

DNA-Doppelstrangbrüche als zentrales Ereignis alkylierungsinduzierter Zytotoxizität

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

vorgelegt von
Jochen Lips
geb. in Bremerhaven

Mainz, 2000

Tag der mündlichen Prüfung: 16.2.2001

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
Ak.	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATM	Ataxia Telangiectasia-mutantes Protein
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATR	<i>ATM related polypeptide</i>
BCNU	1,3-Bis(2-chlorethyl)-nitrosoharnstoff (Carmustin)
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxy-Uridin
BS	Bloom Syndrom
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	<i>counts per minute</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Tag
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
dI/dC	Desoxyinosin-5'-Phosphat/Desoxycytidin-5'-Phosphat
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PK _{CS}	katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DSB, DSBs	DNA-Doppelstrangbruch, DNA-Doppelstrangbrüche
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> R I-Typ-II-Restriktionsendonuklease
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
f	femto
F	Farad
FA	Fanconi Anämie
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FBS	Fötale Rinderserum
FITC	Fluorescein
h	Stunde
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
Gy	Gray

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
hPMS1/2	<i>human postmeiotic segregation 1/2</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
J	Joule
k	kilo
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LMP	<i>low melting point</i>
μ	mikro
m	milli
M	molar
mA	Milliampere
mex ⁺	MGMT-profizient
mex ⁻	MGMT-defizient
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
MMR	<i>mismatch repair</i> (Basenfehlpaarungsreparatur)
MMS	Methylmethansulfonat
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MNU	Methylnitrosoharnstoff
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
MLH1	MutL homolog 1
MSH2/6	MutS homolog 2/6
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid
n	nano
NaAc	Natriumacetat
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaOH	Natronlauge
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
NP-40	Nonidet P-40
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
Ω	Ohm
O ⁶ -BG	O ⁶ -Benzylguanin
O ⁶ -MeG	O ⁶ -Methylguanin
O ⁶ -MeG/C	O ⁶ -Methylguanin gepaart mit Cytosin
O ⁶ -MeG/T	O ⁶ -Methylguanin fehlgepaart mit Thymin
OD	Optische Dichte
p	pico
PAA	Polyacrylamid (38%) / Bispolyacrylamid (2%)
PAG	Polyacrylamid-Gel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribosyl)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	T4-Polynukleotid-Kinase
Polβ	DNA-Polymerase β
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PvuII	<i>Proteus vulgaris</i> II-Typ-II-Restriktionsendonuklease

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	Alkalische Phosphatase aus Shrimp (<i>P. borealis</i>)
SCE	Schwesterchromatidenaustausch
Scid	<i>Sever combined immunodeficiency</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSB, SSBs	DNA-Einzelstrangbruch, DNA-Einzelstrangbrüche
SSC	Standard-Salz-Citrat-Puffer
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE (10:1)	TRIS-EDTA-Puffer im Verhältnis 10:1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> -Ribonukleinsäure
U	<i>Unit</i> (standardisierte Enzymeinheit)
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
UVC	Ultraviolette Strahlung der Wellenlänge 200-280 nm
V	Volt
Vol.	Volumen
WS	Werner Syndrom
wt	Wildtyp
ZMW	Zentrale Materialwirtschaft

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit DNA-Doppelstrangbrüchen, die durch genotoxische Agenzien verursacht werden sowie den zytotoxischen Auswirkungen, die DNA-Doppelstrangbrüche für die Säuger-Zelle haben.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die molekularen Mechanismen untersucht, die am O⁶-Methylguanin (O⁶-MeG)-DNA-Schaden, hervorgerufen durch alkylierende Agenzien, ablaufen. Zwar ist bekannt, daß diese Läsion von dem Reparaturenzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) effektiv repariert wird und dieses somit den zytotoxischen, mutagenen, SCE-induzierenden, klastogenen und kanzerogenen Auswirkungen entgegengewirkt. Jedoch war bisher unklar, ob die O⁶-Methylguanin-Läsion nach der Fehlpaarung mit Thymin von MGMT erkannt und repariert wird. Dies gab Anlaß dazu, die Reparatur von MGMT an den Substraten O⁶-MeG/C und O⁶-MeG/T vergleichend zu untersuchen. Wie im MGMT-Aktivitätstest *in vitro* gezeigt werden konnte, gibt es keine Unterschiede in der Substratspezifität und folglich auch nicht in der Aktivität von MGMT, diese DNA-Läsionen zu reparieren. Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß die Reparatur von O⁶-MeG im MGMT-Aktivitäts-Test nicht von der Anwesenheit und der Bindung von Proteinen der Basenfehlpaarungsreparatur (MMR) beeinträchtigt wird. Nachdem mit diesen Experimenten die Aktivität von MGMT an Substraten, die erst nach dem ersten Replikationszyklus entstehen, beschrieben wurde, interessierte im folgenden die physiologische Auswirkung der postreplikativen Reparatur des O⁶-MeG-Schadens. Mit Hilfe eines Modellsystems auf Grundlage des Koloniebildungstests, in dem die MGMT-Aktivität in Zellen selektiv reprimiert und induziert werden konnte, wurde gezeigt, daß die Reparatur von O⁶-MeG nach dem ersten Zellzyklus protektive Auswirkung auf das zelluläre Überleben hat.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit stand die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in Mausfibroblasten und Zellen des Chinesischen Hamsters (CHO) durch genotoxische Agenzien im Mittelpunkt. Mit Hilfe der neutralen und alkalischen Einzelzellgelelektrophorese (SCGE, „Comet Assay“) wurde gezeigt, daß die alkylierenden Substanzen N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) und Methylmethansulfonat (MMS) sowie γ -Strahlung als Vergleichsnoxe DNA-Doppelstrangbrüche induzieren können. Während nach γ -Bestrahlung sofort nach Behandlung die höchsten DNA-Doppelstrangbruchraten gemessen wurden, erfolgte die DNA-Doppelstrangbruch-Induktion durch alkylierende Agenzien erst nach 1-3 Tagen nach Behandlung der Zellen. Dies deutet darauf hin, daß erst die Prozessierung des Primärschadens (hier O⁶-MeG) zu DNA-

Doppelstrangbrüchen führt. Es wurde auch gezeigt, daß MGMT der DNA-Doppelstrangbruch-induzierenden Wirkung von MNNG entgegenwirkt.

Um die Auswirkungen von DNA-Doppelstrangbrüchen genauer zu untersuchen, wurden Restriktionsendonukleasen durch Elektroporation in die Zellen eingebracht. Eine derartige Behandlung von Säuger-Zellen mit PvuII und EcoRI führte zu einer starken DNA-Doppelstrangbruchinduktion 3-6 h nach Behandlung, die nach 24 h nicht mehr detektierbar war. Die Elektroporation von Säuger-Zellen mit hitzeinaktiviertem Enzym hatte keine meßbaren Auswirkungen auf die DNA-Doppelstrangbruch-Induktion. In diesen Experimenten waren PvuII-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche durch p53 und DNA-PK_{CS} beeinflussbar, da p53- und DNA-PK_{CS}-defiziente Zellen höhere Strangbruchraten aufwiesen als p53- und DNA-PK_{CS}-profiziente Zellen.

Im dritten Teil vorliegender Arbeit wurden die physiologischen Auswirkungen nach Behandlung von Zellen mit gentoxischen Agenzien und nach DNA-Doppelstrangbruch-Induktion durch Enzyme untersucht. Es wurde gezeigt, daß sowohl Alkylanzien wie MNNG und MMS als auch γ -Strahlung Apoptose und Nekrose induzieren. MGMT und DNA-Polymerase β - ein Enzym der Basenexzisions-reparatur - wirken der MNNG-induzierten Zytotoxizität entgegen, da Zellen, die defizient für diese Reparaturenzyme sind, hypersensitiv reagierten. Die Elektroporation von CHO-9 Zellen mit PvuII induziert Apoptose, während die Elektroporation mit EcoRI zu keiner Erhöhung der Apoptoserate in CHO-9 Zellen führte. Der Einfluß von p53 auf die DNA-Doppelstrangbruch-induzierte Apoptose wurde durch Verwendung von p53-defizienten (p53-knockout) Zellen untersucht. Die Elektroporation von p53-defizienten Zellen mit PvuII führte zur Induktion hoher Apoptoseraten, während PvuII in p53-profizienten Zellen nur marginale Apoptoseraten zu induzieren vermochte. Die Nekroserate war in beiden Zelllinien in den selben Versuchsansätzen nicht erhöht. Die Induktion der Apoptose nach Behandlung mit PvuII aber auch nach γ -Bestrahlung ging einher mit einem Abfall der Proteinmenge des antiapoptotischen Bcl-2, während die Bax-Proteinmenge unverändert blieb.

Zusammengenommen weisen die Versuchsergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, daß DNA-Doppelstrangbrüche, induziert durch PvuII wie auch durch ionisierende Strahlung, Apoptose induzieren und auch als kritischer Apoptose-induzierender Sekundärschaden nach DNA-Alkylierung in Frage kommen.

Inhalt

Abkürzungen

Zusammenfassung

1. Einleitung	1
1.1 Alkylanzien-induzierte DNA-Schäden und ihre Reparatur	1
1.2 Der DNA-Doppelstrangbruch als Intermediat zwischen DNA-Schaden und Zellantwort	3
1.3 Der Einfluß von p53 auf die DNA-schadensinduzierte Zellantwort	7
1.4 Ziele dieser Arbeit	10
2. Material und Methoden	13
2.1 Material und Tiere	13
2.1.1 Bakterienstämme und Säuger-Zelllinien	13
2.1.2 Tiere	15
2.1.3 Plasmide	15
2.1.4 Oligonukleotide	16
2.1.5 Antikörper	16
2.1.6 Enzyme	17
2.1.7 „Kits“	17
2.1.8 Spezial-, Radiochemikalien und Mutagene	18
2.1.9 Geräte	20
2.1.10 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.11 Lösungen	22
2.2 Arbeiten mit Säuger-Zellen	22
2.2.1 Kultivierung von Säuger-Zelllinien	22
2.2.2 Isolierung primärer Mausfibroblasten aus Embryonen	23
2.2.3 Mycoplasmen-Detektion und –Eliminierung	23

2.2.4	Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit	23
2.2.5	Elektroporation und Restriktion der DNA <i>in vivo</i>	24
2.2.6	Bestimmung der Zellzyklusverteilung mit dem FACS	24
2.2.7	Bestimmung des Zellzyklus' nach BrdU-Labeling mit dem FACS	24
2.3	Bestimmung von Apoptose und Nekrose	25
2.3.1	Bestimmung der Sub-G1-Population mit dem FACS	25
2.3.2	Annexin-V/Propidiumiodid-Labeling und FACS-Analyse	25
2.3.3	Detektion der nukleosomalen Fragmentierung	25
2.4	Bestimmung von Chromosomenaberrationen	26
2.4.1	Chromosomenpräparation	26
2.4.2	Signifikanzberechnung	27
2.5	Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mit der Einzelzellgelelektrophorese (SCGE; „Comet Assay“)	27
2.5.1	Neutrale Einzelzellgelelektrophorese	27
2.5.2	Alkalische Einzelzellgelelektrophorese	28
2.6	Zytotoxizitäts-Tests	28
2.6.1	Koloniebildungs-Test	28
2.6.2	MTT-Test	29
2.7	O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Aktivitäts-Test	29
2.8	Protein-Präparation	30
2.8.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	30
2.8.2	Gesamtproteinextraktion aus kultivierten Zellen	30
2.8.3	Kernproteinextraktion für Westernblot-Analysen	30
2.8.4	Kernproteinextraktion für Gelretardations-Analysen	31
2.8.5	Aufreinigung rekombinanter Proteine	31
2.8.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32

2.8.7	Westernblot-Analyse	32
2.9	Nukleinsäure-Präparation	33
2.9.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.9.2	Extraktion und Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen	33
2.9.3	Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Zellen und aus Frischgewebe der Maus	33
2.9.4	Plasmid-DNA-Isolierung	34
2.9.4.1	„Mini“-Präparation (1)	34
2.9.4.2	„Mini“-Präparation (2)	34
2.9.4.3	„Midi“- und „Maxi“- Präparation	35
2.9.5	Transfer von DNA auf Membranen	35
2.9.6	Hybridisierung von Nukleinsäuren	35
2.10	Radioaktives Labelling von DNA-Sonden und Doppelsträngigen Oligonukleotiden	36
2.11	Gelretardations-Analyse	37
2.12	Subklonierung und Arbeiten mit Bakterienstämmen	37
2.12.1	Restriktion von DNA <i>in vitro</i>	37
2.12.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden	38
2.12.3	Auffüllen von 5'-überstehenden DNA-Enden	38
2.12.4	Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.12.5	Agarose-Gelelektrophorese und Präparation von DNA aus dem Gel	39
2.12.6	Präparation CaCl ₂ -kompetenter Bakterien	39
2.12.7	Transformation CaCl ₂ -kompetenter Bakterien	39
2.12.8	Kryokonservierung von Bakterien	40
2.12.9	Koloniehybridisierung	40
2.13	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	41

3. Ergebnisse	42
3.1 DNA-Reparatur des O⁶-Methylguanin-Schadens	
Nach dem ersten Zellzyklus	42
3.1.1 MGMT repariert O ⁶ -MeG/C und O ⁶ -MeG/T <i>in vitro</i> mit gleicher Effizienz und wird nicht durch die Bindung von Basenfehlpaarungsreparaturproteinen beeinflusst	42
3.1.2 Zellen des „Toleranz“-Phänotyps sind defekt in der Bindung der G/T-Basenfehlpaarung	46
3.1.3 MGMT ist durch O ⁶ -Benzylguanin effektiv hemmbar	47
3.1.4 Arretierung von CHO-9 Zellen am Übergang von der G1- zur S-Phase und synchroner Eintritt in den Zellzyklus	48
3.1.5 Postreplikative Reparatur von O ⁶ -Methylguanin durch MGMT hat protektive Wirkung auf das zelluläre Überleben	49
3.2 Der DNA-Doppelstrangbruch als Folge der Einwirkung DNA-schädigender Agenzien	52
3.2.1 Charakterisierung der p53-profizienten (BK4+/+) und p53-defizienten (p53-/-E) Mausfibroblasten	52
3.2.2 Etablierung der Einzelzellgelelektrophorese (SCGE; „Comet Assay“), neutral und alkalisch	55
3.2.3 Gentoxische Agenzien induzieren DNA-Doppelstrangbrüche	56
3.2.3.1 DNA-Doppelstrangbruch-induzierende Wirkung von MNNG und MMS	56
3.2.3.2 Initiale DNA-Schädigung durch MMS	58
3.2.3.3 Protektive Wirkung von MGMT auf MNNG-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche	59
3.2.3.4 DNA-Doppelstrangbruch-induzierende Wirkung von β -D-Glucose-Ifofamid mustard, getestet in V79wt versus V79 CL-V5B Zellen	60
3.2.3.5 γ -Strahlung induziert DNA-Doppelstrangbrüche	61
3.2.4 Restriktionsendonukleasen induzieren DNA-Doppelstrangbrüche <i>in vivo</i>: ein Modellsystem	62
3.2.4.1 DNA-Doppelstrangbruch-Induktion durch die Restriktionsendonukleasen PvuII und EcoRI, die DNA-Enden unterschiedlicher Morphologie erzeugen ⁶³	

3.2.4.2 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch PvuII in Abhängigkeit von p53	65
3.3 DNA-Doppelstrangbrüche sind potentiell zytotoxisch und Klastogen	66
3.3.1 Gentoxische Agenzien entfalten ihre Zytotoxizität über Apoptose und Nekrose	66
3.3.1.1 MGMT-Aktivität nach MNNG- und MMS-Behandlung	66
3.3.1.2 p53 und DNA-PK _{CS} wirken der MNNG- und MMS-induzierten Zytotoxizität entgegen	67
3.3.1.3 Apoptose-induzierende Wirkung von MNNG und MMS	69
3.3.1.3 Zytotoxischer Effekt von γ -Strahlung auf p53-profiziente und p53-defiziente Mausfibroblasten	70
3.3.1.4 γ -Strahlung induziert Apoptose vornehmlich in p53-defizienten Mausfibroblasten	71
3.3.2 DNA-Polymerase β und MGMT wirken der MNNG-induzierten Zytotoxizität gemeinsam entgegen	73
3.3.2.1 Alkylanzien-induzierte Zytotoxizität in Abhängigkeit von MGMT und DNA-Polymerase β	73
3.3.2.2 Die Apoptose- und Nekrose-induzierende Wirkung von MNNG in Abhängigkeit von MGMT und DNA-Polymerase β	75
3.3.3 Restriktionsendonuklease-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche sind zytotoxisch und führen zu Apoptose	76
3.3.3.1 Zytotoxische Wirkung von PvuII versus EcoRI	76
3.3.3.2 Apoptose-Induktion durch verschiedene Restriktionsendonukleasen	77
3.3.3.3 Apoptose-induzierende Wirkung von PvuII versus EcoRI	78
3.3.3.4 PvuII-induzierte Zytotoxizität in Abhängigkeit von p53	80
3.3.3.5 Apoptose-induzierende Wirkung von PvuII in Abhängigkeit von p53	81
3.3.3.6 Zusammenhang zwischen DNA-Doppelstrangbruch- und Apoptose-Induktion nach Behandlung von Zellen mit PvuII und γ -Strahlung	83

