG zu beobachten. Hier zeigte sich eine 7,3-fache Steigerung der Proteinmenge. Nach der Behandlung mit ENU und MNU zeigte die Zunahme der MSH2-Proteinmenge bei beiden Agenzien in etwa die gleiche Stärke. Die stärksten Zunahmen waren nach der Behandlung mit 2 mM ENU (5,4-fache Zunahme) und mit 2 mM MNU (5,1-fache Zunahme) zu beobachten (Abb.3.1.B). Zur Quantifizierung und als Beladungskontrolle wurden die Filter mit einem Antikörper gegen ERK2 („extracellular signal receptor regulated kinase 2“) inkubiert.

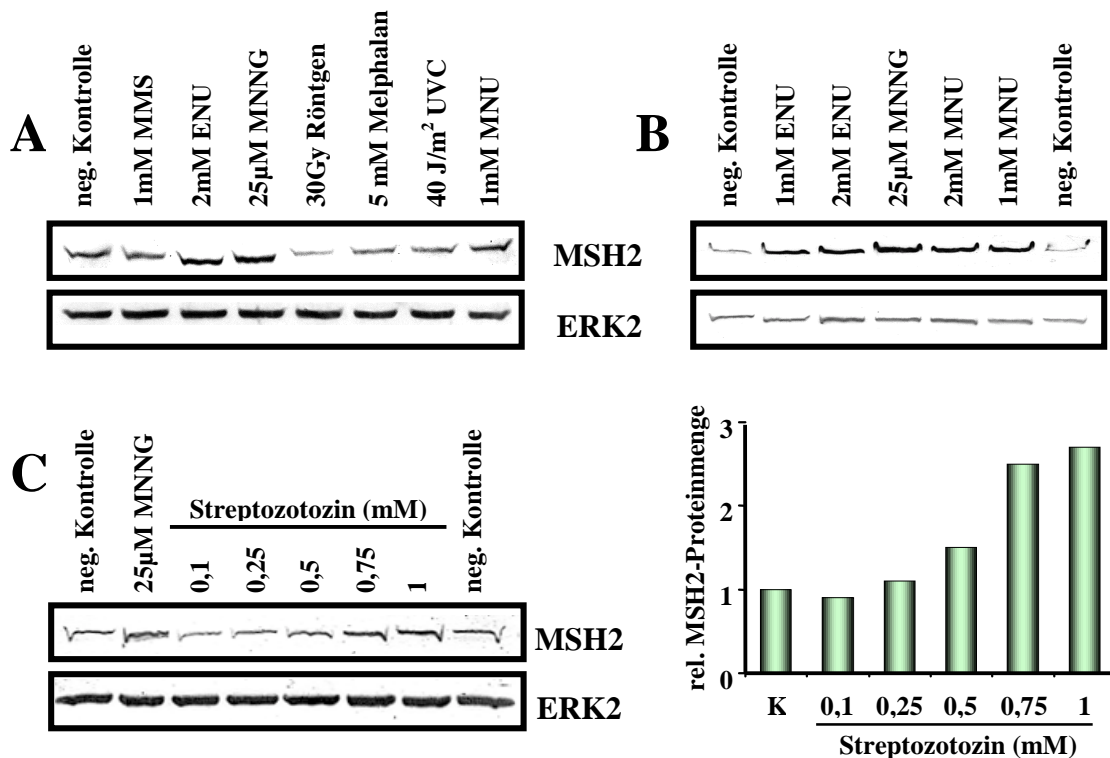


Abb.3.1 Einfluß der Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit Mutagenen auf die MSH2-Expression

(A) HeLa-MR-Zellen wurden für 6 h mit verschiedenen Mutagenen inkubiert. Von den behandelten Zellen wurden nukleäre Extrakte isoliert und jeweils 25 μ g zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörper gegen MSH2 inkubiert. Die Inkubation mit ERK2 diente als Beladungskontrolle. (B) HeLa-MR-Zellen wurden für 6 h mit verschiedenen Dosen der alkylierenden Agenzien MNNG, MNU und ENU inkubiert. Von den behandelten Zellen wurden nukleäre Extrakte isoliert und jeweils 25 μ g zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörper gegen MSH2 inkubiert. Die Inkubation mit ERK2 diente als Beladungskontrolle. (C) HeLa-MR-Zellen wurden für 2 h mit verschiedenen Dosen Streptozotocin inkubiert. Von den behandelten Zellen wurden nukleäre Extrakte isoliert und jeweils 25 μ g zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörpern gegen MSH2 und ERK2 inkubiert und die relative MSH2-Proteinmenge in Abhängigkeit von der Streptozotocinkonzentration in einem Säulendiagramm dargestellt.

Da sich nur bei der Behandlung mit alkylierenden Agenzien, die O⁶-Alkylguanin generieren, eine Änderung der MSH2-Proteinmenge zeigte, wurde zusätzlich überprüft, ob diese Regulation auch nach der Behandlung mit dem klinisch relevanten Chemotherapeutikum Streptozotozin, welches ebenfalls O⁶-Alkylguanin generiert, erfolgt. Hierzu wurden die Zellen für 2 h mit verschiedenen Dosen Streptozotozin und als Kontrolle mit 25 µM MNNG behandelt. Es zeigte sich, daß die Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit Dosen über 0,5 mM Streptozotozin zur deutlichen Steigerung der MSH2-Proteinmenge führt (Abb.3.1.C).

Um die Bedeutung der Zunahme der MSH2-Proteinmenge im Zellkern nach MNNG-Behandlung für die Zelle abzuschätzen, war es nötig zu untersuchen, in welchem Konzentrationsbereich der Effekt zu beobachten ist, und ob in diesem Konzentrationsbereich toxische Wirkungen auftreten. Hierzu wurden HeLa-MR-Zellen mit unterschiedlichen Dosen MNNG für 6 h behandelt und die Expression des MSH2-Proteins untersucht. Es zeigte sich, daß die Zunahme der MSH2-Proteinmenge schon bei einer Konzentration von 0,5 µM MNNG zu beobachten ist (Abb.3.2.A). In diesem Bereich waren die Zellen im Koloniebildungstest (siehe Abb.3.11) schon stark geschädigt (Überlebensrate 6%), in Massenkulturen führte die Behandlung mit dieser Dosis jedoch zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums der Kultur. Dies zeigt, daß die Zunahme der MSH2-Proteinmenge in dem Sinne ein physiologischer Vorgang ist, daß sie nicht die Folge unspezifischer toxischer Wirkungen der Mutagenbehandlung ist.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welcher Art die Regulation der MSH2-Expression ist, wurde untersucht, nach welchen Zeitpunkten die Zunahme von MSH2 erfolgt. Eine frühe Expressionssteigerung würde auf kurzfristige Regulationsmechanismen, wie posttranskriptionale Modifikationen hinweisen, während eine späte Zunahme eher für eine Geninduktion sprechen würde. Hierzu wurden HeLa-MR-Zellen für unterschiedliche Zeiten mit 25 µM MNNG behandelt und die Expression des MSH2-Proteins untersucht. Die Versuche zeigten, daß es sich bei der Zunahme der MSH2-Expression um eine sehr schnelle Antwort handelt. Schon 30 min nach Mutagenbehandlung war eine Steigerung der MSH2-Proteinmenge zu beobachten, die mindestens für die nächsten 12 h über der Proteinmenge der unbehandelten Kontrolle blieb (Abb. 3.2.B).

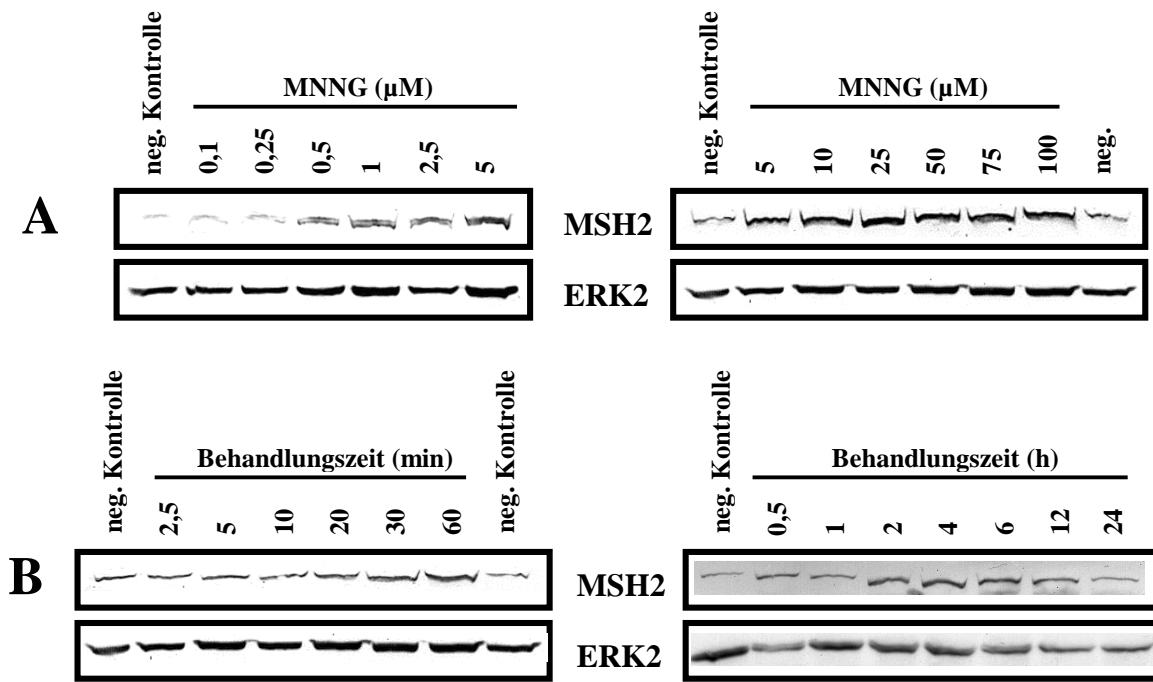


Abb.3.2 Zeit- und dosisabhängige Zunahme von nukleärem MSH2 als Folge der Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit MNNG

(A) HeLa-MR-Zellen wurden für 6 h mit verschiedenen Dosen MNNG inkubiert. Die nukleären Extrakte wurden isoliert und jeweils 25 μg zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörper gegen MSH2 inkubiert. Die Inkubation mit ERK2 diente als Beladungskontrolle. (B) HeLa-MR-Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit 25 μM MNNG inkubiert. Von den behandelten Zellen wurden nukleäre Extrakte isoliert und jeweils 25 μg zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörper gegen MSH2 und ERK2 inkubiert.

3.1.2 Die Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit MNNG führt zur Induktion der GT-Bindungsaktivität

Für die Relevanz der MSH2-Zunahme ist auch entscheidend, ob nicht nur die Proteinmenge gesteigert wird, sondern ob es auch zur Erhöhung der Reparaturfunktion kommt. Um dieser Frage nachzugehen wurden in HeLa-MR-Zellen nach MNNG-Behandlung GT-Bindungsstudien durchgeführt. Wie bereits erwähnt, stellt die Bindung des MutS α -Komplexes (MSH2 + MSH6) an eine Basenfehlpaarung den initialen Schritt der MMR dar. Zuerst erfolgten Kontrollexperimente, um die spezifische GT-MutS α Bande zu identifizieren (Abb.3.3A). Hierbei wurden die Zellextrakte mit radioaktiv markiertem GT-oligo gemischt und mit einem 10, 50 oder 100-fachem Überschuss nicht markiertem GC- oder GT-oligo kompetiert. Die spezifische Bande kann nur durch das unmarkierte GT-oligo, nicht aber durch das GC-oligo kompetiert werden. Zusätzlich wurden die Extrakte, vor Zugabe der radioaktiven GT-Oligonukleotide, mit Antikörper gegen MSH6 inkubiert, wodurch die spezifische Bande nach oben verschoben wird („Supershift“).

Bei den eigentlichen Versuchen wurden Extrakte von HeLa-MR-Zellen eingesetzt, die für 6 h mit unterschiedlichen Dosen der Mutagene MMS und MNNG behandelt wurden. Es zeigte sich, daß die Behandlung mit MNNG aber nicht mit MMS zu einer signifikanten Steigerung der GT-Bindungsaktivität führte (Abb.3.3.B-C). Die Steigerung der GT-Bindungsaktivität konnte dabei schon nach einer Behandlung mit 5 μ M MNNG beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen, daß die Zunahme des MSH2-Proteins auch mit der Zunahme der GT-Bindungsaktivität und damit mit einer funktionellen Aktivierung der MMR assoziiert ist.

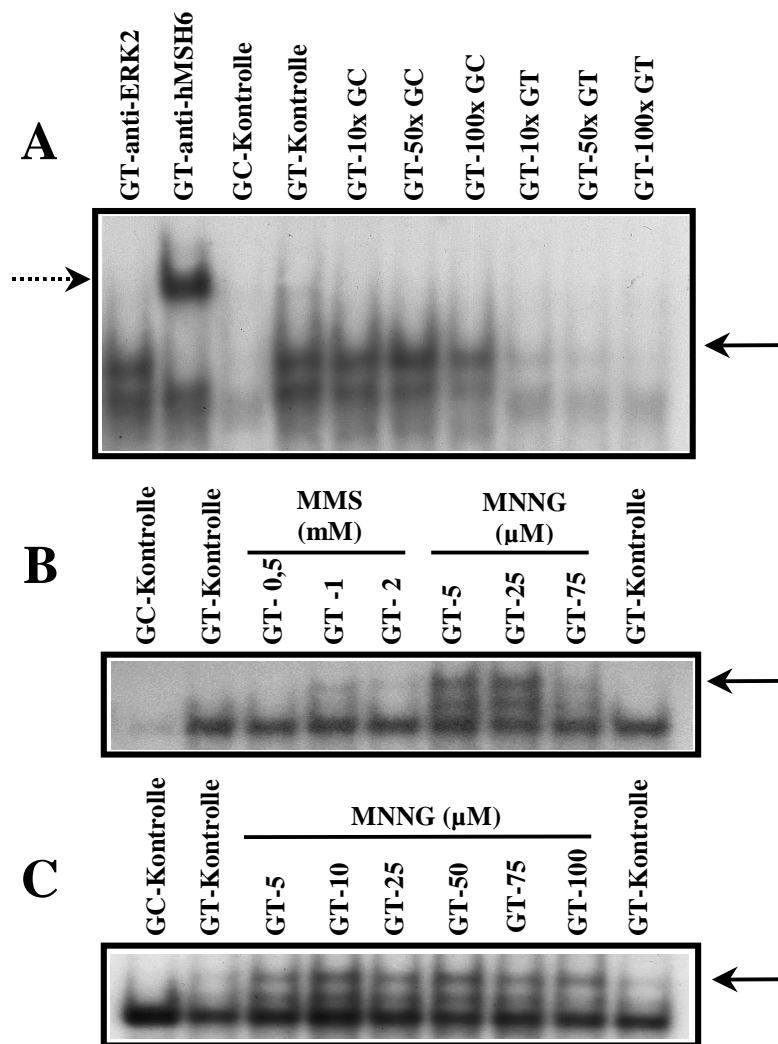


Abb.3.3 Einfluß der Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit alkylierenden Agenzien auf die Bindung eines spezifischen GT-Fehlpaarungs-Oligonukleotids

(A) 4 μ g nukleärer Extrakte von HeLa-MR-Zellen wurden mit spezifischen radioaktiv markierten GC- und GT-Oligonukleotide inkubiert. Zusätzlich wurden unmarkierte Oligonukleotide zugesetzt, um die spezifische Bande zu kompetieren. Der Pfeil zeigt die Lage des spezifischen Komplex zwischen dem GT-oligo und Mut α . Zwei der Proben wurden mit Antikörper gegen MSH6 oder ERK2 für 30 min vorinkubiert. Der gestrichelte Pfeil zeigt den hierdurch entstehenden Supershift. (B) HeLa-MR-Zellen wurden für 6 h mit verschiedenen Dosen MMS und MNNG inkubiert. Nukleäre Extrakte wurden isoliert und jeweils 4 μ g für ein Gelretardationsexperiment eingesetzt. (C) HeLa-MR Zellen wurden für 6 h mit verschiedenen Dosen MNNG inkubiert. Nukleäre Extrakte wurden isoliert und jeweils 4 μ g für ein Gelretardationsexperiment eingesetzt.

3.1.3 Die Zunahme des MSH2-Proteins beruht weder auf einer Induktion des Promotors, noch auf erhöhter Stabilität der mRNA und ist unabhängig von Protein de novo Synthese

Die Tatsache, daß es sich bei der Zunahme der MSH2-Proteinmenge um einen schnellen Vorgang handelt, lieferte schon Hinweise darauf, daß eine Geninduktion von MSH2 wahrscheinlich nicht die Ursache für diese Proteinzunahme ist. Um die Frage einer möglichen Assoziation zwischen der Proteinzunahme und einer Geninduktion zu klären, sollte die Regulation des MSH2-Promotors durch die Behandlung mit mutagenen Agenzien untersucht werden. Die Klonierung des MSH2-Promotors erfolgte über PCR. Hierzu wurde die genomische DNA von HeLa-S3-Zellen isoliert und der MSH2-Promotor mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden anhand der bereits bekannten Sequenz für den MSH2-Promotor ausgesucht (Scherer *et al.*, 1996a). Das PCR-Produkt wurde nun in die SmaI Stelle von pUC18 inkliniert und dieser Klon als pUC-MSH2.pro bezeichnet. Aus diesem Klon wurde der MSH2-Promotor ausgeschnitten und in den pBLcat5 Vektor inkliniert. Hierzu wurde pUC-MSH2.pro mittels EcoRI an einer Stelle geschnitten und anschließend die überhängenden Enden mit Klenow Enzym aufgefüllt. Anschließend wurde das Promotorfragment mit HindIII ausgeschnitten. Der pBLcat5 Vektor wurde ebenfalls mit mehreren Enzymen geschnitten. Zuerst erfolgte der Restriktionsverdau mit XhoI gefolgt von „Endfilling“ und einem Restriktionsverdau mit HindIII, so daß der Promotor gerichtet über die HindIII Schnittstelle inkliniert werden konnte. Der so entstandene Vektor pBI-MSH2.pro und der Vektor pUC-MSH2.pro sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

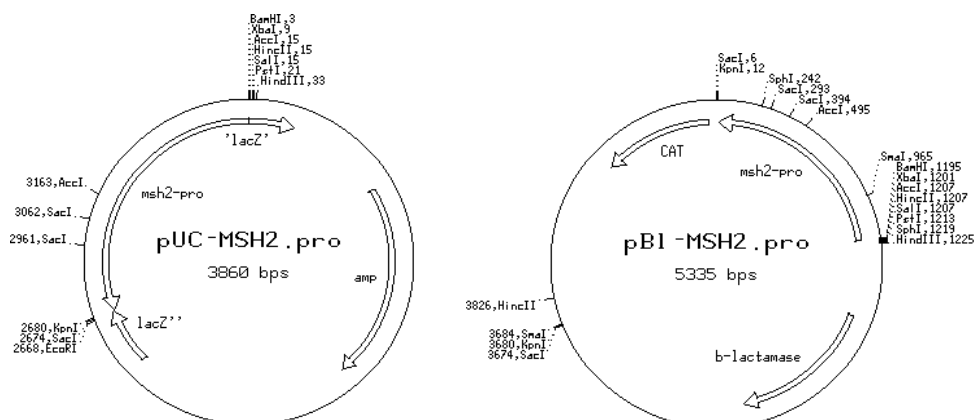


Abb.3.4.A Vektorkarten der neu klonierten Vektoren pUC-MSH2.pro und pBI-MSH2.pro

Der humane MSH2-Promotor wurde mittels RT-PCR aus genomischer DNA von HeLa-S3-Zellen amplifiziert und in den Vektor pUC18 und pBLcat5 inkliniert. Die Abbildung zeigt die Vektorkarten der so entstandene Vektoren pBI-MSH2.pro und pUC-MSH2.pro.

Ergebnisse

Zur Kontrolle wurde der klonierte MSH2-Promotor im Vektor pBI-MSH2.pro komplett sequenziert. Die Sequenz ist in Abb.3.5 dargestellt. Hierbei zeigte sich, daß keine der relevanten Bindungsstellen innerhalb des Promotors mutiert war. Zu der veröffentlichten Sequenz (Scherer *et al.*, 1996a) gab es einige Unterschiede, die aber zum Teil darauf beruhen, daß die veröffentlichte Sequenz nicht identifizierte Basen beinhaltete.

ggcgtgaacatagctgacggcagaagacctcctgggctcaaacgatcctcctggctcgtgct**acc**caaaagtactgggatta
GGCGTGAACATAGCTGACGGCAGAAGACCTCCTGGGCTCAAACGATCCTCCTGGCTCGTGCT-**CCCAAAGTACTGGGATTA**

tgg**g**cgtgtgacaccacgcctggcgtcaaacgtttgtctttttatattttatattttgtattttttgagacagggttttca
TGG-CGTGTGACACCACGCCTGGCGTCAAACGTTTGTCTTTTATTTATTTATTTTGTATTTTGTAGACAGGGTTTTC

atctg**tcgcccacgct**ggagtgagtgccacaatttacggct**g**caccgcagcctcgacctccgggctcaggtgatccttt
ATCTG**TCGCCCACGCT**GGAGTGCAGTGGCACAATTTACGGCT-CACCGCAGCCTCGACCTCCCGGGCTCAGGTGATCCTTT

cgctcagccctgctaataatctgggatcacagacgtgggttttaccatggtgccaggatggtgtcaatctcctgggctca
CGCTCAGCCCTGCTAATATCTGGGATCACAGACGTGGGTTTACCATGTTGCCAGGATGGTGTCAATCTCCTGGGCTCA

agtgat**ccgccc**acctcggcctcccaaattgctgggattacagcgctgagctaccgcgcctgccacaaacgcatacttc
AGTGAT**CCGCCC**ACCTCGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCTACCGCGCCCTGCCACAAACGCATATCTTC

taacgtaccatcttcatcttacttgcctatattcattatctgaat**tt**ttctcatattagaatgtaagcagaataaaggcagtgat
TAACGTACCATTTCACTTACTTGTCTATATTCATTATCTGAAT**CT**TTCTCATATTAGAATGTAAGCAGAATAAAGGCAGTGAT

ttttctttttactggcgatcctcagagccaagaagagctcgggacatagcagccatataaatgttttcgaatgag**tgaat**
TTTTCTTTTACTGGCGATCCTCAGAGCCAAGAAGAGTCTGGGACATAGCAGGCCATATAAATGTTTTTCGAATGAG**TGAAT**

catcnacgagtgatgaagcgataatgtggctacagggcagcagtaaggaggctgtgtagaataaacccgtaaatcccgatg
CATC**AA**CGAGTGGATGAAACGATAATGTGGCTAACAGGCAGCAGTAAGGAGGCTGTGTAGAATAAACCCGTAATCCCGATG

ttggcagtttgcttagaagaaaaagggaggcagtcggagagggg**tatacngg**taacaaaatactgggaggaggagg**ag**
TTGGCAGTTTGCTTAGAAAAGAAAAaGGGAGGCAGTCGGAGAGGGG**CA**CAG**TTT**TAACAAAATACTGGGAGGAGGAG**AG**

gctagtttttttttgtttt**caagtttcct**tctgatgttactcccatgcttccgggcacattacagactcagtgctgctgccc
GCTAGTTTTTTTTTTGTTTT**CAAGTTTCCT**TCTGATGTTACTCCCATGCTTCCGGGCACATTACGAGCTCAGTGCCTGCC

gaaatctcccacctgggtggcaacctacccttgcatcacccccaccaggggcttcaagccttgacgt**tgagtaa**acacaga
GAAATCTCCCACCTGGTGGCAACCTACCCTTGATACACCCACCAGGGCTTCAAGCCTTGACGT**TGAGTAA**ACACAGA

aaggagctctactaaggatgcgcgctctgcgggtttccgcgcgacctaggcgcagggatgcgcagtagctaaagtcaccagc
AAGGAGCTCTACTAAGGATGCGCGTCTGCGGGTTTCCGCGCGACCTAGGCGCAGGCATGCGCAGTAGCTAAAGTCACCAGC

gtgcgcgggaagctgggcccgcgctcgtctatg**attg**ttgcgcggcagactcccaccaccgaaacgcagccttggaaagct
GTGCGCGGGAAGCTGGGCCGCGTCTGCTTATG**ATTG**TTGCCGCGCAGACTCCACCCACCAGAAACGCAGCCTTGGAAAGCT

gg**attg**gtgtggtcgcctggccggacgccgctcgggggacgtgggagggga**ggcggg**aaacagcttagtgggtgtgggg
G**ATTG**GTGTGGTCGCCGTGGCCGGACGCCGCTCGGGGGACGTGGGAGGGGA**GCCGGG**AAACAGCTTAGTGGGTGTGGGG

tgcgcattttcttcaaccaggaggtgaggaggttttcgac eigene Sequenz
TCGCGCATTTTCTTCAACCAGGAGGTGAGGAGGTTTCGAC Datenbank Sequenz



Abb.3.4.B Vergleich der Sequenz des klonierten MSH2-Promotors mit der veröffentlichten Sequenz und Darstellung der potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen.

Der humane MSH2-Promotor wurde im Vektor pBI-MSH2.pro überlappend sequenziert. Die Sequenz wurde mit der bereits veröffentlichten MSH2-Promotorsequenz verglichen und die relevanten Transkriptionsfaktorbindungsstellen des MSH2-Promotors wurden mittels farbiger Kästchen hervorgehoben. Die zwischen den beiden Sequenzen unterschieden Basen wurden blau markiert.

Um zu testen, ob die unterschiedliche Expression des MSH2-Proteins auf der Induktion des Promotors beruht, wurde der pBl-MSH2.pro Vektor transient in HeLa-MR-Zellen transfiziert und diese 24 h nach der Transfektion mit Mutagenen behandelt. Der humane MSH2-Promotor zeigt in den HeLa-MR-Zellen eine hohe Basalaktivität. Diese wird jedoch durch die Behandlung mit MNNG, MMS, MNU und ENU nicht gesteigert (Abb.3.5.A). Um einen möglichen Effekt der Expositionszeit auszuschließen, wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion mit 25 μ M MNNG behandelt und unterschiedliche Zeiten danach die CAT-Aktivität gemessen. Es zeigte sich, daß bis zu 36 h nach der MNNG Behandlung keine Veränderung der CAT-Aktivität auftrat (Abb.3.5.B).

Eine weitere Möglichkeit, die Zunahme des MSH2-Proteins nach Mutagenexposition zu erklären, ist eine verstärkte Transkription oder eine erhöhte Stabilität der *msh2*-mRNA. Dies würde zu einer verstärkten Translation und damit zu einer Zunahme der MSH2-Proteinmenge führen. Um diese Annahme zu testen, wurde die Menge an *msh2*-mRNA mittels Northern-Blot-Analysen bestimmt. Hierzu wurden HeLa-MR-Zellen für 0, 2, 4, 8 und 16 h mit 25 μ M MNNG behandelt, die polyA⁺-RNA isoliert und zur Northern-Blot-Analyse eingesetzt. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten *msh2*-cDNA zeigt, daß die Behandlung mit MNNG nicht zu einer Zunahme der *msh2*-mRNA Menge führt (Abb.3.5.C). Die unveränderte Menge an *msh2*-mRNA schließt sowohl eine verstärkte Transkription als auch eine erhöhte Stabilität der mRNA als Ursache für die Zunahme der MSH2-Proteinmenge in HeLa-MR-Zellen aus.

Da weder die Induktion des MSH2-Promotors noch eine Veränderung der *msh2*-mRNA zu der Zunahme der MSH2-Proteinmenge führte, muß die Ursache des Phänomens auf der Proteinebene selbst liegen. Hierbei war es nun wichtig herauszufinden, ob für die Zunahme der MSH2-Proteinmenge eine Protein *de novo* Synthese nötig ist. Hierzu wurden HeLa-MR-Zellen für 1 h mit 10 μ g/ml Cycloheximid und 100 μ M Anisomycin vorbehandelt. Durch diese Behandlung kommt es zu einer Blockierung der Translation und damit zu einer Verhinderung der Protein *de novo* Synthese. Zusätzlich wurden Zellen für 3 oder 6 h mit 25 μ M MNNG behandelt. Die Western-Blot-Analyse der so behandelten Zellen zeigte sowohl in der Kontrolle (nicht vorbehandelte Zellen) als auch bei den vorbehandelten Zellen eine deutliche Zunahme der MSH2-Proteinmenge (Abb.3.5.D). Die Effektivität der Behandlung mit Cycloheximid und Anisomycin wurde durch Inkubation des Filters mit Antikörper gegen c-Jun überprüft. Bei c-Jun handelt es sich um ein instabiles Protein. Nach einer kompletten Hemmung der Translation sollte c-Jun, welches durch MNNG induziert

wird, innerhalb von 6 Stunden nicht mehr nachweisbar sein, was auch der Fall war. Die Ergebnisse zeigen, daß die Zunahme der MSH2-Proteinmenge von einer Protein *de novo* Synthese unabhängig ist. Der einzige Mechanismus, über den die Zunahme des nukleären MSH2-Proteins noch erklärt werden kann, ist die Annahme einer post-translationalen Regulation.

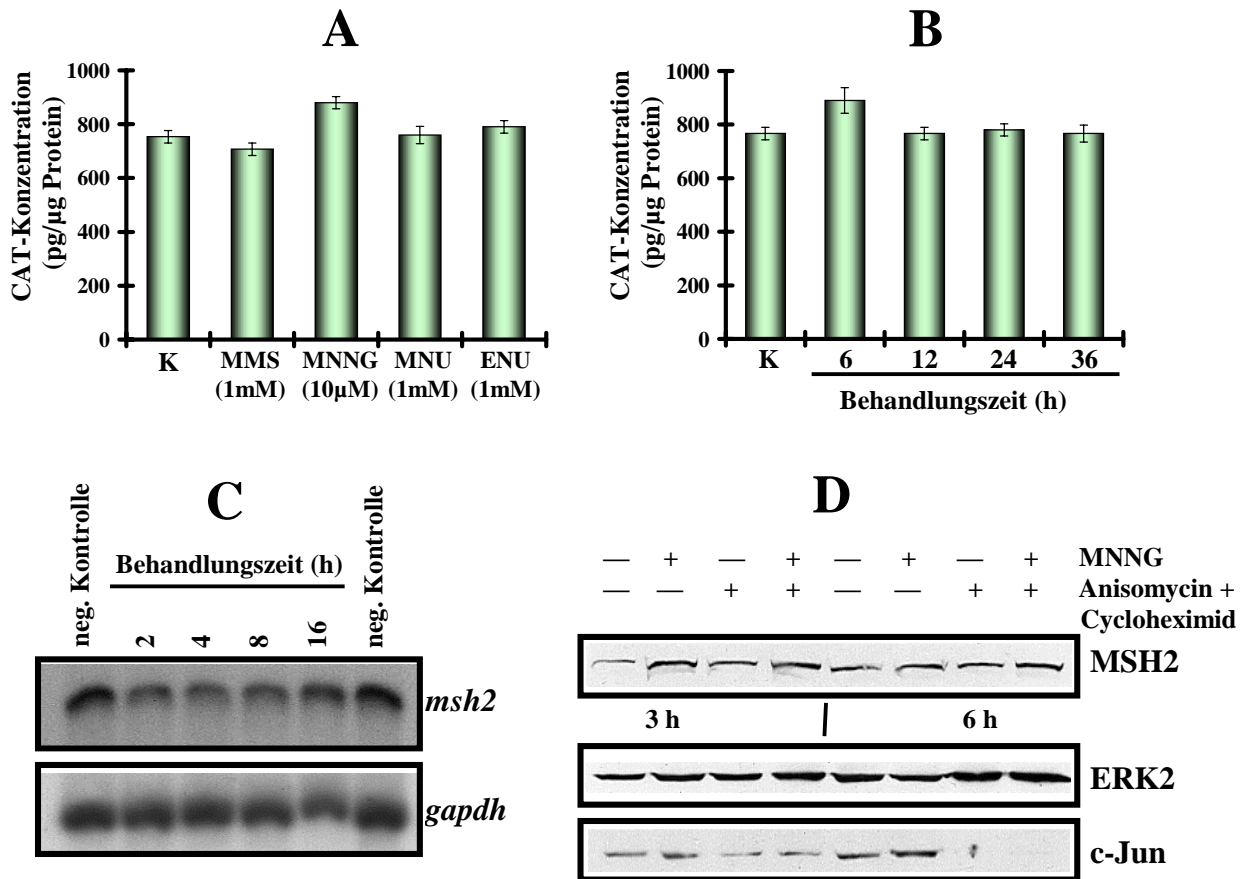


Abb.3.5 Einfluß der Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit alkylierenden Agenzien auf Promotoraktivität, mRNA-Stabilität und Protein *de novo* Synthese

(A/B) HeLa-MR-Zellen wurden transient mit dem MSH2-Promotor-CAT Konstrukt transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit unterschiedlichen alkylierenden Agenzien für 12 h (A) oder mit 25 µM MNNG für unterschiedliche Zeiten inkubiert (B). Aus den behandelten Zellen wurden Gesamtzellextrakte isoliert und für CAT-Analysen eingesetzt. Mit K ist die transfizierte aber nicht Mutagen-behandelte Kontrolle bezeichnet. Die Werte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen dar. (C) HeLa-MR-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit 25 µM MNNG inkubiert. Die mRNA wurde isoliert und jeweils 10 µg für eine Northern-Blot-Analyse eingesetzt. Der Filter wurde mit einer radioaktiv markierten *msh2*-cDNA hybridisiert. Die Inkubation mit einer *gapdh*-Sonde diente als Beladungskontrolle. (D) HeLa-MR Zellen wurden mit 100 µM Anisomycin und 10 µg/ml Cycloheximid für 4 oder 7 h inkubiert. Nach 1 h Behandlung wurden die Zellen entweder mit 25 µM MNNG für zusätzliche 3 oder 6 h behandelt (+), oder sie wurden nicht behandelt (-). Nukleäre Extrakte wurden isoliert und für Western-Blot-Analysen eingesetzt. Der Filter wurde mit Antikörper gegen MSH2 inkubiert. Die Inkubation mit Antikörper gegen ERK2 diente als Beladungskontrolle, die Inkubation mit Antikörper gegen c-Jun diente als Kontrolle der Anisomycin/Cycloheximid-Behandlung.