3.3.4 Die Induktion der Apoptose in Mausfibroblasten und in Epithelzellen des Chinesischen Hamsters geht einher mit einer Verringerung der Bcl-2-Proteinmenge	84
3.3.4.1 Verringerung der Bcl-2-Proteinmengen nach Elektroporation von PvuII versus EcoRI und nach γ -Bestrahlung in CHO-9 Zellen	84
3.3.4.2 Verringerung der Bcl-2-Proteinmenge nach Elektroporation von PvuII und nach γ -Bestrahlung in Abhängigkeit von p53	85
3.3.5 Induktion von Chromosomenaberrationen durch unterschiedliche Noxen	87
3.3.5.1 Chromosomen-schädigende Wirkung von MMS	87
3.3.5.2 Chromosomen-schädigende Wirkung von PvuII versus EcoRI	88
3.3.5.3 Chromosomen-schädigende Wirkung von PvuII in Abhängigkeit von p53	89
3.3.6 Einfluß von p53 auf PvuII-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit Wortmannin und 3-Aminobenzamid	90
3.3.6.1 Einfluß von p53 auf die Prozessierung PvuII-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit Wortmannin und 3-Aminobenzamid	91
3.3.6.2 Einfluß von p53 PvuII-induzierte Apoptose bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit Wortmannin und 3-Aminobenzamid	93
3.3.6.3 Vergleich DNA-PK _{CS} -profizienter (Balb/c) und -defizienter (Scid) Mausfibroblasten hinsichtlich der Prozessierung PvuII-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche	94
4. Diskussion	96
4.1 Die postreplikative Reparatur am O ⁶ -Methylguanin-DNA-Schaden	96
4.2 Die Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Säuger-Zellen	100
4.3 Zellphysiologische Auswirkungen von DNA-Doppelstrangbrüchen	104
5. Literatur	111

Anhang

1. Einleitung

1.1 Alkylanzien-induzierte DNA-Schäden und ihre Reparatur

Alkylierende Agenzien sind Substanzen, die nukleophile Atome in der DNA *in vivo* und *in vitro* zumeist direkt über nukleophile Substitution oder die Bildung eines reaktiven Alkyldiazoniumions angreifen und ihre Methyl-, Ethyl-, Chlorethyl- oder sonstige Alkylgruppe kovalent an die DNA binden (Swenson, 1983). Alkylanzien werden in vier Gruppen eingeteilt: a) die Alkylsulfate, b) die Alkylalkansulfonate, zu denen u. a. Methylmethansulfonat (MMS) gehört, c) die Nitrosamine und d) die Nitrosamide, zu denen u. a. das monofunktionelle N-Methyl-N⁷-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) und das bifunktionelle 1,3-Bis(2-chlorethyl)-nitrosoharnstoff (BCNU) gezählt werden. MMS methyliert mit abnehmender Affinität die Atome N⁷-Guanin, N³-Adenin, N¹-Adenin, N⁷-Adenin, N³-Guanin und O⁶-Guanin, wobei ~0,3% aller insgesamt übertragenen Methylgruppen auf das O⁶-Atom des Guanins entfallen; MNNG überträgt eine Methylgruppe auf N⁷-Guanin, N³-Adenin, O⁶-Guanin (~7%), N³-Cytosin und N¹-Adenin (Beranek, 1990). 4% der von BCNU verursachten Chlorethylierungen sind an der Position O⁶ des Guanins zu finden (Tong *et al.*, 1982). Nachdem Alkylanzien anfänglich produziert wurden, um sie als Chemosterilanz gegen Insekten einzusetzen und erwogen wurde, sie als Kontrazeptivum für Männer zu gebrauchen (Jackson, 1964), wurde nach intensiven Untersuchungen ihr mutagenes, zytotoxisches, klastogenes, Schwesterchromatidaustausch (SCE)-induzierendes und kanzerogenes Potential erkannt. Dabei stellte sich heraus, daß sowohl die Alkylierungen am O- als auch am N-Atom genotoxische Auswirkungen haben (Natarajan *et al.*, 1984; van Zeeland *et al.*, 1985). In Zellen, die Alkylanzien-induzierte O⁶-Methylguanin (O⁶-MeG)-Läsionen nicht reparieren können, ist O⁶-MeG der Hauptauslöser der Toxizität, während in Reparatur-profizienten Zellen die N-Alkylierungen hauptsächlich dafür verantwortlich gemacht werden (Saffhill *et al.*, 1985; Kaina *et al.*, 1993). Aufgrund veränderter Basenpaarungseigenschaften von O⁶-MeG paart es mit Thymin anstatt mit Cytosin, so daß nach dem zweiten Replikationszyklus nach Behandlung eine G/C → A/T Transitionsmutation entsteht (Abbott & Saffhill, 1979; Eadie *et al.*, 1984; Murray, 1987). Diese Punktmutation kann zur Aktivierung zellulärer Proto-Onkogene wie beispielsweise dem H-ras führen (Sukumar *et al.*, 1983; Mitra *et al.*, 1989; Kamiya *et al.*, 1991; Pletsa

et al., 1992) und zur Transformation der Zelle einen entscheidenden Beitrag leisten (Tabin *et al.*, 1982; Balmain & Pragnell, 1983; Yoakum *et al.*, 1985).

Aufgrund der beschriebenen drastischen Auswirkungen des O⁶-MeG-DNA-Schadens für die Zelle und den Organismus kommt der präreplikativen Entfernung dieser Läsion große Bedeutung zu (Kaina *et al.*, 1991). Die Reparatur erfolgt durch Alkyltransferasen, die in *E. coli* vom *ada*- und *ogt*-Gen (Potter *et al.*, 1987; Bhattacharyya *et al.*, 1988), in Vertebraten vom O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Gen kodiert werden (Kaina *et al.*, 1991). MGMT (23 kDa; EC 2.1.1.63) entfernt die Methylgruppe und - mit geringerer Effizienz - längerkettige Alkyl- sowie Chlorethylgruppen von der O⁶-Position des Guanins und von der O⁴-Position des Thymins in einer stöchiometrischen Ein-Schritt-Reaktion („reversal of damage“) durch Übertragung auf das interne Cystein-145 innerhalb des katalytischen Zentrums mit der Aminosäuresequenz Pro-Cys-His-Arg-Val (Pegg, 1990; Mitra & Kaina, 1993; Pegg *et al.*, 1995). Dadurch wird Guanin restauriert, das Protein aber funktionell inaktiviert, so daß MGMT auch als Suizid-Enzym bezeichnet wird (Demple & Karran, 1983). Die Reaktion ist fehlerfrei und verläuft relativ schnell, verglichen mit der Entfernung von N-Alkylierungen durch die Basenexzisionsreparatur (BER; Friedberg *et al.*, 1995). Da MGMT durch die Reaktion inaktiviert wird und es infolgedessen zu einer Depletion des Proteins kommen kann, ist die rasche Neusynthese nach Behandlung von Zellen mit gentoxischen Agenzien von besonderer Relevanz (Fritz *et al.*, 1991; Fukuhara *et al.*, 1992).

Wie oben angesprochen, erfolgt die Reparatur der gentoxischen N-Alkylierungen durch die Basenexzisionsreparatur (BER), zu der mindestens die vier Enzyme Glykosylase, apurine/apyrimidine Endonuklease, DNA-Polymerase β (Pol β) und DNA-Ligase gehören (Prasad *et al.*, 1996; Srivastava *et al.*, 1998). Pol β ist hierbei ein entscheidender Faktor, wie Studien an Pol β -defizienten Zellen zeigten (Sobol *et al.*, 1996). Neueste Berichte wiesen Pol β eindeutig protektive Wirkung sowohl gegen Methylierungs-induzierte Zytotoxizität (Horton *et al.*, 2000) als auch gegen Alkylierungs-induzierte Apoptose und Chromosomenschädigung (Ochs *et al.*, 1999) zu.

Der Vergleich von Zellen, die keine MGMT-Aktivität zeigen (Mex⁻-Phänotyp) mit solchen, die aktives MGMT besitzen (Mex⁺-Phänotyp; Sklar & Strauss, 1981), hat entscheidende Einblicke in die Bedeutung des O⁶-MeG-DNA-Schadens und des MGMT-Reparaturproteins ermöglicht. Aus diesen Experimenten geht hervor, daß MGMT protektiv wirkt gegenüber der zytotoxischen (Day *et al.*, 1980; Scudiero *et al.*, 1984; Kataoka *et al.*, 1986; Samson *et al.*, 1986; Ishizaki *et al.*, 1986; Brennand & Margison, 1986a, Dunn *et al.*, 1991; Kaina *et al.*, 1991, 1997a, 1998), mutagenen (Brennand & Margison, 1986b; Kaina *et al.*, 1991; Aquilina *et al.*, 1992), kanzerogenen (Dumenco *et al.*, 1993;

Nakatsuru *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1996, 1997), SCE-induzierenden (Schwartz *et al.*, 1989; Kaina *et al.*, 1991) und klastogenen (White *et al.*, 1986; Kaina *et al.*, 1991, 1993, 1997a; Kaina 1998) Wirkungen O⁶-MeG-generierender Agenzien. Im Umkehrschluß bedeuten diese Versuchsergebnisse, daß nicht-repariertes O⁶-MeG verantwortlich ist für die gentoxischen und kanzerogenen Effekte dieser Substanzen. So protektiv die Wirkung von MGMT gegenüber Umwelt-bedingter Alkylanzien-Exposition auch ist, so unerwünscht kann die MGMT-Aktivität in Tumorzellen sein, die mit alkylierenden Agenzien chemotherapiert werden, weil MGMT in diesem speziellen Falle Resistenz bewirken kann (D'Incalci *et al.*, 1988; Kaina *et al.*, 1995; Maze *et al.*, 1996; Preuss *et al.*, 1996).

Während die Relevanz von MGMT nach Alkylanzien-Exposition unbestritten ist, bleiben Fragen hinsichtlich der molekularen Mechanismen, wie der O⁶-MeG-Schaden in die verschiedenen biologischen Endpunkte konvertiert wird, offen. So kommt es infolge der O⁶-MeG-Läsion nicht zu einem Replikationsblock, wie es bei apurinen Stellen, Pyrimidin-Dimeren und sogenannten „bulky-adducts“ in der DNA beobachtet werden kann. Vielmehr scheint der Prozeß der Basenfehlpaarung des O⁶-MeG mit Thymin sowie dessen Erkennung durch Basenfehlpaarungsreparatur (Mismatch-Reparatur; MMR)-Komponenten ursächlich involviert zu sein (Jones & Wagner, 1981; Karran & Marinus, 1982). Einen Hinweis auf die Entstehung der ultimalen DNA-Läsion liefert die Beobachtung, daß MNNG und Methylnitrosoharnstoff (MNU) SCEs fast ausschließlich im zweiten Replikationszyklus nach Behandlung zu induzieren vermögen (Kaina & Aurich, 1985). Das fällt zeitlich mit der Präsenz der O⁶-MeG/T-Fehlpaarung zusammen, die Substrat der MMR ist und als solche in Zusammenhang mit der O⁶-MeG-vermittelten Zytotoxizität gebracht wird (Karran & Stephenson, 1990; Karran & Bignami, 1992). Unterstützt wird die Hypothese, daß MMR-defekte Bakterien (Jones & Wagner, 1981; Karran & Marinus, 1982), MSH2-defiziente humane Tumorzelllinien (Kat *et al.*, 1993; Branch *et al.*, 1993; Branch *et al.*, 1995), Zellen von MSH2-Knockout-Mäusen (de Wind *et al.*, 1995), hPMS2-mutante Karzinomzellen (Risinger *et al.*, 1995) und MMR-defekte CHO-Zellen des sogenannten „Toleranz“-Phänotyps (Goldmacher *et al.*, 1986; Fritz *et al.*, 1993; Dosch *et al.*, 1998) Resistenz gegenüber MNNG aufweisen.

1.2 Der DNA-Doppelstrangbruch als Intermediat zwischen DNA-Schaden und Zellantwort

Der DNA-Doppelstrangbruch (DSB), d. h. die vollständige Diskontinuität beider Einzelstränge der DNA-Doppelhelix in enger Nachbarschaft, ist eine der schwersten Schädigungen, die der DNA

widerfahren kann. Die Entstehung von DSBs im genetischen Material kann auf unterschiedliche Weise erfolgen, wobei zwischen intrazellulären Prozessen und exogenen Einwirkungen unterschieden werden kann. Endogene Prozesse, die zu DSBs führen, sind **1**) spontane Zerfälle der DNA (Lindahl, 1993), **2**) nicht-enzymatische Hydrolyse- und Oxidationsreaktionen durch reaktive Sauerstoffspezies wie den Saustoffanionen (HO_2^- , O_2^{2-}), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hypochlorit (HOCl), die im Zuge der mitochondrialen Atmungskette (Wei, 1998) und bei inflammatorischen Reaktionen entstehen (Bernofsky, 1991; Pero *et al.*, 1996), **3**) enzymatische Reaktionen durch Topoisomerasen (Wang, 1996), **4**) Replikation (Roth & Wilson, 1988; Lieber, 1997; Tishkoff *et al.*, 1997; Haber, 1999), **5**) Meiose (Sun *et al.*, 1989; Keeney *et al.*, 1997, 1999; McKim & Hayashi-Hagihara, 1998; Romanienko & Camerini-Otero, 1999), **6**) V(D)J-Rekombination (Gellert, 1992; Jackson & Jeggo, 1995; Grawunder *et al.*, 1998; Roth & Craig, 1998), **7**) andere Rekombinationsprozesse (Haber, 1992), **8**) Exzision und Reinsertion transposabler Elemente, auch in menschlichen Zellen (Finnegan, 1994; Lim & Simmons, 1994; Erickson & Lewis, 1995; Hall & Collis, 1995; Britten, 1997; Labrador & Corces, 1997), **9**) Reaktionen an Mikro- und Minisatellitensequenzen (Jeffreys *et al.*, 1997; Sutherland *et al.*, 1998; Debrauwere *et al.*, 1999), **10**) DNA-Exzisionsreparatur-Prozesse: Basenfehlpaarungsreparatur (Mismatch-Reparatur, MMR), Basenexzisionsreparatur (BER) und Nukleotidexzisionsreparatur (NER) (Doutriaux *et al.*, 1986; Croteau & Bohr, 1997; Cunningham, 1997; Wilson & Thompson, 1997). Zu den exogenen Einwirkungen, die DSBs induzieren, gehören **1**) ionisierende Strahlen: Röntgenstrahlung (Olive *et al.*, 1990; Olive & Banath, 1993), γ -Strahlung (Östling & Johanson, 1987; Vijayalaxmi *et al.*, 1993) und α -Strahlung (Jostes *et al.*, 1993), die direkt oder indirekt über die Radiolyse von Wasser (Ward, 1985) und die Generierung von Radikalen auf die DNA einwirken (Mello Filho & Meneghini, 1984; Narayanan *et al.*, 1997; Sheng-Tanner, 1999), **2**) UV-Strahlung (Gedik *et al.*, 1992; McKelvey-Martin *et al.*, 1993; Arlett *et al.*, 1993; Green *et al.*, 1994), **3**) chemische Substanzen, die mannigfaltige DNA-Läsionen erzeugen wie zum Beispiel Bleomycin (Östling & Johanson, 1987; Olive & Banath, 1993), MMS (Resnick & Martin, 1976; Frankenberg-Schwager & Frankenberg, 1990; Green *et al.*, 1992; Speit *et al.*, 1999) und MNNG (Pool-Zobel *et al.*, 1992; Michalek *et al.*, 1993; Hartmann & Speit, 1994, 1995).

Die physiologischen Auswirkungen von DSBs für die Zelle und den Organismus sind gut untersucht. So ist seit langem bekannt, daß DSBs die Voraussetzung für die Entstehung von Chromosomenaberrationen sind (Natarajan & Obe, 1978; Natarajan *et al.*, 1980; Obe *et al.*, 1982; Nowak & Obe, 1984). Bei diesen Untersuchungen hat sich die Verwendung von Restriktionsendonukleasen bewährt, die, durch Elektroporation in die Zelle hineingebracht, ohne andere Schäden zu verursachen DSBs induzieren (Bryant & Liu, 1994; Thacker, 1994). Im Gegensatz dazu verursachen γ - und Röntgenstrahlen, die klassischen DSBs-Induktoren, zusätzlich eine Vielzahl

anderer DNA- und Zellschädigungen. Die Tatsache, daß eine Behandlung von Zellen mit Restriktionsendonukleasen die Rate an Chromosomenaberrationen erhöht, unterstützt die Vorstellung, daß DSBs die Auslöser für Chromosomenaberrationen sind (Natarajan & Obe, 1984; Obe *et al.*, 1992; Yates & Morgan, 1993). Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Restriktionsendonukleasen zur DSB-Induktion ist die spezifische Generierung von DNA-Enden definierter Struktur mit a) stumpfen Enden („blunt-ends“), b) 5'-überhängenden oder c) 3'-überhängenden Enden („cohesive-ends“, „sticky-ends“). Daraufhin wurden die molekularen Mechanismen der Entstehung der Chromosomenaberrationen sowie der DSB-Reparatur in Abhängigkeit vom produzierten DNA-Ende untersucht (Winegar *et al.*, 1992; King *et al.*, 1993; Philips & Morgan, 1994; Pfeiffer, 1998). DSBs mit stumpfen Enden besitzen eine größere Klastogenität als DSBs mit überhängenden Enden (Winegar & Preston, 1988; Moses *et al.*, 1990; Costa & Bryant, 1991). Eindrucksvolle Beispiele für die Wichtigkeit der chromosomalen Integrität sind Krankheiten wie das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS), Fanconi Anämie (FA), Bloom Syndrom (BS), Werner Syndrom (WS) und Ataxia Telangiectasia (AT) (Lavin *et al.*, 1999). Neben schweren physiologischen Defekten, Tumorprädisposition und beim WS vorzeitigem Altern weisen alle Patienten mit einer solchen Krankheit eine stark erhöhte Frequenz spontaner chromosomaler Aberrationen auf. Zwar sind die molekularen Ursachen dieser Krankheiten noch nicht vollständig erforscht, jedoch ist in allen zumindest ein Defekt in der DNA-Reparatur nachgewiesen worden. Der homozygote Verlust eines der beiden BRCA-Tumorsuppressorgene, dessen Genprodukte an der DSB-Reparatur beteiligt sind, führt ebenfalls zu drastisch erhöhter Chromosomeninstabilität und wird für den hereditären familiären Brustkrebs verantwortlich gemacht (Zhang *et al.*, 1998).

Durch ionisierende Strahlung und durch Restriktionsendonukleasen induzierte DSBs sind aber nicht nur klastogen, sondern auch zytotoxisch (Bryant, 1985; Winckler *et al.*, 1988; Obe *et al.*, 1992; Costa *et al.*, 1993; Obe *et al.*, 1995; Strathern *et al.*, 1995; Costa & Thacker, 1996). Ebenso sind beide unterschiedlich induzierten DSBs gleichermaßen potentiell mutagen (Pfeiffer, 1998) und fähig, Proto-Onkogene zu aktivieren (Weinberg, 1988; Bryant & Ritches, 1989; Pierotti *et al.*, 1992) oder Tumorsuppressorgene zu inaktivieren und somit der Kanzerogenese Vorschub zu leisten (Weinberg, 1991; Mitelman *et al.*, 1997; Cheng & Loeb, 1997; Cho & Hendrick, 1997; Hagmar *et al.*, 1998). Intensive Untersuchungen zeigten auch, daß DSBs Auslöser für einen G1/S-Zellzyklusarrest sind, was der Zelle Zeit zum Reparieren der DNA-Schäden vor der Replikation geben sollte (Nelson & Kastan, 1994; Siede 1995).

Aufgrund der dramatischen Auswirkungen, die DSBs für die Zelle und den Organismus haben können, ist das Vorhandensein effektiver Reparaturmechanismen von größter Bedeutung. Während zelluläre Reparatursysteme wie MMR, BER und NER ein Template, d. h. komplementäre Sequenzen

der wiederherzustellenden DNA (vom Schwesterchromatid oder vom homologen Chromosom) benötigen, steht die DSB-Reparatur vor dem Problem, daß ihr oftmals kein Template zur Verfügung steht und freie DNA-Enden religiert werden müssen. Heute unterscheidet man zwei wesentliche DSB-Reparaturmechanismen: die homologe Rekombination (HR) und die illegitime Rekombination, welche auch als nicht-homologes End-joining (NHEJ) bezeichnet wird (Kanaar *et al.*, 1998; Tsukamoto & Ikeda, 1998; Haber, 1999). Die DSB-Reparatur durch HR ist präzise und nahezu fehlerfrei, benötigt das Vorhandensein homologer Sequenzen und ist ein entscheidender Faktor innerhalb der mitotischen Rekombination/Crossing-over (Würgler & Fahrig, 1993). Wichtige Komponenten dieses Reparatursystems in Säuger-Zellen sind die Proteine RAD51, RAD52, RAD54, RAD55 und RAD57 (Bezzubova *et al.*, 1993a,b; Morita *et al.*, 1993; Shinohara *et al.*, 1993; Kanaar *et al.*, 1996) sowie die Proteine RAD50, MRE11 und NBS1, die als Nukleasekomplex vorliegen (Featherstone & Jackson, 1998; Haber, 1998; Paull & Gellert, 1998; Trujillo *et al.*, 1998). Außerdem sind an der HR akzessorische Proteine beteiligt, wie zum Beispiel die BRCA1- und BRCA2-Proteine sowie p53, die mit Rad51, mit dem Rad50/Mre11-Komplex oder auch miteinander interagieren können (Stürzbecher *et al.*, 1996; Scully *et al.*, 1997; Dudenhöffer *et al.*, 1998; Marmorstein *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Moynahan *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 1999; Süsse *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu Hefe-Zellen, die DSBs vorwiegend über HR reparieren, scheinen Säuger-Zellen zur Reparatur von DSBs vorwiegend auf NHEJ zurückzugreifen (Roth & Wilson, 1988; Pfeiffer *et al.*, 2000). Untersuchungen an NHEJ-Mutanten zeigten, daß dieser Reparaturmechanismus unterteilt werden kann in einen „akkuraten“, Ku-Protein-abhängigen Weg und einen „fehler-behafteten“, Ku-Protein-unabhängigen Weg (Pfeiffer *et al.*, 2000; Feldmann *et al.*, 2000), wobei dem Vorhandensein von Ku86-Protein protektive Wirkung auf die Chromosomenstabilität nachgewiesen wurde (Difilippantonio *et al.*, 2000). Allgemein ist NHEJ ein Prozeß, der zwar DSBs mit Enden mit Mikrohomologien (1-10 bp) erkennt aber vor allem nicht-komplementäre DNA-Enden ungeachtet ihrer Sequenz oder Struktur repariert (Pellicier *et al.*, 1980; Perucho *et al.*, 1980). Dieser Mechanismus geht infolgedessen einher mit einer höheren Fehlerrate, was die Restaurierung der ursprünglichen DNA-Sequenz angeht. Die Gene und somit die Proteine, die am NHEJ im wesentlichen beteiligt sind, wurden aus Zellen identifiziert, die gegenüber ionisierender Strahlung hypersensitiv und defekt in der DSB-Reparatur und V(D)J-Rekombination waren (Jeggo, 1990, 1998a; Zdzienicka, 1999). XRCC4 (Li *et al.*, 1995) als essentieller Kofaktor der DNA-Ligase IV (Critchlow *et al.*, 1997; Grawunder *et al.*, 1997) sowie die drei Untereinheiten der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), Ku70, Ku86 und die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PK_{CS}), sind die bisher identifizierten Proteine des NHEJ (Jackson & Jeggo, 1995; Jeggo, 1997). Die beiden Ku-Proteine bilden ein Heterodimer, das mit DNA-PK_{CS} komplexiert vorliegt. Wenn das Ku-Heterodimer den DSB bindet, wird die Serin/Threonin-Kinase-Domäne von DNA-PK_{CS} aktiviert, was

zur Phosphorylierung zahlreicher Substrate, u. a. XRCC4 und p53, führt. Da DSBs oftmals nicht zueinander passende Enden aufweisen, müssen diese vor der Religation durch den DNA-Ligase IV-XRCC4-Komplex durch Exo- und/oder Endonukleasen „getrimmt“ werden, was durch den Rad50/Mre11/Nbs1-Komplex erfolgen kann. Zudem gibt es Hinweise, daß der Rad50/Mre11/Nbs1-Nukleasekomplex direkt mit Ku70 (Goedecke *et al.*, 1999) sowie p53 indirekt mit DNA-PK_{CS} (Wang *et al.*, 2000) interagieren kann. Eine Auffüllung eventueller Lücken im DNA-Strang erfolgt durch eine DNA-Polymerase, deren Identität bis dato unbekannt ist.

Neben DNA-PK_{CS} gibt es in Säuger-Zellen zwei weitere Proteine, ATM und ATR, die das Signal des DNA-Schadens weiterleiten können. ATM bindet ebenfalls DSBs, induziert durch ionisierende Strahlung, und phosphoryliert infolgedessen p53. Fehlt ATM, kommt es zu keiner p53-Phosphorylierung (Nakagawa *et al.*, 1999). ATR vermag ebenfalls Zielproteine wie p53 nach DNA-Schädigung zu phosphorylieren. Ob DNA-PK_{CS}, ATM und ATR verschiedene Typen von DSBs erkennen, zu unterschiedlichen Zeiten im Zellzyklus aktiv sind oder in verschiedenen Kompartimenten des Kerns vorliegen, ist unklar. Zellen und Tiere mit Mutationen im Gen, das für DNA-PK_{CS} kodiert, sind hypersensitiv gegenüber ionisierender Strahlung und werden Scid (*severe combined immunodeficient*) genannt. Diese Mutation verhindert die V(D)J-Rekombination der Immunglobulingene, was für die normale Entwicklung der Antikörper und T-Zell-Rezeptoren essentiell ist (Lieber *et al.*, 1988; Fulop & Phillips, 1990; Biedermann *et al.*, 1991; Hendrickson *et al.*, 1991).

Neben den genannten Reparaturproteinen gibt es die Poly(ADP-Ribosyl)-Polymerase (PARP), die an DNA-Schäden, besonders DNA-Brüchen, bindet, dadurch aktiviert wird und den Transfer von ADP-Ribose-Einheiten vom Substrat NAD⁺ auf Empfänger-Moleküle, u. a. auf eine eigene Automodifikationsdomäne, auf Histone, Lamine, Topoisomerasen und DNA-Polymerasen katalysiert (Althaus & Richter, 1987; Jeggo, 1998b). Danach fällt das Protein von der DNA ab und andere Proteine können die Bruchstelle binden, womit PARP ein restriktiver Effekt auf die Rekombination zugeschrieben wird (Sato & Lindahl, 1992; Shall, 1995). Auch vermag PARP DNA-Enden zu verbinden und die Integration von Fremd-DNA in das Genom zu erleichtern (Farzaneh *et al.*, 1988; Ding *et al.*, 1992). Die Inhibition von PARP durch 3-Aminobenzamid führt zu erhöhter genomischer Instabilität nach Behandlung von Zellen mit DNA-schädigenden Agenzien (Catena *et al.*, 1994; Steirum *et al.*, 1995).

1.3 Der Einfluß von p53 auf die DNA-schadensinduzierte Zellantwort

Eine Schlüsselrolle innerhalb der Streß-induzierten Zellantwort nimmt das Protein p53 ein, welches in ~50% aller menschlichen Tumore mutiert ist (Lane & Crawford, 1979; Hollstein *et al.*, 1991; Levine, 1997; Agarwal *et al.*, 1998). Die wahre Bedeutung von p53 wird nicht während der normalen Entwicklung sondern erst nach Stimulation der Zelle durch Noxen erkennbar (Donehower *et al.*, 1992). DNA-Schädigung durch Elektroporation von Restriktionsendonukleasen in die Zelle (Nelson & Kastan, 1994; Levine, 1997), ionisierende Strahlung (Kastan *et al.*, 1991; Kuerbitz *et al.*, 1992), UV-Strahlung (Maltzman & Czyzyk, 1984; Lu & Lane, 1993) Schädigung des Spindelapparates (Cross *et al.*, 1995), Ribonukleotid-Depletion (Linke *et al.*, 1996), Hypoxie (Graeber *et al.*, 1996), Hitzeschock (Ohnishi *et al.*, 1996) und Stickstoffmonoxid (Forrester *et al.*, 1996) sind Auslöser für eine Induktion von p53. Ebenso führt eine Anhäufung chromosomaler Schäden zur Akkumultion von p53, was seine Bedeutung innerhalb der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität zeigt (Lane, 1992; Bouffler *et al.*, 1995). Des weiteren kann p53 induziert werden durch eine Reihe von oncogenen Proteinen, wie zum Beispiel Myc, Ras, Adenovirus E1A und auch β -Catenin (Debbas & White, 1993; Hermeking & Eick, 1994; Serrano *et al.*, 1997; Damalas *et al.*, 1999). Die Akkumulation von p53 durch aktivierende Signale beruht hauptsächlich auf post-translationalen Mechanismen, die die Halbwertszeit des Proteins deutlich erhöhen und die die latente Form des p53 in eine aktive überführen (Hupp *et al.*, 1992; Bayle *et al.*, 1995; Wolkowicz *et al.*, 1995). Diese p53-Aktivierung ist eine Folge von Phosphorylierung, Glykosylierung, Oxidation/Reduktion, Acetylierung, Bindung von regulatorischen Proteinen und/oder alternativem Splicing und verändert sowohl die DNA-Bindeeigenschaften als auch die Aktivitäten des Proteins (Ko & Prives, 1996). Eine wichtige p53-aktivierende Kinase ist DNA-PK_{CS}, welche durch DSBs aktiviert wird und infolgedessen p53 phosphoryliert (Lees-Miller *et al.*, 1992; Gottlieb & Jackson, 1993; Fiscella *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996). Auch die in Reparaturprozesse involvierte PARP ist an der Aktivierung von p53 beteiligt (Whitacre *et al.*, 1995), wobei das Fehlen von PARP in Mausfibroblasten zwar zu verringerter p53-Induktion nach Streß-Einfluß führt, welches sich aber nicht in veränderter DNA-Reparatur oder Apoptose-Induktion in diesen Zellen bemerkbar macht (Wang *et al.*, 1995; Agarwal *et al.*, 1997).

Neben entscheidenden Funktionen innerhalb des Zellzyklusarrests nach DNA-Schädigung (Agarwal *et al.*, 1995; Pellegata *et al.*, 1996) ist p53 an der Replikation und basalen Transkription beteiligt (Dutta *et al.*, 1993; Li & Botchan, 1993; Wang, 1999). Die Aktivierung von p53 nimmt wichtigen Einfluß auf die DNA-Reparatur durch Interaktion mit Komponenten der HR (Stürzbecher *et al.*, 1996;

Marmorstein *et al.*, 1998; Süsse *et al.* 2000), des NHEJ (Bristow *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000), der NER (Abramova *et al.*, 1998; Ford *et al.*, 1998; McKay *et al.*, 1999), MGMT (Harris *et al.*, 1996; Grombacher *et al.*, 1998), durch seine Exonuklease-Aktivität (Mummenbrauer *et al.*, 1996) und durch seine Fähigkeit, die Hybridisierung komplementärer Nukleinsäure-Einzelstränge zu katalysieren (Oberosler *et al.*, 1993).

Nach Schädigung der DNA kann es neben oder wegen der p53-Aktivierung und verstärkter DNA-Reparatur zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose kommen. Die Apoptose ist ein biochemischer Mechanismus, der die Zelle eines Metazoons als Antwort auf ein spezifisches Signal programmiert absterben läßt, somit die Zellzahl in Geweben kontrolliert und geschädigte Zellen, die den Organismus gefährden könnten, eliminiert (Vaux, 1993; Evan & Littlewood, 1998). Die apoptotische Zelle ist charakterisiert durch eine Reihe morphologischer Kennzeichen, wie die Kern-/Zytoplasmakondensation und die Bildung apoptotischer Körperchen (Kerr *et al.*, 1972; Bursch *et al.*, 1992). Noch bevor es zur Auflösung der Zelle und zum Freiwerden reaktiver Substanzen, die die umliegenden Zellen und Gewebe schädigen könnten, kommt, erfolgt die Phagozytose durch benachbarte Zellen (Savill *et al.*, 1993). Neben den morphologischen gibt es die biochemischen Kennzeichen der Apoptose (Fadeel *et al.*, 1999). Dazu gehören der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials einhergehend mit Cytochrom c-Efflux, die Umlagerung des membrangebundenen Phosphatidylserins von der Innen- zur Außenseite, die intrazelluläre Azidifikation, die selektive Proteolyse zellulärer Proteine sowie die DNA-Degradation zu nukleosomalen Bruchstücken (Wyllie *et al.*, 1984; Hockenbery *et al.*, 1993; Lazebnik *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1995; Gottlieb *et al.*, 1996; Zazami *et al.*, 1996; Green & Reed, 1998). Steuerungselemente dieses programmierten Zelltod-Apparates sind die Caspasen. Dies sind Cysteinproteasen mit Aspartat-Spezifität, die nach Aktivierung Substrat-Proteine spalten und die Signalkaskade in Richtung apoptotischen Zelltod vorantreiben (Salvesen & Dixit, 1997; Nicholson & Thornberry, 1997; Thornberry & Lazebnik, 1998; Cryns & Yuan, 1998).