3.1.5 Die nukleäre Translokation des MSH2-Proteins ist unabhängig vom p53-Status und erfolgt in verschiedenen Säugerzelllinien

Um festzustellen, ob es sich bei der Translokation um einen allgemeinen Mechanismus handelt, oder ob es eine zelltypspezifische Reaktion auf die Behandlung mit MNNG ist, wurden verschiedene Zelltypen aus unterschiedlichen Spezies untersucht. Die untersuchten Zellen unterscheiden sich auch hinsichtlich des p53-Status, wodurch ihre Untersuchung auch Aussagen über einen möglichen Einfluß von p53 auf die nukleäre Translokation von MSH2 zuläßt. Die Beteiligung von p53 an der Regulation von MSH2 wäre durchaus denkbar, da sich im MSH2-Promotor p53-Bindestellen befinden (Scherer *et al.*, 1996b). Bei den untersuchten Zellen handelte es sich um die humane p53 defiziente Zelllinie HeLa-MR, die beiden Ratten-Zelllinien H4IIE (p53 profizient) und H5 (p53 funktionell inaktiv) und die beiden Maus-Zelllinien BK4 (p53 wildtyp) und E (p53 defizient). Die Zelllinien wurden für 2 h mit 25 µM MNNG behandelt, die nukleären sowie die cytoplasmatischen Extrakte isoliert und für eine Western-Blot-Analyse verwendet. Bei der Untersuchung der nukleären Proteine zeigte sich bei jeder untersuchten Zelllinie eine Steigerung der MSH2-Proteinmenge nach Mutagenbehandlung (Abb.3.7). Parallel dazu war bei den cytoplasmatischen Proteinen eine Verringerung der MSH2-Proteinmenge zu beobachten. Die Ergebnisse zeigen, daß die Translokation von MSH2 aus dem Cytoplasma in den Kern unabhängig von dem p53-Status erfolgt. Zusätzlich zeigen sie, daß es sich bei der durch MNNG induzierten Translokation um einen konservierten Mechanismus handelt, der nicht nur in humanen Zellen, sondern auch in Zellen aus anderen Säugern, wie Maus und Ratte, zu beobachten ist.

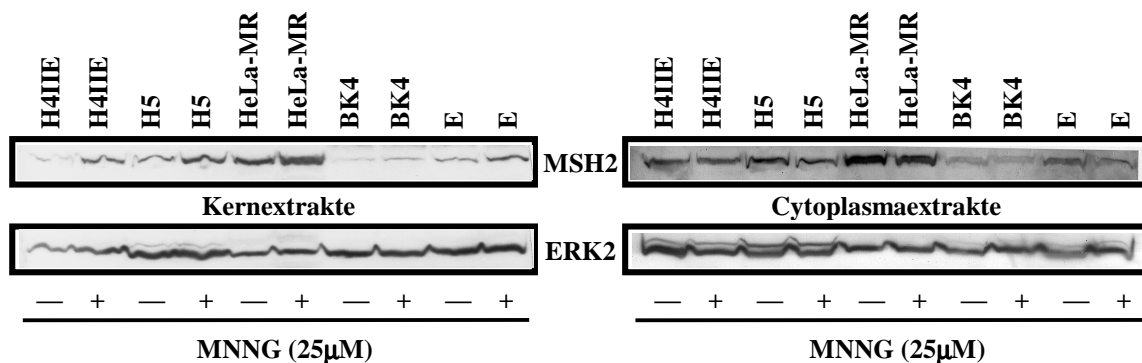


Abb.3.7 Untersuchung der MNNG-induzierten Translokation von MSH2 in verschiedenen Säugerzelllinien
 Humane HeLa-MR-Zellen (p53 defizient), Ratten H5 (p53 funktionell inaktiv) und H4IIE-Zellen (p53 profizient), sowie Maus E (p53 defizient) und BK4 (p53 profizient)-Zellen wurden für 2 h mit 25 µM MNNG inkubiert. Nukleären Extrakte wurden isoliert und jeweils 25 µg zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörper gegen MSH2 inkubiert. Die Inkubation mit ERK2 diente als Beladungskontrolle.

3.1.6 Behandlung von HeLa-MR-Zellen, nicht aber von MSH6-negativen DLD1-Zellen, mit MNNG führt zur Translokation von MSH2, MSH6 und PMS2

Wie in den bisherigen Versuchen gezeigt wurde, erfolgt nach der Behandlung mit MNNG sowohl eine Translokation von MSH2 als auch die Zunahme der GT-Bindungsaktivität. Da die letztgenannte auf der Bindung des MutS α Komplexes beruht, welcher neben MSH2 auch aus MSH6 besteht, ist anzunehmen, daß es auch zu einer nukleären Translokation von MSH6 kommt. Um dies zu untersuchen, wurden HeLa-MR-Zellen für 2 h mit 25 μ M MNNG behandelt, Gesamtzellextrakte, nukleäre Extrakte und cytoplasmatische Extrakte isoliert und die Expression der MMR-Proteine mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abb.3.8.A). Neben der bereits beobachteten Translokation von MSH2 konnte hierbei auch die Translokation der Proteine MSH6 und PMS2 beobachtet werden. Bei allen drei Proteinen war 2 h nach der Behandlung eine Zunahme der Proteinmenge im Kern und die Abnahme im Cytoplasma zu beobachten, wogegen sich im Gesamtzellextrakt keine signifikante Änderung zeigte. Bei MLH1 konnte im Kernextrakt ebenfalls eine Zunahme der Proteinmenge festgestellt werden, in den cytoplasmatischen Extrakten war das Protein jedoch nicht nachweisbar. Dies deutet darauf hin, daß die Regulation von MLH1 nicht auf Translokation, sondern eventuell auf einer Stabilisierung des Proteins beruht. Der Versuch zeigt erneut die Relevanz der Translokation von MSH2; es kommt nicht nur zu einer Steigerung der Proteinmenge und der GT-Bindungsaktivität, sondern auch die Menge der an der weiteren Prozessierung der Fehlpaarung beteiligten Proteinen wird im Kern erhöht. Dies läßt vermuten, daß die Translokation von MSH2 Teil eines Mechanismus ist, der ultimativ zur Erhöhung der Basenfehlpaarungsreparatur-Funktion führt.

Es ist bekannt, daß die Translokation von Proteinen aus dem Cytoplasma in den Kern oft über sogenannte Kernlokalisationssequenzen (NLS) in der Aminosäuresequenz des Proteins vermittelt wird. Diese Kernlokalisationssequenzen können in unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen vorliegen, worüber sie aktiviert oder inaktiviert werden. Um zu untersuchen, ob solche Kernlokalisationssequenzen auch bei den MMR-Proteinen vorliegen, wurden deren Aminosäuresequenzen mittels des Computerprogramms PSORT II untersucht. Dieses Programm liefert anhand verschiedener Parameter, zu denen auch das Vorhandensein der Kernlokalisationssequenzen gehört, eine Prognose für die zelluläre Lokalisation der untersuchten Proteine. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

Tab. 3.1 Prognosen für die intrazelluläre Verteilung der humanen MMR-Proteine

Die Aminosäuresequenzen der MMR-Proteine wurden mit Hilfe des Programmes PSORT II des „Human Genome Center, Institute for Medical Science, University of Tokyo, Japan“ (<http://psort.nibb.ac.jp>) auf Hinweise für die intrazelluläre Verteilung der Proteine untersucht.

Lokalisation	MSH2	MSH6	MSH3	MLH1	PMS2
Kernlokalisations-Sequenz (NLS)	-	pat4: 4x pat7: 4x bipartite: 3x	pat4: 6x pat7: 2x bipartite: 3x	pat4: 1x pat7: 2x	pat7: 1x
Nukleär	26,1 %	39,1 %	43,5 %	73,9 %	82,6 %
Cytoplasmatisch	47,8 %	17,4 %	8,7 %	13,0 %	8,7 %
Mitochondrial	17,4 %	13,0 %	43,5 %	4,3 %	-
Golgi	-	13 %	-	4,3 %	4,3 %
Extrazellulär	-	4,3 %	4,3	-	-
Vesikel	-	4,3 %	-	-	-
Plasmamembran	4,3 %	4,3 %	-	-	-
Cytoskeletal	4,3 %	4,3 %	-	4 %	4,3 %

Die Analyse zeigte, daß MSH2 keine bekannten Kernlokalisationsequenzen aufweist, wogegen MLH1, MSH3 und MSH6 mehrere Kernlokalisationssequenzen besitzen. Auch die direkte Lokalisationsvorhersage, in die verschiedene Parameter miteinbezogen werden, prognostizieren für MLH1, MSH6, MSH3 und PMS2 eine nukleäre Lokalisation. Im Gegensatz dazu wird für MSH2 eine cytoplasmatische Lokalisation angenommen. Da MSH2 keine Kernlokalisationssequenzen besitzt, kann die Translokation von MSH2 in den Zellkern nicht über einen NLS-vermittelten Transport erfolgen. Da MSH2 aber auch für einen passiven Transport zu groß ist, stellt sich die Frage, wie gewährleistet wird, daß MSH2 in den Kern gelangt. Wie bekannt ist, bilden MSH2 und MSH6 zusammen den MutS α Komplex. Es ist jedoch nicht bekannt, wo die Komplexbildung erfolgt. Erfolgt sie bereits im Cytoplasma, so könnte MSH2 im Komplex mit MSH6 in den Zellkern gelangen. Für die Translokation könnten hierbei die Translokationsstellen von MSH6 verantwortlich sein. Um dies zu prüfen wurde die MSH6-defiziente Zelllinie DLD1 für 2 h mit 25 μ M MNNG behandelt und die intrazelluläre Verteilung der MMR-Proteine untersucht. In der Western-Blot-Analyse zeigte sich weder eine nukleäre Translokation von MSH2 oder PMS2 noch eine Stabilisierung von MLH1 (Abb.3.8.B). MSH2-Protein war im Kern nur in geringsten Mengen zu detektieren, was zeigt, daß MSH2 ohne MSH6 nur sehr ineffektiv in den Kern gelangt. Da MSH2 in Abwesenheit von MSH6 auch mit MSH3 Komplexe bilden kann, könnte die nukleäre MSH2 Menge in den DLD1-Zellen daher stammen, daß MSH2 in Form des MutS β Komplexes in den Zellkern gelangt. Die Tatsache, das es in diesem Fall nicht zu einer Translokation von MSH2 kommt, weist darauf hin, daß die Bindung an

die Fehlpaarung eine wichtige Rolle spielt, denn MutS β kann im Gegensatz zu MutS α nicht an diese Fehlpaarungen binden. Daß es in den DLD1-Zellen nicht zu einer GT-Fehlpaarungsbindung kommt, konnte in Abb.3.8.C gezeigt werden. Dieses Gelretardationsexperiment verifiziert auch, daß es sich bei DLD1 wirklich um eine MSH6-defiziente Zelllinie handelt.

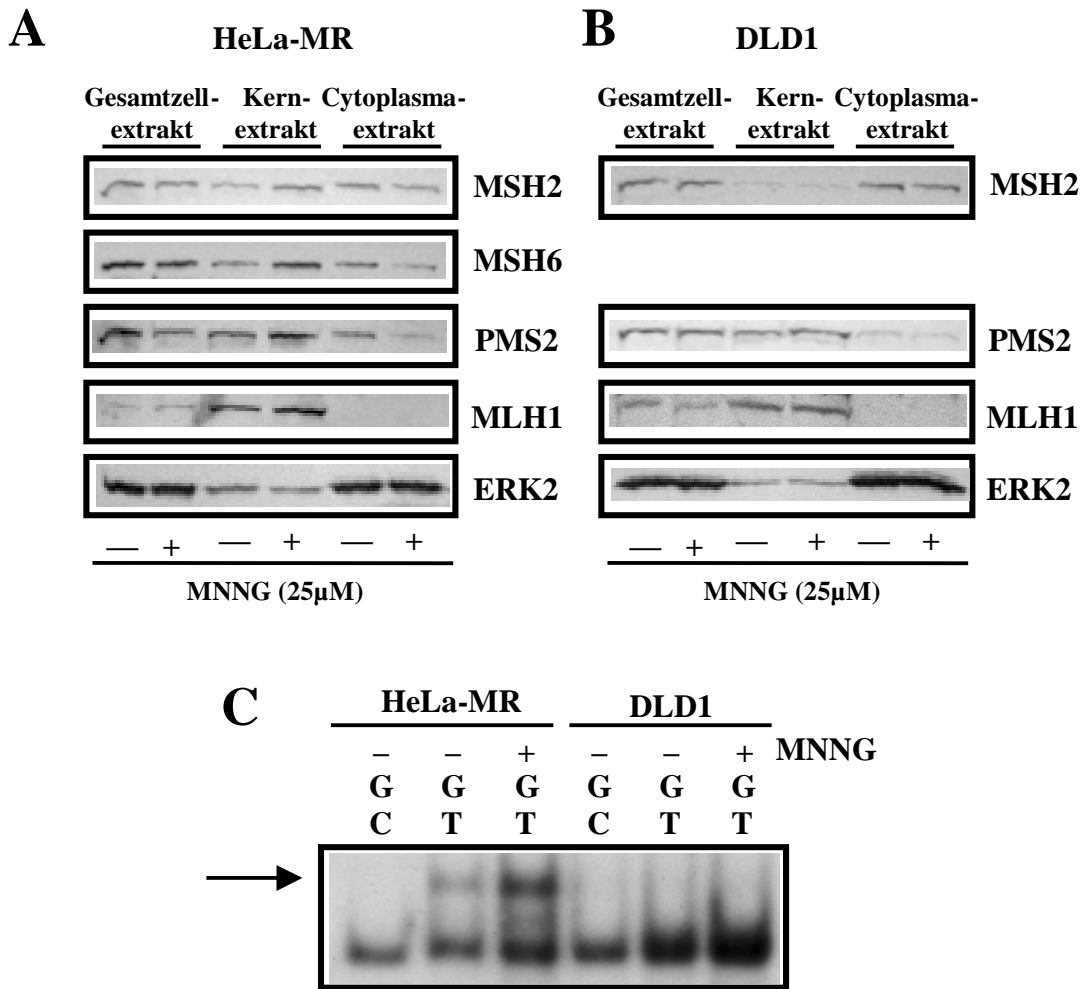


Abb.3.8 Einfluß der Behandlung von HeLa-MR und MSH6-defizienten DLD1-Zellen mit MNNG auf die Expression der MMR-Proteine

HeLa-MR-Zellen (A) und MSH6-defiziente DLD1-Zellen (B) wurden für 2 h mit 25 μ M MNNG behandelt. Es wurden Gesamtzell-extrakte, nukleäre und cytoplasmatische Extrakte isoliert und jeweils 25 μ g Protein zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörpern gegen MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 und ERK2 inkubiert. (C) HeLa-MR und DLD1-Zellen wurden für 2 h mit 25 μ M MNNG inkubiert. Nukleäre Extrakte wurden isoliert und jeweils 4 μ g mit spezifischen radioaktiv markierten GC- und GT-Oligonukleotiden für ein Gelretardationsexperiment eingesetzt. Der Pfeil zeigt die Lage des spezifischen Komplexes zwischen dem GT-oligo und MutS α .

Eine weitere Methode, die Translokation von MSH2 und MSH6 nachzuweisen, ist die Immunfluoreszenz. Bei dieser Methode ist es nicht nötig, die Zellextrakte in Cytoplasma und Zellkern zu trennen, wodurch ausgeschlossen wird, daß es sich bei der beobachteten Translokation um ein Artefakt handelt, welcher auf unsaubere Trennung der Fraktionen zurückzuführen ist. Zur Immunofluoreszenz-Analyse wurden HeLa-MR-Zellen für 2 h mit 25 μ M MNNG behandelt und anschließend mittels Formaldehyd fixiert. Nach der Inkubation mit anti-MSH2 oder anti-MSH6 Antikörpern, und der Inkubation mit einem Rhodamin-gekoppelten sekundären Antikörper konnten die MMR-Proteine im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (Abb.3.9). Die Ergebnisse zeigen, daß es insbesondere zu einer Verlagerung des MSH6-Proteins kommt. Während in der unbehandelten Kontrolle MSH6 über die ganze Zelle verteilt ist, kann man das Protein in den behandelten Zellen nur noch im Kern beobachten. Bei der Untersuchung der Verteilung von MSH2 konnten die selben Beobachtungen gemacht werden, nur war die Fluoreszenzintensität ein wenig geringer, was darauf zurückzuführen sein kann, daß der anti-MSH2 Antikörper für die Immunfluoreszenz scheinbar schlechter als der anti-MSH6 Antikörper geeignet ist.

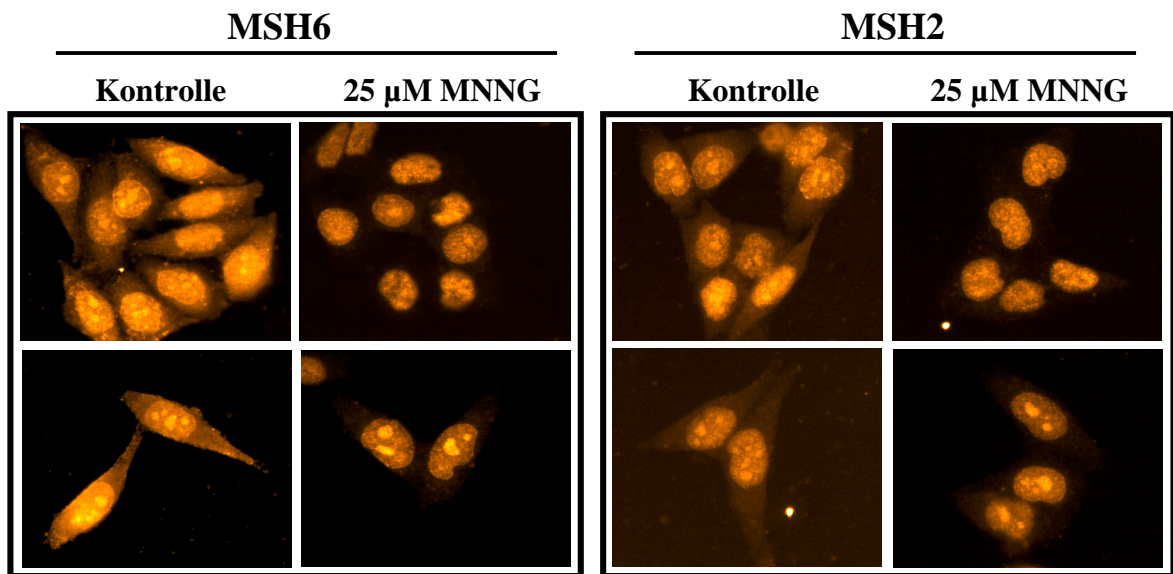


Abb.3.9 Untersuchungen zur Translokation von MSH2 und MSH6 mittels Immunfluoreszenz

HeLa-MR-Zellen wurden für 2 h mit 25 μ M MNNG behandelt und mittels Formaldehyd auf dem Objektträger fixiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit anti-MSH2 oder anti-MSH6 Antikörpern. Als Sekundärantikörper wurde ein Rhodamin-gekoppelter IgG Antikörper verwendet. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels des Fluoreszenzmikroskops BX 50 von Olympus, bei einer 400-fachen Vergrößerung.

3.1.7 Die Translokation von MSH2 und MSH6 erfolgt als MutS α -Komplex

Zusätzlich zu Western-Blot-Analysen und der Untersuchung mittels Immunfluoreszenz wurden auch Immunpräzipitationen durchgeführt, um die nukleäre Translokation von MSH2 und MSH6 nachzuweisen. Hierbei wurden HeLa-MR-Zellen für 2 h mit 25 μ M MNNG behandelt und aus den nukleären und den cytoplasmatischen Extrakten die Proteine MSH2 und MSH6 mittels monoklonaler Antikörper immunpräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend für eine Western-Blot-Analyse eingesetzt und mittels der spezifischen Antikörper detektiert. Sowohl MSH2 als auch MSH6 konnten in Kernextrakten aus unbehandelten Zellen nur in äußerst geringen Mengen immunpräzipitiert werden, wogegen in Kernextrakten aus MNNG-behandelten Zellen die immunpräzipitierte Proteinmenge deutlich erhöht war (Abb.3.10.A). Auch die Immunpräzipitation vom MSH2 und MSH6 aus cytoplasmatischen Extrakten zeigte die erwarteten Unterschiede. Die Menge der immunpräzipitierten Proteine war in den cytoplasmatischen Extrakten aus den MNNG-behandelten Zellen deutlich geringer als in Extrakten aus unbehandelten Zellen.

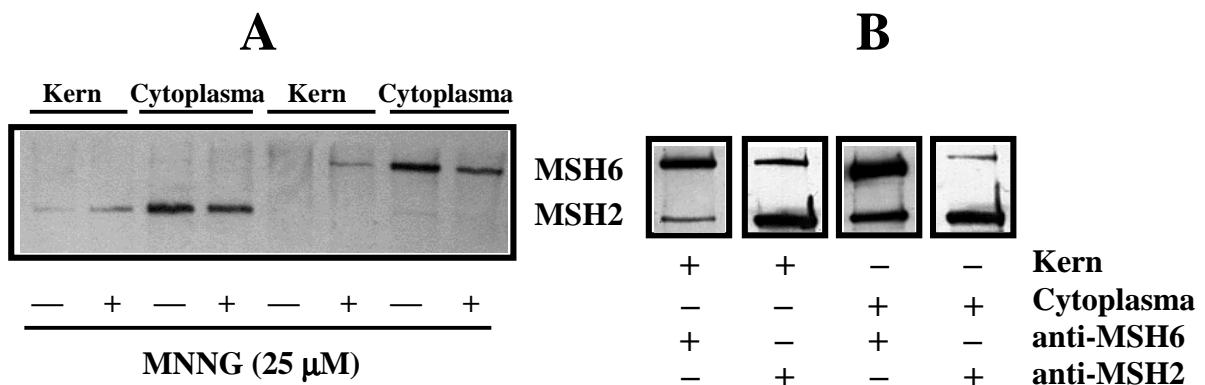


Abb.3.10 Untersuchungen zur Bildung des MutS α -Komplexes

(A) Aus unbehandelten und aus 2 h mit 25 μ M MNNG behandelten HeLa-MR-Zellen wurden nukleäre und cytoplasmatische Extrakte isoliert. Mittels spezifischer Antikörper wurden die MSH2 und MSH6 Proteine immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden komplett zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörpern gegen MSH2 und MSH6 inkubiert. (B) HeLa-MR-Zellen wurden für 2 h mit 25 μ M MNNG behandelt. Nukleäre und cytoplasmatische Extrakte wurden isoliert und mittels spezifischer Antikörpern wurden die MSH2 und MSH6 Proteine immunpräzipitiert. Die Proteine wurden komplett zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörper gegen MSH2 und MSH6 inkubiert. Nach Inkubation mit einem anti-Maus Sekundärantikörper wurde eine ECL-Reaktion durchgeführt um die Proteine zu detektieren.

Um unsere Hypothese zu unterstützen, daß die Translokation von MSH2 und MSH6 in Form des MutS α -Komplexes erfolgt, wurden weitere Immunpräzipitationsversuche durchgeführt.

Hierbei konnte durch Optimierung der Methode und den Einsatz größerer Zellmengen eine Coimmunpräzipitation von MSH2 und MSH6 nachgewiesen werden. In diesen Versuchen wurden die Zellen mit MNNG vorbehandelt, um auch in Kernextrakten eine nachweisbare Proteinmenge vorliegen zu haben. Eine Coimmunpräzipitation von MSH2 und MSH6 konnte sowohl in nukleären Extrakten wie auch in cytoplasmatischen Extrakten nachgewiesen werden (Abb.3.10.B). Dieses Ergebnis wie auch die Untersuchungen mit MSH6-defizienten Zellen verdeutlichen, i) daß die Bildung des MutS α -Komplexes bereits im Cytoplasma erfolgt und ii) daß die Translokation von MSH2 und MSH6 in Form dieses Komplexes geschieht.

3.1.8 Charakterisierung unterschiedlicher HeLa-Zelllinien

Für weitere Untersuchungen, die sich mit der Rolle von O⁶-MeG als Auslöser der beobachteten nukleären Translokation von MSH2 und MSH6 befaßten, war es notwendig, die einzelnen Zelllinien genauer zu charakterisieren. Als Modellsystem dienten verschiedene HeLa-Zelllinien, die sich im MGMT-Status voneinander unterscheiden. Bei den HeLa-MR-Zellen handelt es sich um Mex⁻ Zellen, die keine MGMT-Aktivität aufweisen. Bei den HeLa-MR-adaC3-Zellen handelt es sich um HeLa-MR-Zellen, die mit dem bakteriellen MGMT-Gen (*ada*-Gen) transfiziert worden sind, wodurch sie phänotypisch Mex⁺ wurden. HeLa-S3-Zellen sind Mex⁺ Zellen und exprimieren die humane MGMT. Ein weiteres Zellpaar wurde neu etabliert; es handelt sich hierbei um HeLa-MR-Zellen, die mit der humanen MGMT-cDNA stabil transfiziert wurden. Zur Transfektion diente der pSV2-MGMT-Vektor (Kaina *et al.*, 1991), der mit pSV2neo cotransfiziert wurde. Ein MGMT-exprimierender Klon wurde isoliert und als HeLa-MR-hMGMT bezeichnet. Die neo-exprimierende Kontrolle wurde als HeLa-MR-neo bezeichnet. Die MGMT-Aktivitäten aller Zelllinien wurden gemessen und in Tab.3.2 zusammengefaßt.

Zusätzlich wurden die HeLa-S3-Zellen, die HeLa-MR-Zellen und die von HeLa-MR abgeleiteten Zellen HeLa-MR-adaC3, HeLa-MR-neo und HeLa-MR-hMGMT im Koloniebildungsassay auf ihre Resistenz gegenüber MNNG untersucht. Die Ergebnisse, welche in Abb.3.11 dargestellt sind, zeigen, daß die MGMT bzw. Ada-exprimierenden Zellen wesentlich resistenter gegenüber MNNG sind als die Mex⁻ Kontrollen. Es gibt somit eine deutliche Korrelation zwischen dem MGMT-Status und der Resistenz gegenüber MNNG.

Tab. 3.2 MGMT-Status der verschiedenen HeLa-Zelllinien

Von der MGMT-defizienten Zelllinie HeLa-MR, der MGMT profizienten Zelllinie HeLa-S3, der Ada-transfizierten Zelllinien HeLa-MR-adaC3, der MGMT-transfizierten Zelllinie HeLa-MR-hMGMT und der neo-transfizierten Zelllinie HeLa-MR-neo wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Messung der MGMT-Aktivität eingesetzt.

Zelllinie	MGMT-Aktivität (fmol/mg)
HeLa-MR	2,8
HeLa-MR-adaC3	669
HeLa-S3	453
HeLa-MR-neo	4,3
HeLa-MR-hMGMT	1712

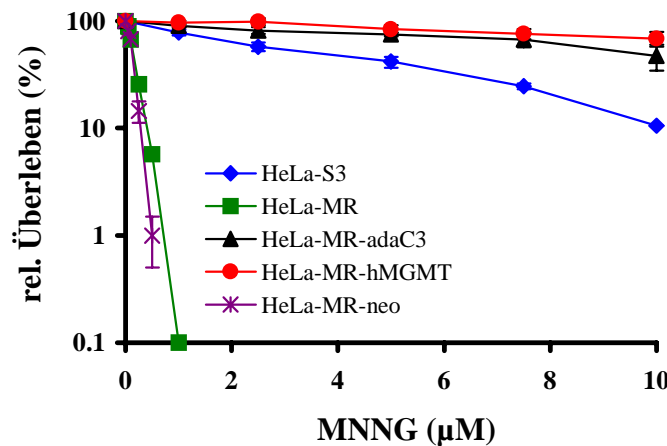


Abb. 3.11 Resistenz der unterschiedlichen HeLa-Zelllinien gegenüber MNNG

Koloniebildungstest der verschiedenen HeLa-Zelllinien nach Behandlung mit MNNG. Pro Schale wurden 400 Zellen ausgesät. Nach 12 h erfolgte für 1 h die Behandlung mit MNNG. Nach 10 Tagen wurden die Kolonien fixiert, gefärbt und ausgezählt. Die Werte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen dar.

3.1.9 Die MSH2-Translokation ist vom MGMT-Status abhängig

Die Untersuchungen, bei denen unterschiedliche Alkylantien verwendet wurden, deuteten darauf hin, daß O⁶-MeG bei der nukleären Translokation von MSH2 und MSH6 eine entscheidende Rolle spielt. Nur die O⁶-MeG-generierenden Agenzien MNNG und MNU, nicht aber MMS, führten zu einer Steigerung der nukleären MSH2-Proteinmenge (s. Kapitel 3.1.1). Zur weiteren Untersuchung der Rolle von O⁶-MeG bei der Translokation von MutSα wurden MGMT-profiziente HeLa-S3-Zellen verwendet. Durch Vorbehandlung mit O⁶-Benzylguanin (O⁶-BG) kann das MGMT-Protein funktionell inaktiviert werden

(Pegg *et al.*, 1993). Durch Anwendung von O⁶-BG konnte somit in einer Zelllinie sowohl der Mex⁻ als auch der Mex⁺ Phänotyp erzeugt werden, wodurch bei den weiteren Untersuchungen eventuelle zelltypspezifische Unterschiede ausgeschlossen werden konnten. Wenn O⁶-MeG das primäre Signal für die Translokation von MSH2 und MSH6 liefert, so sollte es in Zellen, die diese Läsion nicht reparieren können, zu einer verstärkten nukleären Translokation von MSH2 kommen. Dies war in der Tat der Fall, wie man in Abb.3.12.A sehen kann. In nicht mit O⁶-BG vorbehandelten HeLa-S3-Zellen kommt es erst nach einer Behandlung mit 25 µM MNNG zur Zunahme der MSH2-Proteinmenge. Die Vorbehandlung mit O⁶-BG führte zu einer empfindlicheren zellulären Reaktion, wobei es schon nach einer Behandlung mit 0,5 µM MNNG zur MSH2-Zunahme im Kern kommt. Die Quantifizierung in Abb.3.12.B zeigt, daß die MSH2-Zunahme in MGMT-defizienten HeLa-MR-Zellen und O⁶-BG-vorbehandelten HeLa-S3-Zellen annähernd den gleichen Verlauf hat, während unvorbehandelte HeLa-S3-Zellen erst bei höheren Dosen reagierten.

Zur weiteren Unterstützung dieser Ergebnisse wurden HeLa-MR-Zellen stabil mit der humanen MGMT-cDNA transfiziert. Die MGMT-transfizierten HeLa-MR-hMGMT und die neo-transfizierte HeLa-MR-neo-Zelllinien wurden für 2 h mit unterschiedlichen Dosen MNNG behandelt, nukleäre Extrakte wurden isoliert und die Expression von MSH2 untersucht. Es zeigte sich hierbei, daß es durch die Transfektion von MGMT zu einer Verhinderung der MNNG-induzierten MSH2-Translokation in den Zellkern kommt (Abb.3.12.C). Während in den Kontrollzellen schon eine Behandlung mit 5 µM MNNG eine Zunahme der nukleären MSH2-Proteinmenge bewirkte, war dies in den MGMT-transfizierten Zellen selbst bei einer Dosis von 25 µM MNNG nicht nachweisbar.