Im Gegensatz zur Apoptose steht die zweite „Zelltod-Variante“ von mehrzelligen Organismen, die Nekrose, die die Folge von lethal-toxischen oder traumatischen Verletzungen der Zelle ist und zu passivem, nicht-programmiertem Zelltod führt (Bonfoco *et al.*, 1995). Die Nekrose geht im Gegensatz zur Apoptose einher mit einem unkontrollierten, energieunabhängigen Zusammenbruch der Zellstruktur, -funktionen und -homöostase, führt zur Auflösung der Membranen, zum Freiwerden intrazellulärer Bestandteile und infolgedessen zu inflammatorischen Reaktionen des Organismus' (Swartz *et al.*, 1993; Kerr *et al.*, 1994; Voll *et al.*, 1997; Fiers *et al.*, 1999; Kolenko *et al.*, 1999; Melcher *et al.*, 1999).

Determinierende Funktionen innerhalb der Apoptose-Regulation nehmen die Proteine der Bcl-2-Familie ein, die in pro- und antiapoptotisch eingeteilt werden (Reed, 1997, 1998; Adams & Cory, 1998). Gemeinsam ist allen Proteinen dieser Familie mindestens eine von vier Bcl-2-Homologie-Domänen. Die funktionelle Unterscheidung beruht auf der physiologischen Auswirkung hinsichtlich der Förderung oder der Verhinderung der Apoptose (Fadeel *et al.*, 1999). Bcl-2 ist das meist-untersuchte antiapoptotische Protein, zu dessen Gruppe unter anderem noch Bcl_{XL} gehört. Wichtiges proapoptotisches Protein ist Bax, welches mit Bak, Bad und anderen zusammengefaßt wird. Bcl-2 hemmt Apoptose hauptsächlich durch Verhinderung der mitochondrialen Cytochrom c-Freisetzung (Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997). Dabei ist die subzelluläre Lokalisation des membrangebundenen Bcl-2 und des cytosolischen Bax bestimmend. Während Bax homo- und mit Bcl-2 heterodimerisieren kann, vermag Bcl-2 nicht zu homodimerisieren (Oltvai *et al.*, 1993; Oltvai & Korsmeyer, 1994; Schendel *et al.*, 1997; Rosse *et al.*, 1998; Conus *et al.*, 2000). Infolge von Apoptose-Stimuli kommt es zu einer Veränderung der Dimerisierungseigenschaften von Bcl-2 und Bax und zu einer subzellulären Umlagerung, so daß der mitochondriale Cytochrom c-Efflux in Abhängigkeit vom Mengenverhältnis der verschiedenen Dimere gefördert oder gehemmt wird (Gross *et al.*, 1998; Jürgensmeier *et al.*, 1998).

Ein wichtiges Signalmolekül der Apoptoseinduktion/-prävention ist p53. Klassische Arbeiten weisen p53 direkt eine Apoptose-induzierende Funktion zu (Yonish-Rouach *et al.*, 1991; Clarke *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1993a, b; Lu & Lane, 1993; Strasser *et al.*, 1994; Symonds *et al.*, 1994; Polyak *et al.*, 1997), die genauen Mechanismen sind aber noch Gegenstand der Forschung. p21 wird als Mediator p53-induzierter Apoptose ausgeschlossen (Cannon *et al.*, 1995). Zwar kann p53 proapoptotisches Bax auf transkriptioneller Ebene direkt aktivieren (Miyashita & Reed, 1995; Han *et al.*, 1996), aber Thymocyten aus Bax-Knockout-Mäusen können nach wie vor den p53-abhängigen Apoptoseweg beschreiten (Knudson *et al.*, 1995). Desweiteren ist p53 fähig, die Transkription des Fas-Rezeptors zu stimulieren und die des antiapoptotisches Bcl-2 zu hemmen (Miyashita *et al.*, 1994a, b), aber auch dies ist nicht der einzige Weg, der zur Apoptose führt (Vogt Sionov & Haupt, 1999). Man favorisiert statt dessen die zwei sich einander nicht ausschließenden Modelle, daß p53 vermittelte Apoptose sowohl durch seine sequenzspezifische Transaktivierung, d. h. p53 wirkt als transkriptioneller Aktivator (Amundson *et al.*, 1998; Bates & Vousden, 1999), als auch unabhängig davon erfolgen kann (Caelles *et al.*, 1994). Weiterhin ist die p53-Aktivierung und daraus resultierende Apoptose-Induktion vom Zelltyp abhängig (Midgley *et al.*, 1995). Ein wichtiger Aspekt der Diskussion um die Apoptose-Induktion wurde in den letzten Jahren immer mehr bestätigt: Apoptose kann auch unabhängig von p53 erfolgen (Berges *et al.*, 1993; Kelley *et al.*, 1994; Strasser *et al.*, 1994; Zhuang *et al.*, 1995; Kruyt *et al.*, 1996; Shao *et al.*, 1997; Aladjem *et al.*, 1998; Casenghi *et al.*, 1999; Schmitt & Lowe, 1999; Lackinger & Kaina, 2000). p53-abhängige und -unabhängige Apoptose-Induktion

können einen unterschiedlichen zeitlichen Verlauf nach DNA-Schädigung nehmen und stehen miteinander in Verbindung (Frenkel *et al.*, 1999; Uberti *et al.*, 1999).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Unter dem Gesichtspunkt der zytotoxischen, mutagenen, klastogenen und infolgedessen kanzerogenen Eigenschaften alkylierender Agenzien ist ihre Wirkweise in der Zelle sowie die Eliminierung oder Tolerierung der verursachten Schadensprodukte von großem Interesse. Entscheidende Bedeutung kommt hierbei Methylierungen in der O⁶-Position des Guanins zu, weil die daraus resultierenden DNA-Schäden für die oben genannten Auswirkungen hauptverantwortlich sein können.

Es ist bekannt, daß das Reparaturprotein O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) O⁶-Methylguanin (O⁶-MeG) reparieren und somit den drastischen Folgen dieser DNA-Läsion entgegenwirken kann. Ebenso können die Proteine der Basenfehlpaarungsreparatur (MMR) den durch O⁶-MeG verursachten Sekundärschaden, nämlich die infolge der Replikation entstandene G/T-Basenfehlpaarung, beheben. Unbekannt war bei diesem Mechanismus jedoch, ob die Reparatureffizienz von MGMT an O⁶-MeG/T verändert ist gegenüber O⁶-MeG/C, was mit Hilfe eines *in vitro*-MGMT-Aktivitätstests untersucht werden sollte.

Da an die O⁶-MeG/T-Basenfehlpaarung auch MMR-Proteine binden, war die nächste Frage, ob die Bindung von MGMT an den Substraten O⁶-MeG/C und O⁶-MeG/T und die Reparatur von O⁶-MeG durch die gleichzeitige Bindung von MMR-Komponenten behindert wird. Diese Fragen sollten ebenfalls mit Hilfe eines modifizierten MGMT-Aktivitätstest *in vitro* untersucht werden.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, wurde die Frage untersucht, ob die Entfernung des O⁶-MeG-DNA-Schadens durch MGMT nach dem ersten Replikationszyklus eine protektive Wirkung auf das Zellüberleben hat. Dazu sollte ein Modellsystem entworfen werden, mit dem das Koloniebildungsvermögen von Zellen nach Induktion des O⁶-MeG-DNA-Schadens bestimmt werden kann, wobei die MGMT-Aktivität selektiv im zweiten Zellzyklus induziert werden sollte.

Die Beobachtungen, daß alkylierende Agenzien Chromosomenaberrationen und Apoptose induzieren und daß klassische DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-induzierende Noxen wie ionisierende Strahlen ebenfalls Chromosomenaberrationen und Apoptose induzieren, sind Indizien für die Hypothese, daß alkylierende Agenzien ihre klastogene und zytotoxische Wirkung ebenso über die Induktion von DSBs entfalten. Diese Hypothese wird durch eine weitere interessante Beobachtung unterstützt, nämlich daß der zytotoxische O⁶-MeG-DNA-Schaden von Zellen des „Toleranz“-Phänotyps, die in der Basenfehlpaarungsreparatur defekt sind, toleriert wird. Diese Tatsache impliziert, daß die

Prozessierung des O⁶-MeG-DNA-Schadens durch das MMR-System an der zytotoxischen Determinierung beteiligt ist, was nach heutiger Vorstellung durch Doppelstrangbrüche vermittelt werden könnte.

Die vorliegende Arbeit sollte daher, diesen Hypothesen folgend, nachstehende Fragen beantworten:

- 1.) Induzieren genotoxische Agenzien im allgemeinen und Alkylanzien im besonderen DNA-Doppelstrangbrüche?
- 2.) Sind es die DNA-Doppelstrangbrüche und nicht pleiotrope Effekte genotoxischer Exposition, die die Apoptose induzieren?
- 3.) Welche Auswirkungen haben DNA-Doppelstrangbrüche hinsichtlich der Induktion von Zelltod und Chromosomenaberrationen?
- 4.) Gibt es Unterschiede in der DNA-Doppelstrangbruch- und Apoptose-induzierenden Wirkung von Restriktionsendonukleasen, die DSBs unterschiedlicher Morphologie („blunt-end“ versus „cohesive-end“) erzeugen?
- 5.) Wirkt das Tumorsuppressorprotein p53 der DNA-Doppelstrangbruch- bzw. Apoptose-induzierenden Wirkung genotoxischer Agenzien entgegen?
- 6.) Welchen Einfluß hat MGMT zusammen mit der DNA-Polymerase β als Bestandteil der Basenexzisionsreparatur auf Alkylanzien-induzierte Zytotoxizität und Apoptose?
- 7.) Läßt sich die Doppelstrangbruchreparatur und infolgedessen die Apoptose-Induktion durch Hemmung der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase durch Wortmannin oder durch Hemmung der Poly (ADP-Ribosyl)-Polymerase durch 3-Aminobenzamid in Abhängigkeit vom p53-Status modifizieren?

2. Material & Methoden

2.1 Material und Tiere

2.1.1 Bakterienstämme und Säuger-Zelllinien

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet:

E. coli DH5 α F⁸⁰lacZ Δ (lacZYA-argF)U169 *endA1 recA1 hsd* R17(rk-mk+) *deoR supE44 thi* -
1 λ - *gyrA96 relA1* (Woodcock *et al.*, 1989)

E. coli sure e14⁻(McrA⁻) Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB*
recJ sbcC umuC::Tn5(kan^r) uvrC [F⁺*proAB lacIqZ* Δ M15 Tn10 (Tet^r) Amy Camr]
(Greener, 1990)

E. coli BL21 F⁺ *ompT gal[dcm] [lon] hsdS_B* (r_B⁻ m_B⁻; an *E. coli* B strain) with DE 3, a λ prophage
carrying the T7 RNA polymerase gene (Studier *et al.*, 1990)

Für Bakterien verwendete Medien:

Luria Broth Base (LB): 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl, dH₂O ad 1 l, pH 7,5

SOB-Medium: 20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 250 mM KCl,
10 ml 1 M MgCl₂, dH₂O ad 1 l, pH 7,5

SOC-Medium: 20 ml 1 M Glucose/500 ml SOB-Medium

LB-, SOB-Platten: 15 g Agar/1 l Medium

Folgende Säugerzelllinien wurden verwendet:

CHO-9 Epithelzelllinie aus dem Ovar des Chinesischen Hamsters, mex⁻;
in DMEM F12/5% FBS (Kaina, 1987)

CHO-9neoC5 Epithelzelllinie aus dem Ovar des Chinesischen Hamsters, stabil
transfiziert mit pSV2neo, mex⁻; in DMEM F12/5% FBS
(Kaina *et al.*, 1991)

CHO-9TK47AT17C3	Epithelzelllinie aus dem Ovar des Chinesischen Hamsters, stabil transfiziert mit pSV2neo:hMGMT, mex ⁺ ; in DMEM F12/5% FBS (Kaina <i>et al.</i> , 1991)
CHO-9TK22cos-9/5-1/2C1M	Epithelzelllinie aus dem Ovar des Chinesischen Hamsters, transfiziert mit einer Cosmid-Bank humaner DNA (c81) und pSV2neo, MNNG-resistent, mex ⁻ , sogen. „Toleranz“-Phänotyp; in DMEM F12/10% FBS (Fritz <i>et al.</i> , 1993)
BK4+/+	etablierte Mausfibroblasten-Zelllinie, p53+/+; in DMEM/10% FBS (Haas, 1997)
p53 ⁻ /E	etablierte Mausfibroblasten-Zelllinie, p53 ⁻ /-; in DMEM/10% FBS (Donehower <i>et al.</i> , 1992; von Dr. Balmain, Glasgow)
Balb/c	etablierte Mausfibroblasten-Zelllinie, in DMEM F12/10% FBS (Patek <i>et al.</i> , 1978)
Scid DMEM	etablierte Mausfibroblasten-Zelllinie, DNA-PK _{CS} -defizient; in F12/10% FBS
Polβ ^{+/+} MGMT-Klon 20	etablierte Mausfibroblasten-Zelllinie, Polβ ^{+/+} , mex ⁺ , mit SV40 immortalisiert, mit LXSN:MGMT stabil transfiziert; in DMEM/10% FBS bei 34°C (Sobol <i>et al.</i> , 1995)
Polβ ^{+/+} Kontroll-Klon 2 SV40 FBS bei	etablierte Mausfibroblasten-Zelllinie, Polβ ^{+/+} , mex ⁻ ; mit immortalisiert, mit LXSN stabil transfiziert; in DMEM/10% 34°C (Sobol <i>et al.</i> , 1995)
Polβ ^{-/-} MGMT-Klon 15	etablierte Mausfibroblasten-Zelllinie, Polβ ^{-/-} , mex ⁺ ; mit SV40 immortalisiert, mit LXSN:MGMT stabil transfiziert; in DMEM/10% FBS bei 34°C (Sobol <i>et al.</i> , 1995)
Polβ ^{-/-} Kontroll-Klon 3	etablierte Mausfibroblasten-Zelllinie, Polβ ^{-/-} , mex ⁻ ; mit SV40 immortalisiert, mit LXSN stabil transfiziert; in DMEM/10% FBS bei 34°C (Sobol <i>et al.</i> , 1995)
Hela S3 F12/5%	epitheliale humane Cervixkarzinomzelllinie, mex ⁺ ; in DMEM FBS
Hela MR	epitheliale humane Cervixkarzinomzelllinie, mex ⁻ ; in DMEM F12/5% FBS
V79wt	Hamster-Lungenfibroblastenzelllinie; in DMEM F12/5% FBS (Zdzienicka, <i>et al.</i> , 1989)
V79 CL-V5B DMEM	Hamster-Lungenfibroblastenzelllinie, Mitomycin C-sensitiv; in F12/5% FBS (Tellemann <i>et al.</i> , 1995)

JLMz^{+/+} bzw. JLMz^{+/-} (Jun Lips Mainz) primäre Mausfibroblasten-Zelllinien der Passagen 3-4; homozygot bzw. heterozygot hinsichtlich des c-jun-Allels; inDMEM/15% FBS oder Fibroblast Growth Medium

Für Säuger-Zellen verwendete Medien:

DMEM, DMEM F12	GIBCOBRL, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FBS)	GIBCOBRL, Karlsruhe, Greiner, Frickenhausen
Fibroblast Growth Medium	Promocell, Heidelberg

Mit Ausnahme der selbst isolierten primären Mausfibroblasten-Zelllinien JLMz^{+/+} und JLMz^{+/-} wurden mir alle verwendeten Zelllinien von Prof. Dr. B. Kaina, Universität Mainz, zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Tiere

Mausstamm: C57 Bl/6J- Jun tm 1 Pa, von Jackson Laboratory, USA

2.1.3 Plasmide

pGEX-2T:hMGMT	prokaryotischer, induzierbarer Expressionsvektor, der hMGMT exprimiert (Bankmann & Kaina)
pGEX-4T-1	prokaryotischer, induzierbarer Expressionsvektor (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
pMSH11/XL1-Blue	hMSH2-cDNA (3116 bp) in pBluescript-Klonierungsvektor (Fishel <i>et al.</i> , 1993)

2.1.4 Oligonukleotide

a) Für Konkurrenzexperimente auf Basis des MGMT-Aktivitäts-Test und für Gelretardationsanalysen (Dosch *et al.*, 1998):

5' ggg ctc gag ctg cag ctg cta gta gat ct 3'	Guanin-Oligonukleotid
5' ggg ctc gag ctg cag ctg ^{CH₃} cta gta gat ct 3'	O ⁶ -Methylguanin-Oligonukleotid
5' ggg aga tct act agc agc tgc agc tcg ag 3'	Cytosin-Oligonukleotid
5' ggg aga tct act agt agc tgc agc tcg ag 3'	Thymin-Oligonukleotid

b) Für die Genotypisierung der C57Bl/6J-Jun tm 1 Pa-Mäuse via PCR (nach Protokoll des Jackson Laboratory, USA):

5' ctt cca ccg aga att ccg tga 3'	zur Erkennung des c-Jun-Allels
5' gct agc act cac gtt ggt agg 3'	
5' taa aac gca cgg gtg ttg ggt 3'	zur Erkennung des Neomycin-Markers
5' agc ggt tcc ttg gag ccc gc 3'	

c) Für die Klonierung der MSH2-cDNA aus pMSH11/XL1-Blue:

5' gcg cgg atc cga cat ggc ggt gca gcc 3'
5' cgc gct cga gaa act aca tga ttt tat 3'

Die verwendeten Oligonukleotide stammten von Eurogentec (Belgien), MWG-Biotech (Ebersberg) und B&G Biotech (Freiburg).