Ob eine Vorbehandlung der Zellen mit O⁶-BG auch zu einer Verstärkung der GT-Bindungsaktivität führt, wurde in dem nächsten Experiment untersucht. Hierzu wurden verschiedene HeLa-Zelllinien in Gegenwart oder in Abwesenheit von 20 µM O⁶-BG für 2 h mit 10 µM MNNG inkubiert und in ein Gelretardationsexperiment eingesetzt (Abb.3.13). In HeLa-MR-Zellen hatte die Behandlung mit O⁶-BG keinen Einfluß auf die MGMT-Aktivität (Tab.3.3) und auch die durch MNNG induzierte Zunahme der GT-Bindungsaktivität blieb in den vorbehandelten und nicht vorbehandelten Zellen gleich stark. In den HeLa-S3-Zellen führte die Behandlung mit O⁶-BG zu einer Inhibition der MGMT-Aktivität. Nur in den O⁶-BG-vorbehandelten Zellen konnte die durch MNNG

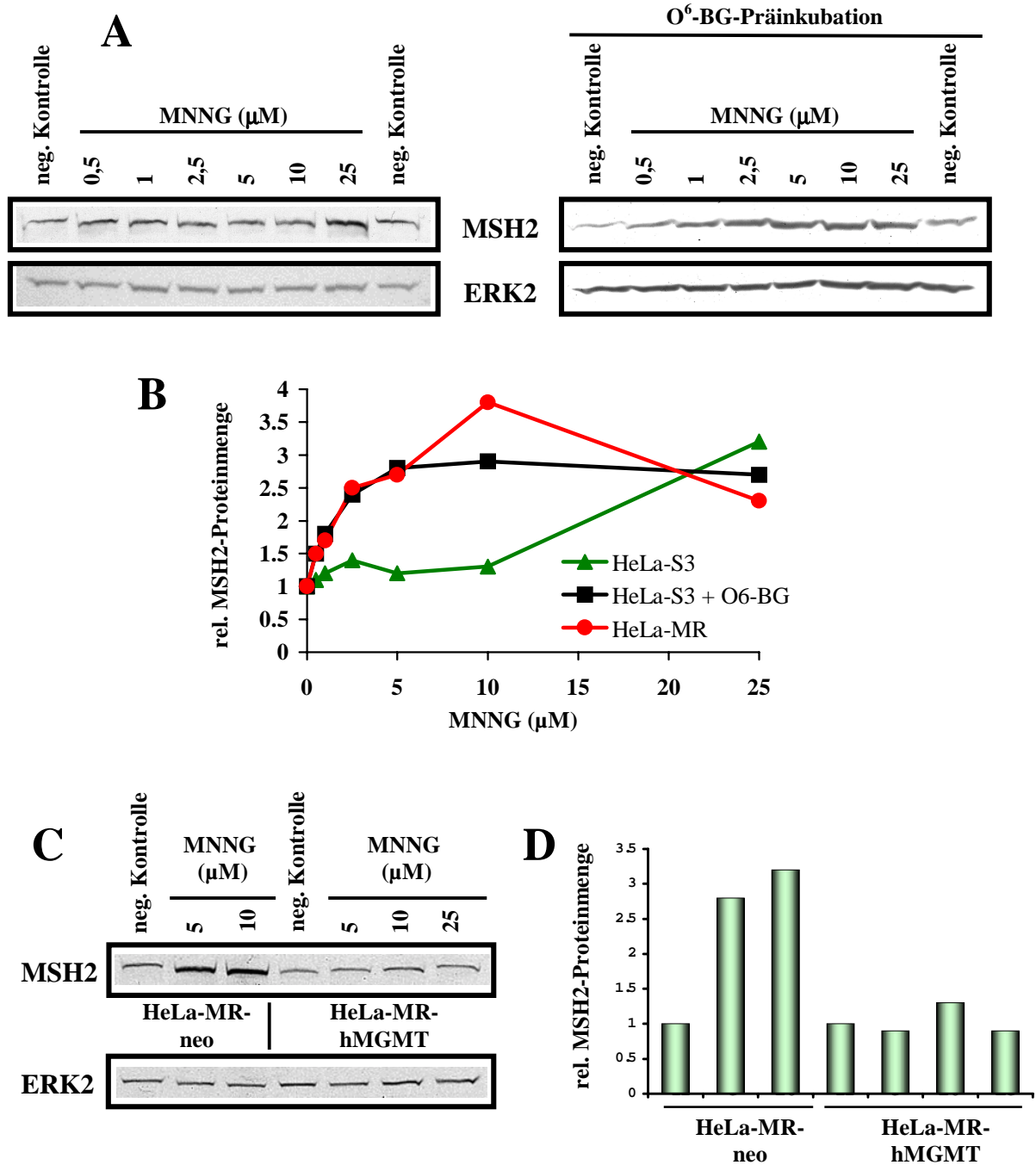


Abb.3.12 Einfluß des MGMT-Status auf die nukleäre Translokation von MSH2

(A) MGMT-profiziente HeLa-S3-Zellen wurden in Gegenwart oder in Abwesenheit von 20 μM O⁶-Benzylguanin für 2 h mit verschiedenen Dosen MNNG inkubiert. Von den behandelten Zellen wurden nukleäre Extrakte isoliert und jeweils 25 μg zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörper gegen MSH2 inkubiert. Die Inkubation mit anti-ERK2 diente als Beladungskontrolle. (B) Quantifizierung der MSH2-Signale aus (A) und nicht gezeigter Daten. (C) HeLa-MR-Zellen wurden stabil mit pSV2MGMT oder dem pSV2neo-Plasmid als Kontrolle transfiziert. HeLa-MR-hMGMT und HeLaMR-neo Zellen wurden mit verschiedenen Dosen MNNG für 2 h inkubiert. Von den behandelten Zellen wurden nukleäre Extrakte isoliert und jeweils 25 μg zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Der Filter wurde mit Antikörper gegen MSH2 inkubiert. Die Inkubation mit anti-ERK2 diente als Beladungskontrolle. (D) Quantifizierung der MSH2-Signale aus (C).

induzierte Zunahme der GT-Bindungsaktivität beobachtet werden. In den HeLa-MR-adaC3 Zellen hatte O⁶-BG keine Auswirkung auf die MGMT-Aktivität, da es nicht in der Lage ist, das bakterielle Enzym zu inhibieren. Es kam daher in diesen Zellen, wie zu erwarten war, weder in den O⁶-BG-vorbehandelten noch in den nicht vorbehandelten Zellen zu einer Zunahme der GT-Bindungsaktivität nach MNNG-Behandlung. Die Versuche mit O⁶-BG und die Transfektionsexperimente mit dem MGMT-Gen zeigen eindrucksvoll, daß O⁶-MeG das primäre Signal für die nukleäre Translokation von MSH2 darstellt.

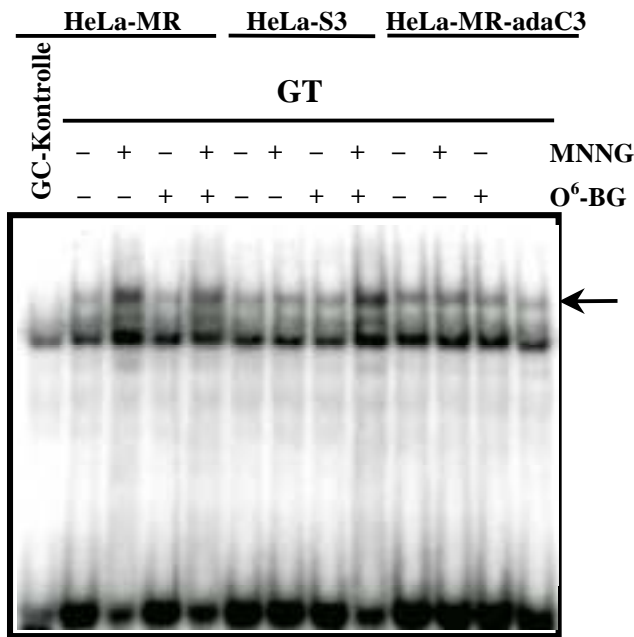


Abb.3.13 Einfluß des MGMT-Status auf die Bindung von MutS α an GT-Fehlpaarungs-Oligonukleotide in MGMT-profizienten und defizienten HeLa-Zellen nach MNNG-Behandlung

HeLa-MR, HeLa-S3 und HeLa-MR-adaC3-Zellen wurden in Gegenwart oder in Abwesenheit von 20 μ M O⁶-Benzylguanin für 2 h mit 10 μ M MNNG inkubiert. 4 μ g nukleärer Extrakte wurden mit spezifischen radioaktiv markierten GC- und GT-Oligonukleotide inkubiert. Der Pfeil zeigt die Lage des spezifischen Komplexes zwischen dem GT-oligo und MutS α .

Tab.3.3 Einfluß von O⁶-Benzylguanin auf die MGMT-Aktivität unterschiedlicher HeLa-Zelllinien

HeLa-MR, HeLa-S3 und HeLa-MR-adaC3-Zellen wurden mit 20 μ M O⁶-Benzylguanin für 2 h inkubiert. Gesamtzellextrakte wurden isoliert und zur Messung der MGMT-Aktivität eingesetzt.

Zelllinie	O ⁶ -Benzylguanin	MGMT-Aktivität (fmol/mg)
HeLa-MR	—	30
HeLa-MR	+	23,7
HeLa-S3	—	429
HeLa-S3	+	14,7
HeLa-MR-adaC3	—	757
HeLa-MR-adaC3	+	738

3.1.10 MNNG-Behandlung von HeLa-MR-Zellen führt zu einer Steigerung der O⁶GC und O⁶GT Bindungsaktivität

Nach einer Behandlung von Zellen mit MNNG kommt es zur Bildung von O⁶-MeG, welches in der DNA mit Cytosin gepaart vorliegt. Im nächsten Replikationszyklus erfolgt die Ausbildung einer Fehlpaarung zwischen O⁶-MeG und Thymin. Wenn O⁶-MeG wirklich der Auslöser für die Translokation von MSH2 ist, so kann es dies nur in der Form einer der beiden Paarungen O⁶GC oder O⁶GT sein. Um zu überprüfen, ob der MutS α -Komplex sowohl an O⁶GC als auch an O⁶GT bindet, und ob diese Bindung nach Mutagenbehandlung verstärkt wird, wurden HeLa-MR-Zellen für 2 h mit 25 μ M MNNG behandelt. Die nukleären Extrakte wurden zusammen mit radioaktiv markierten O⁶GC und O⁶GT-Oligonukleotiden für Gelretardationsexperimente eingesetzt (Abb.3.14). Die Ergebnisse zeigen, daß die Behandlung von Zellen mit MNNG zu einer deutlichen Steigerung der GT-Bindungsaktivität führt. Parallel dazu konnte auch die Bindung des Proteinkomplexes an O⁶GC und O⁶GT-Fehlpaarungen nachgewiesen werden, wobei es auch hier durch die Behandlung mit MNNG zu einer Steigerung der Bindungsaktivität an beide O⁶-MeG-Paarungen kommt, wenngleich auch die Bindungsaktivität wesentlich niedriger als bei der GT-Fehlpaarung ist (Abb.3.14). Dies und die Tatsache, daß die Behandlung mit MNNG zu einer Zunahme dieser Bindung führt, unterstützt unsere Annahme, daß die O⁶-MeG-Läsionen, sowohl mit Cytosin als auch mit Thymin gepaart, das primäre Signal für die nukleäre Translokation des MutS α -Komplexes darstellt.

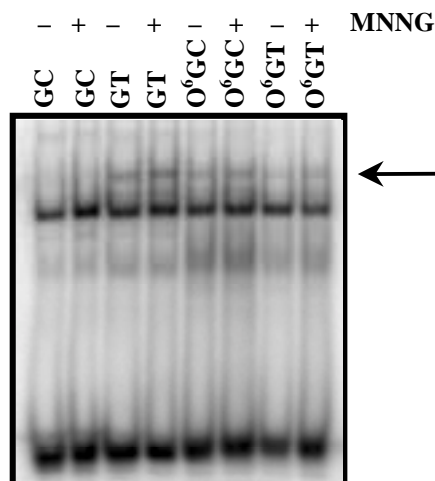


Abb.3.14 Einfluß der Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit MNNG auf die Bindung spezifischer O⁶GC- und O⁶GT-Fehlpaarungs-Oligonukleotide

HeLa-MR-Zellen wurden für 2 h mit 25 μ M MNNG inkubiert. 3 μ g nukleärer Extrakte wurden mit spezifischen radioaktiv markierten GC- oder GT-Oligonukleotiden und 6 μ g mit spezifischen radioaktiv markierten O⁶GC- oder O⁶GT-Oligonukleotiden inkubiert und in einem Gelretardationsexperiment eingesetzt. Der Pfeil zeigt die Lage des spezifischen Komplexes bestehend aus MutS α und dem Oligonukleotid.

3.2 Post-translationale Modifikation des MutS α -Komplexes

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Behandlung von Zellen mit O⁶MeG-generierenden Agenzien zu einer Translokation von MutS α in den Zellkern führt. Die Mechanismen, über welche die nukleäre Translokation gesteuert wird, sind damit jedoch noch nicht aufgeklärt worden. Es wäre möglich, daß es durch die Behandlung mit O⁶MeG-generierenden Agenzien zu einer post-translationalen Modifikation der MMR-Proteine kommt, die ihrerseits die Translokation ermöglicht. Zu möglichen post-translationalen Modifikationen gehören Ribosylierungen, Glykosylierungen oder Phosphorylierungen. Es ist bekannt, daß viele Proteine über ihren Phosphorylierungsstatus reguliert werden. So kann unterschiedliche Phosphorylierung die Aktivität eines Proteins, die Spezifität, die DNA-Bindungsaktivität, oder eben auch die Translokation in zelluläre Kompartimente regulieren. Um zu überprüfen, ob unterschiedliche Phosphorylierung eine Rolle bei der Regulation der MMR spielt, wurde untersucht, ob auch die an der MMR beteiligten Proteine MSH2 und MSH6 einer Phosphorylierung unterliegen. Diese Untersuchungen wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt.

3.2.1 MSH2 und MSH6 enthalten mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen

Um Hinweise für eine Beteiligung von Phosphorylierungen der MMR-Proteine bei der Regulation der MMR zu finden, wurde *in vitro* die Phosphorylierung durch unterschiedliche Proteinkinasen überprüft. Um Anhaltspunkte zu erhalten, welche Proteinkinasen bei einer Phosphorylierung der MMR-Proteine eine Rolle spielen könnten, wurde die Aminosäuresequenz der MMR-Proteine MSH2 und MSH6 auf das Vorhandensein potentieller Phosphorylierungsstellen untersucht. Die Computeranalysen wurden mit Hilfe des Programms MOTIF des „Institute for Chemical Research, University of Kyoto, Japan“ (<http://motif.genome.ad.jp>) durchgeführt und zeigten, daß sowohl MSH2 als auch MSH6 potentielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC) und die Casein Kinase II (CK2) besitzen. Für eine dritte Kinase, die Proteinkinase A (PKA), die in späteren Untersuchungen verwendet wurde, konnten hingegen keine Phosphorylierungsstellen gefunden werden (siehe Tab.3.4). Zusätzlich zu den potentiellen Phosphorylierungsstellen für PKC und CKII enthalten beide Proteine potentielle Phosphorylierungsstellen für die Tyrosinkinase und potentielle Glykosylierungsstellen.

Tab. 3.4 Darstellung der Aminosäure-Positionen potentieller post-translationaler Modifikationen der Proteine MSH2 und MSH6

Die Aminosäuresequenzen der MMR-Proteine MSH2 und MSH6 wurden mit Hilfe des Programmes MOTIF des „Institute for Chemical Research, University of Kyoto, Japan“ (<http://motif.genome.ad.jp>) auf Konsensussequenzen für eine post-translationalen Modifikation untersucht. In der Tabelle sind die potentiellen Positionen einer post-translationalen Modifikation, sowie die entsprechenden Proteinkinasen mit ihren Konsensussequenzen dargestellt.

hMSH2		
Motif	Position	Konsensussequenz
CK2-Phosphorylierungsstelle	13-16, 129-132, 253-156, 158-188, 206-209, 233-236, 292-295, 316-319, 375-378, 456-459, 526-529, 540-543, 558-561, 568-571, 594-597, 703-706, 755-758, 806-809	[ST]-x(2)-[DE]
PKC-Phosphorylierungsstelle	33-35, 225-227, 233-235, 526-528, 905-907	[ST]-x-[RK]
Thyrosinkinase Phosphorylierungsstelle	110-118	[RK]-x(2)-[DE]-x(3)-Y [RK]-x(3)-[DE]-x(2)-Y
Glycosylierungsstelle	127-130, 477-480, 538-541, 566-569, 583-586, 903-906, 919-922	N-(P)-[ST]-(P)
ATP/GTP Bindungsstelle Motiv A	669-667	[AG]-x(4)-G-K-[ST]

hMSH6		
Motif	Position	Konsensussequenz
CK2-Phosphorylierungsstelle	86-89, 91-94, 200-203, 219-222, 227-230, 252-255, 254-257, 261-264, 269-272, 274-277, 285-288, 315-318, 503-506, 525-528, 541-544, 616-619, 636-639, 664-667, 672-675, 757-760, 860-863, 914-917, 935-938, 950-953, 1028-1031, 1049-1052, 1168-1171, 1251-1254, 1343-1346	[ST]-x(2)-[DE]
PKC-Phosphorylierungsstelle	24-26, 126-128, 144-146, 167-169, 216-218, 238-240, 241-243, 309-311, 314-315, 315-317, 336-338, 359-361, 541-543, 633-635, 719-721, 851-853, 928-930, 986-988, 998-1000, 999-1001, 1028-1030, 1180-1182, 1238-1240, 1329-1331, 1340-1342	[ST]-x-[RK]
Thyrosinkinase Phosphorylierungsstelle	635-642, 939-937	[RK]-x(2)-[DE]-x(3)-Y [RK]-x(3)-[DE]-x(2)-Y
Glycosylierungsstelle	307-310, 534-537, 600-603, 748-751, 752-754, 984-987, 1065-1068, 1327-1330	N-(P)-[ST]-(P)
ATP/GTP Bindungsstelle Motiv A	1134-1141	[AG]-x(4)-G-K-[ST]

3.2.2 MSH2 und MSH6 werden *in vitro* durch PKC und CK2 phosphoryliert

Um zu prüfen, ob MMR-Proteine phosphoryliert werden können, wurde *in vitro* die Phosphorylierung von MSH2 und MSH6 nach Inkubation mit unterschiedlichen Proteinkinasen untersucht. Bei den Proteinkinasen handelt es sich um zwei Kinasen, für die gezeigt wurde, daß für sie sowohl MSH2 als auch MSH6 potentielle Phosphorylierungsstellen besitzen (Tab.3.4); es sind dies die Caseinkinase II (CKII) und die Proteinkinase C (PKC). Zusätzlich wurden MSH2 und MSH6 auf eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) untersucht, was als negative Kontrolle diente, da weder MSH2 noch MSH6 Phosphorylierungsstellen für diese Kinase besitzen.

Die Untersuchungen wurden mit gereinigtem, rekombinanten Mut α Protein durchgeführt, das wir von Prof. Jiricny aus Zürich bekommen haben. Die Ergebnisse zeigten, daß MSH6 *in vitro* sowohl durch die PKC als auch durch die CKII stark phosphoryliert wurde (Abb.3.15). MSH2 wurde ebenfalls durch PKC und CKII phosphoryliert, jedoch viel schwächer als MSH6. Bei keinem der beiden Proteine konnte eine Phosphorylierung durch die PKA festgestellt werden. Die Wirksamkeit der PKA wurde in Kontrollexperimenten mittels Phosphorylierung von Histon H1 überprüft.

Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl MSH6 als auch MSH2 post-translational modifiziert wird. Besonders bei MSH6 konnte eine starke Modifikation durch PKC und CKII nachgewiesen werden, die bei MSH2 nur schwach ausgeprägt war. Dieser Unterschied ist besonders interessant, da nur MSH6, nicht aber MSH2 Kerntranslokationssequenzen enthält, die eventuell durch die Phosphorylierung beeinflußt werden.

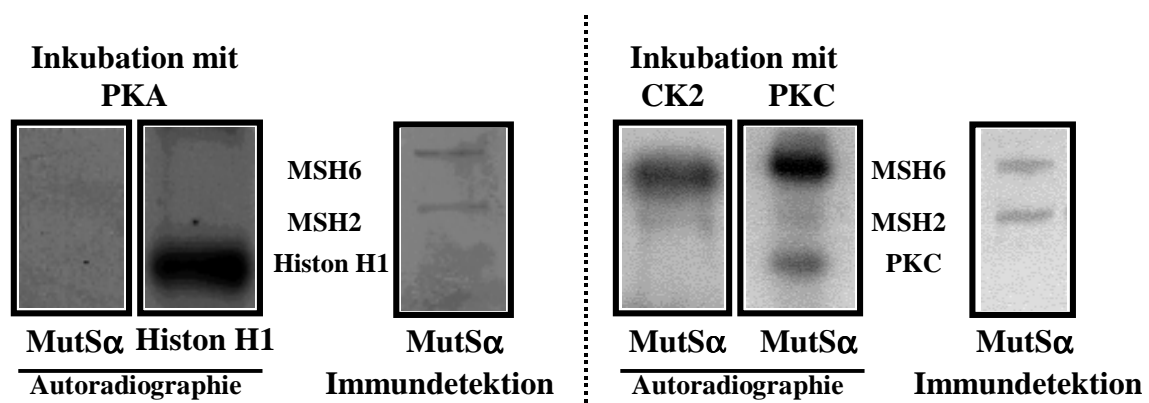


Abb.3.15 *In vitro* Analysen zur Phosphorylierung von MSH2 und MSH6

Humanes Mut α wurde zusammen mit ^{32}P - γ -ATP und spezifischen Proteinkinasen (PKC, CKII und PKA) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationsansätze wurden komplett zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden über Autoradiographie detektiert. Zusätzlich wurde der Filter mit Antikörpern gegen MSH2 und MSH6 inkubiert, um die radioaktiven Signale zweifelsfrei MSH2 oder MSH6 zuordnen zu können. Als positive Kontrolle für die PKA-Behandlung wurde Histon H1 mit PKA inkubiert.

3.2.3 MSH2 und MSH6 werden *in vivo* phosphoryliert

Die Phosphorylierung eines Proteins *in vitro* bedeutet nicht unbedingt, daß es auch zur Phosphorylierung des selben Proteins *in vivo* kommen muß. Um sicher zu gehen, daß die beobachtete Phosphorylierung auch für den Organismus Relevanz hat, wurden *in vivo* die Phosphorylierung der Proteine MSH2 und MSH6 untersucht. Dieser Versuch erfolgte an HeLa-MR-Zellen, die mit MNNG behandelt worden waren, wodurch auch der Einfluß der MNNG-Behandlung auf die Phosphorylierung untersucht werden konnte. Nach 36 h Kultivierung der Zellen in phosphatfreiem Medium erfolgte eine Inkubation mit radioaktiv markierter Phosphorsäure für 6 h. Zwei Stunden vor Ende dieser Inkubation erfolgte die Zugabe von 25 µM MNNG. Nach weiteren 2 h wurden die Zellen geerntet, Gesamtzellextrakte isoliert und komplett zur Immunpräzipitation von MSH2 und MSH6 eingesetzt. Die Immunpräzipitate wurden anschließend zur Western-Blot-Analyse verwendet. Phosphoryliertes Protein wurde auf dem Filter mittels Röntgenfilm detektiert (Abb.3.16.A). Zur Überprüfung der detektierten Bande wurde der Filter mit Antikörpern gegen MSH2 und MSH6 hybridisiert (Abb.3.16.B). Die Antikörperreaktion diente gleichzeitig als Beladungskontrolle, zu der die Intensität der Phosphorylierung in Relation gesetzt wurde. Es zeigte sich, daß sowohl MSH2 als auch MSH6 *in vivo* phosphoryliert werden, wobei übereinstimmend mit den Ergebnissen der *in vitro* Versuche MSH6 stärker als MSH2 phosphoryliert wird.

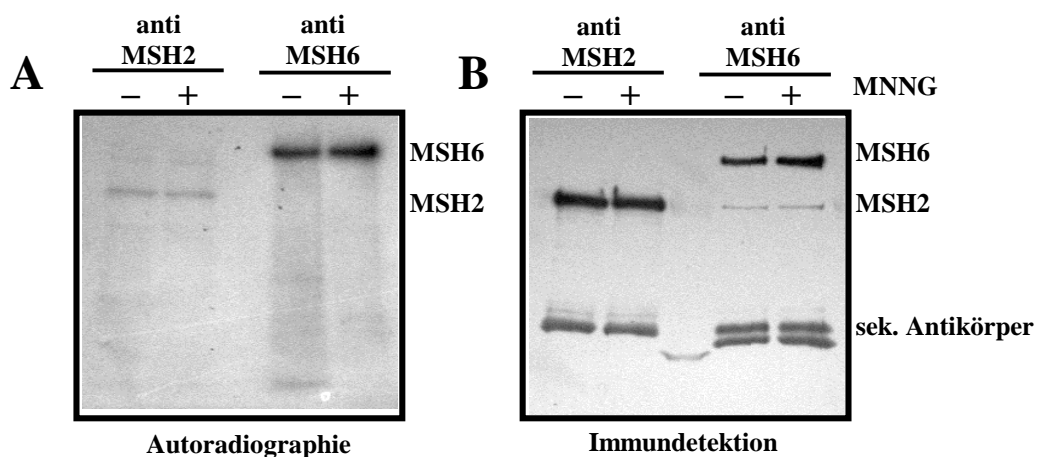


Abb.3.16.A-B In vivo Analysen zur Phosphorylierung von MSH2 und MSH6

HeLa-MR-Zellen wurden für 36 h in phosphatfreiem Medium kultiviert. Nach 6 h Inkubation mit radioaktiver Phosphorsäure und 2 h Inkubation mit 25 µM MNNG wurden Gesamtzellextrakte isoliert. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurden getrennt die Proteine MSH2 und MSH6 immunpräzipitiert und komplett zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden über Autoradiographie detektiert. Zusätzlich wurde der Filter mit Antikörpern gegen MSH2 und MSH6 inkubiert, um die radioaktiven Signale zweifelsfrei MSH2 oder MSH6 zuzuordnen und die Phosphorylierungsstärke mit der Proteinmenge in Relation setzen zu können. Die unteren Banden der Immundetektion repräsentieren den zur Immunpräzipitation verwendeten sekundären Antikörper.

Die Phosphorylierung wurde in dieser *in vivo* Analyse jedoch nicht durch eine Behandlung der Zellen mit MNNG beeinflusst. Zur Bestätigung der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Phosphorylierung von MutS α und zur Bestätigung der Unabhängigkeit der Phosphorylierung von einer MNNG-Behandlung wurde eine zusätzliche *in vivo* Analyse durchgeführt. In diesem Experiment wurden HeLa-MR-Zellen nach 36 h Kultivierung in phosphatfreiem Medium ebenfalls für 6 h mit radioaktiv markierter Phosphorsäure inkubiert. Zwei Stunden vor Ende der Inkubation erfolgte die Zugabe von 25 μ M MNNG. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, Gesamtzellextrakte isoliert und komplett zur Immunpräzipitation von MSH2 eingesetzt. Die Immunpräzipitate wurden anschließend zur Western-Blot-Analyse verwendet. Phosphoryliertes Protein wurde auf dem Filter mittels Röntgenfilm detektiert und zur Überprüfung der detektierten Banden wurde der Filter mit Antikörpern gegen MSH2 und MSH6 hybridisiert.

Es zeigte sich auch in dieser *in vivo* Analyse, daß MSH2 und auch das coimmunpräzipitierte MSH6 *in vivo* phosphoryliert werden (Abb.3.16.C). Im Gegensatz zu dem vorherigen Experiment wurde die Stärke der Phosphorylierung jedoch durch die Behandlung mit MNNG verstärkt. Es konnte folglich nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob die beobachtete Phosphorylierung von MutS α eine direkte Ursache der nukleären Translokation ist. Möglicherweise ist die beobachtete konstitutive Phosphorylierung von MutS α so stark, daß eine O⁶-MeG-induzierte zusätzliche Phosphorylierung nicht immer detektierbar ist.

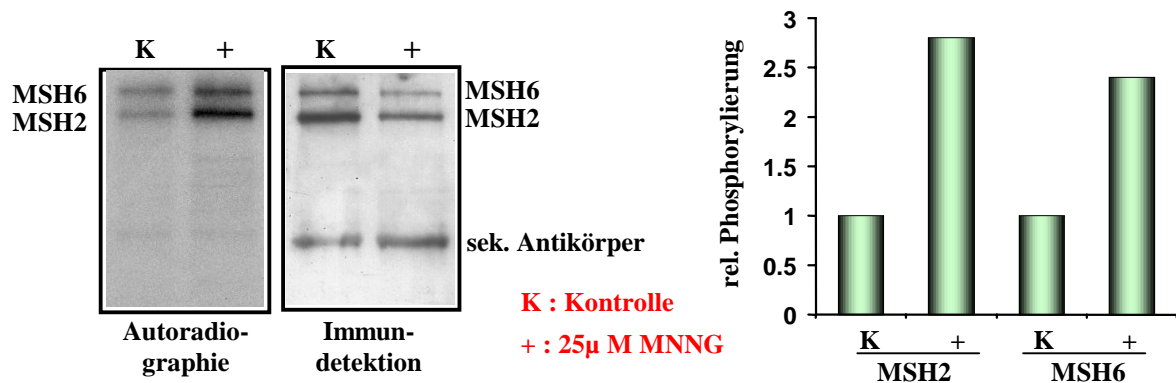


Abb.3.16.C In vivo Analysen zur Phosphorylierung von MSH2 und MSH6

HeLa-MR-Zellen wurden für 36 h in phosphatfreiem Medium kultiviert. Nach 6 h Inkubation mit radioaktiver Phosphorsäure und 2 h Inkubation mit 25 μ M MNNG wurden Gesamtzellextrakte isoliert. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurden die MSH2-Proteine immunpräzipitiert und komplett zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden über Autoradiographie detektiert. Zusätzlich wurde der Filter mit Antikörpern gegen MSH2 und MSH6 inkubiert, um die radioaktiven Signale zweifelsfrei MSH2 oder dem coimmunpräzipitieren MSH6 zuzuordnen und die Phosphorylierungsstärke mit der Proteinmenge in Relation setzen zu können. Die unteren Banden der Immundetektion repräsentieren den zur Immunpräzipitation verwendeten sekundären Antikörper. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die Zunahme der Phosphorylierung nach Abgleich auf die Menge immunpräzipitiertes Protein graphisch dargestellt.

3.2.4 *In vivo phosphoryliertes MSH2 und MSH6 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma detektierbar*

Um eine Aussage über die Rolle der Phosphorylierung machen zu können, ist es nötig herauszufinden, wo die Phosphorylierung erfolgt. Um diese Frage zu beantworten wurden HeLa-MR-Zellen für 36 h in phosphatfreiem Medium kultiviert. Nach einer Inkubation mit radioaktiv markierter Phosphorsäure für 6 h wurden die Zellen geerntet und parallel Kernextrakte und cytoplasmatische Extrakte isoliert. Aus den Extrakten wurde MSH2 mittels eines spezifischen Antikörpers präzipitiert und die Immunpräzipitate zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Phosphoryliertes Protein wurde mittels Röntgenfilm detektiert, und zur Überprüfung der detektierten Banden wurde der Filter mit Antikörpern gegen MSH2 und MSH6 hybridisiert. Die Antikörperreaktion diente gleichzeitig als Beladungskontrolle, zu der die Intensität der Phosphorylierung in Relation gesetzt wurde. Es zeigte sich, daß phosphoryliertes MSH2 und MSH6 sowohl in nukleären Extrakten als auch in cytoplasmatischen Extrakten vorkommt, wobei mehr phosphoryliertes MutS α im Kern detektiert werden konnte (Abb.3.17). Die Phosphorylierung erfolgt dementsprechend schon im Cytoplasma, das nukleäre MutS α ist jedoch stärker phosphoryliert.

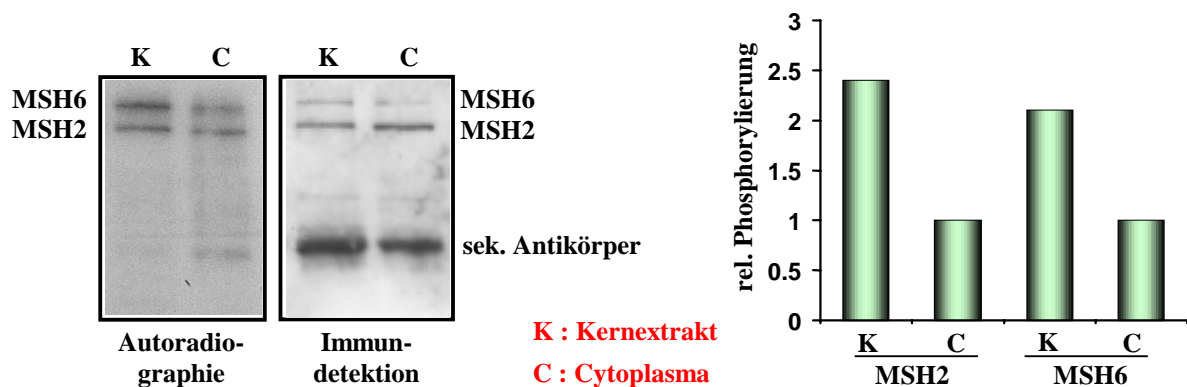


Abb.3.17 *In vivo Analysen zur Phosphorylierung von nukleärem und cytoplasmatischem MSH2 und MSH6*

HeLa-MR-Zellen wurden für 36 h in phosphatfreiem Medium kultiviert. Nach 6 h Inkubation mit radioaktiver Phosphorsäure wurden parallel Kernextrakte und cytoplasmatische Extrakte isoliert. Mithilfe spezifischer Antikörper wurde MSH2 immunpräzipitiert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden über Autoradiographie detektiert. Zusätzlich wurde der Filter mit Antikörper gegen MSH2 und MSH6 inkubiert, um die radioaktiven Signale zweifelsfrei MSH2 oder MSH6 zuzuordnen und die Phosphorylierungsstärke mit der Proteinmenge in Relation setzen zu können. Die unteren Banden der Immundetektion repräsentieren den zur Immunpräzipitation verwendeten sekundären Antikörper. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die relative Phosphorylierung des nukleären und des cytoplasmatischen Proteins nach Abgleich auf die Menge immunpräzipitiertes Protein graphisch dargestellt.

3.2.5 Hemmung der PKC und CKII verhindert nicht die nukleäre MSH2-Translokation

Wichtig für die Bewertung der Phosphorylierung von MSH2 und MSH6 ist die Frage, ob die Phosphorylierung in einem kausalen Zusammenhang mit der beobachteten Translokation von MutS α steht. *In vivo* Phosphorylierungen zeigten nicht eindeutig, ob die Stärke der Phosphorylierung durch Behandlung mit MNNG verändert wird, was weiterhin die Möglichkeit offenläßt, daß eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus für die Translokation verantwortlich ist. Zusätzliche Versuche mit Proteinkinaseinhibitoren sollten im weiteren genauere Auskunft über den Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und Translokation liefern. Hierzu wurden HeLa-MR-Zellen für 1 h mit dem PKC-Inhibitor H7, dem CKII-Inhibitor Quercetin, dem Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein oder dem PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin vorbehandelt.

Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen in Abwesenheit oder in Gegenwart von 25 μ M MNNG für 2 h weiter kultiviert, die Zellen geerntet und parallel Kernextrakte und cytoplasmatische Extrakte isoliert. Die Western-Blot-Analyse der so behandelten Zellen zeigte sowohl in der Kontrolle (nicht vorbehandelten Zellen) als auch bei den vorbehandelten Zellen eine deutliche Zunahme der MSH2-Proteinmenge in den nukleären Extrakten und eine Abnahme in den cytoplasmatischen Extrakten. (Abb.3.18).

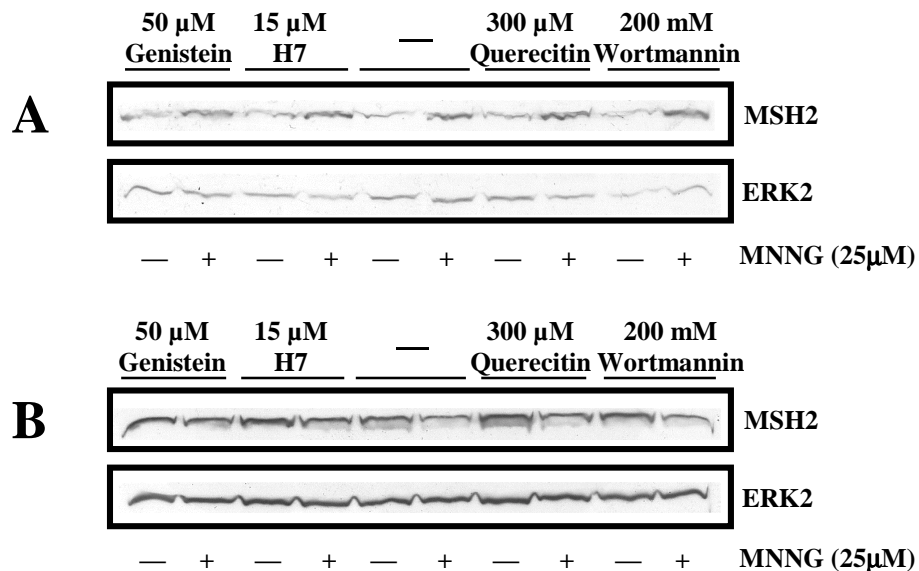


Abb.3.18 Einfluß der Behandlung mit Proteinkinase-Inhibitoren auf die nukleäre MSH2-Translokation
 HeLa-MR-Zellen wurden für 1 h mit verschiedenen Proteinkinase-Inhibitoren vorbehandelt und anschließend für 2 h mit oder ohne 25 μ M MNNG inkubiert. Anschließend wurden Kernextrakte (A) und cytoplasmatische Extrakte (B) isoliert und je 25 μ g zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörpern gegen MSH2 und ERK2 inkubiert.

Die Ergebnisse zeigen, daß es nach der Behandlung von HeLa-MR-Zellen mit Inhibitoren der Tyrosinkinase, der PI3-Kinase, sowie der PKC und der CK2 immer noch zu einer nukleären Translokation des Proteins MSH2 kommt. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, daß die beobachtete Phosphorylierung von MutS α durch die CK2 und die PKC nicht die Ursache für die nukleäre Translokation von MutS α ist.

3.2.6 In Abwesenheit von Phosphat kommt es weder zur nukleären MutS α -Translokation noch zur GT-Bindung

Die Versuche mit verschiedenen Kinaseinhibitoren zeigten keinen Einfluß der Phosphorylierung von MutS α durch die untersuchten Proteinkinasen (CK2 und PKC) auf die Translokation. Wie weitere Versuche zeigten, kann die nukleäre Translokation jedoch durchaus durch den Phosphorylierungsstatus beeinflußt werden. Bei diesen Versuchen wurden HeLa-MR-Zellen in normalem, phosphatfreiem oder serumfreiem Medium kultiviert. Western-Blot-Analysen zeigten, daß die Behandlung mit 25 μ M MNNG für 2 h zwar in serumdepletierten Zellen, nicht aber in den phosphatdepletierten Zellen zu einer Translokation von MSH2 führt (Abb.3.19.A). Es muß also ein Unterschied zwischen der Aktivität von phosphoryliertem und unphosphoryliertem MutS α existieren, der zu einer Verhinderung der nukleären Translokation führt. Eine Möglichkeit besteht darin, daß unphosphoryliertes MutS α eine von phosphoryliertem MutS α unterschiedliche DNA-Bindungsaktivität besitzt, oder daß die Bildung des MutS α -Komplexes phosphorylierungsabhängig erfolgt. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die Extrakte von HeLa-MR-Zellen, die in normalem, phosphatfreiem oder serumfreiem Medium kultiviert wurden und mit 25 μ M MNNG für 2 h behandelt worden waren, auf GT-Bindungsaktivität untersucht. Es zeigte sich, daß es in den Kontrollzellen und den serumdepletierten Zellen durch die Behandlung mit MNNG zu einer Zunahme der GT-Bindungsaktivität kommt. In den phosphatdepletierten Zellen kommt es dagegen unabhängig von der MNNG-Behandlung zu keiner GT-Bindung (Abb.3.19.B).

Im Gegensatz zur GT-Bindung ist die Fähigkeit zur Bildung des MutS α -Komplexes durch die Phosphorylierung nicht beeinflußt. Dies wurde gezeigt, indem HeLa-MR-Zellen in normalem, oder phosphatfreiem Medium kultiviert wurden. Nach 48 h wurden aus Gesamtzellextrakten MSH6 mittels monoklonaler Antikörper immunpräzipitiert. Das präzipitierte Protein wurde komplett für eine Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Analyse zeigte, daß in den Kontrollzellen und den phosphatdepletierten Zellen MSH2 in

gleicher Menge coimmunpräzipitiert wurde, was darauf hinweist, daß sowohl phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes MSH6 mit MSH2 im Komplex vorliegt. (Abb.3.19.C). Die Ergebnisse zeigen, daß in phosphatdepletierten Zellen keine nukleäre Translokation, keine GT-Bindung von MutS α , wohl aber die Bildung des MutS α Komplexes erfolgen kann.

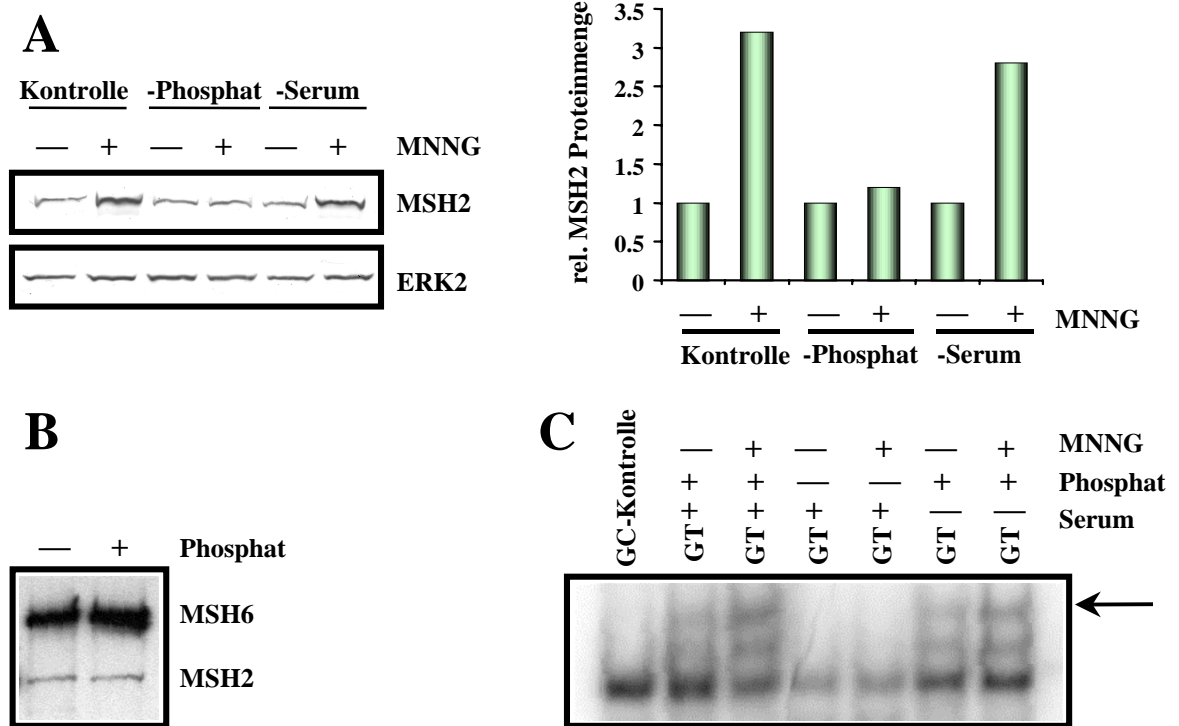


Abb.3.19 Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und nukleärer MSH2-Translokation

(A) HeLa-MR-Zellen wurden für 48 h in normalem, phosphatfreiem oder serumfreiem Medium kultiviert. Nach 2 h Inkubation mit 25 μ M MNNG wurden Kernextrakte isoliert und jeweils 25 μ g zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörpern gegen MSH2 und ERK2 inkubiert. Die Inkubation mit anti-ERK2 diente als Beladungskontrolle. Die relative MSH2-Proteinmenge ist in Form eines Säulendiagramms dargestellt. (B) HeLa-MR-Zellen wurden für 48 h in normalem oder phosphatfreiem Medium kultiviert und aus den Zellen wurden Gesamtzellextrakte isoliert. Mithilfe spezifischer Antikörper wurde MSH6 immunpräzipitiert und komplett zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. (C) HeLa-MR-Zellen wurden für 48 h in normalem, phosphatfreiem oder serumfreiem Medium kultiviert. Nach 2 h Inkubation mit 25 μ M MNNG wurden Kernextrakte isoliert und jeweils 4 μ g zur Gelretardationsanalyse eingesetzt. Der Pfeil zeigt die Lage des spezifischen Komplexes bestehend aus dem GT-Oligonukleotid und MutS α an.

3.2.7 Dephosphorylierung von phosphoryliertem MutS α führt *in vitro* zu einer Verhinderung der GT-Bindung

In weiteren Versuchen sollte der Einfluß der Phosphorylierung von MutS α durch PKC und CK2 *in vitro* auf die GT-Bindungsaktivität untersucht werden. Hierbei wurden HeLa-MR-Zellen für 6h mit 25 μ M MNNG behandelt, um die Menge an nukleärem MutS α zu erhöhen. Aus den Zellen wurden nukleäre Extrakte isoliert und mit Phosphatasen oder Proteinkinasen inkubiert, und in Gelretardationsexperimenten eingesetzt.

Als erstes erfolgten Untersuchungen zur Auswirkung der Dephosphorylierung von MutS α auf die GT-Bindungsaktivität. Hierzu wurden die Extrakte mit 2 U SAP („shrimp alkaline phosphatase“) oder 2 U CIP („calf intestinal phosphatase“) für 30 min bei 30° C inkubiert und in Gelretardationsexperimenten eingesetzt. Es zeigte sich, daß Dephosphorylierung der Extrakte eine GT-Bindung vollständig verhindert (Abb.3.20.A). Die Kontrollinkubation mit hitzedenaturierter Phosphatase zeigte hingegen immer noch die spezifische Bindung an das GT-Oligonukleotid.

Wenn Dephosphorylierung von MutS α zu einer Verminderung der GT-Bindungsaktivität führt, so liegt es nahe zu vermuten, daß eine spezifische Hyperphosphorylierung die GT-Bindungsaktivität erhöht. Um dies zu untersuchen, wurden nukleäre Extrakte von HeLa-MR-Zellen mit jeweils 1 U CKII, PKC oder PKA für 30 min bei 30° C inkubiert. Es zeigte sich hierbei, daß die Phosphorylierung der Extrakte durch PKC und CKII eine GT-Bindung vollständig verhindert (Abb.3.20.B). Die Kontrollinkubation mit hitzedenaturierter Phosphatase zeigt hingegen immer noch die spezifische Bindung an das GT-Oligonukleotid. Die Phosphorylierung der Extrakte durch PKA hingegen führt nur zu einer Reduktion der GT-Bindung.

Die Ergebnisse zeigen, daß die spezifische Phosphorylierung von MutS α für eine effektive Bindung des Komplexes an GT-Fehlpaarungen nötig ist. Nicht phosphoryliertes oder unphysiologisch hyperphosphoryliertes MutS α bindet hingegen *in vitro* nicht an GT-Fehlpaarungen.

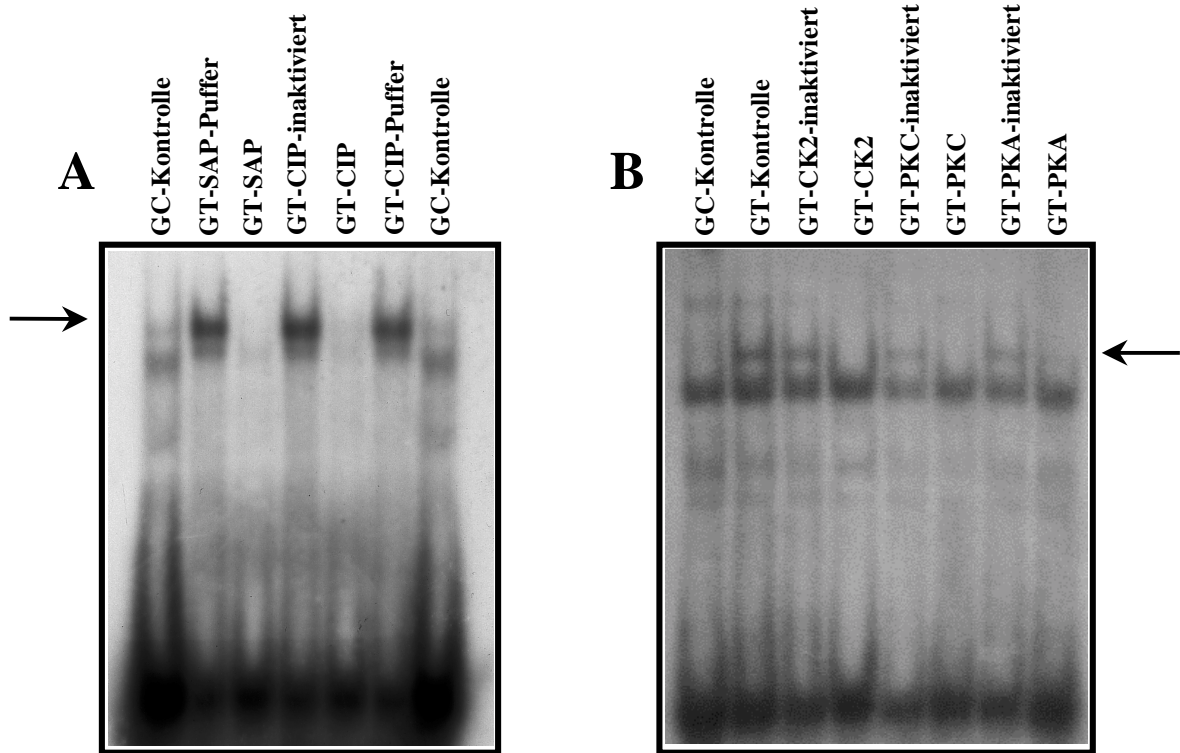


Abb.3.20 Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und GT-Bindung

(A) Nach der Inkubation von HeLa-MR Zellen für 2 h mit 25 μ M MNNG wurden Kernextrakte isoliert. Je 4 μ g Kernextrakt-Protein wurden mit 1 U SAP („shrimp alkaline phosphatase“) oder CIP („calf intestinal phosphatase“) für 30 min bei 30° C inkubiert und anschließend zusammen mit α^{32} P-dCTP und Klenow Enzym markierten GC- und GT-Oligonukleotiden zur Gelretardationsanalyse eingesetzt. In Kontrollexperimenten wurden die Kernextrakte mit Puffer oder inaktivierter Phosphatase inkubiert. Der Pfeil zeigt die Lage des spezifischen Komplexes bestehend aus dem GT-Oligonukleotid und MutS α an. (B) Nach der Inkubation von HeLa-MR-Zellen für 2 h mit 25 μ M MNNG wurden Kernextrakte isoliert. Je 4 μ g wurden mit 2 U CKII, PKC oder PKA für 30 min bei 30° C inkubiert und anschließend zur Gelretardationsanalyse eingesetzt. In Kontrollexperimenten wurden die Kernextrakte mit hitzeinaktivierter Proteinkinase inkubiert. Der Pfeil zeigt die Lage des spezifischen Komplexes bestehend aus dem GT-Oligonukleotid und MutS α an.

3.3 Untersuchungen zur Resistenzentwicklung in humanen Melanomzellen.

Im dritten Teil der Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, wie es in Tumorzellen zur Resistenzentwicklung gegenüber bestimmten Zytostatika kommt. Dieses Projekt wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Schadendorf an der Hautklinik des Klinikums Mannheim und Dr. H. Lage vom Institut für Pathologie der Charité in Berlin durchgeführt. Von der Arbeitsgruppe Prof. Schadendorf bekamen wir Melanomzelllinien zur Verfügung gestellt, die gegenüber der Ausgangszelllinie durch chronische Exposition unterschiedlicher Zytostatika Resistenzen gegenüber den entsprechenden Agenzien entwickelten (Kern *et al.*, 1997). Es handelt sich hierbei jeweils um eine niedrig- und eine hoch-resistente Zelllinie, die nach Behandlung mit Cisplatin, Etoposid, Fotemustin oder Vindesin erhalten worden war (Tab. 3.5).

Tab. 3.5 Selektionsbedingungen der einzelnen resistenten Melanomzelllinien

Die Bezeichnung der Zelllinien orientiert sich nach der Dosis des zur Selektion verwandten Agens. So wird z.B. die mit 4 µg/ml Fotemustin selektionierte MeWo-Zelllinie als MeWoFote4 bezeichnet.

Zelllinie	Behandlung
MeWo	Ausgangszelllinie
MeWoCis0.01	0,01 µg/ml Cisplatin
MeWoCis 1	1 µg/ml Cisplatin
MeWoEto0.1	0,1 µg/ml Etoposid
MeWoEto1	1 µg/ml Etoposid
MeWoFote4	4 µg/ml Fotemustin
MeWoFote40	40 µg/ml Fotemustin
MeWoVin0.5	0,5 ng/ml Vindesin
MeWoVin 5	5 ng/ml Vindesin

3.3.1 Untersuchung der Basenfehlpaarungsreparatur in Zytostatika-resistenten Melanomzelllinien

Ein häufiger Mechanismus, über den Tumorzellen Resistenzen entwickeln können, beruht auf der Ausbildung des Toleranz-Phänotyps (siehe auch Kapitel 1.3.2.5 und Fink *et al.*, 1998). Dieser beruht auf einer Defizienz oder der Herunterregulation der Expression von MMR-Proteinen. Um zu untersuchen, ob dieser „Toleranz-Phänotyp“ bei der Resistenzentwicklung der Melanomzellen eine Rolle spielt, wurden in den in Tabelle 3.5 aufgeführten Zelllinien die Expression der MMR-Proteine MSH2, MLH1 und MSH6 untersucht. Es zeigte sich hierbei, daß die Ausgangszelllinie MeWo hinsichtlich aller drei untersuchten Proteinen die stärkste Expression besitzt (Abb.3.21.A). Die Zelllinien

MeWoEto0.1 / MeWoEto1 / MeWoCis0.01 / MeWoCis1 / MeWoVin0.5 und MeWoVin5 zeigen eine deutliche Verringerung der Expression von MSH2 und/oder MSH6, während die Zelllinien MeWoFote4 und MeWoFote40 nur eine geringe Verminderung der Expression dieser Proteine aufwiesen (Abb.3.21.A). Eine Verringerung der Expression von MLH1 zeigten nur die Zelllinien MeWoVin0.5 und MeWoVin5. In Übereinstimmung mit den Protein-Expressionsdaten stehen Ergebnisse von GT-Bindungsanalysen. Diese zeigten, daß die GT-Bindungsaktivität in den hoch-resistenten Zelllinien MeWoEto1, MeWoCis1 und MeWoVin5 vermindert ist (Abb.3.21.B).

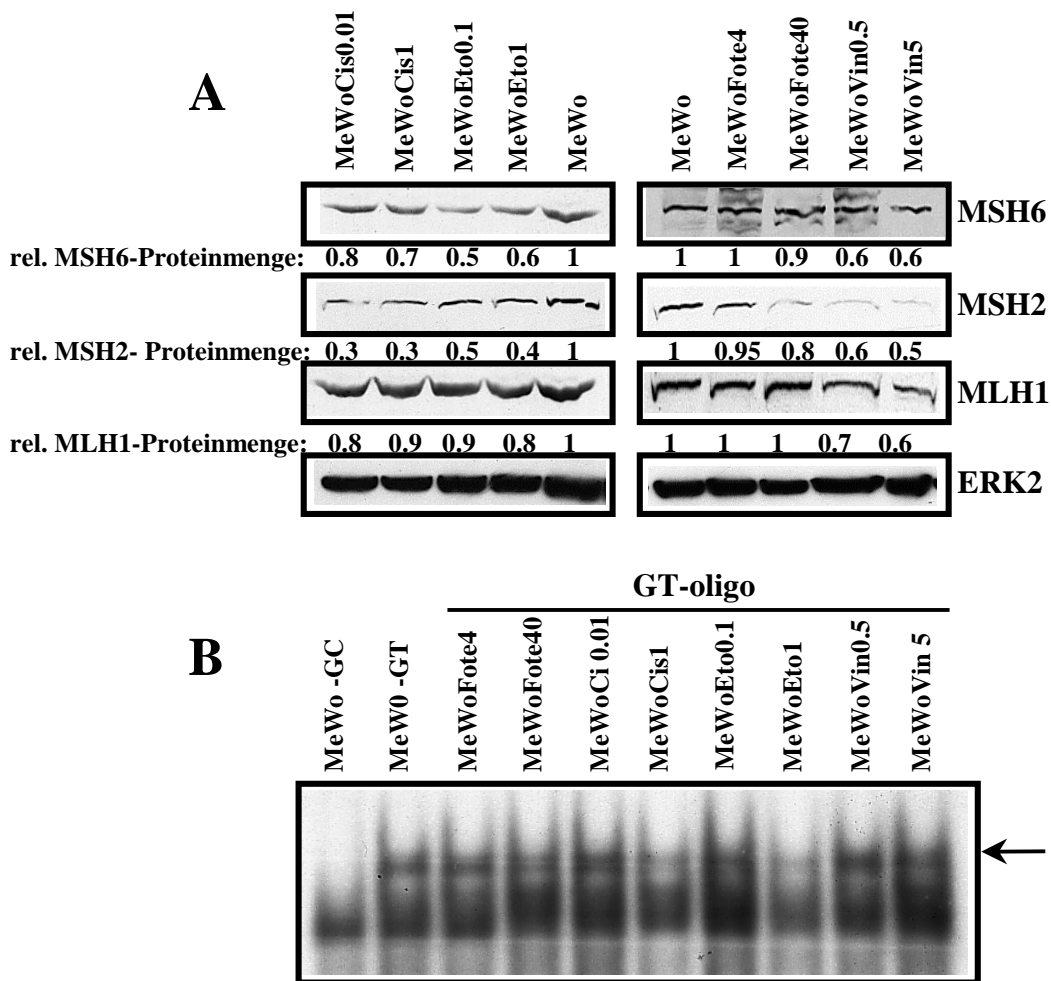


Abb.3.21 Expression der MMR-Proteine MSH2, MSH6 und MLH1 und GT-Bindungsaktivität in MeWo-Zellen und deren Zytostatika-resistenten Abkömmlingen

(A) Von verschiedenen resistenten Melanomzelllinien wurden nukleäre Extrakte isoliert und jeweils 25 µg zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörpern gegen MSH2, MSH6 und MLH1 inkubiert. Die Inkubation mit anti-ERK2 diente als Beladungskontrolle. (B) Von verschiedenen resistenten Melanomzelllinien wurden nukleäre Extrakte isoliert und jeweils 4 µg für ein Gelretardationsexperiment eingesetzt. Für das Experiment wurden spezifische radioaktiv markierte GC- und GT-Oligonukleotide eingesetzt. Der Pfeil zeigt die Lage des spezifischen Komplexes bestehend aus dem GT-Oligonukleotid und MutS α an.

3.3.2 Untersuchung verschiedener Resistenzfaktoren in resistenten Melanomzelllinien

Die Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika ist ein äußerst komplexer Vorgang, bei dem eine Vielzahl von Faktoren beteiligt sein können. Ein häufig involviertes Gen ist das *mdr1* („*multi drug resistance 1*“) Gen (Gros *et al.*, 1986a; Ueda *et al.*, 1987). Bei dem korrespondierenden MDR1-Protein (P170-Glykoprotein) handelt es sich um einen membranständigen Transporter, über den hydrophobe Agenzien (Vinblastin, Etoposid, Doxorubicin) aus der Zelle herausgeschleust werden, so daß es gar nicht erst zur Bildung von toxischen Läsionen kommt (Horio *et al.* 1988). Es wurde bereits gezeigt, daß Behandlung von Zellen mit Vinblastin und Doxorubicin zu einer Amplifikation des *mdr1*-Gens führt (Roninson, 1986). Die Analyse der Expression dieses Proteins zeigt, daß das MDR1-Protein in allen Zelllinien nachweisbar ist, und daß es in allen resistenten Zelllinien zu einer Expressionssteigerung um den Faktor 2-3 kommt (Abb.3.22.A). Es ist folglich nicht auszuschließen, daß die gesteigerte Expression des MDR1-Proteins an der Resistenzentwicklung der MeWo-Zellen beteiligt ist.

Ein wichtiger Faktor für die Tumorzell-Resistenz ist die Reparatur der durch Chemotherapeutika induzierten Schäden. Neben der Beteiligung der Reparaturproteine MSH2, MSH6 und MLH1 (siehe Kapitel 3.2.1) wurde noch die Expression weiteren Reparaturproteine untersucht. Hierbei handelte es sich um das an der Nukleotidexzisionsreparatur beteiligte Protein ERCC1 („*excision repair cross-complementing 1*“; Westerveld *et al.*, 1984) und die Topoisomerase II α (Miller *et al.*, 1981). Die Untersuchung der Expression dieser Proteine zeigte bei den MeWoEto0,1 und MeWoEto1-Zellen (nach Abgleich auf ERK2) eine geringe Abnahme der Topoisomerase II α Proteinmenge und eine Abnahme der ERCC1-Proteinmenge in den Fotemustin-resistenten Zelllinien MeWoFote4 und MeWoFote40 (Abb.3.22.B).

Ein weiterer Mechanismus, der bei der Zytostatikaresistenz eine Rolle spielt, besteht in der Veränderung von Faktoren des apoptotischen Signalwegs. Durch Ausfall der an der Apoptose beteiligten Proteine könnte Apoptose verhindert werden, wodurch es zum gesteigertem Überleben der geschädigten Zellen kommen würde. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Expression einiger an der Apoptose beteiligter Proteine in den Melanomzellen bestimmt. Die Western-Blot-Analyse zeigte, daß die Proteine Bcl-2, Bax und Fas in allen Zelllinien gleichermaßen exprimiert werden (Abb.3.22.C). Eine Veränderung der Expression dieser Proteine ist folglich als Ursache der beobachteten Resistenzentwicklung unwahrscheinlich.

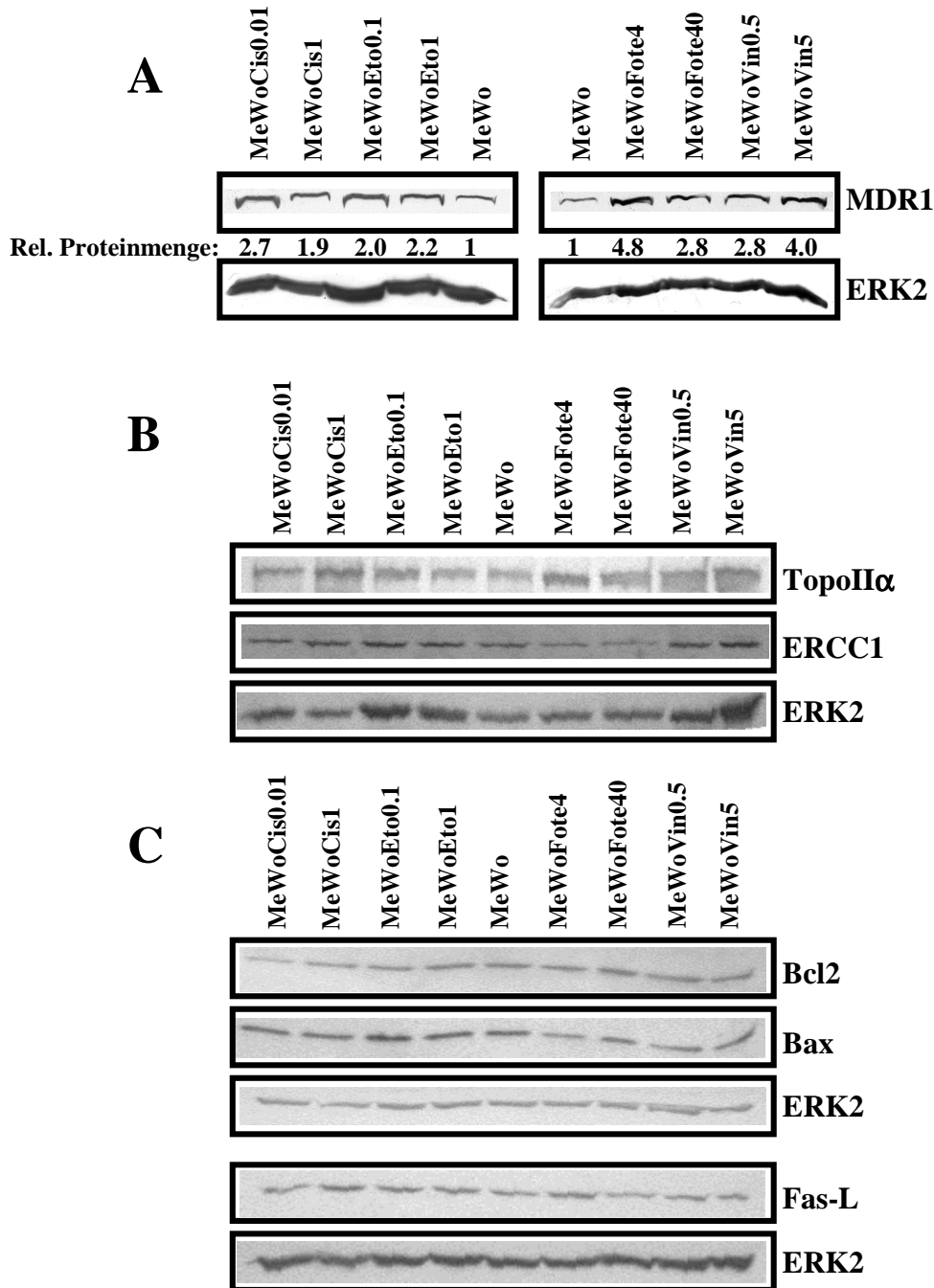


Abb.3.22 Untersuchung der Expression verschiedener potentieller „Drug-Resistenzmarker“ in MeWo-Zellen und den abgeleiteten resistenten Varianten

(A) Von verschiedenen resistenten Melanomzelllinien wurden Gesamtzellextrakte isoliert und jeweils 50 µg zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörper gegen MDR1 inkubiert. Die Inkubation mit anti-ERK2 diente als Beladungskontrolle. (B) Von verschiedenen resistenten Melanomzelllinien wurden nukleäre Extrakte isoliert und jeweils 25 µg zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörpern gegen TopoIIα und ERCC1 inkubiert. Die Inkubation mit anti-ERK2 diente als Beladungskontrolle. (C) Von verschiedenen resistenten Melanomzelllinien wurden Gesamtzellextrakte isoliert und jeweils 50 µg zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit Antikörpern gegen Bcl-2, Bax und Fas-L inkubiert. Die Inkubation mit anti-ERK2 diente als Beladungskontrolle.