2.1.5 Antikörper

Anti-BrdU, FITC-konjugiert, monoklonaler Maus-Ak.	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Maus Ig, <i>horseradish peroxidase</i> -konjugiert	
(aus Schaf), NA 931	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Anti-Kaninchen Ig, <i>horseradish peroxidase</i> -konjugiert	
(aus Esel), NA 934	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Bax sc 493, polyklonaler Kaninchen-Ak.	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Bcl-2 sc 492, polyklonaler Kaninchen-Ak.	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Bcl-2 sc7382, monoklonaler Maus-Ak.	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
ERK2 sc7383, polyklonaler Kaninchen-Ak.	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
p53 OP 03, monoklonaler Maus-Ak.	Calbiochem, Darmstadt
p53 MS-104-P1, monoklonaler Maus-Ak.	Neo Markers, Union City, USA
p21 sc 397, polyklonaler Kaninchen-Ak. Heidelberg	Santa Cruz Biotechnology,

2.1.6 Enzyme

Klenow-Polymerase	Roche, Mannheim
Lysozym (O-Glycosidase)	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Roche, Mannheim
Pwo Polymerase, Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen, diverse	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg GIBCOBRL, Karlsruhe Roche, Mannheim New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen PvuII, EcoRI Freiburg	Amersham Pharmacia Biotech,
RNase A	Roche, Mannheim
RNase H	GIBCOBRL, Karlsruhe
Shrimp Alkaline Phosphatase	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase Freiburg	Amersham Pharmacia Biotech,
T4 Polynukleotidkinase	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thrombin-Protease	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.7 „Kits“

ECL (Plus) Westernblotting detection system	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche, Mannheim
Plasmid Mini/Midi/Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAEXII Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Renaissance Enhanced Luminescence Reagent	NEN, Köln
Renaissance Random Primer Plus Extension Labeling System	NEN, Köln

2.1.8 Spezial-, Radiochemikalien und Mutagene

Acryamid/Bis-, Rotiphorese Gel 40	Roth, Karlsruhe
Agarose	GIBCOBRL, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Amphotericin B [250 µg/ml] _{Stamm} [2,5 µg/ml] _{End}	GIBCOBRL, Karlsruhe
Ampicillin [100 mg/ml] _{Stamm} in dH ₂ O, [50 µg/ml] _{End}	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Annexin V, FITC-konjugiert	PharMingen, Heidelberg
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
APS	Merck, Darmstadt
[γ - ³² P] ATP, 3000 Ci/mmol	NEN DuPont, Boston, USA
BCNU [20 mM] _{Stamm} in dH ₂ O/Ethanol 1:1	Bristol Arzneimittel, München
Bestatin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BM-Cyclin	Roche, Mannheim
Bromphenolblau-Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Coomassie G250 Brilliant Blue (Serva Blue G)	Serva, Heidelberg
[α - ³² P] dCTP, 3000 Ci/mmol	NEN DuPont, Boston, USA
Desoxynukleosid-Triphosphate	Roche, Mannheim
DMSO	Fluka-Riedel-de Häen, Darmstadt
λ -DNA	Roche, Mannheim
DNA (aus Heringssperma)	Roche, Mannheim
DTT	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Calbiochem, Darmstadt

Ethidiumbromid, 1%	Roth, Karlsruhe
Ficoll	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fungizone (siehe Amphotericin B)	GIBCOBRL, Karlsruhe
G418 [200 mg/ml] _{Stamm} in dH ₂ O, [1,5 mg/ml] _{End}	GIBCOBRL, Karlsruhe
Gentamycin [10 mg/ml] _{Stamm} in dH ₂ O[50 µg/ml] _{End}	GIBCOBRL, Karlsruhe
Giemsa	Merck, Darmstadt
α-D-(+)-Glucose	Roth, Karlsruhe
β-D-Glucose-Ifosfamid mustard [25 mM] _{Stamm} in PBS	Prof. Dr. Wießler, Universität Heidelberg
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glutathion Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Guanidinthiocyanat	USB, Cleveland, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
IPTG	Roche, Mannheim
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Low-melting-point Agarose	Appligene, Heidelberg
Luria Broth Base (LB)	GIBCOBRL, Karlsruhe
Metofane	Janssen-Cilag, Neuss
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Mimosine [50 mM] _{Stamm} in 0,1 N NaOH	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MMS [500 mM] _{Stamm} in dH ₂ O	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MNNG [10 mM] _{Stamm} in DMSO/dH ₂ O	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
[³ H]-MNU (18,7 Ci/mmol)	Amersham Life Science, Braunschweig
MOPS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MTT	Amersham Life Science, Braunschweig
MutSα-Protein	Prof. Jiricny, ETH Zürich, Schweiz
N-Lauryl-Sarcosine	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nonidet P40	Fluka-Riedel-de Häen, Darmstadt
O ⁶ -Benzylguanin [10 mM] _{Stamm} in DMSO	Prof. Dr. H. Kunz, Universität Mainz
PBS	GIBCOBRL, Karlsruhe
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phenol Rot	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PMSF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Poly(dI/dC)	Roche, Mannheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Propidiumiodid	Serva, Heidelberg
Proteingewichtsstandard Dalton VII	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protein-Gelladepuffer Roti-Load 1, 4x Konz.	Roth, Karlsruhe
PVP	Fluka, Darmstadt
D-(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	Bio-Rad, München
Select Agar	GIBCOBRL, Karlsruhe
Select Yeast Extract	GIBCOBRL, Karlsruhe
Sephadex G-25	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Scintillationsflüssigkeit Rotiszint eco Plus	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
TRIS Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
tRNA (aus Hefe)	Roche, Mannheim
Trypsin 250	Difco, Augsburg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid, 30%	Roth, Karlsruhe
Xylen Cyanol FF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.1.9 Geräte

Autoclav Tuttnauer 5075 ELV	Systec, Wettenberg
Brutschrank Kelvitron t	Heraeus, Hanau
Capacitance Extender	Bio-Rad, München
CO ₂ Inkubator IR Sensor	Sanyo, über ZMW
Cryostorage System	Taylor-Wharton, Indianapolis, USA
Durchflußzytometer FACSort	Becton Dickinson, Heidelberg
Elisa-Reader Titertec Multiskan Plus MKII	Labsystems, Finnland
Freezer -86C	Forma Scientific, Marjetta, USA
Gel Doc 1000	Bio-Rad, München
Gel Dryer Mode 543	Bio-Rad, München
Gelelektrophorese-Apparaturen (Agarose-Gele)	Bio-Rad, München
Gelelektrophorese-Apparaturen (Western-Blot)	Bio-Rad, München und Biometra, Göttingen
Gene Pulser	Bio-Rad, München

Handmonitor LB 122	Berthold, über ZMW
Kinetic Imaging Komet 4.0.2 Software	BFI Optilas, Puchheim
Kühl-Gefrierkombination (4°C, -20°C)	Liebherr, über ZMW
Lamin Air HB 2448	Heraeus, Hanau
Liquid Scintillation Analyzer TRI-CARB 2100 TR	Canberra-Packard, Dreieich
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph, Kelheim
Mikroliter-Pipette	Hamilton, Darmstadt
Mikroprocessor pH Meter pH 537	WTW, Weilheim
Mikroskop, BX 50 F, Burner mit Hg-Lampe	Olympus, Hamburg
Mikroskop, Wilovert A	Hund, Wetzlar
Mini Hybridisation Oven	Appligene, Heidelberg
Naßblotter Trans-Blot Cell (Western-Blot)	Bio-Rad, München
Pipetboy Plus	Tecnomara, Fernwald
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl) Hamburg	Abimed, Langenfeld und Eppendorf, Hamburg
Power Supply Power Pac 3000	Bio-Rad, München
Pulse Controller	Bio-Rad, München
Rotationsverdampfer („Speedvac“) Christ Jota-RVC	B. Braun Biotech, Melsungen
Schüttelinkubator Ceromat R/TC2	B. Braun Biotech, Melsungen
Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
Spektralphotometer LKB Ultrospec III	Pharmacia, Freiburg
Stickstofftank 35 HC	Taylor-Wharton, Indianapolis, USA
Thermal Cycler Gene E	Techne, Cambridge
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Trocken-Sterilisator	WTB Binder, über ZMW
Turbo-Blotter	Schleicher & Schuell, Dassel
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph, Kelheim
UV-Tisch 312 nm	Bachofer, Reutlingen
Vortexer, Relax top	Heidolph, Kelheim
Waagen, Fein-, Basic	Satorius, Göttingen
Wasserbad, GFL 1092	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5417 C/R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sorvall RC-5B	DuPont, Bad Homburg

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

BIOMAX MS Scientific Imaging Film	Kodak, Stuttgart
Deckgläser 24x60 mm	Roth, Karlsruhe
Gel-Blotting-Papier GB 002	Schleicher & Schuell, Dassel
Gene Pulser Cuvette 0,4 cm elektrode gap	Bio-Rad, München
H ₂ O, deionisiert (reinst), Pure Lab Plus	USF ELGA, über ZMW
Hybond-N+ Nylonmembran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Objektträger, 26x76 mm, <i>frosted end</i>	Menzel, Braunschweig
Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel

2.1.11 Lösungen

PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl ₂ , 0,6 mM MgCl ₂ , 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄
10xTAE	0,4 M TRIS/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,3 mit Essigsäure
10xTBE	0,9 M TRIS/HCl, 0,9 M Borat, 10 mM EDTA
TE (10:1)	10 mM TRIS/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
20xSSC	3 M NaCl, 0,25 M Na-Citrat, pH 6,5
50xDenhardt	1% BSA, 1% Ficoll, 1% PVP

2.2 Arbeiten mit Säuger-Zellen

2.2.1 Kultivierung von Säuger-Zelllinien

Fibroblasten sowie epitheliale Zellen wie CHO-9 und daraus abgeleitete Transfektanten wurden in Monolayer-Kultur in Zellkulturflaschen oder -schalen in mit 5% oder 10% fötalem Rinderserum (FBS) supplementiertem Dulbecco's MEM bzw. DMEM/Nut. Mix F12 Medium (1:1) bei 37°C und 7% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert (Ausnahme: Polß-Zellen: 34°C). Alle 3-5 Tage wurden die Zellen passagiert, indem das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin (0,25% in PBS, 2 mM EDTA) abgelöst wurden. Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte

nach dem Abtrypsinieren durch Aufnahme von ca. $2-5 \times 10^6$ Zellen in entsprechendem Medium mit 20 % FBS und 10% DMSO in Kryoröhrchen und sukzessivem Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Die Zellen wurden im 37°C-Wasserbad rasch aufgetaut, in vorgewärmten Medium aufgenommen, bei 900 Upm 5 min (Megafuge 1.0, Heraeus) abzentrifugiert und ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.

2.2.2 Isolierung primärer Mausfibroblasten aus Embryonen

Die Embryonen wurden zwischen dem 10. und 12. Tag postcoital aus dem Uterus des Muttertieres isoliert, von der Placenta befreit, mit dem Skalpell kleingeschnitten und in 3 ml Dulbecco's Medium (15% FBS, 2,5 µg/ml Amphotericin B, 50 µg/ml Gentamycin) oder Fibroblast Growth Medium (1,0 ng/l bFGF, 5,0 µg/ml Insulin, Gentamycin, Amphotericin B) ausgesät. Innerhalb der ersten vier Passagen wurden die primären Zellen kryokonserviert.

2.2.3 Mycoplasmen-Detektion und -Eliminierung

Zum Nachweis und zur Eliminierung der Mycoplasmen-Species *M. arginini*, *M. hyorhina*, *M. laidlawii* und *M. orale*, die als Zellkultur-Kontaminanten auftreten können, wurde der Zellüberstand hierauf regelmäßig mit einem käuflichen Enzym-Immunoassay (Roche, Mannheim) untersucht: Nach Beschichten einer entsprechenden Anzahl von Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit jeweils 250 µl Wandantikörper wurde mit Blockierungslösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Proben einschließlich Positiv- und Negativkontrollen pipettiert und in 40 µl bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden 3x gewaschen, und der Detektionsantikörper wurde pipettiert. Nach 2 h Inkubation bei 37°C und anschließendem Waschen erfolgte die Erkennung des Detektionsantikörpers durch das Streptavidin-AP für 1 h bei 37°C. Es wurde die Reaktion durch Pipettieren der Substratlösung (1 h, RT) gestartet. Die Auswertung erfolgte visuell (positiv = gelb, negativ = farblos) und mit dem Elisa-Reader bei $\lambda = 405$ nm (gegen Substratlösung gemessen).

Kontaminierte Zellkulturen wurden 4 Tage mit BM1-Lösung (Pleuromutilin-Derivat) behandelt, 1:3 bis 1:4 umgesetzt und dann 3 Tage mit BM2-Lösung (Tetracyclin-Derivat) inkubiert. Dieser Vorgang wurde noch 2x wiederholt und die Zellkultur im Anschluß daran auf Mycoplasmen gescreent.

2.2.4 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit

5×10^4 Zellen wurden pro 5cm-Schale ausgesät und im Zeitraum von 24 - 96 h nach Aussaat alle 12 h durch Trypsinieren geerntet und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.2.5 Elektroporation und Restriktion von DNA *in vivo*

Zum Einbringen von Restriktionsenzymen in die Säugerzelle wurden Zellen einer subkonfluenten Kultur abtrypsiniert, 1x mit Medium, 1x mit eiskaltem PBS und 1x mit eiskaltem Saccharosepuffer (272 mM Saccharose, 1 mM $MgCl_2$, 7 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,4) gewaschen. $\sim 3 \times 10^6$ Zellen wurden in Saccharosepuffer aufgenommen, mit entsprechender Menge Enzym versetzt (Gesamtvolumen 800 μ l) und in Elektroporationsküvetten überführt. Nach der Elektroporation (400 V, 25 μ F, 400 Ω) und 10 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension in Medium ausgesät und entsprechende Zeit bis zur Ernte im Brutschrank inkubiert.

2.2.6 Bestimmung der Zellzyklusverteilung mit dem FACS

Die behandelten Zellen wurden samt Überstand geerntet, 1x mit eiskaltem PBS gewaschen und in PBS zu ca. 1×10^7 Zellen pro ml durch Vortexen aufgenommen. Durch tropfenweises Zugabe von 10 ml eiskaltem 70% Ethanol und 30 minütiger Inkubation bei $-20^\circ C$ wurden die Zellen fixiert. Nach Abzentrifugieren der Zellen und Lufttrocknen des Pellets wurde dieses für 30 min bei $37^\circ C$ RNase [100 μ g/ml]_{End} behandelt, in Propidiumiodid-Lösung [20 μ g/ml in PBS] aufgenommen und im Durchflußzytometer FACSort die Zellzyklusverteilung der Population bestimmt.

2.2.7 Bestimmung des Zellzyklus` nach BrdU-Labeling mit dem FACS

Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation wurde die Zellkultur für 30 min mit 10 μM Bromdesoxyuridin (BrdU) inkubiert. Die Zellen wurden abtrypsinisiert, 1x mit Medium, 1x mit PBS gewaschen und anschließend in 300 μl PBS resuspendiert. Durch tropfenweise Zugabe von 5 ml eiskaltem 70% Ethanol und darauffolgender Inkubation für mindestens 30 min bei 4°C wurden die Zellen fixiert. Nach Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in 300 μM PBS aufgeschüttelt und nach Zugabe von 5 ml 2 M HCl für 30 min im 37°C-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde 5 ml PBS zugegeben, bei 1500 Upm, 5 min abzentrifugiert und nochmals mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml PBT-Puffer (1% BSA, 1% Triton X-100 in PBS) resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert, abzentrifugiert und die Zellen in 10 μl 0,25x PBT-Puffer in PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 10 μl BrdU/FITC gekoppeltem Antikörper (Becton Dickinson) wurde für 45 min im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 200 μl 0,25x PBT-Puffer wurde abzentrifugiert, der Überstand sauber abgenommen und das Pellet in ca. 30-60 μl RNase (0,1 mg/ml) und ca. 700 μl Propidiumiodid-Lösung (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) aufgenommen. Die Messung erfolgte unverzüglich am Durchflußzytometer FACSort (Becton Dickinson).