3.3.3 Untersuchung der MGMT-Aktivität in unterschiedlich resistenten Melanomzelllinien

Ein weiteres an der DNA-Reparatur beteiligtes Enzym ist die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Die MGMT besitzt die Fähigkeit, in einer Suizidreaktion die Methylgruppe der O⁶-Position des Guanins in einer Ein-Schritt-Reaktion auf sich selbst zu übertragen, wodurch Guanosin in der DNA wiederhergestellt wird (Pegg *et al.*, 1995). Um eine eventuelle Beteiligung der MGMT bei der Resistenzentwicklung zu untersuchen, wurde die MGMT-Aktivität in den unterschiedlich resistenten Melanomzellen gemessen. Es zeigte sich, daß in den Fotemustin-resistenten Zelllinien (MeWoFote4 und MeWoFote40) eine starke Erhöhung der Aktivität der MGMT erfolgt war (Tab.3.6). Diese Zellen zeigen demzufolge den Mex⁺ Phänotyp im Gegensatz zu der Kontrollzelllinie MeWo und den Cisplatin-, Etoposid- und Vindesin- resistenten Zelllinien, die keine MGMT-Aktivität zeigten und deshalb Mex⁻ sind.

Tab. 3.6 MGMT-Aktivität der MeWo-Zellen und der abgeleiteten resistenten Varianten

Von MeWo-Zellen und den abgeleiteten resistenten Zelllinien wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Messung der MGMT-Aktivität eingesetzt.

<i>Zelllinie</i>	<i>MGMT-Aktivität (fmol/mg)</i>
MeWo	12
MeWoCis0.01	6
MeWoCis 1	5
MeWoEto0.1	24
MeWoEto1	3
MeWoFote4	806
MeWoFote40	1146
MeWoVin0.5	7
MeWoVin 5	0,3

Es stellt sich nun die Frage, wie stabil dieser erworbene Mex⁺ Phänotyp ist. Um auszuschließen, daß es durch die Behandlung mit Fotemustin nur zu einer kurzzeitigen Expressionssteigerung der MGMT-Aktivität kommt, wurden die Zellen ohne chronische Zugabe von Fotemustin kultiviert. Nach 3 und 6 Monaten der Kultivierung wurden Proteinextrakte isoliert und die MGMT-Aktivität gemessen. Im Vergleich mit den chronisch behandelten Zellen zeigten sich nur geringe Unterschiede. In den MeWoFote4-Zellen kam es nach 3 Monaten zu einer Reduktion der MGMT-Aktivität auf 84% und nach 6 Monaten auf 78%. In den MeWoFote40-Zellen kam es nach 3 Monaten zu einer Reduktion der MGMT-Aktivität auf 74% und nach 6 Monaten auf 76% (Abb.3.23.A). Die

geringe Reduktion der MGMT-Aktivität in den Zellen nach Langzeitkultivierung um maximal 26% zeigt, daß es sich bei der hohen MGMT-Aktivität in den Fotemustin-resistenten Zellen um eine relativ stabile Veränderung handelt. Da Fotemustin eine Substanz ist, die zur Alkylierung von DNA in der O⁶-Position des Guanosins führt, ist anzunehmen, daß zwischen der MGMT-Expression und der Fotemustinresistenz ein direkter Zusammenhang besteht. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden verschiedene Koloniebildungstests durchgeführt. Die Behandlung der Zellen mit Fotemustin zeigt wie erwartet, daß die Zellen MeWoFote4 und MeWoFote40 hochresistent gegenüber Fotemustin sind (Abb.3.23.B). Bei den sensitiven MeWo-Zellen kommt es schon durch eine Behandlung mit 2 µg/ml Fotemustin zum Absterben von über 50% der Zellen. Bei den Fotemustin-resistenten MeWoFote4-Zellen liegt diese LD50 bei 18 µg/ml und bei den MeWoFote40-Zellen bei 30 µg/ml.

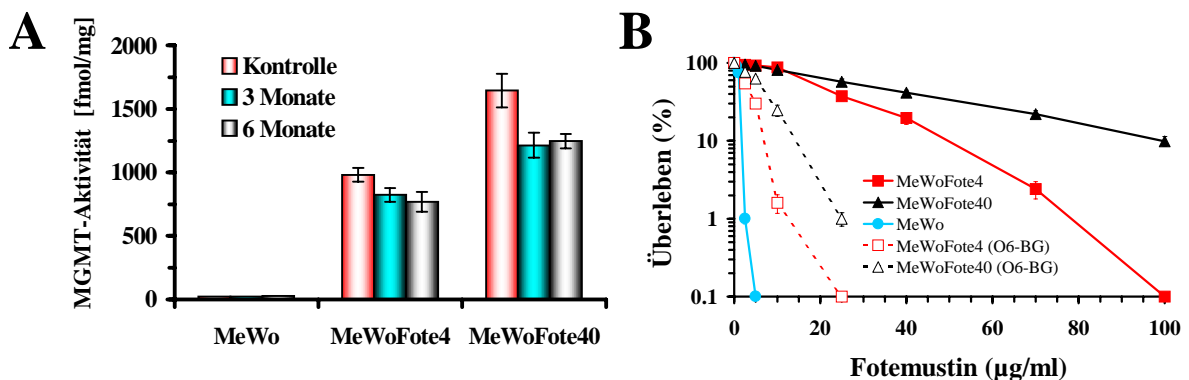


Abb.3.23 Rolle des MGMT-Status bei der Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika

(A) Von den Fotemustin-resistenten Zelllinien (MeWoFote4 und MeWoFote40) und der sensitiven Kontrolle (MeWo) wurden nach 3 und 6 Monaten *in vitro*-Kultivierung (ohne chronischer Exposition mit Fotemustin) Gesamtzellextrakte isoliert und zur Messung der MGMT-Aktivität eingesetzt. Als Kontrolle wurden Gesamtzellextrakte von Zellen verwendet, die weiterhin chronisch mit Fotemustin behandelt worden waren. (B) Koloniebildungstest von MeWo, MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen nach Behandlung mit Fotemustin in Gegenwart oder in Abwesenheit von 20 µM O⁶-Benzylguanin. Pro Schale wurden 10³ Zellen ausgesät. Nach 12 h erfolgte für 1h die Vorbehandlung mit O⁶-Benzylguanin und anschließend die Behandlung mit Fotemustin. Nach 10 Tagen wurden die Kolonien fixiert, gefärbt und ausgezählt. Die Werte stellen Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Versuchen dar.

Wenn verstärkte Expression der MGMT ursächlich an der Fotemustin-Resistenz beteiligt ist, so sollte eine Hemmung der MGMT die Fotemustin-Resistenz aufheben. Ein potenter, äußerst selektiver MGMT-Inhibitor ist O⁶-Benzylguanin (Pegg *et al.*, 1993). Durch Vorbehandlung der Zellen mit 20 µM O⁶-Benzylguanin (O⁶-BG) für eine Stunde kommt es zu einer vollständigen Hemmung der MGMT in den Zellen. Die Hemmung der MGMT zeigt im Koloniebildungstest deutliche Auswirkungen auf die Sensitivität der Zellen gegenüber Fotemustin. Bei O⁶-BG-vorbehandelten MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen

zeigte sich eine starke Verminderung der Resistenz gegenüber Fotemustin. Die Überlebenskurven der resistenten Zelllinien nähern sich deutlich der sensitiven MeWo-Zelllinie an. Bei den MeWoFote4-Zellen sinkt die LD50 auf 3 µg/ml und bei den MeWoFote40-Zellen auf 7 µg/ml (Abb.3.23.B). Die erhöhte Sensitivität der O⁶-BG vorbehandelten MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen demonstriert, daß es in dem verwendeten Zellsystem einen kausalen Zusammenhang zwischen der Entwicklung der Resistenz gegenüber Fotemustin und der Reaktivierung der MGMT gibt.

3.3.4 Die Reaktivierung der MGMT erfolgt nicht auf Transkriptions- und Translationsebene

Die Reaktivierung der MGMT-Aktivität könnte theoretisch auf verschiedenen molekularen Ebenen erfolgen, die im folgenden untersucht wurden. Ein Grund für die fehlende MGMT-Aktivität in den Ausgangszelllinien könnten Mutationen im kodierenden Bereich des MGMT-Gens sein. In diesem Fall würde entweder kein oder ein inaktives Protein gebildet werden. Um dies zu überprüfen, wurden Gesamtzellextrakte der MeWo-Zelllinien hergestellt und mittels Western-Blot-Analyse die Expression der MGMT untersucht. Die Inkubation der Filter mit einem spezifischen Antikörper gegen MGMT zeigte, daß nur die Mex⁺ Zellen MeWoFote4 und MeWoFote40 das MGMT-Protein exprimieren (Abb.3.24.A). Die MGMT-Expression der MeWoFote4-Zellen ist etwa 50% niedriger als die der MeWoFote40-Zellen, was mit der gemessenen MGMT-Aktivität in diesen Zelllinien übereinstimmt. In der Ausgangszelllinie MeWo und den anderen Zytostatika-resistenten Zelllinien (MeWoCis1 und MeWoEto0.1-Zellen) konnte das MGMT-Protein nicht detektiert werden. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse zeigen somit, daß nur die Fotemustin-resistenten Zellen aktives MGMT-Protein exprimieren. Es könnte allerdings sein, daß es in den Mex⁻ Zellen zur Bildung von mutiertem Protein kommt, welches von dem verwendeten Antikörper nicht mehr detektiert wird. Sollte mutiertes Protein gebildet werden, das in Western-Blot-Analysen nicht detektiert werden kann, so müßte in den Mex⁻ Zellen die MGMT-mRNA detektierbar sein. Um dies zu überprüfen, wurden von HeLa-S3-Zellen, MeWo-Zellen, MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen Gesamt-RNA isoliert und zur Northern-Blot-Analyse eingesetzt. Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten MGMT-cDNA zeigte, daß sowohl in der Kontrollzelllinie HeLa-S3 als auch in den Fotemustin-resistenten Zellen die MGMT-mRNA detektierbar war. In den MeWo-Zellen war keine Expression nachweisbar (Abb.3.24.B). Da in den MeWo-Zellen keine MGMT-

mRNA detektierbar war, kann ausgeschlossen werden, daß in diesen Zellen inaktives MGMT-Protein gebildet wird. Dieses Ergebnis zeigt auch, daß weder Punktmutationen noch Rasterschubmutationen in der MGMT-cDNA Ursache für den Mex⁻ Phänotyp der MeWo-Zellen sein können.

Eine andere Möglichkeit der Reaktivierung der MGMT in den Fotemustin-resistenten MeWo-Zellen könnte auf der Promotorebene liegen. Es ist bekannt, daß unter anderem, ein „enhancer binding protein“ (MEBP) bei der Regulation des Promotors beteiligt ist (Chen *et al.*, 1997). Um zu untersuchen, ob die Abwesenheit dieses oder anderer Transkriptionsfaktoren in den Mex⁻ Zellen zu einem Abschalten des MGMT-Promotors führt, wurden die Zellen mit einem MGMT-Promotor-CAT-Konstrukt transfiziert, Gesamtzellextrakte isoliert und für CAT-Analysen eingesetzt. Es zeigte sich hierbei, daß sich die MGMT-Promotoraktivität in den Mex⁻ und Mex⁺ Zellen nicht signifikant voneinander unterscheidet, was dafür spricht, daß in den Mex⁻ Zellen keine Faktoren fehlen, die für die Expression des Promotors entscheidend sind (Abb.3.24.C).

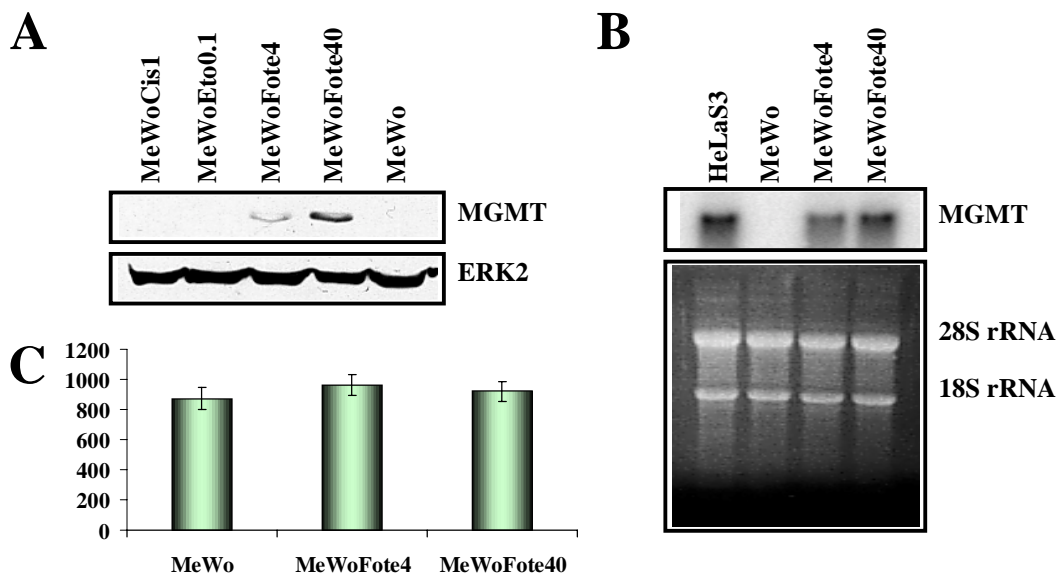


Abb.3.24 Untersuchung der MGMT-Promotoraktivität, der Expression des MGMT-Proteins und der Expression der MGMT-mRNA in den Fotemustin-resistenten Zellen

(A) Von verschiedenen Fotemustin-resistenten Melanomzelllinien wurden Gesamtzellextrakte isoliert und jeweils 50 µg zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Der Filter wurde mit Antikörper gegen MGMT inkubiert. Die Inkubation mit anti-ERK2 diente als Beladungskontrolle. (B) Von HeLa-S3, MeWo, MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und jeweils 10 µg für eine Northern-Blot-Analyse eingesetzt. Der Filter wurde mit der radioaktiv markierten MGMT-cDNA hybridisiert. Als Beladungskontrolle diente die Ethidiumbromid-gefärbte ribosomale RNA. (C) MeWo, MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen wurden transient mit einem MGMT-Promotor-CAT-Konstrukt transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen geerntet und ein Zellextrakt hergestellt, der für CAT-Analysen eingesetzt wurde. Die Werte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen dar.

3.3.5 In den Mex⁺ Zellen kommt es nicht zur Amplifikation des MGMT-Gens

Als Ursache für Unterschiede in der MGMT-Expression nach der Behandlung von Zellen mit alkylierenden Agenzien wurde unter anderem eine Amplifikation des MGMT-Gens beschrieben (Tano *et al.*, 1997). Um zu untersuchen, ob auch in den Fotemustin-resistenten Zellen eine Amplifikation des MGMT-Gens die Ursache für die Reaktivierung der MGMT-Aktivität ist, wurde die genomische DNA von MeWo, MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen isoliert, mit den Restriktionsenzymen HindIII oder MspI geschnitten und zur Southern-Blot-Analyse eingesetzt. Der Filter wurde mit der radioaktiv markierten MGMT-cDNA hybridisiert und das spezifische Signal mittels Autoradiographie detektiert. Die Autoradiographie zeigte keine Unterschiede im Hybridisierungsmuster und auch keine Unterschiede in der Signalstärke zwischen Mex⁻ und Mex⁺ Zellen, was zeigt, daß die Reaktivierung der MGMT nicht auf einer Amplifikation des MGMT-Gens beruht (Abb.3.25).

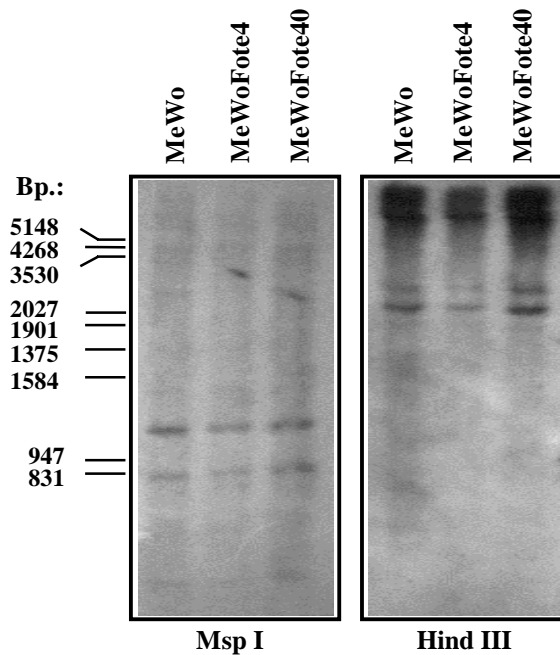


Abb.3.25 Untersuchung einer potentiellen MGMT-Genamplifikation

Von MeWo, MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen wurde genomische DNA isoliert, mit MspI oder HindIII geschnitten und jeweils 10 µg für eine Southern-Blot-Analyse eingesetzt. Der Filter wurde mit der radioaktiv markierter MGMT-cDNA hybridisiert.

3.3.6 In den Mex⁺ Zellen kommt es zur Hypermethylierung des MGMT-Gens

Die Regulation der MGMT-Expression wird auch über eine unterschiedliche Methylierung des Promotors oder des kodierenden Bereich des Gens vermittelt. So bewirkt eine Hypermethylierung im kodierenden Bereich der MGMT-cDNA die Aktivierung des Gens (Wang *et al.*, 1992). Hypermethylierungen des Promotors bewirken den umgekehrten Effekt, nämlich die Verminderung der Expression (Qian and Brent, 1997).

Um herauszufinden, ob eine unterschiedliche Methylierung des MGMT-Promotors die Ursache für die Reaktivierung der MGMT ist, wurde die genomische DNA mit den Restriktionsendonukleasen MspI oder HpaII geschnitten und zur Southern-Blot-Analyse eingesetzt. Der Filter wurde mit einem radioaktiv markierten MGMT-Promotorfragment hybridisiert und mit Röntgenfilm inkubiert. Die Autoradiographie zeigte in den MeWo-Zellen, nach Verdau mit HpaII, eine schwache Doppelbande, die in den Fotemustin-resistenten Zellen nicht auftrat (Abb.3.26.A). Diese Doppelbande könnte eventuell durch die Hypermethylierung eines der beiden Allele entstanden sein.

Eine weitere Möglichkeit der MGMT-Reaktivierung beruht auf einer Hypermethylierung des kodierenden Bereichs der MGMT-cDNA. Diese Möglichkeit wurde, wie auch die Analyse der Promotormethylierung, in Zusammenarbeit mit Dr. H. Lage (Institut für Pathologie der Charité in Berlin) mittels Southern-Blot-Analyse überprüft. Hierbei zeigte sich, daß es in den MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen zu einer Hypermethylierung des kodierenden Bereichs kommt (Abb.3.26.B).

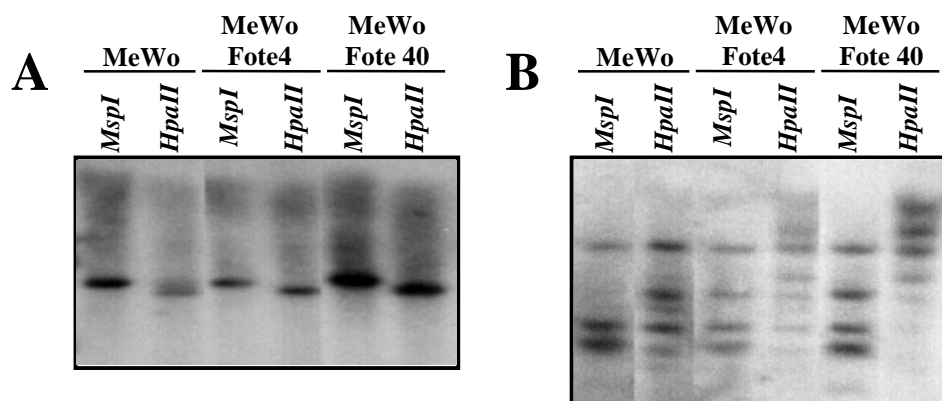


Abb.3.26 Analyse des Methylierungsstatus der genomischen MGMT-DNA

(A) Von MeWo, MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen wurde genomische DNA isoliert, mit MspI oder HpaII geschnitten und jeweils 10 µg für eine Southern-Blot-Analyse eingesetzt. Der Filter wurde mit dem radioaktiv markierten MGMT-Promotorfragment (SstI-Fragment) hybridisiert. (B) Von MeWo, MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen wurde genomische DNA isoliert, mit MspI und HpaII geschnitten und jeweils 10 µg für eine Southern-Blot-Analyse eingesetzt. Der Filter wurden mit der radioaktiv markierter MGMT-cDNA hybridisiert. Die hier gezeigten Southern-Blot-Analysen wurden im Rahmen einer Kooperation von Dr. H. Lage (Institut für Pathologie der Charité in Berlin) durchgeführt.

3.3.7 Die MGMT-Aktivität in den Fotemustin-resistenten MeWo-Zellen kann durch chronische Behandlung mit 5-Azacytidin reduziert werden

Um herauszufinden, ob die beobachtete Hypermethylierung des kodierenden Bereichs der MGMT-cDNA kausal mit der MGMT-Reaktivierung und der Resistenz gegenüber Fotemustin zusammenhängt, wurden Expositions-Versuche mit 5-Azacytidin durchgeführt. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Analogon von Cytidin, das in die DNA inkorporiert werden kann. 5-Azacytidin wird im Gegensatz zu Cytidin in der DNA nicht methyliert, was insgesamt zu einer Demethylierung der genomischen DNA führt. Ist die beobachtete Hypermethylierung des einen Allels des MGMT-Promotors für die Inaktivierung der MGMT-Aktivität verantwortlich, so müßte die Behandlung mit 5-Azacytidin in den MeWo-Zellen zur MGMT-Reaktivierung führen. Ist die Hypermethylierung des kodierenden Bereichs des MGMT-Gens für die Reaktivierung des MGMT-Gens verantwortlich, so müßte die Behandlung mit 5-Azacytidin zur Verminderung der MGMT-Aktivität in den Fotemustin-resistenten Zellen führen. Um dies zu untersuchen, wurden die Melanomzellen für 3 Wochen chronisch mit 5 µM 5-Azacytidin behandelt und anschließend die MGMT-Aktivität gemessen (Abb.3.27.A).

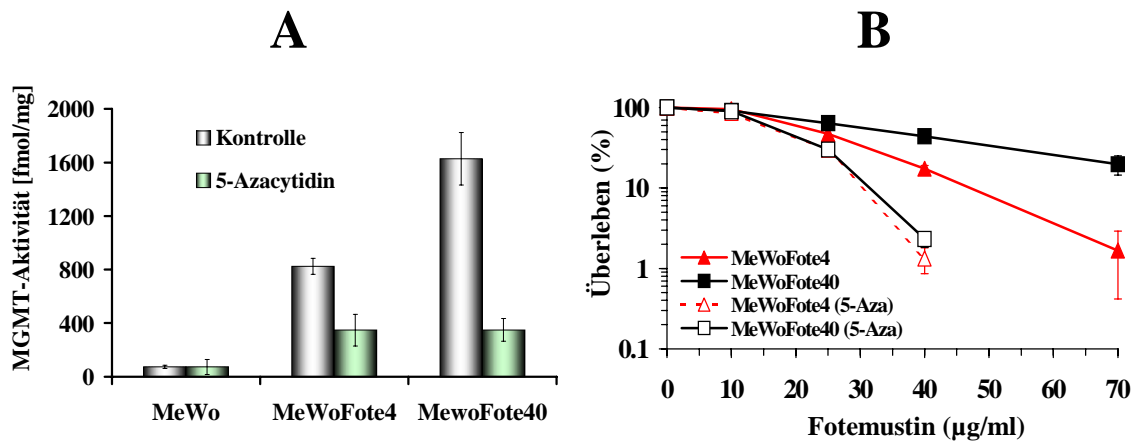


Abb.3.27 Einfluß des Methylierungsstatus des MGMT-Gens auf die MGMT-Aktivität und die Resistenz der Zellen gegenüber Fotemustin

(A) MeWo, MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen wurden für 3 Wochen chronisch mit 5 µM 5-Azacytidin kultiviert. Die Zugabe erfolgte einmal wöchentlich beim Umsetzen der Zellen. Aus nicht behandelten Zellen (Kontrolle) und den mit 5-Azacytidin kultivierten Zellen wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Messung der MGMT-Aktivität eingesetzt. (B) Koloniebildungstest von mit 5-Azacytidin behandelten MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen aus (A) und unbehandelten Zellen nach Behandlung mit Fotemustin. Pro Schale wurden 10³ Zellen ausgesät. Nach 12 h erfolgte die Behandlung mit Fotemustin. Nach 10 Tagen wurden die Kolonien fixiert, gefärbt und ausgezählt.

Die Behandlung der Melanomzellen resultierte in einer Verminderung der MGMT-Aktivität um 58% in den MeWoFote4 und um 79% in den MewoFote40-Zellen. In den MeWo-Zellen hatte die Behandlung mit 5-Azacytidin keinen Einfluß auf die MGMT-Aktivität. Dies zeigt, daß die beobachtete Hypermethylierung eines Allels des MGMT-Promotors in den MeWo-Zellen offensichtlich nicht die Ursache für die Inaktivierung des MGMT-Gens ist, denn in diesem Fall müßte die Behandlung mit 5-Azacytidin zur Demethylierung und damit zur Reaktivierung des MGMT-Gens führen. Andererseits zeigt der Versuch, daß die Demethylierung des MGMT-Genkörpers zu einer signifikanten Reduktion der MGMT-Aktivität führt. Dies bestätigt, daß die Hypermethylierung des MGMT-Genkörpers in den MeWoFote4 und den MeWoFote40-Zellen für die starke MGMT-Expression verantwortlich ist.

Um zu untersuchen, ob die durch 5-Azacytidin induzierte Demethylierung des MGMT-Gens auch zu einer Verminderung der Resistenz gegenüber Fotemustin führt, wurden mit den 5-Azacytidin-behandelten Zellen Koloniebildungstests durchgeführt. Die Versuche zeigen, daß die mit 5-Azacytidin-behandelten Zellen signifikant sensitiver auf Fotemustin reagieren als die unbehandelten Zellen (Abb.3.27.B).

Die Ergebnisse der Untersuchungen führen in ihrer Gesamtheit zu der Schlußfolgerung, daß die Resistenz von MeWo-Zellen gegenüber Fotemustin durch eine Reaktivierung der MGMT-Expression bedingt ist. In den MeWo-Zellen ist weder das MGMT-Protein noch die MGMT-mRNA detektierbar. Das Fehlen von Transkriptionsfaktoren und die Hypermethylierung des MGMT-Promotors konnten als Ursache für die Inaktivierung des MGMT-Gens ausgeschlossen werden. Die Reaktivierung der MGMT-Expression beruht vielmehr auf einer Hypermethylierung des kodierenden Bereichs des MGMT-Gens.

4. Diskussion

4.1 Regulationsmechanismen der Basenfehlpaarungsreparatur

4.1.1 Behandlung von Zellen mit O⁶-MeG-generierenden Agenzien führt zur nukleären Translokation von MutS α aus dem Cytoplasma in den Zellkern

Die Behandlung mit alkylierenden Agenzien führt in Zellen zur Alkylierung von DNA, RNA und Proteinen. Es hat sich gezeigt, daß für die mutagene Wirkung der monoalkylierenden Substanzen die Methylierung der O⁶-Position des Guanins verantwortlich ist. Hierbei kommt es zur Bildung von O⁶-Methylguanin (O⁶-MeG), das - falls es nicht repariert wird - in den folgenden Replikationszyklen zu GC→AT Transitionen führt (Loveless, 1969; Eadi *et al.*, 1984; Yarosh *et al.*, 1985). In MGMT-profizienten Zellen kann O⁶-MeG durch die MGMT demethyliert und somit zu Guanin revertiert werden. Erfolgt diese Reparatur nicht, kommt es zur Bildung von O⁶-MeGT Basenfehlpaarungen. Diese Fehlpaarung kann durch die Basenfehlpaarungsreparatur (MMR) erkannt und prozessiert werden, wobei die Reparatur fehlerhaft ist und zum Tod der Zelle durch Apoptose führt (Ochs and Kaina, 2000). Mutationen in Genen, welche die MMR-Proteine kodieren, sind für eine Form des Dickdarmkrebs verantwortlich, die als „hereditary non-polyposis colon cancer“ (HNPCC) bekannt ist. Zusätzlich ist bekannt, daß eine Änderung der Expression von MMR-Proteinen mit der Entstehung des Toleranz-Phänotyps assoziiert ist, der bei Tumorzellen Resistenz gegenüber methylierenden Krebs-Chemotherapeutika (Zytostatika) vermittelt (Karran and Bignami, 1992; Dosch *et al.*, 1998). Die Bedeutung der MMR für die Tumorgenese und die Tumorthherapie durch Zytostatika verdeutlicht, daß die Erforschung der Regulation der MMR wichtige Erkenntnisse liefern kann, die sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der anwendungsorientierten Forschung von Bedeutung sein können. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und auf welche Weise die MMR durch Behandlung von Zellen mit mutagenen Agenzien reguliert wird.

4.1.1.1 Behandlung von Zellen mit O⁶-MeG-generierenden Verbindungen, nicht aber mit anderen mutagenen Agenzien führt zu einer Zunahme der nukleären MSH2-Proteinmenge

Bisher war über die Regulation der MMR nur sehr wenig bekannt. Man wußte lediglich, daß sie mit dem Zellzyklus assoziiert ist (Marra *et al.*, 1996) und daß Behandlung von Zellen mit Doxorubicin zur Steigerung der MSH2 und MSH6-Proteinmenge führt (Belloni *et al.*, 1999). Da die MMR auch bei der Reparatur von Fehlpaarungen, die durch alkylierende Agenzien in der DNA induziert werden, beteiligt ist, haben wir uns in unseren Untersuchungen über eine mögliche mutageninduzierte Regulation der MMR auf diese Agenzien konzentriert. Wir haben die Expression des MMR-Proteins MSH2 in humanen HeLa-MR-Zellen nach einer Behandlung mit den alkylierenden Mutagenen ENU, MNU, MMS und MNNG sowie mit Melphalan, UV-Strahlung und γ -Strahlung untersucht. Wir stellten hierbei fest, daß es nur nach Behandlung mit den alkylierenden Agenzien ENU, MNU und MNNG zu einer Steigerung der nukleären MSH2-Proteinmenge kommt. Behandlung mit MMS wie auch mit nicht alkylierenden Agenzien (UV-Strahlung, Melphalan und γ -Strahlung) bewirkte hingegen keine Änderung der MSH2-Expression. Es handelt sich bei der induzierten Zunahme der MSH2-Proteinmenge dementsprechend um einen hochspezifischen Prozeß, der offenbar nur auf alkylierende Agenzien beschränkt ist. Die Unterschiede im erzeugten DNA-Methylierungsspektrum zwischen den Alkylantien MNNG und MNU auf der einen und MMS auf der anderen Seite liefern Hinweise darauf, daß O⁶-MeG bei der Zunahme der MSH2-Proteinmenge eine entscheidende Rolle spielt, denn diese Läsion wird effizient von MNNG und MNU nicht aber von MMS gebildet (Beranek, 1990). Für die Beteiligung von O⁶-MeG spricht auch die Tatsache, daß ein weiteres zur Chemotherapie verwendetes O⁶-Methylguanin-generierendes Agens, Streptozotozin, eine Zunahme der nukleären MSH2-Proteinmenge bewirkt. Daß auch die Behandlung mit ENU zu einer Steigerung der nukleären MSH2-Proteinmenge führt, läßt vermuten, daß auch das von ENU gebildete O⁶-Ethyl-Guanin (O⁶-EtG) eine wichtige Rolle bei der Regulation der MMR spielt. Im Gegensatz zu O⁶-MeG konnte für O⁶-EtG bis jetzt noch keine Bindung von MutS α an diese Läsion nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß ENU zu einer Steigerung der MSH2-Proteinmenge führt, deutet jedoch auf solch eine Interaktion hin.