2.3 Bestimmung von Apoptose und Nekrose

2.3.1 Bestimmung der Sub-G1-Population mit dem FACS

(nach Huschtscha *et al.*, 1994; Fraker *et al.*, 1995)

Die behandelten Zellen wurden samt Überstand geerntet, 1x mit eiskaltem PBS gewaschen und in PBS zu ca. 1×10^7 Zellen pro ml durch Vortexen aufgenommen. Durch tropfenweises Zugeben von 10 ml eiskaltem 70% Ethanol und 30 minütiger Inkubation bei -20°C wurden die Zellen fixiert. Nach Abzentrifugieren der Zellen und Lufttrocknen des Pellets wurde dieses für 30 min bei 37°C RNase [100 $\mu\text{g}/\text{ml}$]_{End} behandelt, in Propidiumiodid-Lösung [20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS] aufgenommen und im Durchflußzytometer FACSort die apoptotische Sub-G1-Fraktion quantifiziert.

2.3.2 Annexin-V/Propidiumiodid-Labeling und FACS-Analyse

(nach Vermes *et al.*, 1995)

Die behandelten Zellen wurden samt Überstand geerntet, 2x mit eiskaltem PBS, mit Binde-Puffer (10 mM HEPES pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 , 1% BSA) gewaschen und 1×10^6 Zellen in 100 μl

Binde-Puffer aufgenommen. Zu 50 µl dieser Zellsuspension wurden 2,5 µl Annexin V-FITC (z. B. PharMingen International) gegeben, gemischt und 15 min lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 440 µl Binde-Puffer wurde die Suspension mit 10 µl Propidiumiodid [50 µg/ml in PBS] versetzt, gemischt und direkt im Durchflußzytometer FACSort gemessen.

2.3.3 Detektion der nukleosomalen Fragmentierung

(nach Ioannou & Chen, 1996)

Die Zellen wurden abtrypsiniert, 1x mit PBS gewaschen und 5×10^6 Zellen in 100 µl PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 600 µl Lysis-Puffer (0,1% Triton X-100, 20 mM EDTA, 5 mM TRIS/HCL pH 8,0), PEG 800 [2,5%]_{End} und NaCl [1M]_{End} wurden die Ansätze für 10 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert. Nach Phenol-Extraktion (siehe oben) wurde die hochmolekulare DNA durch Zugabe von 2 Vol. reinem Ethanol für 30 min bei -20°C ausgefällt und für 20 min bei 14.000 Upm, 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde für 30 min bei 37°C mit RNase [100 µg/ml]_{End} behandelt, in TE aufgenommen, mit 6x Ladepuffer (50% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 1 mM EDTA) versetzt und in einem 1,5% Agarose-Gel in TBE plus 5 µg/ml Ethidiumbromid bei 25 V üN aufgetrennt.

2.4 Bestimmung von Chromosomenaberrationen

2.4.1 Chromosomenpräparation

Eine subkonfluente Zellkultur wurde nach Behandlung, z.B. mit einem Alkylanz oder mit Restriktionsenzym elektroporiert, 18 h inkubiert. Nach 2 h Colcemid [50 ng/ml]_{End}-Behandlung wurden die Zellen abtrypsiniert und im überstehenden Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 6 min, 1000 Upm abzentrifugiert, das Medium bis auf 2 ml abgenommen und die Zellen darin durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml hypotoner KCl-Lösung [75 mM] wurde 7 min bei RT inkubiert und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 ml Rest-Medium resuspendiert, und es wurde mit eiskalter Methanol-Eisessig-Lösung (4:1) tropfenweise und unter Schütteln auf 12 ml aufgefüllt. Nach Zentrifugation wurde der Vorgang wiederholt und die Zellen mindestens für 30 min bei -20°C fixiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen 2x mit Methanol-Eisessig-Lösung (4:1) gewaschen, das Zellpellet in 0,2-1 ml Methanol-Eisessig-Lösung (2:1)

resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Zur Vorbereitung der Objektträger wurden diese mindestens 4 h in Ethanol-HCl-Lösung [1:2]_{End}, 1x mit einer Detergenz-Lösung und 1x mit Wasser gewaschen und in dH₂O bei 4°C aufbewahrt. Die Zellsuspension wurde auf die Objektträger aufgetropft, zur Fixierung durch die Flamme gezogen und luftgetrocknet. Die Chromosomen wurden 6 min in frischem Giemsa-Soerensen*-Puffer (1:20) gefärbt, 3x mit dH₂O gewaschen, luftgetrocknet und bei 1000 facher Vergrößerung am Mikroskop ausgewertet.

* Soerensen-Puffer pH 7,2: 67 mM KH₂PO₄ (27,4 ml) + 67 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O (72,6 ml)

2.4.2 Signifikanzberechnung

Mit Hilfe des Vierfelder-Chi-Quadrat (χ^2)-Tests wurde überprüft, ob Unterschiede zwischen ermittelten Aberrationsfrequenzen signifikant sind:

$$\chi^2 = \frac{n (a d - b c)^2}{(a + b) (c + d) (a + c) (b + d)}$$

a = % geschädigte Mitosen der Wildtyp-Zelllinie (jun+/+)

b = % ungeschädigte Mitosen der Wildtyp-Zelllinie (jun+/+)

c = % geschädigte Mitosen der heterozygoten Zelllinie (jun+/-)

d = % ungeschädigte Mitosen der heterozygoten Zelllinie (jun+/-)

Jedem χ^2 entspricht ein p-Wert (vergleiche Sachs, 1991), der die Signifikanz des Unterschiedes angibt.

Ist $p \leq 0,001$, so ist der Unterschied hochsignifikant.

Ist $p \leq 0,01$, so ist der Unterschied signifikant.

Ist $p \leq 0,05$, so ist der Unterschied schwach signifikant.

Ist $p > 0,05$, so ist der Unterschied nicht signifikant.

2.5 Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mit der Einzelzellgelelektrophorese (SCGE; „Comet-Assay“)

2.5.1 Neutrale Einzelzellgelelektrophorese

10 µl der (entsprechend behandelten) Zellsuspension [1×10^6 /ml] wurden in 120 µl LMP-Agarose (0,5% in dH₂O, 37°C) aufgenommen und auf einen mit Agarose beschichteten Objektträger (1,5% in PBS, auf 80°C temperieren, Objektträger bis zum frosted end eintauchen, kurz abtropfen lassen, Unterseite abwischen, üN trocknen lassen) gegeben, mit einem Deckglas eingedeckelt und für 5 min bei 4°C geliert. Nach Abziehen des Deckglases wurde der Objektträger in Lysispuffer (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS/HCL, 1% Na-Laurylsarcosinat, pH 7,5; vor Gebrauch werden zu 100 ml dieses Puffers 10 ml DMSO und 1 ml Triton X-100 zugegeben und 1 h bei 4°C vorgekühlt) für 1 h bei 4°C inkubiert. Das Präparat wurde aus dem Lysispuffer genommen, kurz abgetropft und in die Elektrophoresekammer in den auf 4°C vorgekühlten Elektrophoresepuffer (90 mM TRIS, 90 mM Borat, 2 mM EDTA, pH 7,5) gelegt. Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C, 25 V exakt 15 min. Der Objektträger wurde kurz abgetropft, in dH₂O gespült, abgetropft und für 5 min in 100% Ethanol getaucht. Das Präparat wurde einige Stunden bei RT getrocknet und kann mehrere Monate aufbewahrt werden. Zur Auswertung wurde die DNA auf dem Objektträger mit 50 µl Ethidiumbromid [20 µg/ml] gefärbt und bei 100 facher Vergrößerung im Mikroskop unter Zurhilfenahme der Software Kinetic Imaging Komet 4.0.2 (BFI Optilas, Puchheim) ausgewertet.

2.5.2 Alkalische Einzelzellgelelektrophorese

10 µl der (entsprechend behandelten) Zellsuspension (1×10^6 /ml) wurden in 120 µl LMP-Agarose (0,5% in dH₂O, 37°C) aufgenommen und auf einen mit Agarose beschichteten Objektträger (1,5% in PBS, s.o.) gegeben, mit einem Deckglas eingedeckelt und für 5 min bei 4°C geliert. Nach Abziehen des Deckglases wurde der Objektträger in Lysispuffer (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS/HCL, 1% Na-Laurylsarcosinat, pH 10,0; vor Gebrauch werden zu 100 ml dieses Puffers 10 ml DMSO und 1 ml Triton X-100 zugegeben und 1 h bei 4°C vorgekühlt) gestellt und 1 h bei 4°C inkubiert. Das Präparat wurde aus dem Lysispuffer genommen, kurz abgetropft und in die Elektrophoresekammer in den auf 4°C vorgekühlten Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH ≥ 13 , Leitfähigkeit 60-65 mS) gelegt. Nach einer Denaturierungszeit von 25 min erfolgte

die Elektrophorese bei 4°C, 25 V, 300 mA für exakt 15 min. Der Objektträger wurde anschließend 3x für 5 min mit Neutralisierungspuffer (0,4 M TRIS/HCl pH 7,5) gewaschen, dann kurz abgetropft und 5 min in 100% Ethanol getaucht. Das Präparat wurde einige Stunden bei RT getrocknet und kann mehrere Monate aufbewahrt werden. Zur Auswertung wurde die DNA auf dem Objektträger mit 50 µl Ethidiumbromid [20 µg/ml] gefärbt und bei 100 facher Vergrößerung im Mikroskop unter Zuhilfenahme der Software Kinetic Imaging Komet 4.0.2 (BFI Optilas, Puchheim) ausgewertet.

2.6 Zytotoxizitäts-Tests

2.6.1 Koloniebildungs-Test

400 bis 1.500 Zellen wurden auf einer 5 cm-Schale ausgesät, üN anwachsen lassen und mit MNNG, MMS oder BCNU für eine Stunde behandelt oder γ -bestrahlt (^{137}Cs , Gammacell 2000, Moolsgaard, Dänemark). Nach Auswachsen deutlicher Klone wurden die Zellen mit Methanol fixiert, Giemsa (1,25%)-Kristallviolett (0,125%) gefärbt und ausgezählt. Beim Elektroporations-Experiment wurden die Zellen nach der Elektroporation gezählt und entsprechend ausgesät; hier war die Kontrolle mit hitzeinaktiviertem Enzym elektroporiert. Die Anzahl Klone der unbehandelten Kontrolle wird 100% gesetzt.

2.6.2 MTT-Test

Zur Bestimmung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen als Maß für die Lebensfähigkeit wurden Zellen nach γ -Bestrahlung oder Elektroporation von Restriktionsendonukleasen ausgezählt und entsprechende Zellmengen in 24-Well-Platten ausgesät. Nach 48 h wurden 50 µl MTT-Lösung [5mg/ml in PBS] zugesetzt, 4 h inkubiert und die Zellen in reinem Ethanol unter Schütteln lysiert. Die Absorptionsmessung im Photometer erfolgte bei $\lambda = 540 \text{ nm}$ und $\lambda = 690 \text{ nm}$.

2.7 O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Aktivitäts-Test

Die Einführung von [³H]-markierten Methylgruppen in die Substrat-DNA erfolgte *in vitro* durch Inkubation von 30 ml DNA-Lösung (6,3 mg/ml) mit [³H]-MNU (16,5 Ci/mmol) in 0,2 M NaCacodylat, 1 mM EDTA pH 7,5 für 2 h bei 37°C. Die DNA wurde mit 2 Vol. Ethanol ausgefällt und gegen TE (1:10) pH 8,0 dialysiert. Die gereinigte DNA wurde erneut ausgefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in TE (10:1) pH 8,0 aufgenommen. Die Aktivität des Substrates betrug 6600 cpm/μl. Von dem aus Zellen hergestellten Gesamtproteinextrakt in Ultraschallpuffer (20 mM TRIS/HCL pH 8,5, 1 mM EDTA, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 5% Glycerin, 10 μg/ml Aprotinin, 10 μM Bestatin, 10 μM Leupeptin, 1 μM Pepstatin, 100 μM PMSF) oder von rekombinantem MGMT wurde die Aktivität bestimmt, indem zu 20 μl Reaktionspuffer (700 mM HEPES, 10 mM DTT, 50 mM EDTA) und 15 μl [³H]-DNA (mit spezifischer Aktivität, von z. B. 17,1 Ci/mmol) 150 μg Proteinextrakt oder 500 ng rekombinantes MGMT sowie dH₂O ad 200 μl zugegeben werden. Nach 90 minütiger Inkubation bei 37°C wurden 400 μl 13% TCA und 150 μg BSA zugegeben und für 15 min bei 95°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren für 10 min bei 14.000 Upm wurde das Pellet 3x mit 5% TCA gewaschen, in 200 μl 0,1 N NaOH aufgenommen und in 5 ml Liquid-Scintillationsflüssigkeit im Liquid Scintillation Analyzer vermessen.

2.8 Protein-Präparation

2.8.1 Proteinkonzentrationsbestimmung (nach Bradford, 1976)

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde an einer BSA-Eichreihe (0-5 μg Protein) vorgenommen. Ein entsprechendes Aliquot wurde in einer 96-Well-Elisa-Platte mit 200 μl Bradford-Lösung (25 mg Coomassie G250 Brillant Blue, 12,5 ml 100% EtOH, 25 ml 85% Phosphorsäure, 212,5 ml dH₂O, abfiltriert) vermischt und 20 min im Dunkeln inkubiert. Die Absorptionsmessung im Elisa-Reader erfolgte bei $\lambda = 600$ nm.

2.8.2 Gesamtproteinextraktion aus kultivierten Zellen

Die Zellen wurden 2x mit eiskaltem PBS gewaschen, in PBS abgeschabt und für 2 min bei 10.000 Upm, 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Ultraschallpuffer (20 mM TRIS/HCl pH 8,5, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 5% Glycerin) aufgenommen, auf Eis sonifiziert (Branson Sonifier 30 kHz, 3x 10 Impulse) und für 10 min bei 14.000 Upm, 4°C abzentrifugiert. Mit dem verdünnten Überstand konnte die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgen. Zur Extraktion auch

membrangebundener Proteine (z.B. Bcl-2, Bax, u.a.) wurde folgender Ultraschallpuffer verwendet: 25 mM TRIS/HCl pH 6,8, 1% SDS, 5% Glycerin, 2,5% 2-Mercaptoethanol.

2.8.3 Kernproteinextraktion für Westernblot-Analysen

Die Zellen wurden 2x mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1 ml PBS abgeschabt, für 2 min bei 10.000 Upm, 4°C abzentrifugiert und in 500 µl Lysispuffer (10 mM TRIS/HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂) aufgenommen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde NP40 [0,5%]_{End} zugesetzt, 2 min auf Eis inkubiert und für 5 min bei 3.200 Upm, 4°C abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen des Pellets mit Lysispuffer wurden die Zellen in Ultraschallpuffer (50 mM TRIS/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) sonifiziert (Branson Sonifier 30 kHz, 3 x 10 Impulse) und 30 min, 14.000 Upm, 4°C abzentrifugiert. Mit dem Überstand erfolgte die Proteinkonzentrations-Bestimmung.

2.8.4 Kernproteinextraktion für Gelretardations-Analysen

Die Zellen wurden 2x mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1 ml PBS abgeschabt und für 2 min bei 10.000 Upm, 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl Lysispuffer (10 mM TRIS/HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 2 mM DTT) aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert, mit NP40 bis zu einer Endkonzentration von 0,5% versetzt, gemischt und nochmals 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 3.200 Upm, 4°C wurde das Pellet 1x mit Lysispuffer gewaschen, in doppeltem Pellet-Volumen Kernextraktionspuffer (20 mM HEPES pH 7,4, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,2 mM EDTA, 600 mM KCl) aufgenommen und nach 30 min Inkubation auf Eis für 10 min bei 14.000 Upm, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 Vol. Kernextraktionspuffer ohne KCl sowie Glycerin [20%]_{End} versetzt und ein Aliquot zur Proteinkonzentrations-Bestimmung verwendet.

2.8.5 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Aufreinigung rekombinanten Proteins (z. B. humanes MGMT) wurde die entsprechende cDNA in den geeigneten pGEX-Expressionsvektor (pGEX-2T:hMGMT, pGEX-4T-1:hMSH2) *in frame* kloniert. 500 ml LB-Medium plus Ampicillin [50 µg/ml]_{End} wurden mit 50 ml Vorkultur des entsprechenden Vektors in *E. coli* DH5α oder *E. coli* BL21 angeimpft, für 1 h bei 37°C, 220 Upm inkubiert und mit 0,5 mM IPTG für 2 h induziert. Das Wachstum wurde auf Eis abgestoppt und die Bakterien für 10 min bei 7700 g, 4°C pelletiert. Die Zellen wurden in 20 ml eiskaltem PBS resuspendiert, sonifiziert, und der Zellbruch abzentrifugiert. Nach Zugabe von Triton X-100 [1%]_{End} wurde für 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Abzentrifugieren für 10 min bei 12.000 g, 4°C wurde der Überstand abgenommen und mit 200 µl equilibrierter 50% Glutathion Sepharose 4B in PBS (*Beds*) versetzt und 30 min, 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert, so daß das GST-Fusionsprotein an der Glutathion Sepharose 4B binden konnte. Die Suspension wurde für 5 min bei 500 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, und das Pellet mehrmals mit 10 Vol. PBS gewaschen. Die Elution des GST-Fusionsproteins von den *Beds* erfolgte durch Zugabe von 1 ml Glutathion-Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion in 50 mM TRIS/HCL pH 8,0) pro 1 ml *Bed*-Volumen unter 10 minütigem leichtem Schütteln bei RT. Nach Abzentrifugieren für 5 min bei 500 g wurde der Überstand, der das Fusionsprotein enthielt, abgenommen. Der Vorgang wurde 2x wiederholt, die Überstände gepoolt. Alternativ konnte das Protein vom GST-Anteil abgespalten werden, indem pro ml *Bed*-Vol. 80 µl Thrombin-Lösung (500 U in 0,5 ml PBS) zugegeben wurden und für 2-16 h bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert wurde. Nach Abzentrifugieren für 2 min bei 12.000 g wurde der Überstand ebenso wie der nach der Glutathion-Spaltung erhaltene überprüft, indem ein Aliquot via SDS-PAGE charakterisiert wurde. Die Lagerung des Proteins erfolgte bei -80°C.

2.8.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte im diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Nach einer Konzentration der Proben im Sammelgel (5% PAA, 125 mM TRIS/HCL pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,005% TEMED) wandern die Proteine in das Trenngel (z. B. 10% PAA, 375 mM TRIS/HCL pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,005% TEMED). Abgeglichene Proteinmengen wurden mit 4xLaemmli-Gelladepuffer (250 mM TRIS/HCL pH 6,8, 8% SDS, 40% Glycerin, 20% 2-Mercaptoethanol, 0,04% Bromphenolblau) versetzt, 5 min aufgekocht und in die Geltaschen eingefüllt. Die Separation erfolgte in Laufpuffer (25 mM TRIS/HCL, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) bei konstanter Stromstärke von 25 mA pro Gel bis die Lauffront aus dem Gel herauslief.

Die Proteine im Gel konnten mit Coomassie-Lösung (50 mg Coomassie G250 Brillant Blue, 5 ml dH₂O plus 200 ml folgender Lösung: 70 ml Eisessig, 60 ml TCA, 200 ml Methanol, 800 ml dH₂O) gefärbt, mit 40% Methanol/5% Eisessig/3% Glycerin entfärbt und fixiert, auf Filterpapier gezogen und im Geltdrockner haltbar gemacht werden.

2.8.7 Westernblot-Analyse

Zur Identifizierung der Proteine nach Auftrennung mit der SDS-PAGE mittels Antikörper wurden die Proteine auf Nitrocellulose-Membran geblottet. Dazu wurde das Gel in dem Blotpuffer (12,5 mM TRIS/HCL, 86 mM Glycin, 20% Methanol) equilibriert, auf ebenfalls equilibrierte Membran gelegt, und von beiden Seiten mit in Blotpuffer eingeweichtem Filterpapier bedeckt. In der Blotapparatur eingespannt, erfolgte der Naßblot im Blotpuffer für 2-5 h bei 360 mA.

Zur Kontrolle des Blotes wurde die Membran für 15 min mit Ponceau (1% Ponceau S, 3% TCA) gefärbt und kurz mit dH₂O entfärbt. Der Filter wurde für 1 h in Blocklösung (5% Magermilchpulver in PBS, 0,1% Tween 20) bei RT geschwenkt und anschließend mit dem Primärantikörper (1:500 - 1:100 in Blocklösung) inkubiert. Der Antikörper wurde entfernt, 3x für 10 min mit PBS/0,1% Tween 20 gewaschen und mit dem entsprechenden *horseradish-peroxidase*-konjugierten Sekundärantikörper (1:3000 - 1:5000 in Blocklösung) inkubiert. Nach Waschen des Filters wurde Lumigen PS-3 durch Mischen der Substrat- und der Acridan-Lösungen des ECL-Kits auf dem Filter gebildet, so daß die Chemolumineszenz-Reaktion mit der *horseradish-peroxidase* des Sekundärantikörpers gestartet wurde. Die Detektion erfolgte mit Hyperfilm ECL. Durch Waschen des Filters für 2x 15 min in 100 mM Glycin pH 2,8 wurden die Antikörper entfernt und der Filter konnte erneut verwendet werden.

2.9 Nukleinsäure-Präparation

2.9.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wurde in wässriger Lösung gegen dH₂O in Quarzküvetten im Spektralphotometer bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm gemessen. Eine Extinktion von 1 bei $\lambda = 260$ nm entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA oder 20 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA. Der Quotient aus der Extinktion bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm gibt Aufschluß über die Reinheit der DNA bzw. RNA und sollte annähernd 1,8 bzw. 2,0 betragen.

2.9.2 Extraktion und Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen

Zur Aufreinigung von DNA aus einer wässrigen Lösung wurde 1 Vol. Phenol (mit 1 M TRIS-HCl pH 8,0 gesättigt) zugegeben, gemischt, 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, gemischt, und die Phasen durch Zentrifugation für 2 min bei 14.000 Upm getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit gleichem Vol. Chloroform/Isoamylalkohol erneut extrahiert. Die in Lösung befindliche DNA wurde mit 1/10 Vol. 3 M NaAc pH 5,2 und 2,5 Vol. Isopropanol für 30 min bei -20°C präzipitiert. Nach Abzentrifugieren für 20 min bei 14.000 Upm wurde das Pellet 2x mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE (10:1) aufgenommen.

2.9.3 Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Zellen und aus Frischgewebe der Maus

Zur Isolierung genomischer DNA aus Schwanz- oder Ohrbiopsie bzw. aus Organen der Maus wurde das Gewebe mechanisch zerkleinert (Organe wurden in flüssigem N₂ gemörsert, 100 mg wurden eingesetzt), in 700 µl Extraktionspuffer (50 mM TRIS-HCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 600 µg/ml Proteinase K) aufgenommen und üN bei 56°C inkubiert. Zellen einer Kultur wurden abgeschabt, in PBS aufgenommen, abzentrifugiert und in entsprechendem Vol. Extraktionspuffer für einige Stunden bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 200µg RNase A und Inkubation für 2 h bei 37°C wurde die DNA - wie beschrieben - durch Phenol-Extraktion gewonnen und in TE (10:1) pH 8,0 aufgenommen. Alternativ wurde DNA mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* isoliert.

2.9.4 Plasmid-DNA-Isolierung

2.9.4.1 „Mini“-Präparation (nach Chowdhury, 1991)

Von Selektionsplatten gepickte Bakterienklone wurden in 3 ml LB-Medium plus Antibiotikum üN bei 37°C, 220 Upm kultiviert. Ein Aliquot wurde für 2 min bei 10.000 Upm abzentrifugiert, das Bakterienpellet in 100 µl Lysozypuffer (50 mM Glucose, 25 mM TRIS/HCL pH 8,0, 10 mM EDTA, 40 mg/ml Lysozym) resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert, und mit 200 µl Alkali-Puffer (200 mM

NaOH, 1% SDS) vermischt. Nach Inkubation für 5 min auf Eis wurden 150 µl Neutralisationspuffer (3 M Kaliumacetat, 11,5% Essigsäure pH 5,5) zugegeben, es wurde 5 min inkubiert und für 10 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die Nukleinsäuren mit Phenol - wie beschrieben - extrahiert und in TE (10:1) pH 8,0 plus 25 µg/ml RNase aufgenommen.

2.9.4.2 „Mini“-Präparation (nach del Sal *et al.*, 1988)

Von Selektionsplatten gepickte Bakterienklone wurden in 3 ml-Medium plus Antibiotikum üN bei 37°C, 220 Upm kultiviert, ein Aliquot wurde für 2 min bei 10.000 Upm abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl STET-Puffer (8% Saccharose, 0,1% Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM TRIS/HCL pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 5 µl Lysozym (50 mg/ml) wurde der Ansatz 5 min bei RT inkubiert, 45 s im Wasserbad aufgekocht, für 10 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert, und der Überstand mit 10 µl 5% CTAB versetzt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 14.000 Upm wurde die Plasmid-DNA in 300 µl 1,2 M NaCl gelöst, mit 2,5 Vol. Ethanol präzipitiert und nach dem Trocknen in TE (10:1) pH 8,0 plus 25 µg/ml RNase aufgenommen.

2.9.4.3 „Midi“- und „Maxi“-Präparation

500 ml (100 ml) einer üN bei 37°C, 220 Upm unter Selektionsdruck inkubierten Bakterienkultur werden auf Eis abgekühlt, 15 min bei 6000 g, 4°C pellettiert, in 10 ml (4 ml) TRIS-HCl pH 8,0/10 mM EDTA/400 µg (100 µg) RNase resuspendiert und nach Zugabe von 10 ml (4 ml) Alkali-Puffer (200 mM NaOH, 1 % SDS) für 5 min bei RT inkubiert. Mit 10 ml (4 ml) 3 M Kaliumacetat pH 5,5 wurde für 20 min (15 min) auf Eis neutralisiert, und der Zellbruch für 30 min bei 4300 Upm (Megafuge 1.0), 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde dekantiert und auf eine mit 10 ml (4 ml) QBT-Puffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Ethanol, 0,15% Triton X-100) equilibrierte QIAGEN-tip 500 (-tip 100) Säule gegeben. Nach Bindung der Plasmide an das Säulenmaterial wurde 2x mit 30 ml (10 ml) QC-Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Ethanol) gewaschen und die Plasmide mit 15 ml (5 ml) QF-Puffer (1,25 M NaCl, 50 mM TRIS/HCL pH 8,5, 15% Ethanol) in 0,7

Vol. Isopropanol eluiert. Die Plasmide wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 4300 Upm, 4°C pellettiert, mit 5 ml (2 ml) 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE (10:1) pH 8,0 resuspendiert.

2.9.5 Transfer von DNA auf Membranen (Chomczynski, 1992)

10 µg mit einer Restriktionsendonuklease (z. B. EcoRI) verdaute genomische DNA wurde mit 6x Ladepuffer (50 % Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 1 mm EDTA) versetzt und in einem 0,8 % Agarose-Gel/0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer zuerst 30 min bei 5 V/cm², dann 3,5 h bei 10 V/cm² aufgetrennt. Das Gel wurde bis zum Farbumschlag in 0,25 M HCl depuriniert, 2x 30 min in 0,4 M NaOH/3 M NaCl denaturiert, 15 min in Transferpuffer (8 mM NaOH, 3 M NaCl) gewaschen und gemäß „Turbo-Blot“-Anleitung mit Transferpuffer 1 h auf Nylonmembran geblottet. Der Filter wurde in 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,8 für 5 min neutralisiert und die DNA mit 0,5 J UVC-Strahlung an der Membran quervernetzt (Church & Gilbert, 1984).

2.9.6 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Die zu hybridisierenden Filter wurden mindestens für 1 h bei 60-68°C in Hybridisierungslösung (6,25 ml 20x SSC, 1,25 ml 100x Denhardt-Lösung, 1,25 ml 10% SDS, 16,25 ml dH₂O, 5 µg nichthomologe einzelsträngige Heringssperma-DNA) im Hybridisierungsofen inkubiert. Die ³²P-markierte DNA-Sonde wurde 3 min aufgeköcht, 3 min auf Eis abgekühlt und in 3 ml Hybridisierungslösung auf den Filter gegeben. Nach der Inkubation üN bei 60-68°C wurde die Sonde entfernt, der Filter kurz mit 2x SSC gespült und je 1x mit 4x SSC/0,5% SDS, 2x SSC/0,5% SDS und evt. 1x SSC/0,5% SDS für jeweils 15 min bei 60-68°C gewaschen. Der Filter wird kurz mit 2x SSC gespült, feucht in Plastikfolie eingeschweißt und ein *BIOMAX MS Scientific Imaging Film* zur Autoradiographie aufgelegt. Die hybridisierte Sonde konnte durch Aufkochen des Filters in 0,5% SDS für 15 min entfernt werden.

2.10 Radioaktives Labelling von DNA-Sonden und doppelsträngigen Oligonukleotiden

Die radioaktive Markierung eines DNA-Fragmentes zum Einsatz in der Southernblot-Analyse erfolgte mit Hilfe des *Renaissance Random Primer Plus Extension Labeling Systems*: 50 ng gereinigte,

einzelsträngige DNA wurden mit 6 μl 5x Reaktionspuffer, 6 μl dNTP-Mix ohne dCTP, 5 μl α - ^{32}P -dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), 5 U Klenow-Polymerase und dH_2O ad 30 μl für 1 h bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute dNTPs wurden mittels Sephadex-G25 ausschlußchromatographisch abgetrennt. Die Spezifität der Markierung wurde am Liquid-Scintillation Analyzer überprüft und lag im Bereich von $1\text{-}2 \times 10^9$ cpm/ μg DNA.

Komplementäre Einzelstrang-Oligonukleotide wurden hybridisiert, indem je 250 pmol Oligonukleotid in 40 μl dH_2O für 5min bei 80°C im Wasserbad inkubiert und langsam auf RT abgekühlt wurden. 2,5 pmol doppelsträngige Oligonukleotide mit „blunt-ends“ wurden mit 2 μl 10x PNK-Reaktionspuffer (500 mM TRIS/HCL pH 7,6, 100 mM MgCl_2 , 50 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM EDTA), 3 μl γ - ^{32}P -ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), 10 U PNK und dH_2O ad 20 μl für 1 h bei 37°C inkubiert.

Doppelsträngige Oligonukleotide mit 5'-überhängenden Enden wurden markiert, indem 2,5 pmol DNA mit 2 μl 10x Reaktionspuffer (700 mM TRIS/HCL pH 7,5, 70 mM MgCl_2), 2 μl 10 mM DTT, 3 μl α - ^{32}P -dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), 5 U Klenow-Enzym und dH_2O ad 20 μl für 30 min bei RT inkubiert wurden.

Zur Abtrennung nicht eingebauter Radionuklide von den ^{32}P -gelabelten Oligonukleotiden wurde bei beiden Markierungsformen nach Zugabe von 2 μl 1 M MgCl_2 , 100 μl 4 M NH_4OAc und 10 μg Hefe-tRNA mit dH_2O ad 200 μl aufgefüllt, und die DNA mit 2,5 Vol. Ethanol präzipitiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 14.000 Upm wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 ml dH_2O aufgenommen.

2.11 Gelretardations-Analyse

5 μl Kernextrakt (4 μg) oder rekombinantes Protein (100 ng) wurden mit 15 μl Reaktionsmix (2 μg Poly dIdC, 1 μg BSA, 4 μl 5x Bandshiftpuffer, 8 μl dH_2O), 1 μl ^{32}P -markiertem Oligonukleotid (25 fmol, 50.000-100.000 cpm) und gegebenenfalls einem molaren Überschuß an ungelabelten Oligonukleotid gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Der 5x Bandshiftpuffer besteht aus: 60 mM HEPES pH 7,9, 20 mM TRIS/HCL pH 7,9, 300 mM KCl, 25 mM MgCl_2 , 3 mM EDTA, 3 mM DTT, 60% Glycerin. Zur Auftrennung der DNA-gebundenen Proteine wurden im nativen Gel (5 ml 40% PAA, 1,25 ml 10x TBE, 43,75 ml dH_2O , 500 μl APS, 50 μl TEMED, 1 h/100 V Vorlauf) die Ansätze für 1,5 h bei 100 V in 0,25x TBE separiert. Das Gel wurde auf Filterpapier gezogen, im Geltrockner

getrocknet und zur Autoradiographie mit einem *BIOMAX MS Scientific Imaging Film* bei -80°C exponiert.