4.1.1.2 Ursachen der nukleären MSH2-Zunahme

Die Zunahme der nukleären MSH2-Proteinmenge kann theoretisch durch eine Vielzahl von Mechanismen gesteuert werden. Denkbare Möglichkeiten wären hierbei eine gesteigerte MSH2-Promotoraktivität, erhöhte Halbwertszeit der mRNA, verstärkte Translation und post-translationale Modifikationen. Einen Hinweis auf die Art der Regulation könnte die Zeitspanne liefern, die zwischen der Behandlung mit MNNG und der Steigerung der MSH2-Proteinmenge liegt. Western-Blot-Analysen zeigten, daß die Zunahme der MSH2-Proteinmenge schon 30 min nach Behandlung mit MNNG zu beobachten ist. Diese schnelle Expressionssteigerung deutet darauf hin, daß die MSH2-Proteinzunahme nicht über eine gesteigerte Promotoraktivität erfolgt, da die Zeit bis zum Erscheinen der erhöhten Proteinmenge zu kurz wäre, um die Neusynthese des Proteins zu ermöglichen. Selbst sehr schnellen Antworten der Zellen auf Mutagen-Exposition („immediate early response“), wie die UV-induzierten Zunahme der *jun* und *fos*-mRNA erfolgt erst nach 30 min, die korrespondierende Proteine werden erst nach noch längeren Zeiten gebildet (Dosch and Kaina, 1996). Um eine mögliche Involvierung der MSH2-Promotoraktivierung direkt zu überprüfen, wurde die Aktivität des MSH2-Promotors in nichtbehandelten Zellen und in mit Mutagenen behandelten HeLa-MR-Zellen gemessen. Die Versuche zeigten, daß die Aktivität des MSH2-Promotors durch Behandlung der Zellen (nach Transfektion mit dem MSH2-Promotor-CAT-Konstrukt) mit MNNG, MNU und ENU nicht gesteigert werden kann. Die Behandlung mit diesen alkylierenden Agenzien führt dementsprechend nicht zu einer Induktion des MSH2-Promotors. Eine weitere Möglichkeit, die Steigerung der MSH2-Proteinmenge zu erklären, ist die Annahme, daß es durch Behandlung der Zellen mit MNNG zu einer Stabilisierung der mRNA kommt. Dies würde die Translationsrate verstärken und damit auch die MSH2-Proteinmenge erhöhen. Northern-Blot-Analysen zeigten jedoch, daß Behandlung von Zellen mit MNNG nicht zu einer Zunahme der MSH2-mRNA-Menge führt. Da die Behandlung mit MNNG zu einer Steigerung der MSH2-Proteinmenge führte, lag es nahe zu vermuten, daß diese Zunahme auf einer Protein *de novo* Synthese beruht. Um dies zu überprüfen, wurden Versuche mit den Translationsinhibitoren Cycloheximid und Anisomycin durchgeführt. Entgegen der ursprünglichen Annahme zeigte sich, daß es auch in Zellen, in denen die Proteinbiosynthese blockiert war, nach der Behandlung mit MNNG zu einer deutlichen Steigerung der MSH2-Proteinmenge kommt. Die Zunahme der MSH2-Proteinmenge muß dementsprechend auf einen post-translationalen Mechanismus beruhen. Aus der Tatsache,

daß für alle Versuche nur Kernextrakte eingesetzt wurden, ergibt sich die theoretische Möglichkeit, daß die beobachtete Zunahme des MSH2-Proteins auf einer Änderung der intrazellulären Verteilung des Proteins beruht. Versuche, bei denen parallel cytoplasmatische und nukleäre Proteinextrakte zur Western-Blot-Analyse eingesetzt wurden, zeigten, daß es parallel zur Steigerung der MSH2-Proteinmenge im Zellkern zu einer Reduktion im Cytoplasma kommt. Diese Änderung der intrazellulären Verteilung des MSH2-Proteins kann nur mit einer Translokation des Proteins aus dem Cytoplasma in den Zellkern erklärt werden.

4.1.1.3 Assoziation der nukleären Translokation von MSH2 und MSH6

Es stellte sich nun die Frage, wie diese nukleäre Translokation des MSH2-Proteins aus dem Cytoplasma in den Zellkern gesteuert wird. Der Transport von Proteinen in den Kern ist grundsätzlich von der Größe des Proteins abhängig. Proteine mit einer Größe bis zu 50 kDa können über Diffusion durch die Kernporen in und aus dem Zellkern gelangen. Größere Proteinen (> 50 kDa) können nicht frei durch die Kernporen in den Zellkern diffundieren, sie werden vielmehr aktiv und ATP-abhängig über verschiedenen Transporterproteine in den Zellkern transportiert (siehe Kapitel 1.4). Für diesen aktiven Kerntransport ist das Vorhandensein eines Kernsignals (NLS., „nuclear localization signal“) entscheidend, an welches die Transporterproteine binden.

Bei der Suche nach Kernlokalisationssequenzen zeigte sich, daß MSH2 das einzige der an der MMR beteiligten Proteine ist, welches keine NLS besitzt. Bei allen anderen an der MMR beteiligten Proteine konnten NLS-Sequenzen identifiziert werden. Da MSH2 mit einer Größe von 102 kDa viel zu groß ist, um durch Diffusion in den Kern zu gelangen, stellte sich die Frage, wie MSH2 ohne eigenen NLS-vermittelten Transport in den Kern gelangt. Wie bekannt ist, bilden MSH2 und MSH6 als Dimer den MutS α Komplex. Es ist somit möglich, daß MSH2 als Komplex mit MSH6 in den Kern gelangt. Da keine Daten darüber existieren, ob die Komplexbildung von MSH2 und MSH6 im Kern oder im Cytoplasma erfolgt, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Es zeigte sich hierbei, daß MSH2 und MSH6 sowohl im Cytoplasma als auch im Kern coimmunpräzipitiert werden. Dies zeigt, daß die Bildung des MutS α -Komplexes bereits im Cytoplasma erfolgt. Offenbar wird der gesamte MutS α -Komplex in den Zellkern transloziert. Die nukleäre Translokation von MSH2 in den Kern dürfte dementsprechend in MSH6-defizienten Zellen nicht erfolgen. Dies konnte in Experimenten mit MSH6-defizienten DLD1-Zellen

tatsächlich bestätigt werden: Weder MSH2 noch MLH1 oder PMS2 reichert sich in diesen Zellen nach MNNG-Behandlung im Kern an. Dieses Ergebnis zeigt, daß MSH2 ohne seinen Partner MSH6 nicht effektiv in den Kern gelangen kann. Die geringe Menge an MSH2, die noch im Kern detektierbar war, könnte eventuell an MSH3 gebunden (in Form des MutS β Komplexes) in den Zellkern transportiert werden, da auch MSH3 über NLS-Signale verfügt. Da jedoch MNNG keine nukleäre Translokation des MutS β Komplexes induziert, ist es wahrscheinlich, daß die Regulation der nukleären Translokation von MSH2 über MSH6 erfolgt. Der Unterschied in der Fähigkeit zur MNNG-induzierten nukleären Translokation zwischen MutS α und MutS β weist darauf hin, daß die Fähigkeit des Proteinkomplexes zur Bindung an Basenfehlpaarungen eine Rolle bei der Translokation spielt. Tatsächlich ist diese Fähigkeit nur bei MutS α , nicht aber bei MutS β vorhanden.

4.1.1.4 Rolle von O⁶-MeG bei der nukleären Translokation von MutS α

Die Tatsache, daß insbesondere O⁶-MeG-generierende Agenzien eine nukleäre Translokation von MutS α induzieren, impliziert eine entscheidende Rolle dieser Läsion bei der Regulation der nukleären Translokation von MutS α . Wie bereits erwähnt, führt die Methylierung der O⁶-Position des Guanins zur Bildung von O⁶-Methylguanin (O⁶-MeG). Diese Methylgruppe kann durch ein spezielles Reparaturenzym, der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) wieder entfernt werden. Die Menge an entstehendem O⁶-MeG ist somit vom MGMT-Status der Zelle abhängig. Erfolgt keine Reparatur von O⁶-MeG, so kommt es zur Bildung von O⁶-MeGT Basenfehlpaarungen, die durch die Basenfehlpaarungsreparatur (MMR) erkannt und prozessiert werden.

Um die Rolle der O⁶-MeG-Läsion bei der nukleären Translokation von MutS α zu analysieren, kann man überlegen, was passieren würde, wenn trotz der gleichen MNNG-Konzentration, die zur Induktion der Translokation verwendet wird, die Menge von O⁶-MeG-Läsionen variiert. Diese experimentelle Situation kann durch Verwendung von Zelllinien, die sich hinsichtlich ihres MGMT-Status voneinander unterscheiden, erreicht werden. HeLa-MR-Zellen, die zunächst in der vorliegenden Arbeit für fast alle Versuche verwendet wurden, sind defizient für MGMT; sie weisen dementsprechend wesentlich mehr O⁶-MeG-Läsionen auf als HeLa-S3-Zellen, die MGMT-profizient sind (450 fmol/mg). Bei diesen Zellen ist die nukleäre Translokation von MutS α erst nach einer Behandlung mit höheren Konzentrationen (25 μ M) an MNNG zu beobachten als in HeLa-

MR-Zellen. Werden diese Zellen jedoch mit dem Basenanalogen O⁶-Benzylguanin vorinkubiert, daß die MGMT spezifisch hemmt, so kommt es in diese Zellen schon nach einer Behandlung mit einer weitaus geringeren MNNG-Konzentration (0,5 µM) zur MutSα-Translokation. Der selbe Effekt konnte auch auf der Ebene der GT-Bindung beobachtet werden. Um diese Ergebnisse zu unterstützen, wurden MGMT-defiziente HeLa-MR-Zellen mit der humanen MGMT-cDNA transfiziert. Exposition der so entstandenen MGMT-profizienten HeLa-MR-hMGMT Zellen mit MNNG zeigte, daß die nukleäre Translokation von MutSα durch die Transfektion von MGMT verhindert wird. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß es durch die Behandlung mit O⁶-MeG-generierenden Agenzien zu einer Bildung von O⁶-MeG-Läsionen in der DNA kommt, welche als Basenpaar O⁶-MeGC und O⁶-MeGT von MutSα erkannt werden. Die Bindung von MutSα an diese Basenpaarungen bewirkt offenbar über einen noch nicht bekannten Mechanismus die nukleäre Translokation von MutSα.

4.1.1.5 Relevanz der nukleären Translokation von MutSα

Es stellte sich nun die Frage, ob die in HeLa-MR-Zellen nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien beobachtete nukleäre Translokation von MutSα für die Zelle selbst von Bedeutung ist. Um die Relevanz abschätzen zu können, müssen mehrere Parameter beachtet werden. Ein sehr wichtiger Faktor ist die Konzentration des eingesetzten Mutagens. Es ist entscheidend, ob die Konzentration, bei der die Zunahme des MSH2-Proteins erfolgt, für die Zellen noch im nicht-toxischem Bereich liegt. Dosis-Wirkungskurven zeigten, daß die Zunahme der MSH2-Proteinmenge schon bei einer Konzentration von 0,5 µM MNNG zu beobachten ist. In diesem Bereich waren im Koloniebildungstest zwar schon zytotoxische Wirkungen zu beobachten, in Massenkulturen führte die Behandlung mit dieser Dosis jedoch nicht zu einer Beeinträchtigung des Wachstums der Kultur. Dies zeigt, daß die MNNG-Konzentrationen, die zur Steigerung der nukleären MSH2-Proteinmenge benötigt werden, durchaus im „physiologischen“ Bereich liegen.

Für die Relevanz der nukleären Translokation von MutSα ist auch entscheidend, ob es zu einer Erhöhung der MMR an sich kommt. Wie bereits erwähnt, stellt die Bindung des MutSα-Komplexes an eine Basenfehlpaarung den initialen Schritt der MMR dar. GT-Bindungsstudien zeigten, daß Behandlung von Zellen mit MNNG nicht nur zur Steigerung der MSH2- und MSH6-Proteinmenge führt, sondern daß auch die GT-Bindungsaktivität erhöht wird. Die Untersuchung der Expression weiterer MMR-Proteine zeigte, daß es auch

zu einer nukleären Translokation von PMS2 und zu einer nukleären Anreicherung von MLH1 kommt. Nach Behandlung von Zellen mit MNNG kommt es offenbar zu einer Zunahme der nukleären Proteinmenge aller MMR-Proteine und zu einer Steigerung ihrer GT-Bindungsfähigkeit. Dies läßt vermuten, daß es auch zu einer Steigerung der Effizienz der MMR kommt. Eine derartige Reparatursteigerung hätte direkte Auswirkung auf das Überleben der Zellen. Ob die MMR-Aktivität tatsächlich durch MNNG-Vorbehandlung erhöht ist, konnte experimentell im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Verbreitung der nukleären Translokation von MutS α in der Natur. Wenn es sich bei der nukleären Translokation von MutS α nur um einen zelltypspezifischen Mechanismus handeln würde, wäre eine Relevanz für den Organismus möglicherweise nicht gegeben. Die Untersuchung verschiedener Zelltypen aus unterschiedlichen Spezies zeigte jedoch, daß die nukleäre Translokation von MSH2 aus dem Cytoplasma in den Kern nicht auf HeLa-Zellen beschränkt ist. Auch in Zelllinien der Maus und der Ratte konnte eine nukleäre Translokation von MSH2 beobachtet werden. Obwohl die nukleäre Translokation von MutS α nicht in unterschiedlichen Geweben und Organen untersucht wurde, so kann doch davon ausgegangen werden, daß sie ein generelles Phänomen der Antwort von Zellen auf gentoxischen Streß darstellt.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen gefolgert werden, daß die nukleäre Translokation von MutS α bei „physiologischen“ Konzentrationen von MNNG erfolgt, daß nicht nur die Menge der MMR-Proteine (MSH2, MSH6, PMS2 und MLH1), sondern auch zumindest der erste Schritt der MMR, die Bindung des MutS α -Komplexes an die Fehlpaarung, durch die Behandlung mit MNNG gesteigert wird und daß die nukleäre Translokation von MutS α in Zellen unterschiedlicher Spezies erfolgt. All dies weist daraufhin, daß die nukleäre Translokation von MutS α nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien auch für den Organismus von Relevanz ist. Die Tatsache, daß auch das Chemotherapeutikum Streptozotozin eine Induktion der nukleären Translokation von MSH2 bewirkt, zeigt, daß die nukleäre Translokation von MutS α klinische Relevanz besitzt. Die nukleäre MutS α -Translokation könnte daher auch ein Mechanismus sein, der den Erfolg einer Chemotherapie beeinflussen kann.

4.1.1.6 Zelluläre Konsequenzen der nukleären Translokation von MutS α

Welche Konsequenz hat die nukleäre Translokation von MutS α auf das Überleben der Zelle und die Prävention von Mutationen? Da in den Zellen nach einer Behandlung mit O⁶-

MeG-generierenden Agenzien sowohl eine nukleäre Zunahme der MMR-Proteine (MSH2, MSH6, PMS2 und MLH1) als auch eine Erhöhung der Bindung an GT-Fehlpaarungen zu beobachten war, kann man annehmen, daß auch die MMR-Aktivität gesteigert wird. Diese gesteigerte MMR-Kapazität könnte für die Zelle sowohl protektive als auch entgegengesetzte toxische Effekte haben, abhängig davon, ob GT und O⁶-MeGT Fehlpaarungen prozessiert werden.

Im Normalfall stellen GT-Fehlpaarungen das natürliche Substrat der MMR dar. Diese GT-Fehlpaarungen entstehen entweder durch fehlerhaften Einbau von Nukleotiden durch eine DNA-Polymerase oder es kommt zu spontaner Desaminierung der exozyklischen Aminogruppen, wobei aus 5-Methylcytosin die Base Thymin entsteht (Duncan and Miller, 1980; Brown *et al.*, 1987). Diese Läsionen werden von der MMR fehlerfrei repariert, wodurch eine gesteigerte MMR-Kapazität zur Verhinderung von Mutationen führen würde. Durch die Exposition von Zellen mit O⁶-MeG-generierenden Agenzien, kommt es zur Bildung von O⁶-MeGC Basenfehlpaarungen. Da O⁶-MeG effizienter mit Thymin statt mit Cytosin paart, kommt es während der nachfolgenden Replikationsrunde zur Bildung von O⁶-MeGT Fehlpaarungen. Die Tatsache, daß die nukleäre Translokation von MutS α schon 30 min nach der Exposition mit den O⁶-MeG-generierenden Agenzien nachweisbar ist, zeigt, daß die Translokation höchstwahrscheinlich durch die Bindung an O⁶-MeGC Fehlpaarungen ausgelöst wird. Es kommt also schon vor der Bildung der prämutagenen Läsion O⁶-MeGT zu einer Anreicherung der MMR-Proteine im Zellkern und hierdurch zu einer Aktivierung der MMR-Kapazität. Zum Zeitpunkt der Bildung von O⁶-MeGT-Läsionen wäre die MMR-Kapazität dementsprechend schon erhöht und würde über fehlerhafte Reparatur dieser Läsion und hierdurch ausgelöste Apoptose zum Tod der Zelle führen (Ochs and Kaina, 2000). Die Elimination von geschädigten Zellen würde zur Verhinderung von Mutationen führen, was bedeuten würde, daß die Induktion der MMR ein protektiver Mechanismus für den Gesamtorganismus darstellen würde.

4.1.7 Modelle der nukleären Translokation von MutS α

Um den Mechanismus, über den MutS α in den Zellkern transloziert wird, zu erklären, kann man sich prinzipiell zwei Modelle vorstellen. Beide Modelle gehen davon aus, daß O⁶-MeG-Läsionen die nukleäre Translokation von MutS α einleiten. Die DNA-Läsionen könnten über einen modifikationsabhängigen oder modifikationsunabhängigen Mechanismus zur Translokation von MutS α führen. Bei dem modifikationsunabhängigen

Mechanismus könnte davon ausgegangen werden, daß durch den NLS-vermittelten Import in den Zellkern und dem NES-vermittelten Export aus dem Zellkern ein Gleichgewicht zwischen nukleärer und cytoplasmatischer MutS α -Menge aufgebaut wird. O⁶-MeG-Läsionen würden zur Bildung von O⁶-MeGC und O⁶-MeGT Basenpaarungen führen, an die MutS α bindet. Hierdurch könnte es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen cytoplasmatischem und nukleärem MutS α kommen. Dieses Äquilibrium zwischen freiem MutS α im Kern und im Cytoplasma würde durch die Translokation von MutS α aus dem Cytoplasma in den Kern wieder ausgeglichen (Abb.4.1.1). Die erhöhte Menge an MutS α im Kern nach Behandlung von Zellen mit MNNG würde somit aus freiem MutS α und dem an O⁶-MeGC oder O⁶-MeGT Basenpaarungen gebundenem MutS α bestehen. Wie es zur Einstellung dieses Gleichgewichts kommt ist allerdings schwer vorstellbar. Eventuell spielen hierbei auch Stabilisierungsvorgänge der Proteine eine Rolle. Es könnte sein, daß freies MutS α im Kern einem proteolytischen Abbau unterliegt, während an O⁶-MeGC und O⁶-MeGT gebundenes MutS α stabilisiert wird.

Bei der Modellvorstellung eines modifikationsabhängigen Mechanismus der nukleären MutS α -Translokation würde die O⁶-MeG-Läsion zu einer post-translationalen Modifikation der beteiligten Proteine führen. Die Modifikationen könnten bei cytoplasmatischem MSH6 im Bereich der Kernsignale zu Konformationsänderungen führen, durch die diese Stellen aktiviert werden und somit die Translokation ermöglichen (Fig.4.1.2). Es könnte auch sein, daß diese Modifikationen nötig für die Assoziation des MutS α -Komplexes sind oder die Bindung an potentielle „Carrier“-Proteine ermöglichen. In jedem Fall müßte angenommen werden, daß Proteine existieren, die O⁶-MeG-Läsionen erkennen und ihrerseits weitere Proteine wie Proteinkinasen, Glykosylasen oder Ribosylasen aktivieren. Die post-translationalen Modifikation könnte jedoch auch den nukleären MutS α -Komplex betreffen. Hier könnten die Modifikationen im Bereich der NES erfolgen und somit zu Konformationsänderungen führen, durch die der Austritt von MutS α aus dem Zellkern verhindert wird (Fig.4.1.3). Die Beobachtung, daß MSH2 post-translational modifiziert wird spricht dafür, daß der nukleäre Transport von MutS α über einen modifikationsabhängigen Mechanismus erfolgt (siehe Kapitel 4.1.2).

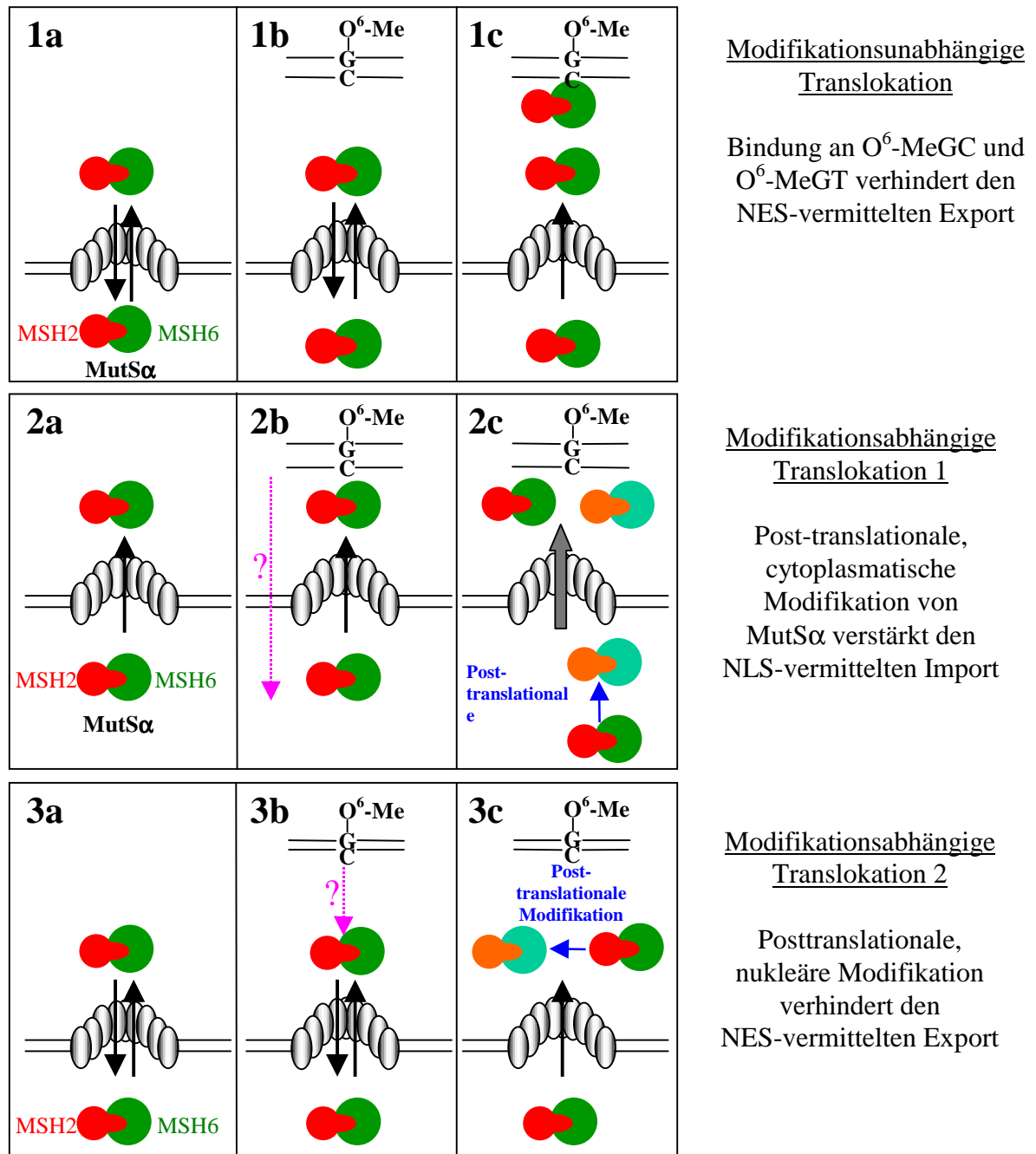


Abb.4.1 Modelle der nukleären Translokation von MutSα

Bildteil 1: Bei der modifikationsunabhängigen Translokation kommt es durch die Bildung von MutSα an O⁶-MeGC und O⁶-MeGT Basenfehlpaarungen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen cytoplasmatischem und nukleärem MutSα. Gebundenes MutSα kann nicht aus dem Kern in das Cytoplasma gelangen. Durch weiterhin in den Kern translozierendes MutSα kommt es zur Erhöhung der nukleären Menge an MutSα.

Bildteil 2 und 3: Bei der modifikationsabhängigen Translokation von MutSα gehen von der O⁶-MeG-Läsion Signale aus, die zu einer post-translationalen Modifikation der beteiligten Proteine (MSH2 und/oder MSH6) führen. Diese Modifikationen können im Bereich der NLS liegen und den Transport in den Zellkern verstärken (2a-c), oder sie können im Bereich der NES liegen und den Transport aus dem Zellkern hinaus verhindern (3a-c), wodurch es ebenfalls zu einer Anreicherung von MutSα kommen würde.

4.1.2 Phosphorylierung der MMR-Proteine MSH2 und MSH6 ist mit der Stärke der GT-Fehlpaarungsbildung assoziiert

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß Behandlung von Zellen mit O⁶MeG-generierenden Agenzien zu einer Translokation von MutS α aus dem Cytoplasma in den Zellkern führt. Diese Translokation muß über einen NLS-vermittelten Transport erfolgen, da MutS α und auch die einzelnen Proteine MSH2 und MSH6 zu groß sind, um passiv in den Zellkern zu gelangen. Zur Erklärung der nukleären Translokation wurde unter anderem ein Modell diskutiert, welches auf einer post-translationalen Modifikation von MutS α beruht (Kapitel 4.1.7).

Zu den post-translationalen Modifikationen, die bekannterweise für die nukleäre Translokation wichtig sind, gehören vor allem Phosphorylierungen. Um Hinweise zu finden, ob auch die Translokation von MutS α auf Phosphorylierung beruht, wurde die Phosphorylierung der MMR-Proteine MSH2 und MSH6 genauer untersucht. Da Computeranalysen zeigten, daß MSH2 und MSH6 potentielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC) und die Casein Kinase II (CK2) besitzen, wurden diese beiden Proteinkinasen für *in vitro* Phosphorylierungsversuchen eingesetzt. Hierbei zeigte sich, daß die Proteine MSH2 und MSH6 durch die PKC und die CKII, nicht aber durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert werden. Eine Phosphorylierung von MSH2 und MSH6 konnte auch in Zellen beobachtet werden, wobei die Phosphorylierung von MSH6 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stärker als die Phosphorylierung von MSH2 war. Dies könnte darauf hinweisen, daß die Modifikationen, die mit der nukleären Translokation von MutS α assoziiert sind, an MSH6 erfolgen, was auch mit der Tatsache vereinbar sein würde, daß MSH6 der Träger der NLS-Signalsequenz ist. Eine Induktion der Phosphorylierung von MSH2 und MSH6 nach Behandlung mit MNNG konnte nur in einem unserer Versuchen nachgewiesen werden. Zwei weitere Versuche zeigten keine Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von MSH2 und MSH6. Da nach Behandlung von Zellen mit MNNG keine eindeutige Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von MutS α nachgewiesen werden konnte, kann geschlußfolgert werden, daß die Phosphorylierung von MSH2 und MSH6 nicht die direkte Ursache der nukleären Translokation von MutS α ist. Zusätzlich zeigten Versuche mit verschiedenen Hemmstoffen (H7, Quercetin, Wortmannin und Genistein), daß die Hemmung der Proteinkinasen PKC, PKA und CK2 keinen Einfluß auf die MutS α -Translokation hat.

Der Phosphorylierungsstatus von MutS α scheint jedoch indirekt für die Translokation entscheidend zu sein. Es zeigte sich nämlich, daß in Zellen, die in phosphatfreiem Medium kultiviert wurden, keine nukleäre Translokation von MutS α mehr auftrat. Die Verhinderung der nukleären Translokation von MutS α beruht wahrscheinlich nicht auf dem Effekt des Zellteilungsstops, der durch den Phosphatmangel erzeugt wird, da Serumentzug ebenfalls zu einem Teilungsstopp führt, nicht aber die Translokation verhindert. Offenbar muß es einen Unterschied zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem MutS α geben, der Einfluß auf die Translokation hat. Eine Möglichkeit wäre, daß die Phosphorylierung von MSH2 und MSH6 einen Einfluß auf die Komplexbildung von MutS α ausübt. Diese Möglichkeit kann jedoch ausgeschlossen werden, da sowohl in den Extrakten von phosphatdepletierten Zellen als auch in den Kontrollzellen dieselbe Menge von coimmunpräzipitiertem MutS α zu erkennen war.

Eine weitere Möglichkeit beruht darin, daß die Phosphorylierung von MutS α eine Rolle bei der Effektivität der Bindung an Basenfehlpaarungen spielt. Mehrere unterschiedliche Versuche zeigten in der Tat, daß der Phosphorylierungsstatus mit der Fähigkeit zur GT-Bindung korreliert. Zum einen konnte in phosphatdepletierten Zellen keine GT-Bindungsaktivität mehr festgestellt werden, zum anderen zeigten Versuche, daß die GT-Bindungsaktivität von Proteinextrakten durch Behandlung mit Phosphatasen oder Proteinkinase moduliert werden kann. Die Behandlung von Proteinextrakten mit Phosphatasen zeigte, daß dephosphorylierte Extrakte keine Fähigkeit mehr zur Bindung an GT-Fehlpaarungen besitzen. Da Dephosphorylierung von MutS α zur Reduktion der GT-Bindungsaktivität führt, wäre zu erwarten, daß eine Hyperphosphorylierung zur Erhöhung der GT-Bindungsaktivität führt. In weiteren Versuchen zeigte sich jedoch, daß auch die *in vitro* Phosphorylierung durch PKC und CK2 die GT-Bindungsaktivität von MutS α verhindert. Dieses Ergebnis kann nur dadurch erklärt werden, daß es durch die *in vitro* Phosphorylierung zur unphysiologischen Hyperphosphorylierung von MutS α kommt. Der Phosphorylierungsstatus hat also eine signifikante Bedeutung für die GT-Bindungsaktivität, wobei nicht phosphoryliertes oder unphysiologisch hyperphosphoryliertes MutS α *in vitro* nicht effektiv an GT-Fehlpaarungen bindet. Es sollte hier auch erwähnt werden, daß es bei den Gelretardationsversuchen mit hyperphosphorylierten Extrakten nicht zu einer Interferenz zu der bekannten Abhängigkeit der GT-Bindung vom ATP-Status kommt. Es ist bekannt, daß die Bindung von MutS α an GT-Fehlpaarungen abhängig von der Bindung und Hydrolyse von ATP durch MutS α

erfolgt (Alani *et al.*, 1997; Iccarino *et al.*, 1998; Kapitel 1.3.2.6). Um die natürliche ATP-Menge in den Extrakten nicht zu verändern, wurde deshalb während der Phosphorylierungsreaktion *in vitro* (im Gegensatz zu den beschriebenen Methoden) kein externes ATP zugesetzt.

Durch die vorliegenden Untersuchungen steht fest, daß eine Phosphorylierung von MSH2 und MSH6 erfolgt. Ob und wie diese jedoch mit der Translokation von MutS α assoziiert ist, kann nicht abschließend beantwortet werden. Die Behandlung von Zellen mit MNNG führt in einem der gezeigten Experimente nicht zu einer Änderung des Phosphorylierungsstatus, in einem weiteren Experiment konnte jedoch eine geringe Erhöhung des Phosphorylierungsstatus durch Behandlung der Zellen mit MNNG beobachtet werden. Es ist durchaus denkbar, daß die Phosphorylierung von MSH2 und/oder MSH6 unterschiedliche Mechanismen steuert. So könnte die starke konstitutive Phosphorylierung für die GT-Bindungsaktivität verantwortlich sein, was durch die Versuche mit phosphatdepletierten Zellen und den Gelretardationsexperimenten unterstützt wird. Eine O⁶-MeG-induzierte zusätzliche Phosphorylierung von MutS α könnte die Translokation verstärken, wobei diese Phosphorylierung aufgrund der hohen Basalphosphorylierung eventuell nur schwer detektierbar ist. Die Phosphorylierung könnte von einer bislang unbekanntem Proteinkinase durchgeführt werden, was die negativen Ergebnisse der Versuche mit den verwendeten Proteinkinaseinhibitoren erklären könnte.

Eine andere Möglichkeit, die Rolle der Phosphorylierung zu erklären, besteht in der Annahme, daß die Bindung von MutS α an O⁶-MeGC oder O⁶-MeGT Fehlpaarungen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen cytoplasmatischem und nukleärem MutS α führt. Hierbei muß angenommen werden, daß MutS α über NLS- und NES-vermittelten Transport zwischen Cytoplasma und Zellkern hin und her wandert. Im Falle der Bindung an die Fehlpaarung wäre der Ausstrom von MutS α aus dem Kern verhindert und das einströmende MutS α würde passiv zur Erhöhung der nukleären Proteinmenge führen. Die Phosphorylierung von MutS α wäre in diesem Fall somit lediglich für die GT-Bindungsaktivität verantwortlich, die nukleäre Translokation wäre eine „passive“ Folge der erhöhten GT-Bindung. Eine unphysiologisch starke Phosphorylierung oder das Fehlen der Phosphorylierung könnte zur Verhinderung der GT-Bindung und damit auch zur Verhinderung der Translokation führen. Um zwischen diesen aufgeführten Möglichkeiten unterscheiden zu können, sind weitere Versuche unerlässlich.

4.2 Rolle von MMR-Proteinen und MGMT bei der Resistenzentwicklung von Melanomzellen

Der zweite Teil der Arbeit befaßt sich mit der Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber einer Behandlung mit unterschiedlichen Zytostatika. Das Thema hat insofern Bezug zur Thematik der MMR als bekannt ist, daß Defekte in der MMR die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber bestimmten Zytostatika beeinflussen können. Dies ist vor allem bei dem „Toleranz-Phänotyp“ der Fall, bei welchem über eine Verminderung der MMR-Aktivität Resistenz gegenüber O⁶-MeG-generierenden Agenzien vermittelt wird (Goldmacher *et al.*, 1986; Dosch *et al.*, 1998).

Die Entstehung von Resistenzen gegenüber Zytostatika stellt eines der größten Probleme bei der Behandlung von malignen Tumoren dar. Besonders Melanomzellen sind bekannt für ihre Resistenz gegenüber einer Chemotherapie; nur 30% der Tumore können chemotherapeutisch behandelt werden (Ho und Sober, 1990). Als Testsystem zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Resistenzentstehung dienten mehrere Melanomzelllinien, die durch chronische Exposition unterschiedlicher Zytostatika Resistenzen gegenüber den entsprechenden Agenzien entwickelt haben (Kern *et al.*, 1997). Die dabei verwendeten Zytostatika, ihre Wirkung und Hauptindikationen sind in Tab.4.1 dargestellt.

Tab.4.1 Verwendete Zytostatika, Wirkungsweise und Hauptindikation

Zytostatika	Wirkung	Hauptindikation
Cisplatin	-DNA-Quervernetzungen -Alkylierung von RNA und Proteinen -Induktion von Apoptose -Hemmung der DNA-Reparatur	Bronchialkarzinome
Etoposid	-Blockierung der Mitose -Bildung freier Radikale -Induktion von Apoptose -Hemmung des Membrantransports -Hemmung der Topoisomerase II α	Bronchialkarzinome
Fotemustin	-Chloroethylierung von Guanosin in der O ⁶ -Position -Induktion von Apoptose -Hemmung der DNA-Reparatur	maligne Melanome
Vindesin (Desacetyl- vinblastin)	-Hemmung der Tubulinsynthese \Rightarrow Arretierung der Zellen in der Metaphase -Induktion von Apoptose -Stimulation der Adenylatcyclase	Akute Leukämien

Da es sich bei der Resistenzentstehung um einen Prozeß handelt, der maßgeblich von der Wirkungsweise der verwendeten Zytostatika abhängig ist, ist nicht anzunehmen, daß die Ursache der Resistenzentwicklung in allen verwendeten Zelllinien dieselbe ist. Aus diesem Grund wurden mehrere unterschiedliche Systeme untersucht, deren Veränderung die Resistenzbildung bedingen könnte.

4.2.1 Die Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber Cisplatin, Vindesin und Etoposid ist mit einer verminderten MSH2- und MSH6-Expression assoziiert

Zunächst wurde die Beteiligung des MMR-Systems bei der Entstehung von Resistenz gegenüber Zytostatika untersucht. Daß der Toleranz-Phänotyp eine Rolle bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber Zytostatika spielt, konnte bereits für alkylierende Agenzien (Temozolomid und Procarbazin) und Cisplatin gezeigt werden (Fink *et al.*, 1998). Bei der Untersuchung der Expression der MMR-Proteine MSH2, MSH6 und MLH1 zeigte sich in den Zelllinien MeWoEto0,1, MeWoEto1, MeWoCis0,01, MeWoCis1, MeWoVin0,5 und MeWoVin5 eine deutliche Verminderung der Expression der beiden Proteine MSH2 und MSH6 (Abb. 3.21). In Ergänzung hierzu konnte auch gezeigt werden, daß es in den hochresistenten Zellen MeWoCis1 und MeWoEto1 auch zu einer Verminderung der GT-Bindungsaktivität kommt. Diese Verminderung der Expression der MMR-Proteine (MSH2 und MSH6) und der GT-Bindungsaktivität konnte in den Zelllinien MeWoFote4 und MeWoFote40 nicht beobachtet werden. Es ist dementsprechend möglich, daß bei den Etoposid-, Cisplatin- und Vindesin-resistenten Zelllinien die Reduktion der Menge der MMR-Proteine wie auch der GT-Bindungsaktivität eine Rolle bei der Resistenzentwicklung spielt (Lage *et al.*, 1999).

4.2.2 Die Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber Cisplatin, Vindesin, Fotemustin und Etoposid ist mit einer erhöhten MDR1-Expression assoziiert

Ein weiterer Faktor, der bei der Resistenzentwicklung der untersuchten Zellen eine Rolle zu spielen scheint, ist das MDR1 („*multi drug resistance*“) Protein (Schadendorf *et al.*, 1995). Bei dem MDR1-Protein (P170-Glykoprotein) handelt es sich um einen membranständigen Transporter, über den verschiedene hydrophobe Agenzien wie Vinblastin, aus der Zelle herausgeschleust werden (Horio *et al.*, 1988). Auch ist bekannt, daß Behandlung von Zellen mit Vinblastin, Vinchristin und Doxorubicin zu einer Amplifikation des MDR1-Gens führt (Gros *et al.*, 1986b; Roninson *et al.*, 1986; Teeter *et*

al., 1986). Die Expression dieses Proteins war in allen resistenten Zelllinien um den Faktor 2-3 erhöht. Es ist daher anzunehmen, daß die gesteigerte Expression auch einen Anteil an der Resistenzentstehung hat. Es ist allerdings unwahrscheinlich, daß die Erhöhung der MDR1-Proteinmenge für die Resistenzen gegenüber Fotemustin und Cisplatin verantwortlich ist, da es für diese beiden Verbindungen keinen Hinweis darauf gibt, daß sie von dem MDR1-Protein aus der Zelle transportiert werden können. Die Steigerung der MDR1-Expression könnte jedoch bei den Vindesin- und Etoposid-resistenten Zelllinien einen Anteil an der Resistenzentstehung haben.

4.2.3 Die Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber Fotemustin ist mit einer verminderten ERCC1-Expression assoziiert

Es ist bekannt, daß die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Cisplatin mit der Expression des an der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) beteiligten Proteins ERCC1 korreliert (Westerveld *et al.*, 1984). So kommt es in humanen Tumorzellen durch Behandlung mit Cisplatin zu einer Induktion von ERCC1 (Li *et al.*, 1998), und Zellen die eine verringerte Expression der ERCC1 besitzen, zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cisplatin (Li *et al.*, 2000). Bei der Untersuchung der ERCC1-Expression in unserem Zellsystem zeigte sich eine Abnahme der Proteinmenge in den Fotemustin-resistenten Zelllinien (MeWoFote4 und MeWoFote40). Ob die Reduktion der ERCC1-Proteinmenge allerdings die Ursache der Fotemustin-Resistenz ist, kann bezweifelt werden, da durch Fotemustin induzierte Chloroethylierungen nicht durch die NER repariert werden können, und wie nachfolgend gezeigt wurde, das MGMT-Protein entscheidend involviert ist (siehe Kapitel 4.2.4).

4.2.4 Die Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber Etoposid ist mit einer verminderten Topoisomerase II α -Expression assoziiert

Eine Resistenz gegenüber Etoposid kann über die Expressionsänderung der Topoisomerase II α vermittelt werden (Miller *et al.*, 1981), welche vor allem bei Reparaturprozessen während der Rekombination beteiligt ist. Topoisomerase II α bindet an doppelsträngige DNA, schneidet in beiden DNA-Strängen ein und fädelt einen Einzelstrang durch den geschnittenen DNA-Doppelstrang. Anschließend ligiert die Topoisomerase II α den geschnittenen DNA-Doppelstrang (Osheroff *et al.*, 1994). Inhibitoren wie Etoposid verhindern nur die Ligation des DNA-Doppelstrangbruches, nicht aber dessen Entstehung (Liu *et al.*, 1983; Nelson *et al.*, 1984). Inhibition der Topoisomerase II α führt somit zur

Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Dementsprechend führt eine Überexpression der Topoisomerase II α zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber Etoposid (Zhou *et al.*, 1999) und die Expressionsminderung zu einer Resistenz (Spiridonidis *et al.*, 1989). Die Untersuchung der Expression der Topoisomerase II α zeigte, daß es in den Etoposid-resistenten Zelllinien (MeWoEto0,1 und MeWoEto1) zu einer Abnahme der Topoisomerase II α -Proteinmenge kommt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer kürzlich erschienenen Arbeit, die zeigte, daß die Erniedrigung der Topoisomerase II α -Proteinmenge zur Resistenz in den Etoposid-resistenten MeWo-Zellen führt (Lage *et al.*, 2000).

4.2.6 Die Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber Zytostatika beruht nicht auf einer Expressionsänderung von an der Apoptose beteiligter Proteine

Ein weiteres System, welches bei der Entstehung von Zytostatika-Resistenzen verantwortlich sein kann, ist der Ausfall von Proteinen, die beim programmierten Zelltod (Apoptose) eine Rolle spielen (Gallo *et al.*, 1999). Man kann zwei Hauptwege der Apoptose unterscheiden. Bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose kommt es zur Expressionssteigerung des Fas-Rezeptors und des an ihn bindenden Fas-Liganden (Srinivasula *et al.*, 1996). Durch die Aktivierung dieses Systems wird eine Kaskade von nachgeschalteten Caspasen aktiviert, über welche die Apoptose vermittelt wird. Bei der Mitochondrien-vermittelten Apoptose stehen das anti-apoptotische Protein Bcl-2 (Hanada *et al.*, 1995) und das pro-apoptotische Protein Bax (Zhan *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995) im Mittelpunkt. Beide Proteine können miteinander Heterodimere bilden (Thomas *et al.*, 1995), die in der Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Es wird angenommen, daß es bei der Apoptose durch den Abbau des Bcl-2 Proteins zur Bildung von Bax-Homodimeren kommt, welche Poren in der Membran bilden. Durch diese Poren kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C, welches im Komplex mit Apaf-1, Pro-caspase-9 und ATP zur Bildung der aktiven Caspase 9 führt (Li *et al.*, 1997). Diese aktiviert ihrerseits die Caspase-Kaskade, in deren Verlauf die Haupteffektorcaspase (Caspase-3/7) aktiviert werden. Die Untersuchung der basalen Expression der an der Apoptose beteiligten Proteine Bcl-2, Bax und Fas zeigte keine Unterschiede zwischen den MeWo-Zellen und den resistenten Zelllinien. Dies zeigt, daß eine Störung der Apoptose wahrscheinlich nicht mit der Entstehung der Zytostatika-Resistenz assoziiert ist.

4.2.7 Die Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber Fotemustin beruht auf einer Reaktivierung des Reparaturproteins MGMT

Bei Fotemustin handelt es sich um ein Nitrosoharnstoffderivat mit einer Alanin-ähnlichen Aminosäure (1-Amin-Äthylphosphonat) als Seitenkette (Tapiero *et al.*, 1989). In der Zelle kommt es zu einer nicht-enzymatischen Abspaltung des Chlorethyl-Carboniums und zu dessen endgültigen Abbau zu 2-Chlorethyl-Kationen. Die freigesetzte Chlorethylgruppe führt unter anderem zur Chlorethylierung der O⁶-Position des Guanins (Gibson *et al.*, 1985). Diese Läsion wird (vergleichbar zu O⁶-MeG) von der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) repariert, welche hierdurch vor der toxischen und mutagenen Wirkung der chlorethylierenden Agenzien schützt (Becker *et al.*, 1997). Es war deshalb anzunehmen, daß die Fotemustin-Resistenz mit der MGMT assoziiert ist. Untersuchungen der MGMT-Aktivität in den MeWo-Zellen und den resistenten Zelllinien zeigten, daß die MGMT-Aktivität tatsächlich in den Fotemustin resistenten Zelllinien MeWoFote4 und MeWoFote40 stark erhöht war. Diese Zellen zeigen folglich den Mex⁺ Phänotyp im Gegensatz zu der Kontrollzelllinie MeWo und den übrigen resistenten Zelllinien, die keine signifikante MGMT-Aktivität besitzen (Mex⁻). Die Erhöhung der MGMT-Aktivität in den Fotemustin-resistenten Zelllinien ist ein äußerst stabiler Effekt, denn auch wenn die Zellen für mehrere Monate ohne Fotemustin kultiviert wurden, verringerte sich die MGMT-Aktivität in den MeWoFote4 und Fote40-Zellen nur insignifikant. Um zu überprüfen, ob die MGMT-Aktivität für die Resistenz gegenüber Fotemustin verantwortlich ist, wurden Koloniebildungstests nach einer Behandlung der Zellen mit Fotemustin und O⁶-Benzylguanin durchgeführt. Bei O⁶-Benzylguanin handelt es sich um ein Basenanalogen von Guanin, welches irreversibel von der MGMT gebunden wird und diese hierdurch inaktiviert (Pegg *et al.*, 1993). Durch die Vorbehandlung der MeWoFote4 und MeWoFote40-Zellen mit O⁶-Benzylguanin, welche zu einer vollständigen Hemmung der MGMT führt, konnte die Resistenz der Zellen gegenüber Fotemustin signifikant reduziert werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Reaktivierung der MGMT die Ursache für die erworbene Fotemustin-Resistenz in den Melanomzellen ist.

Um herauszufinden, über welchen Mechanismus eine Behandlung der Zellen mit Fotemustin die Reaktivierung der MGMT-Aktivität steuert, wurden unterschiedliche Parameter untersucht. Die Untersuchung der Proteinexpression zeigte, daß nur in den Fotemustin-resistenten, nicht aber in den sensitiven MeWo-Zellen das MGMT-Protein zu detektieren war. Dies spricht dafür, daß die MGMT-Reaktivierung nicht über eine

mutationsbedingte Aktivitätssteigerung der MGMT-Aktivität vermittelt wird. Vielmehr exprimieren die Fotemustin-sensitiven Zellen kein funktionelles MGMT-Protein. Es könnte allerdings sein, daß in diesen Zellen ein mutiertes Protein gebildet wird, welches durch den verwendeten Antikörper nicht erkannt wird und die Reaktivierung der MGMT-Aktivität auf einer Reversion der entsprechenden Mutation beruht. Northern-Blot-Analysen zeigten jedoch, daß es nur in den Fotemustin-resistenten Zellen zur Transkription des Gens und damit zu einer Expression der MGMT-mRNA kommt. In den sensitiven MeWo-Zellen war keine MGMT-mRNA detektierbar, was zeigt, daß die Reaktivierung der MGMT in den Fotemustin-resistenten Zellen nicht auf einer Stabilisierung der mRNA beruht, und daß in den sensitiven MeWo-Zellen auch kein inaktives MGMT-Protein gebildet wird.

Die Regulation der MGMT-Transkription benötigt unterschiedliche transaktivierende Faktoren (Grombacher *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1991), wie das „Enhancer binding protein“ (MEBP., Chen *et al.*, 1997). Eine veränderte Expression dieser Faktoren könnte dementsprechend auch für die veränderte Transkription des MGMT-Gens verantwortlich sein. Ein in die Melanomzellen transfizierter MGMT-Promotor, welcher auch die „Enhancer“-Bindestellen trägt, zeigte jedoch in den sensitiven und den resistenten MeWo-Zelllinien die gleiche Aktivität. Dies zeigt, daß ein Fehlen von transaktivierenden Faktoren sehr wahrscheinlich nicht für die Reaktivierung der MGMT-Expression verantwortlich ist.

Ein weiterer Mechanismus, von dem bekannt ist, daß er zum Anstieg der MGMT-Expression führt ist die Amplifikation des MGMT-Gens (Tano *et al.*, 1997). Southern-Blot-Analysen zeigten nach Verdau der genomischen DNA mit den Restriktionsenzymen MspI oder HindIII keine Änderung des Restriktionsmusters und auch keine unterschiedliche Intensivität der Hybridisierungssignale zwischen der sensitiven und der resistenten MeWo-Zelllinien. Eine Amplifikation des MGMT-Gens kann dementsprechend nicht die Ursache für die Reaktivierung der MGMT-Expression sein.

Die Expression der MGMT wird sehr stark vom Methylierungsstatus des Gens beeinflusst. Methylierungen von Cytosin im kodierenden Bereich der MGMT-cDNA führen hierbei zu einer Aktivierung des MGMT-Gens; Hypermethylierungen im MGMT-Promotor führen hingegen zur Deaktivierung des MGMT-Gens (Fritz and Kaina, 1992; Harris *et al.*, 1991). Es wurde gezeigt, daß der MGMT-Promotor spezifische CpG-Methylierungsstellen enthält, deren Methylierung für die „Abschaltung“ des MGMT-Promotors verantwortlich ist (Harris *et al.*, 1991; Qian and Brent, 1997). Sind diese CpG-Stellen unmethyliert, so kann die Transkriptionsstartstelle von vier präzise positionierten Nukleosomen besetzt werden,

welche eine Transkription ermöglichen. In MGMT-defizienten Zellen kommt es zur Methylierung dieser CpG-Stellen und damit zu einer lokalen Heterochromatinisierung, bei der die Transkriptionsstartstelle von statistisch verteilten Nukleosomen besetzt ist (Patel *et al.*, 1997; Watts *et al.*, 1997). Diese Nukleosomenanordnung verhindert, daß Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase an den Promotor binden können, und schalten hierdurch die MGMT-Expression ab. In unserem Zellsystem zeigten Southern-Blot-Analysen, daß womöglich eines der beiden Allele des MGMT-Promotors hypermethyliert ist. Zur Überprüfung der Relevanz dieser Hypermethylierung wurden die sensitiven MeWo-Zellen mit 5-Azacytidin kultiviert. Bei 5-Azacytidin handelt es sich um ein Nukleosidanalogen, welches anstelle von Cytidin in die DNA inkorporiert wird. Da bei 5-Azacytidin die C⁵-Position durch eine Aza-Gruppe besetzt ist, kann dieses Analogon nicht methyliert werden und führt somit zu einer unspezifischen Demethylierung der genomischen DNA. Da die Behandlung der sensitiven MeWo-Zellen mit 5-Azacytidin nicht zu einer Reaktivierung der MGMT-Aktivität führte, scheint die Hypermethylierung des Promotors in einem der beiden Allele jedoch nicht für die Abschaltung der MGMT-Expression in diesen Zellen verantwortlich zu sein.

Im Gegensatz zu der Methylierung des MGMT-Promotors führt eine Methylierung von Cytosin im kodierenden Bereich des Gens zu einer Aktivierung der MGMT-Aktivität (Wang *et al.*, 1992); eine chronische Behandlung mit 5-Azacytidin führt in diesem Fall zu einer Reduktion der MGMT-mRNA-Expression (Pieper *et al.*, 1991). Southern-Blot-Analysen zeigten, daß es in den Fotemustin-resistenten MeWo-Zellen, nicht aber in den sensitiven MeWo-Zellen, zu einer Hypermethylierung von MspI/HpaII-Stellen innerhalb des kodierenden Bereichs des MGMT-Gens kommt. Diese Hypermethylierung scheint der Grund für die Reaktivierung des MGMT-Gens zu sein, denn die Behandlung der Fotemustin-resistenten MeWo-Zellen mit 5-Azacytidin bewirkte sowohl eine signifikante Reduktion der MGMT-Aktivität als auch eine Reduktion der Fotemustin-Resistenz. Die Verminderung der Fotemustin-Resistenz war in den 5-Azacytidin-behandelten Zellen jedoch nur schwach ausgeprägt. Dies kann damit erklärt werden, daß die MGMT-Aktivität nach der Behandlung mit 5-Azacytidin zwar um bis zu 80% reduziert wurde, aber immer noch vergleichbar mit der MGMT-Aktivität anderen Zelllinien (HeLa-S3) ist. In diesen Zellen ist die MGMT-Aktivität hoch genug um eine Resistenz gegenüber alkylierenden Schäden zu bewirken.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den MeWo-Zellen führen zu dem Schluß, daß Resistenzentwicklung gegenüber unterschiedlichen Zytostatika auf unterschiedlichen Mechanismen beruht. Während bei der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin, Etoposid und Vindesin die Verminderung der MSH2- und MSH6-Expression, die Überexpression von MDR1 und die Verminderung der Topoisomerase II α eine entscheidende Rolle spielen (Lage *et al.*, 1999; Lage *et al.*, 2000), so kommt es in den Fotemustin-resistenten Zellen zu einer Fotemustin-induzierten Reaktivierung des MGMT-Gens, welche auf einer Hypermethylierung des kodierenden Bereichs des MGMT-Gens beruht. Die vorliegenden Daten liefern neue Einsichten in den Mechanismus der Entstehung von Zytostatika-Resistenzen. Da Fotemustin ein Vertreter der chlorethylierenden Agenzien ist, zu denen auch die in der Chemotherapie häufig eingesetzten Substanzen Carmustin (BCNU), Lomustin (CCNU) and Nimustin (ACNU) gehören, könnte die durch chlorethylierende Agenzien induzierte Hypermethylierung des MGMT-Gens und als dessen Folge die Erhöhung der MGMT-Aktivität einen generellen Mechanismus darstellen, über den die Resistenzentstehung in Tumorzellen gegenüber dieser Gruppe von Zytostatika vermittelt wird.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Behandlung von Zellen (HeLa-MR) mit den O⁶-Methylguanin-generierenden Substanzen N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG), N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU) und N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (ENU), nicht aber mit Röntgenstrahlen, UV-Licht und Methylmethansulfonat (MMS), zu einer Steigerung der nukleären MSH2-Proteinmenge und zu einer Zunahme der GT-Bindungsaktivität in nukleären Extrakten führt. Die durch MNNG induzierte Proteinzunahme von MSH2 war schon bei einer Konzentration von 0,5 µM MNNG zu beobachten und erfolgt bereits 30 Minuten nach Mutagenbehandlung. MSH2-Promotor-Analysen und Northern-Blot-Analysen zeigten, daß die Zunahme der nukleären MSH2-Proteinmenge weder auf einer Induktion des MSH2-Promotors noch auf einer Stabilisierung der mRNA beruht. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Zunahme der nukleären MSH2-Proteinmenge nicht auf einer *de novo* Synthese des Proteins sondern auf einer Translokation des MSH2-Proteins aus dem Cytoplasma in den Zellkern beruht. Die Translokation konnte nicht nur in humanen HeLa-MR-Zellen, sondern auch in Ratten- und in Maus-Zelllinien beobachtet werden. Neben der Translokation von MSH2 konnte in humanen HeLa-MR-Zellen auch die MNNG-induzierte Translokation der Proteine MSH6 und PMS2 und eine Steigerung der nukleären MLH1-Proteinmenge nachgewiesen werden. Versuche mit MSH6-defizienten DLD1-Zellen und Coimmunpräzipitationsversuche zeigten, daß der MutS α -Komplex (MSH2 + MSH6) bereits im Cytoplasma gebildet wird, und daß die Translokation von MSH2 nur im Komplex mit MSH6 erfolgt. Durch die Untersuchung von Zelllinien mit unterschiedlichem MGMT-Status konnte gezeigt werden, daß der DNA-Alkylierungsschaden O⁶-Methylguanin (O⁶-MeG) in Form des O⁶-MeGC oder O⁶-MeGT-Basenpaars das initiale Signal für die nukleäre Translokation von MutS α darstellt. Zur Erklärung der nukleären Translokation von MutS α wurden modifikationsabhängige und modifikationsunabhängige Mechanismen diskutiert.

Bei der Suche nach post-translationalen Modifikationen, bei denen es sich um die Ursache für die nukleäre Translokation von MutS α handeln könnte, zeigte sich, daß die Proteine MSH2 und MSH6 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durch die Proteinkinase C (PKC) und die Casein Kinase II (CKII) phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung ist von der MNNG-Behandlung unabhängig und deshalb nicht die direkte Ursache der Translokation.

Bei weiteren Untersuchungen zeigte sich jedoch, daß es in Phosphat-freiem Medium zu keiner MutS α -Translokation kommt und auch die GT-Bindung verhindert wird. Im Gegensatz dazu hat der Phosphorylierungsstatus keinen Einfluß auf die Bildung des MutS α -Komplexes. Die Phosphorylierung von MutS α spielt eine wichtige Rolle für die Effektivität der Bindung an Basenfehlpaarungen, denn sowohl unphosphoryliertes als auch unphysiologisch hyperphosphoryliertes MutS α kann *in vitro* nicht effektiv an GT-Fehlpaarungen binden.

Bei der Untersuchung der Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika in Melanomzellen konnten mehrere zu Grunde liegende Mechanismen identifiziert werden. Für Zelllinien, die Resistenz gegenüber den Zytostatika Etoposid-, Cisplatin- oder Vindesin- entwickelt haben, konnte gezeigt werden, daß die veränderte Expression unterschiedlicher Faktoren bei der Resistenzentwicklung eine entscheidende Rolle spielen. In Cisplatin-, Etoposid- und Vindesin-resistenten Zellen konnte die Verminderung der Expression der MMR-Proteine MSH2 und MSH6 und eine erhöhte Expression des MDR1-Proteins festgestellt werden. In den Etoposid-resistenten Zellen konnte zusätzlich eine verminderte Expression der Topoisomerase II α beobachtet werden. In Zelllinien, die Resistenz gegenüber Fotemustin erworben haben (MeWoFote4 und MeWoFote40), konnte die Erhöhung der Menge des Reparaturproteins O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) für die Resistenz verantwortlich gemacht werden. In diesen Zellen war die Aktivität der MGMT gegenüber der sensitiven Ausgangszelllinie MeWo stark erhöht, welche keine nachweisbare MGMT-Aktivität zeigte. Die erworbene Resistenz gegenüber Fotemustin konnte durch Behandlung mit dem MGMT-Inhibitor O⁶-Benzylguanin aufgehoben werden, was zeigt, daß die Reaktivierung der MGMT die Ursache für die Fotemustin-Resistenz ist. Im Vergleich zu den sensitiven MeWo-Zellen wurde in den resistenten Zellen sowohl die MGMT-mRNA als auch das MGMT-Protein stark exprimiert. Southern-Blot-Analysen zeigten, daß das MGMT-Gen durch die Fotemustin-Behandlung nicht amplifiziert wurde und daß auch eine beobachtete CpG-Hypomethylierung eines Allels des MGMT-Promotors nicht die Ursache der MGMT-Reaktivierung ist. Vielmehr beruht die Reaktivierung des MGMT-Gens auf einer CpG-Hypermethylierung des kodierenden Bereichs des Gens. Eine Aufhebung der Hypermethylierung mit dem Cytidin-Analogen 5-Azacytidin führte sowohl zu einer Verminderung der MGMT-Aktivität als auch zu einer erhöhten Sensitivität der resistenten Zellen gegenüber Fotemustin.

6. Literatur

- Aaltonen, L. A., Peltomäki, P., Leach, F. S., Sistonen, P., Pylkkänen, L., Mecklin, J. P., Järvinen, H., Powell, S. M., Jen, J., Hamilton, S. R., Petersen, G. M., Kinzler, K. W., Vogelstein, A. and de la Chapelle, A. (1993) Clues to the Pathogenesis of Familial Colorectal Cancer, *Science*, **260**, 812-816.
- Abdel-Monem, M., Durwald, H. and Hoffmann-Berling, H. (1977) DNA unwinding enzyme II of *Escherichia coli*. 2. Characterization of the DNA unwinding activity, *Eur. J. Biochem.*, **79**, 39-45.
- Adam, S. A., Marr, R. S. and Gerace, L. (1990) Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors, *J. Cell Biol.*, **111**, 807-816.
- Adam, S. A. and Gerace, L. (1991) Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import, *Cell*, **66**, 837-847.
- Adam, E. J. and Adam, S. A. (1994) Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope, *J. Cell Biol.*, **125**, 547-555.
- Alani, E., Sokolsky, T., Studamire, B., Miret, J. J. and Lahue, R. S. (1997) Genetic and Biochemical Analysis of Msh2p-Msh6p: Role of ATP Hydrolysis and Msh2p-Msh6p Subunit Interactions in Mismatch Base Pair Recognition, *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2436-2447.
- Allen, D. J., Makhov, A., Grilley, M., Taylor, J., Thresher, R., Modrich, P. and Griffith, J. D. (1997) MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism, *EMBO J.*, **16**, 4467-4476.
- Au, K. G., Welsh, K. and Modrich, P. (1992) Initiation of methyl-directed mismatch repair, *J. Biol. Chem.*, **267**, 12142-12148.
- Becker, K., Gregel, C. M. and Kaina, B. (1997) The DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase protects against skin tumor formation induced by antineoplastic chloroethylnitrosourea, *Cancer Res.*, **57**, 3335-3338.
- Beranek, D.T. (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, *Mutat. Res.*, **231**, 11-30.
- Belloni, M., Uberti, D., Rizzibi, R., Jiricny, J. and Memo, M. (1999) Induction of two DNA Mismatch Repair Proteins, MSH2 and MSH6 in Differentiated Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Exposed to Doxorubicin, *J. Neurochem.*, **72**, 974-979.
- Bischoff, F. R. and Ponstingl, H. (1991a) Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 10830-10834.
- Bischoff, F. R. and Ponstingl, H. (1991b) Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1, *Nature*, **354**, 80-82.
- Bischoff, F. R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A. and Ponstingl, H. (1994) RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 2587-2591.
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W. and Ponstingl, H. (1995) Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1, *EMBO J.*, **14**, 705-715.
- Biswas, T., Ramana, C. V., Srinivasan, G., Boldogh, I., Hazra, T. K., Chen, Z., Tano, K., Thompson, E.B. and Mitra, S. (1999) Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone, *Oncogene*, **18**, 525-532.
- Blackwell, L. J., Bjornson, K. P. and Modrich, P. (1998a) DNA-dependent Activation of the hMutS α ATPase, *J. Biol. Chem.*, **273**, 32049-32054.

- Blackwell, L. J., Martik, M., Bjornson, K. P. and Modrich, P. (1998b) Nucleotide-promoted release of hMutS α from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism, *J. Biol. Chem.*, **273**, 32055-32062.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Branch, P., Aquilina, G., Bignami, M. and Karran, P. (1993) Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage, *Nature*, **362**, 652-654.
- Brooks, P., Dohet, C., Almouzni, G., Méchali, M. and Radman, M. (1989) Mismatch repair involving localized DNA synthesis in extracts of *Xenopus* eggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 4425-4429.
- Brown, T. C. and Jiricny, J. (1987) A specific mismatch repair event protects mammalian cells from loss of 5-methylcytosine, *Cell*, **50**, 945-950.
- Chan, C. L., Wu, Z., Eastman, A. and Bresnick, E. (1992) Irradiation-induced expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells, *Cancer Res.*, **52**, 1804-1809.
- Chen, S. S., Citron, M., Spiegel, G. and Yarosh, D. (1994) O6-methylguanine-DNA methyltransferase in ovarian malignancy and its correlation with postoperative response to chemotherapy, *Gynecol. Oncol.*, **52**, 172-174.
- Chen, F. Y., Harris, L. C., Remack, J. S. and Brent, T. P. (1997) Cytoplasmic sequestration of an O6-methylguanine-DNA methyltransferase enhancer binding protein in DNA repair-deficient human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 4348-4353.
- Colledge, W. H., Richardson, W. D., Edge, M. D. and Smith, A. E. (1986) Extensive mutagenesis of the nuclear location signal of simian virus 40 large-T antigen, *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 4136-4139.
- Cooper, D. L., Lahue, R. S. and Modrich, P. (1993) Methyl-directed mismatch repair is bidirectional, *J. Biol. Chem.*, **268**, 11823-11829.
- Day, R. S. 3d., Ziolkowski, C. H., Scudiero, D. A., Meyer, S. A., Lubiniecki, A. S., Girardi, A. J., Galloway, S. M. and Bynum, G. D. (1980) Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV40-transformed human cell strains, *Nature*, **288**, 724-727.
- Dohet, C., Wagner, R. and Radman, M. (1986) Methyl-directed repair of frameshift mutations in heteroduplex DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 3395-337.
- Dolan, M. E. and Pegg, A. E. (1997) O⁶-benzylguanine and its role in chemotherapy, *Clinical Cancer Res.*, **3**, 837-847.
- Dosch, J., Christmann, M. and Kaina, B. (1998) Mismatch G-T binding activity and MSH2 expression is quantitatively related to sensitivity of cells to methylating agents, *Carcinogenesis*, **19**, 567-573.
- Dosch, J. and Kaina, B. (1996) Induction of c-fos, c-jun, junB and junD mRNA and AP1 by alkylating mutagens in cells deficient and proficient for the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and its relationship to cell death, mutation induction and chromosomal instability, *Oncogene*, **13**, 1927-1935.
- Drummond, J. T., Li, G. M., Longley, M. J., Modrich, P. (1995) Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells, *Science*, **268**, 1909-1912.
- Duckett, D., Drummond, J. T., Murchie, A. I. H., Reardon, J. T., Sancar, A., Lilley, D. M. J. and 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.

- Duckett, D. R., Bronstein, S. M., Taya, Y. and Modrich, P. (1999) hMutSalpha- and hMutLalpha-dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 12384-12388.
- Duncan, B. K. and Miller, J. H. (1980) Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA, *Nature*, 1980, **87**, 560-561.
- Eadi, J. S., Conrad, M., Toorchen, D. and Topal, M. D. (1984) Mechanism of mutagenesis by O⁶-methylguanine, *Nature*, **308**, 201-203.
- Fagotto, F., Gluck, U. and Gumbiner, B.M. (1998) Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin, *Curr. Biol.*, **8**, 181-190.
- Fang, W. and Modrich, P. (1993) Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction, *J. Biol. Chem.*, **268**, 11838-11844.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13.
- Feinstein, S. I. and Low, K. B. (1986) Hyper-recombining recipient strains in bacterial conjugation, *Genetics*, **113**, 13-33.
- Fink, D., Aebi, S. and Howell, S. B. (1998) The role of DNA mismatch repair in drug resistance, *Clin. Cancer Res.*, **4**, 1-6.
- Fishel, R., Lescoe, M. K., Rao, M. R. S., Coperland, N. G., Jenkins, N. A., Garber, J., Kane, M. and Kolodner, R. (1993) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer, *Cell*, **75**, 1027-1038.
- Fritz, G., Tano, K., Mitra, S. and Kaina, B (1991) Inducibility of the DNA repair gene encoding O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments, *Mol. Cell. Biol.* 1991, **11**, 4660-4668.
- Fritz, G. and Kaina, B. (1992) Genomic difference between O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase proficient (mex⁺) and deficient (mex⁻) cell lines: possible role of genetic and epigenetic changes in conversion of mex⁺ and mex⁻, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 1184-1190.
- Gallo, O., Chiarelli, I., Boddi, V., Bocciolini, C., Bruschini, L. and Porfirio, B. (1999) Cumulative prognostic value of p53 mutations and bcl-2 protein expression in head-and-neck cancer treated by radiotherapy, *Int. J. of cancer*, 1999, **84**, 573-579.
- Genschel, J., Littman, S. J., Drummond, J. T. and Modrich, P. (1998) Isolation of MutS β from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutS β and MutS α , *J. Biol. Chem.*, **273**, 19895-19901.
- Gibson, N. W., Erickson, L. C. and Kohn, K. W. (1985) DNA damage and differential cytotoxicity produced in human cells by 2-chloroethyl (methylsulfonyl)methanesulfonate (NSC 338947), a new DNA-chloroethylating agent, *Cancer Res.*, **45**, 1674-1679.
- Glickman, B. W., van den Elsen, P. and Radman, M. (1978) Induced mutagenesis in dam- mutants of Escherichia coli: a role for 6-methyladenine residues in mutation avoidance, *Mol. Gen. Genet.*, **163**, 307-312.
- Glickman, B. W (1979) Spontaneous mutagenesis in Escherichia coli strains lacking 6-methyladenine residues in their DNA. An altered mutational spectrum in dam- mutants, *Mutat. Res.*, **61**, 153-162.
- Glickman, B. W. and Radman, M. (1980) Escherichia coli mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 1063-1067.
- Görlich, D., Prehn, S., Laskey, R. A. and Hartmann, E. (1994) Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import, *Cell*, **79**, 767-778.

- Görlich, D., Vogel, F., Mills, A. D., Hartmann, E. and Laskey, R. A. (1995a) Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import, *Nature*, **377**, 246-248.
- Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R. A., Hartmann, E. and Prehn, S. (1995b) Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope, *Curr. Biol.*, **5**, 383-392.
- Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A and Hartmann, E. (1996a) A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus, *EMBO J.*, **15**, 1810-1817.
- Görlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U. and Bischoff, F. R. (1996b) Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import, *EMBO J.*, **15**, 5584-5559.
- Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F. R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S. and Izaurralde, E. (1997) A novel class of RanGTP binding proteins, *J. Cell Biol.*, **138**, 65-80.
- Goldmacher, V. S., Cuzick, R. A. Jr. and Thilly W. G. (1986) Isolation and partial characterization of human cell mutants differing in sensitivity to killing and mutation by methylnitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12462-12471.
- Gradia, S., Acharya, S. and Fishel, F. (1997) The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch, *Cell*, **91**, 995-1005.
- Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA, *Virology*, **52**, 456-467.
- Grilley, M., Welch, K. M., Su, S. S. and Modrich, P. (1989) Isolation and characterization of the Escherichia coli mutL gene product, *J. Biol. Chem.*, **264**, 1000-1004.
- Grilley, M., Griffith, J. and Modrich, P. (1993) Bidirectional Excision in Methyl-directed Mismatch Repair, *J. Biol. Chem.*, **268**, 11830-11837.
- Grösch, S., Fritz, G. and 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.
- Grombacher, T., Mitra, S. and 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.
- Grombacher, T., Eichhorn, U. and 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.
- Gros, P., Croop, J. and Housman, D. (1986a) Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins, *Cell*, **47**, 371-380.
- Gros, P., Croop, J. Roninson, I. Varshavsky, A. and Housman, D. E. (1986b) Isolation and characterisation of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 337-341.
- Guerrette, S., Wilson, T., Gradia, S. and Fishel, R. (1998) Interactions of human hMSH2 with hMSH3 and hMSH2 with hMSH6: Examination of mutations found in hereditary nonpolyposis colorectal cancer, *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6616-6623.
- Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. and Prakash, S. (1996) Binding of insertion/deletion DNA mismatches by the heterodimer of yeast mismatch repair proteins MSH2 and MSH3, *Curr. Biol.*, **6**, 1185-1187.
- Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. and Prakash, S (1998) ATP-dependent assembly of a ternary complex consisting of a DNA mismatch and the yeast MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 protein complexes, *J. Biol. Chem.*, **273**, 9837-9841.

- Hanada, M., Aime-Sempe, C., Sato, T and Reed, J. C. (1995) Structure-function analysis of Bcl-2 protein identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax, *J. Biol. Chem.*, **270**, 11962-11969.
- Harris, L. C., Potter, P. M., Tano, K., Shiota, S., Mitra, S. and Brent, T. P. (1991) Characterization of the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6163-6167.
- He, M., Wilde, A. and Kaderbhai, MA (1990) A simple single-step procedure for small-scale preparation of Escherichia coli plasmids, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1660.
- Herman, G. E. and Modrich, P. (1981) Escherichia coli K-12 clones that overproduce dam methylase are hypermutable, *J. Bacteriol.*, **145**, 644-646.
- Hickson, I. D., Arthur, H. M., Bramhill, D. and Emmerson, P. T. (1983) The E. coli uvrD gene product is DNA helicase II, *Mol. Gen. Genet.*, **190**, 265-270.
- Ho, V. C. and Sober, A. J. (1990) Therapy for cutaneous melanoma: an update, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **22**, 159-176.
- Holland, J. F., Bast R. C. Jr., Morton, D. L., Frei III, E., Kufe, D. W. and Weichselbaum, R. R. (1997) Cancer Medicin Vol. 4, *Williams & Wilkins, Baltimore, USA* ; ISBN 0-683-04095-2.
- Holliday, R. A. (1964) Mechanism for gene conversion in fungi, *Genet. Res.*, **5**, 282-304.
- Holmes, J., Clark, S. and Modrich, P (1990) Strand-specific mismatch correction in nuclear extracts of human and Drosophila melanogaster cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 5837-5841.
- Horio, M., Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1988) ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 3580-3584.
- Iccarino, I., Marra, G., Palombo, F. and Jiricny, J (1998) hMSH2 and hMSH6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutS α , *EMBO J.*, **17**, 2677-2686.
- Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I. W. and Görlich, D. (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus, *EMBO J.*, **16**, 6535-6547.
- Jäkel, S. and Görlich, D. (1998) Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells, *EMBO J.*, **17**, 4491-4502.
- Jäkel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F. R., Schwamborn, K., Doenecke, D. and Görlich, D. (1999) The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1, *EMBO J.*, **18**, 2411-2423.
- Johnson, R. E., Kovvali, G. K., Prakash, L. and Prakash, S. (1995) Requirement of the yeast RTH1 5' to 3' exonuclease for the stability of simple repetitive DNA, *Science*, **269**, 238-240.
- Johnson, R. E., Kovvali, G. K., Guzder, S. N., Amin, N. S., Holm, C., Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. and Prakash, S. (1996) Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair, *J. Biol. Chem.*, **271**, 27987-27990.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K. K., Cato, A. C., Gebel, S., Ponta, H. and Herrlich, P. (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone, *Cell*, **62**, 1189-1204.
- Jones, M., Wagner, R. and Radman, M. (1987) Repair of a mismatch is influenced by the base composition of the surrounding nucleotide sequence, *Genetics*, **115**, 605-610.

- Kaina, B., Fritz, G., Mitra, S. and Coquerelle, T. (1991) Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents, *Carcinogenesis*, **12**, 1857-1867.
- Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K. and Coquerelle, T. (1997) Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models, *Mutat. Res.*, **381**, 227-241.
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. and Smith, A. E. (1984) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen, *Nature*, **311**, 33-38.
- Karran, P., and Bignami, M (1992) Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2933-2940.
- Kern, M. A., Helmbach, H., Artuc, M., Karmann, D., Jurgovsky, K. and Schadendorf, D. (1997) Human melanoma cell lines selected in vitro displaying various levels of drug resistance against cisplatin, fotemustine, vindesine or etoposide: modulation of proto-oncogene expression, *Anticancer Res.*, **17**, 359-370.
- Klebe, C., Bischoff, F. R., Ponstingl, H., Wittinghofer, A. (1995) Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1, *Biochemistry.*, **34**, 639-647.
- Kokkinakis, D. M., Ahmed, M. M., Delgado, R., Fruitwala, MM., Mohiuddin, M., Albores-Saavedra, J. (1997) Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the resistance of pancreatic tumors to DNA alkylating agents, *Cancer Res.*, **57**, 5360-5368.
- Kramer, B., Kramer, W. and Fritz, H. J. (1984) Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*, *Cell*, **38**, 879-887.
- Krishna, T. S. R., Kong, X. P., Gary, S., Burgers, P. M. and Kuriyan, J. (1994) Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA, *Cell*, **79**, 1233-1243.
- Kumura, K. and Sekiguchi, M (1984) Identification of the *uvrD* gene product of *Escherichia coli* as DNA helicase II and its induction by DNA-damaging agents, *J. Biol. Chem.*, **259**, 1560-1565.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R. and Görlich, D. (1997) Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor, *Cell*, **90**, 1061-1071.
- Lage, H., Christmann, M., Kern, M. A., Dietel, M., Pick, M., Kaina, B. and Schadendorf, D. (1999) Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance, *Int. J. Cancer*; **80**, 744-750.
- Lage, H., Helmbach, H., Dietel, M. and Schadendorf, D. (2000) Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance, *Br. J. Cancer*, **82**, 488-491.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- Längle-Rouault, F., Maenhaut, M., Miche, G. and Radman, M. (1987) GATC sequences, DNA nicks and the MutH function in *Escherichia coli* mismatch repair, *EMBO J.* **6**, 1121-1127.
- Lahue, R. S., Su, S. S. and Modrich, P (1987) Requirement for d(GATC) sequences in *Escherichia coli* mutHLS mismatch correction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 1482-1486.
- Lahue, R. S., Au, K. G. and Modrich, P (1989) DNA Mismatch Correction in a Defined System, *Science*, **245**, 160-164.

- Leach, F. S., Nicolaides, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomäki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L. A., Nystrom-Lahti, M., Guan, X. Y., Zhang, J., Meltzer, P. S. Yu, J. W., Kao, F. T., Cheh, D. J., Cerosaletti, K. M., Fournier, K. R. E., Todd, S., Lewis, T., Leach, R. J., Naylor, S. L., Weissenbach, J., Mecklin, J. P., Järvinen, H., Petersen, G. M., Hamilton, S. R., Green, J., Jass, J., Watson, P., Lynch, H. T., Trent, J. M., de la Capelle, A., Kinzler, K. W and Vogelstein, B (1993) Mutations of a mutS Homolog in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, *Cell*, **75**, 1215-1225.
- Lefebvre, P. and Laval, F. (1986) Enhancement of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase activity induced by various treatments in mammalian cells, *Cancer Res.*, **46**, 5701-5705.
- Lefebvre, P., Zak, P. and 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.
- Li, G. M. and Modrich, P. (1995) Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 1950-1954.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X. D.(1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell*, **91**, 479-489.
- Li, Q., Gardner, K., Zhang, L., Tsang, B., Bostick-Bruton, F. and Reed, E. (1998) Cisplatin induction of ERCC-1 mRNA expression in A2780/CP70 human ovarian cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **273**, 23419-23425.
- Li, Q., Yu, J. J., Mu, C., Yunmbam, M. K., Slavsky, D., Cross, C. L., Bostick-Bruton, F. and Reed, E. (2000) Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells, *Anticancer Res.*, **20**, 645-652
- Lindahl, T. (1974) An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3649-3653.
- Lindahl, T. and Ljungquist, S. (1975) Apurinic and apyrimidinic sites in DNA, *Basic Life Sci.*, **5**, 31-38.
- Littmann, S, J., Fang, W. and Modrich, P. (1999) Repair of large insertion/deletion heterologies in human nuclear extracts is directed by a 5' single-strand break and is independent of the mismatch repair system. *J. Biol. Chem.*, **11**, 7474-7481 .
- Liu, L. F., Rowe, T. C., Yang, L., Tewey, K. M. and Chen, G. L. (1983) Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II, *J. Biol. Chem.*, **258**, 15365-15370.
- Longley, M. J., Pierce, A. J and Modrich, P. (1997) DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro, *J. Biol. Chem.*, **272**, 10917-10921.
- Loveless, A. (1969) Possible relevance of O-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides, *Nature*, **223**, 207-207.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J, Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lu, A. L., Clark, S. and Modrich, P (1983) Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 4639-4643.
- Lynch, H. T., Omaha, M. W. and Shaw, M. D. (1966) Hereditary factors in cancer, *Arch. Int. Med.*, **117**, 206-212
- Lynch, H. T., Smyrk, T. C., Watson, P., Lanspa, S. J., Lynch, J. F., Lynch, P. M., Cavalieri, R. J and Boland, C. R. (1993) Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colon cancer: un updated review, *Gastroenterology*, **104**, 1535-1549.

- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2, *Cell*, **88**, 97-107.
- Mandel, M. and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection, *J. Mol. Biol.*, **53**, 159-162.
- Maples, V. F. and Kusher, S. R. (1982) DNA repair in Escherichia coli: Identification of the uvrD gene product *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 5616-5620.
- Marra, G., Chang, C. L., Laghi, L. A., Chauhan, D. P., Young, D. and Boland, C. R. (1996) Expression of human MutS homolog 2 (hMSH2) protein in resting and proliferating cells, *Oncogene*, **13**, 2189-2196.
- Marra, G., Iaccarino, I., Lettieri, T., Roscilli, G., Delmastro, P. and Jiricny, J. (1998) Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the MSH3 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 8568-8573.
- Matson S. W. (1986) Escherichia coli helicase (II uvrD gene product) translocates unidirectionally in a 3' to 5' direction, *J. Biol. Chem.*, **261**, 19169- 10175.
- Michael, W. M., Choi, M. and Dreyfuss, G. (1995) A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway, *Cell*, **83**, 415-422.
- Miller, K. G., Liu, L. F. and Englund, P. T. (1981) A homogeneous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei, *J. Biol. Chem.*, **256**, 9334-9339.
- Moore, M. S. and Blobel, G. (1993) The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus, *Nature*, **365**, 661-663.
- Moore, M. S. and Blobel, G. (1994) Purification of a Ran-interacting protein that is required for protein import into the nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 10212-10216.
- Mullis, K. B. (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction, *Sci. Am.*, **262**, 56-61 ; 64-65.
- Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51**, 263-273.
- Muster-Nassal, C. and Kolodner, R. (1986) Mismatch correction catalyzed by cell-free extracts of Saccharomyces cerevisiae, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 7618-22.
- Nelson, E. M., Tewey, K. M. and Liu, L. F. (1984) Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1361-1365.
- Newmeyer, D. D. and Forbes, D. J (1988) Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation, *Cell.*, **52**, 641-653.
- Newmeyer, D. D. and Forbes, D. J. (1990) An N-ethylmaleimide-sensitive cytosolic factor necessary for nuclear protein import: requirement in signal-mediated binding to the nuclear pore, *J. Cell Biol.*, **110**, 547-557.
- Nicolaidis, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Wei, Y. F., Carter, K. C., Ruben, S. M., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Fleischmann, R. D., Fraser, C. M., Adams, M. D., Venter, J. C., Dunlop, M. G., Hamilton, S. R., Petersen, G. M., de la Capelle, A., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1994) Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer, *Nature*, **371**, 75-80.
- Ochs, K. and Kaina, B. (2000) Apoptosis induced by DNA damage O⁶-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent, *Cancer Res.*, **60**, 5815-5824.

- Osheroff, N., Corbett, A. H. and Robinson, M. J. (1994) Mechanism of action of topoisomerase II-targeted antineoplastic drugs, *Adv. Pharmacol.*, **29**, 105-126.
- Palombo, F., Gallinari, P., Iaccario, I., Lettieri, T., Hughes, M., D'Arrigo, A., Truong, O., Hsuan, J. J. and Jiricny, J. (1995) GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells, *Science*, **268**, 1912-1914.
- Palombo, F., Iaccario, I., Nakajima, E., Ikejima, M., Shimada, T. and Jiricny, J. (1996) hMutS β , a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA, *Curr. Biol.*, **6**, 1181-1184.
- Papadopoulos, N., Nicolaidis, N. C., Wei, Y. F., Ruben, S. M., Carter, K.C., Rosen, C.A., Haseltine, W. A., Fleischmann, R. D., Fraser, C. M., Adams, M. D., Venter, J. C., Hamilton, S. R., Petersen, G. M. Watson, P., Lynch, H. T. Peltomäki, P. Mecklin, J. P., de la Chapelle, A., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1994) Mutation of a mutL Homolog in Hereditary Colon Cancer, *Science*, **253**, 1625-1628.
- Papadopoulos, N., Nicolaidis, N. C., Liu, B., Parson, R., Lengauer, C., Palombo, F., D'Arrigo, A., Markowitz, S., Wilson, J. K. V., Kinzler, K. W., Jiricny, J. and Vogelstein, B. (1995) Mutations of GTBP in Genetically Unstable Cells, *Science*, **268**, 1915-1917.
- Parson, R., Li, G. M., Longley, M. J., Fang, W., Papadopoulos, N., Jen, J., de la Chapelle, A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Modrich, P. (1993) Hypermutability and Mismatch Repair Deficiency in RER+ Tumor Cells, *Cell*, **75**, 1227-1236.
- Patel, S. A., Graunke, D. M. and Pieper, R. O. (1997) Aberrant silencing of the CpG island-containing human O6-methylguanine DNA methyltransferase gene is associated with the loss of nucleosome-like positioning, *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5813-5822.
- Pegg, A. E., Boosalis, M., Samson, L., Moschel, R. C., Byers, T. L., Swenn, K and Dolan, M. E. (1993) Mechanism of inactivation of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase by O6-benzylguanine, *Biochemistry*, **32**, 11998-2006.
- Pegg, A. E., Dolan, M. E and Moschel, R. C. (1995) Structure, function, and inhibition of O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **51**, 167-223.
- Peltomäki, P., Aaltonen, L. A., Sistonen, P., Pylkkänen, L. Mecklin, J. P, Järvinen, H., Green., J. S. Jass, J. R., Weber, J. L. Leach, F. S., Petersen, G. M., Hamilton, S. R., de la Chapelle, A. and Vogelstein, B. (1993) Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer, *Science*, **260**, 810-812.
- Percipalle, P., Clarkson, W. D., Kent, H. M., Rhodes, D. and Stewart, M (1997) Molecular interactions between the importin alpha/beta heterodimer and proteins involved in vertebrate nuclear protein import, *J. Mol. Biol.*, **266**, 722-732.
- Pieper, R. O., Costello, J. F., Kroes, R. A., Futscher, B. W., Marathi, U. and Erickson, L. C. (1991) Direct correlation between methylation status and expression of the human O-6-methylguanine DNA methyltransferase gene, *Cancer Commun.*, **3**, 241-253.
- Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielnny, S., Siomi, M. C., Wang, F. and Dreyfuss, G (1996) A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway, *Cell.*, **86**, 985-994.
- Preuss, I., Eberhagen, I., Haas, S., Eibl, R. H., Kaufmann, M., von Minckwitz, G., Kaina, B (1995) O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in breast and brain tumors., *Int. J. Cancer*, **61**, 321-326.
- Pukkila, P. J., Peterson, J., Herman, G., Modrich, P. and Meselson, M. (1983) Effects of high levels of DNA adenine methylation on methyl-directed mismatch repair in Escherichia coli, *Genetics*, **104**, 571-582.
- Qian, X. C. and Brent, T. P. (1997) Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene, *Cancer Res.*, **57**, 3672-3677.

- Radu, A., Blobel, G. and Moore, M. S. (1995a) Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 1769-1773.
- Radu, A., Moore, M. S. and Blobel, G. (1995b) The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex, *Cell*, **81**, 215-222.
- Rexach, M. and Blobel, G. (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins, *Cell*, **83**, 683-692.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M. and Görlich, D. (1998) NTF2 mediates nuclear import of Ran, *EMBO J.*, **17**, 6587-6598.
- Ribbeck, K., Kutay, U., Paraskeva, E. and Görlich, D. (1999) The translocation of transportin-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy, *Curr. Biol.*, **9**, 47-50.
- Richet, E. and Kohiyama, M. (1976) Purification and characterization of a DNA-dependent ATPase from *Escherichia coli* *J. Biol. Chem.*, **251**, 808-812.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. and Dingwall, C. (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence, *Cell*, **64**, 615-623.
- Roninson, I. B., Chin, J. E., Choi, K. G., Gros, P., Housman, D. E., Fojo, A., Shen, D. W., Gottesman, M. M and Pastan, I. (1986) Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 4538-4542.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5463-5467.
- Schadendorf, D., Makki, A., Stahr, C., van Dyck, A., Wanner, R., Scheffer, G. L., Flens, M. J., Scheper, R. and Henz, B. M. (1995) Membrane transport proteins associated with drug resistance expressed in human melanoma, *Am. J. Pathol.*, **147**, 1545-1552.
- Scherer, S. J., Seib, T., Seitz, G., Dooley, S. and Welter, C. (1996a) Isolation and characterization of the human mismatch repair gene *hMSH2* promoter region, *Hum. Genet.*, **97**, 114-116.
- Scherer, S. J., Welter, C., Zang, K. D. and Dooley, S. (1996b) Specific *in vitro* Binding of p53 to the Promoter Region of the Human Mismatch Repair Gene *hMSH2*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 722-728.
- Scheuermann, R. H and Echols, H. (1984) A separate editing exonuclease for DNA replication: the epsilon subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 7747-7751.
- Siomi, M. C., Eder, P. S., Kataoka, N., Wan, L., Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1997) Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins, *J. Cell Biol.*, **138**, 1181-1192.
- Southern, E. M (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517,
- Southern, P. J. and Berg, P. (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter, *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 327-341.
- Spiridonidis, C. A., Chatterjee, S., Petzold, S. J. and Berger, N. A. (1989) Topoisomerase II-dependent and -independent mechanisms of etoposide resistance in Chinese hamster cell lines, *Cancer Res.*, **49**, 644-650.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G and Alnemri, E. S. (1996) Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: The Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 14486-14491.

- Su, S. S., Lahue, R. S., Au, K. G. and Modrich, P. (1987) Mismatch specificity of methyl-directed DNA mismatch correction in vitro, *J. Biol. Chem.*, **263**, 6829-6835.
- Szankasi, P and Smith, G. R. (1995) A role for exonuclease I from *S. pombe* in mutation avoidance and mismatch correction, *Science*, **267**, 1166-1169.
- Takizawa, C. G., Weis, K., Morgan, D. O (1999) Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin beta, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 7938-7943.
- Tano, K., Shiota, S., Collier, J., Foote, R. S. and Mitra, S. (1990) Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 686-690. [erratum in *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 3253]
- Tano, K., Dunn, W. C., Darroudi, F., Shiota, S., Preston, R. J., Natarajan, A. T. and Mitra, S. (1997) Amplification of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase associated with resistance to alkylating drugs in a mammalian cell line, *J. Biol. Chem.*, **272**, 13250-13254.
- Tapiero, H., Yin, M. B., Catalin, J., Paraire, M., Deloffre, P., Rustum, Y., Bizzari, J. P. and Tew, K. D. (1989) Cytotoxicity and DNA damaging effects of a new nitrosourea, fotemustine, diethyl- 1-(3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido) ethylphosphonate-S10036, *Anticancer Res.*, **9**, 1617-1622.
- Teeter, L. D., Sanford, J. A., Sen, S., Stallings, R. L., Siciliano, M. J, and Kuo, M. T. (1986) Multidrug-resistant phenotype cosegregates with an amplified gene in somatic cell hybrids of drug-resistant Chinese hamster ovary cells and drug-sensitive murine cells, *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 4268-4273.
- Thomas, D. C., Roberts, J. D., Kunkel, T. A. (1991) Heteroduplex repair in extracts of human HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **266**, 3744-3751.
- Thomas, W. S., Oltvai, Z. N., Yang, E., Wang, K., Boise, L. H., Thompson, C. B. and Korsmeyer, S. J. (1995) Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 7834-7838.
- Topal, M. D. and Fresco, J. R. (1976) Complementary base pairing and the origin of substitution mutations, *Nature*, **263**, 285-293.
- Turchi, J. J. and Bambara, R. A. (1993) Completion of mammalian lagging strand DNA replication using purified proteins, *J. Biol. Chem.*, **268**, 15136-15141.
- Ueda, K., Clark, D. P., Chen, C. J., Roninson, I. B., Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1987) The human multidrug resistance (mdr1) gene cDNA cloning and transcription initiation, *J. Biol. Chem.*, **262**, 505-508.
- Umar, A., Boyer, J. C. and Kunkel, T. A. (1994a) DNA loop repair by human cell extracts, *Science*, **266**, 814-816.
- Umar, A., Boyer, J. C., Thomas, D. C., Nguyen, D. C., Risinger, J. I., Boyd, J., Ionov, Y., Perucho, M. and Kunkel, T. A. (1994b) Defective mismatch repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibiting microsatellite instability, *J. Biol. Chem.*, **269**, 14367-14370.
- Umar, A., Buermeier, A. B., Simon, J. A., Thomas, D. C., Clark, A. B., Liskay, R. M and Kunkel, T. A. (1996) Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis, *Cell*, **87**, 65-73.
- Wagner, R. and Meselson, M (1976) Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 4135-4139.
- Wang, Y., Kato, T., Ayaki, H., Ishizaki, K., Tano, K., Mitra, S. and Ikenaga, M (1992) Correlation between DNA methylation and expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in cultured human tumor cells, *Mutat. Res.*, **273**, 221-230.

- Watts, G. S., Pieper, R.O., Costello, J. F., Peng, Y. M., Dalton, W. S. and Futscher, B. W. (1997) Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene, *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5612-5619.
- Welch, K. M., Lu, A. L., Clark, S. and Modrich, P (1987) Isolation and Characterization of the Escherichia coli mutH Gene Product, *J. Biol. Chem.*, **262**, 15624-15629.
- Westerveld, A., Hoeijmakers, J. H., van Duin, M., de Wit, J., Odijk, H., Pastink, A., Wood, R. D. and Bootsma, D. (1984) Molecular cloning of a human DNA repair gene, *Nature*, **310**, 425-429.
- Yamada, Y., O'Regan, E., Brown, R. and Karran, P. (1997) Selective recognition of a cisplatin adduct by human mismatch repair proteins, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 491-496.
- Yang, E., Zha, J. P., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J. (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x(L) and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death, *Cell*, **80**, 285-291.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene*, **33**, 103-119.
- Yarosh, D. B., Foote, R. S., Mitra, S. and Day, R. S. 3d (1983) Repair of O6-methylguanine in DNA by demethylation is lacking in Mer- human tumor cell strains, *Carcinogenesis*, **4**, 199-205.
- Yarosh, D. B. (1985) The role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis, *Mutat. Res.*, **145**, 1-16.
- Yokoyama, N., Hayashi, N., Seki, T., Pante, N., Ohba, T., Nishii, K., Kuma, K., Hayashida, T., Miyata, T., Aebi, U., Fukui, M. and Nishimoto, T. (1995) A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4, *Nature*, **376**, 184-188.
- Zhan, Q. M., Fan, S. J., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D. A., O'Connor, P. M. and Fornace, A. J. (1994) Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis, *Oncogene*, **9**, 3743-3751.
- Zhou, Z., Zwelling, L. A., Kawakami, Y., An, T., Kobayashi, K., Herzog, C. and Kleinerman, E. S. (1999) Adenovirus-mediated human topoisomerase IIalpha gene transfer increases the sensitivity of etoposide-resistant human breast cancer cells, *Cancer Res.*, **59**, 4618-4624.

Liste der Publikationen

Christmann, M. and Kaina, B. (2000) Nuclear translocation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 as a response of cells to alkylating agents, *J. Biol. Chem.*, **275**, 36256-36262.

Christmann, M., Pick, M., Lage, H., Schadendorf, D. and Kaina, B. (2000) Resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT, *Int. J. Cancer*, **in press**.

Dosch, J., Christmann, M. and Kaina, B. (1998) Mismatch G-T binding activity and MSH2 expression is quantitatively related to sensitivity of cells to methylating agents, *Carcinogenesis*, **19**, 567-573.

Kaina, B., Fritz, G., Ochs, K., Haas, S., Grombacher, T., Dosch, J., Christmann, M., Lund, P., Gregel, C. M. and Becker, K. (1998) Transgenic systems in studies on genotoxicity of alkylating agents: critical lesions, thresholds and defense mechanisms, *Mutat. Res.*, **405**, 179-191.

Lage, H., Christmann, M., Kern, M. A., Dietel, M., Pick, M., Kaina, B. and Schadendorf, D. (1999) Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance, *Int. J. Cancer*, **80**, 744-750.

Tomicic, M. T., Christmann, M., and Kaina, B. (2000) Cloning and Functional Analysis of cDNA Encoding the Hamster Bcl-2 Protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 899-903.

Kaina, B., Ochs, K., Grösch, S., Fritz, G., Lips, J., Tomicic, M., Dunkern, T. and Christmann, M. (2000) BER, MGMT and MMR in defense against alkylation-induced genotoxicity and apoptosis, *Prog. Nucl. Res. Mol. Biol.*, **in press**.

Kongressteilnahme

Posterpräsentation

Christmann, M. and Kaina, B. (1998) Induction of human MSH2 protein by treatment of HeLa cells with alkylating agents is due to posttranslational stabilisation, *Archives of Pharmacology*, **357**, R148. [39. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, März 1998, Mainz]

Christmann, M., Pick, M. and Kaina, B. (2000) Resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT, *Archives of Pharmacology*, **361**, R158. [41. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, März 2000, Mainz]

Kaina, B., Dosch, J., Christmann, M., Grösch, S., Ochs, K. and Grombacher, T. (1998) Mechanisms of alkylating drug resistance, *Anticancer Research*, **18**, 4889. [6. International conference of Anticancer Research, Oktober 1998, Kallithea, Halkidiki, Griechenland]

Lage, H., Kern, M. A., Christmann, M., Pick, M., Dietel, M., Kaina, B. and Schadendorf, D. (1999) Decrease of DNA-mismatch repair protein (hMSH2, hMSH6, hMLH1) expression and increase of MGMT expression in melanoma cells with acquired during resistance, *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting*, **40**, 140. [90th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Philadelphia, Pennsylvania, USA, April 10-14, 1999]

Vorträge

Christmann, M. and Kaina, B. (1999) Induction of human MSH2 protein as a response to treatment of HeLa cells with alkylating agents is caused by translocation, *Archives of Pharmacology* **359**, R144. [40. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, März 1999, Mainz]

Christmann, M. and Kaina, B. (2000) Increase of nuclear MSH2 and MSH6 protein levels as a response of cells to treatment with alkylating agents [6. Workshop des DNA Reparatur Netzwerks, July 2000, Essen]

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Markus Christmann

Geboren: 24.10.1969 in Frankfurt am Main

Staatsangehörigkeit: deutsch

Religion: evangelisch

Familienstand: geschieden am 26.10.2000

Wohnhaft: Am Bahndamm 1, 65451 Kelsterbach

Eltern: Eleonore Gabriele Christmann, geb. Rost
geboren am 22.07.1945 (kaufmännische Angestellte)
Herbert Alfred August Christmann
geboren am 12.12.1937 (technischer Zeichner)

Schulbildung: vom 03.08.1976 bis 09.07.1980 Besuch der Karl Treutel
Grundschule in Kelsterbach
vom 17.08.1980 bis 18.05.1989 Besuch des Gymnasium am
Kurfürstlichen Schloß in Mainz
Abschluß: Abitur mit der Durchschnittsnote 2,2

Wehrdienst: vom 01.06.1989 bis 01.09.1989 Grundausbildung beim
Heeresfliegerausbildungsstaffel 8/III in Niederstetten
vom 01.09.1989 bis 31.08.1990 Dienst in der Stabstaffel des
Heeresfliegerregiment 36 in Fritzlar als Funker

Studium: vom 01.10.1990 bis 01.09.1996 Studium der Biologie an der
Johannes Gutenberg Universität in Mainz
19.11.1992: Vordiplomprüfung mit der Note „Sehr Gut“
15.07.1996: Diplomprüfung mit der Note „Sehr Gut“

Diplomarbeit: vom 01.06.1995 bis 15.07.1996 am Institut für
Molekulargenetik, gentechnische Sicherheitsforschung und
Beratung an der Johannes Gutenberg Universität in Mainz
Thema: „Analyse des Cpy-homologen Gens in *Drosophila
melanogaster* anhand der cDNA Sequenz“

Promotion: vom 01.08.1996 bis heute in der Abteilung für Angewandte
Toxikologie des Instituts für Toxikologie am
Universitätsklinikum in Mainz
Thema: „Untersuchungen zur Regulation der
Basenfehlpaarungsreparatur und zur Zytostatikaresistenz in
Säugerzellen“
Promotionsprüfung am 15.02.2001 mit Magna cum laude