2.12 Subklonierung und Arbeiten mit Bakterienstämmen

2.12.1 Restriktion von DNA *in vitro*

Die Voraussetzung der Subklonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide ist die Generierung von komplementären Enden durch TypII-Restriktionsendonukleasen, die palindromische Sequenzen erkennen und spezifisch schneiden (nach Cohen *et al.*, 1973). Pro μg DNA wurden 1-5 U (1 U = die Enzymmenge, die 1 μg DNA unter optimalen Bedingungen in 1 h vollständig verdaut) Enzym und 0,1 Vol. 10x Reaktionspuffer (vom Hersteller bereitgestellt) eingesetzt, wobei das Gesamtvolumen des Ansatzes mindestens dem Zehnfachen der eingesetzten Enzymmenge entsprach. Die Inkubation erfolgte im Thermostat oder im Wasserbad bei der optimalen Reaktionstemperatur. Durch Erhitzen oder Phenol-Chloroform-Präzipitation der DNA wurde die Reaktion abgestoppt. Die entstandenen DNA-Fragmente bzw. die Linearisierung eines circularen Plasmids konnten im Agarose-Gel (1% in TBE oder TAE) nachgewiesen werden.

2.12.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Zur Vermeidung der Religation komplementärer Enden wurden die Phosphatgruppen mittels alkalischer Phosphatase (SAP) entfernt. Dazu wurden zu 1 μg Plasmid im Reaktionsansatz 5-10 U SAP und 0,1 Vol. Dephosphorylierungspuffer (0,5 M TRIS/HCL pH 8,5, 1 mM EDTA) gegeben, bei 5'-überhängenden oder 5'-rezessiven Enden für 10-30 min, bei „blunt-end“ DNA-Fragmenten für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte für 15 min bei 65°C .

2.12.3 Auffüllen von 5'-überstehenden DNA-Enden

Zur Generierung von „blunt-ends“ wurden die 5'-überhängenden Enden mit dem Klenow-Enzym (Untereinheit der *E. coli* DNA-Polymerase I), welches eine 5'-3'-Polymerase-, eine 3'-5'-Exonuklease- aber keine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, aufgefüllt. Pro 20 µl Reaktionsansatz wurden 2 µl 10x Reaktionspuffer (700 mM TRIS/HCL pH 7,4, 70 mM MgCl₂) 5 U Klenow-Enzym und 1 mM eines jeden erforderlichen dNTP eingesetzt und 30 min bei RT inkubiert. Die Entfernung der dNTPs erfolgte mit dem *QIAquick Nucleotide Removal Kit Protocol*.

2.12.4 Ligation von DNA-Fragmenten

In einem Reaktionsvolumen von 40 µl wurden 4 µl 10x Reaktionspuffer (660 mM TRIS/HCL pH 7,6, 66 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 660 µM ATP) und 5 U T4-DNA-Ligase für die Ligation von „blunt-ends“ bzw. 0,5 U für die Ligation von überhängenden Enden eingesetzt und 12-24 h bei 16°C inkubiert.

Adapter sind doppelsträngige Oligonukleotide, die über einen bestimmten Bereich (hier: 18 bp) komplementär sind, aber überhängende Enden besitzen, die zur Ausbildung spezifischer Restriktionsschnittstellen führen und somit die Ligation von DNA-Fragmenten ermöglichen, die keine komplementären Enden besitzen. Die Adapter-Ligation (Haymerle *et al.*, 1986) erfolgte in einem Ansatz, der 0,04 pmol der zu ligierenden DNA und zusätzlich je 100 pmol der Adapter enthielt.

2.12.5 Agarose-Gelelektrophorese und Präparation von DNA aus dem Gel

Zur Auftrennung von DNA im horizontalen Agarose-Gel (0,8-1,5% in TBE, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) wurde diese, mit 6x Ladepuffer (50% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 1 mM EDTA) versetzt, in die Geltaschen eingefüllt und bei 5-10 V/cm² dem elektrischen Feld ausgesetzt. Das in die Nukleinsäure interkalierte Ethidiumbromid ließ sich mit UVC-Strahlung visualisieren.

Die Extraktion von DNA-Fragmenten erfolgte aus LMP-Agarose-Gelen (0,5-0,8% in TAE, 5 µg/ml Ethidiumbromid), indem die Banden auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit 5 Vol. TE (10:1) versetzt für 5 min bei 65°C zum Schmelzen gebracht wurden. Durch Schockgefrieren für 5 min in N₂ kollabierte die Agarose-Matrix, die durch Zentrifugation für 20 min bei 14.000 Upm abgetrennt wurde. Die Aufreinigung der DNA erfolgte - wie beschrieben - über eine Phenol-Extraktion.

Alternativ erfolgte die Präparation von DNA (< 10 kb) mit dem *Qiaquick Gel Extraction Kit Protocol* bzw. von DNA (> 10 kb) mit dem *QiaExII Agarose Gel Extraction Protocol*.

2.12.6 Präparation CaCl₂-kompetenter Bakterien (nach Sambrook *et al.*, 1989)

Die Bakterien wurden in einer 3 ml-Vorkultur in LB-Flüssigmedium (10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl, dH₂O ad 1 l, pH 7,5) für 8 h bei 37°C, 220 Upm auf dem Schüttelinkubator kultiviert. Hiermit wurde die 20 ml-Hauptkultur angeimpft und üN ebenso inkubiert. Mit dieser Kultur wurden 500 ml Medium angeimpft und bis zu einer OD_{λ600nm} = 0,3-0,5 kultiviert. Nach Abstoppen des Wachstums auf Eis wurde die Bakterienkultur für 10 min bei 4°C, 4000 Upm im Sorvall GS3-Rotor abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Bakterien in 1/5 Vol. eiskaltem 0,1 M CaCl₂ vorsichtig resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Bakterienpellet wieder in eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und mit Glycerin [25%]_{End} versetzt. Die aliquotierten Stocks wurden in N₂ schockgefroren, bei -80°C gelagert und vor Gebrauch auf Eis aufgetaut.

2.12.7 Bakterien-Transformation (nach Sambrook *et al.*, 1989)

Zu 200 µl CaCl₂-kompetente, auf Eis aufgetaute Bakterien werden 1-10 ng des zu transformierenden Plasmids gegeben, einmal vorsichtig pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Reaktionsansatz wird exakt 90 s im 42°C-Wasserbad erwärmt, 3 min auf Eis abgekühlt und mit 800 µl SOC-Medium vermengt. Nach Inkubation für 45 min bei 37°C auf dem Schüttelinkubator werden 200 µl Bakteriensuspension auf eine SOB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert, antrocknen gelassen und üN im 37°C-Brutschrank auf dem Kopf inkubiert. Die gewachsenen Klone werden gepickt, d.h. in 3 ml LB-Medium plus Antibiotikum kultiviert; aus den Bakterien wird Plasmid-DNA isoliert und via Restriktionsverdau das Plasmid charakterisiert.

2.12.8 Kryokonservierung von Bakterien

430 µl einer üN in LB-Medium bei 37°C, 220 Upm inkubierten Bakterienkultur wurden mit 570 µl 86% Glycerin vermischt, in N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.12.9 Koloniehybridisierung

Zur Überprüfung zahlreicher Klone auf das richtige Plasmid nach der Transformation wurde von der Agarplatte ein Abklatsch auf eine Nylonmembran gemacht, die 4 min auf mit 0,4 N NaOH/1% SDS durchtränktes Filterpapier und dann 4 min auf mit 0,5 N NaOH durchtränktes Filterpapier gelegt wurde. Nach kurzem Waschen mit 1 M TRIS/HCL pH 7,4 wurde das Bakterienlysat in 2x SSC/0,1% SDS durch leichtes Reiben mit Papier entfernt und der Filter mit 2x SSC gewaschen. Der Filter wurde - wie beschrieben - mit einer DNA-Sonde hybridisiert.

2.13 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (nach Sambrook *et al.*, 1989)

Die Technik der PCR fand Verwendung bei der Genotypisierung von Transgenen und dem Überprüfen von Klonierungsprodukten sowie bei der Isolierung von DNA-Abschnitten aus einem Plasmid. Prinzip der PCR ist ein sich wiederholender Zyklus von 1.) Denaturierung der Substrat-DNA zu Einzelsträngen, 2.) Hybridisierung spezifischer Primer, 3.) Polymerase-Reaktion, so daß von einer Template nahezu beliebig viele Kopien produziert werden können.

Die Reaktionsbedingungen waren für jedes Experiment neu auszutesten. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem Agarose-Gel zur Auswertung oder auf einem LMP-Agarose-Gel zur weiteren Aufarbeitung elektrophoretisch aufgetrennt. Wurde die amplifizierte DNA weiter verwendet, z. B. zur Klonierung, so schloß sich das *QIAquick PCR Purification Kit Protocol* an.

Beispiel-PCR-Protokoll zur Isolierung von hMSH2 aus pMSH11/XL1-Blue:

Probenansatz:

Reaktionszyklen im Thermocycler:

DNA	100 ng	1x	2 min 94°C
Primer A	24 pmol	30x	30 s 94°C, 60 s 55°C, 120 s 70°C
Primer B	24 pmol	1x	8 min 70°C
10x Reaktionspuffer	5 µl		
dNTP-Mix je [10 mM]	2 µl		
Taq-Polymerase	0,5 µl (2,5 U)		
dH ₂ O	ad 50 µl		

3. Ergebnisse

3.1 DNA-Reparatur des O⁶-Methylguanin-Schadens nach dem ersten Zellzyklus

Unter den zahlreichen, verschiedenen DNA-Addukten, die durch alkylierende Agenzien gebildet werden, nimmt die Methylierung von Guanin an der O⁶-Position eine entscheidende Rolle ein. Die Bildung dieses Addukts, in unseren Versuchen modellhaft durch das Alkylanz N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) hervorgerufen, ist ein entscheidender Faktor für die Zytotoxizität, Klastogenität, Mutagenität und folglich Kanzerogenität dieser Substanzgruppe. Das Reparaturprotein O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) wirkt dem schädigenden Potential von O⁶-Methylguanin (O⁶-MeG) entgegen, indem es diese DNA-Läsion erkennt und die Methylgruppe auf sich selbst überträgt, wobei das Enzym irreversibel inaktiviert und Guanin restauriert wird. Diese Reparatur erfolgt, sobald O⁶-MeG-Substrate in der DNA vorhanden sind. Ob aber die Reparatur von O⁶-MeG auch dann noch erfolgt, wenn O⁶-MeG bereits mit Thymin fehlgepaart ist, also von einer Schadens-Bindung durch Basenfehlpaarungsreparatur (MMR)-Proteinen ausgegangen werden kann, wurde noch nicht bewiesen. Auch war noch unklar, ob der postreplikativen Entfernung dieses Schadens eine protektive Wirkung gegenüber der O⁶-MeG-auslösenden Zytotoxizität zugeschrieben werden kann. Diese offenen Fragen sollten mit den folgenden Versuchen geklärt werden.

3.1.1 MGMT repariert O⁶-MeG/C und O⁶-MeG/T *in vitro* mit gleicher Effizienz und wird nicht durch die Bindung von Basenfehlpaarungsreparaturproteinen beeinflusst

Zur Klärung, ob MGMT die Substrate O⁶-MeG gepaart mit Cytosin (O⁶-MeG/C) und O⁶-MeG fehlgepaart mit Thymin (O⁶-MeG/T) mit gleicher oder unterschiedlicher Spezifität erkennt und repariert, wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, der auf dem MGMT-Aktivitäts-Test beruht. In diesem *in vitro*-Test wird die Übertragung [³H]-markierter Methylgruppen vom Substrat (hier Kalbsthymus-DNA) auf MGMT unter standardisierten Bedingungen gemessen, wobei die Aktivität sowohl von rekombinantes MGMT als auch von solchem aus Gesamtproteinextrakten bestimmt werden kann. In diesem Fall (Abb. 1 A) wurde rekombinantes humanes MGMT verwendet, das als GST-Fusionsprotein aufgereinigt wurde. 2 µg rekombinantes Protein wurden mit Substrat-DNA in Reaktionspuffer für 90 min bei 37° C inkubiert. Von dem mit TCA ausgefällten und von Substrat-DNA sorgfältig gereinigten

Protein wurde die Aktivität im Flüssigscintillationszähler bestimmt. Die auf die spezifische Aktivität der Substrat-DNA abgeglichene Protein-Aktivität betrug in diesem Fall ~3000 fmol pro 2 µg rekombinanten Proteins. Mit der Zugabe von nicht-[³H]-markierten Oligonukleotiden (jeweils 29 bp) in 1 bis 1000 fachem molarem Überschuß (in Bezug zur spezifischen Aktivität der Substrat-DNA), die in ihrer Sequenz O⁶-MeG/C oder O⁶-MeG/T enthielten, wurde die MGMT-Aktivität an der Substrat-DNA kompetiert. Dies drückt sich in einer Abnahme der MGMT-Aktivität in dem Maße aus, in dem nicht-markiertes Oligonukleotid im Überschuß zugegeben wurde. 10-facher Überschuß an nicht-markiertem Oligonukleotid resultierte in einer Reduktion der MGMT-Aktivität auf ca. $\frac{1}{10}$ der Ausgangsaktivität. Die Zugabe von nicht-markierten Oligonukleotiden, die in ihrer Sequenz G/C und G/T enthielten, führte erwartungsgemäß zu keiner Konkurrenz, weil diese Sequenzen kein Substrat für MGMT sind; diese Ansätze dienten der Kontrolle. Die Tatsache, daß die Zugabe von nicht-markierten Oligonukleotiden mit O⁶-MeG/C bzw. O⁶-MeG/T in der Sequenz zu einer Abnahme der MGMT-Aktivität im selben Maße führte, zeigte, daß beide Oligonukleotide gleichermaßen in der Lage waren, die MGMT-Aktivität zu kompetieren. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß MGMT O⁶-MeG/C und O⁶-MeG/T gleich gut erkennt und mit selber Effizienz repariert, und daß es keine Unterschiede in der Substratspezifität von MGMT hinsichtlich der des O⁶-MeG-Schadens gegenüberliegenden Base gibt (Abb. 1 A).

Dieses Ergebnis zur Grundlage nehmend, interessierte die weitergehende Frage, ob die Entfernung der O⁶-Methylgruppe durch MGMT beeinflußt wird durch das Vorhandensein von Basenfehlpaarungsreparatur (MMR)-proteinen. Denn sobald O⁶-MeG mit Thymin fehlpaaert, ist diese Struktur Substrat der MMR und wird durch Komponenten dieses Reparatursystems gebunden. Es ist daher nicht auszuschließen, daß eine Bindung von MMR-Proteinen zu einer sterischen Behinderung der MGMT führt. Um dies experimentell zu überprüfen, wurde der oben beschriebene, etablierte MGMT-Aktivitäts-Kompetitions-Test nochmals modifiziert (Abb. 1 B, C). Durch die Zugabe von 40 µg Kernproteinextrakt MMR-profizienter Zellen zum Reaktionsansatz sollte die MGMT-Aktivität beeinflusbar sein, wenn die Bindung von MMR-Proteinen tatsächlich die MGMT-Aktivität am O⁶-MeG/T-Substrat behindert (Abb. 1 B). Bei den MMR-profizienten Zellen handelte es sich um CHO-9neoC5 Zellen, die MGMT-defizient (*mex*⁻) und mit einem Kontrollplasmid (pSV2neo) stabil transfiziert sind, um sichtbar werdende Unterschiede nicht auf das Vorhandensein des Selektionsmarkers der MMR-defizienten Zellen zurückführen zu können. Zur Kontrolle der Spezifität eventuell sichtbar werdender Unterschiede wurden zu gleichen *in vitro*-Reaktionsansätzen 40 µg Kernproteinextrakt MMR-defizienter Zellen gegeben. Hierbei handelte es sich um CHO-9TK22cos9/5-1/2-C1M Zellen, die stabil mit einer humanen Cosmidbank und pSV2neo transfiziert sind. Trotz ihrer MGMT-Defizienz (*mex*⁻) sind die Zellen MNNG-resistent, weshalb sie dem sogenannten „Toleranz“-Phänotyp zugeordnet werden können (Kaina, 1987; Kaina *et al.*, 1987; Fritz *et al.*, 1993). Die Kernproteinextrakte wurden gewonnen, indem isolierte Kerne mit hypertotonischer KCl-Lösung schonend aufgeschlossen wurden, so daß die Bindungsaktivität der MMR-Proteine erhalten blieb (siehe Abb. 2). Das Ergebnis der

Kompetition von MGMT unter Zugabe von MMR-Proteinen aus Kernextrakten zeigt Abb. 1 B: O⁶-MeG/C- und O⁶-MeG/T-enhaltende Oligonukleotide waren gleichermaßen in der Lage, für MGMT als Substrat zu dienen, ungeachtet des Vorhandenseins und der Bindung von MMR-Komponenten an die Basenfehlpaarung. Die Abnahme der MGMT-Aktivität als Folge der Kompetition mit nicht-markierten Oligonukleotiden in dem Maße, wie Oligonukleotid im Überschuß zugegeben wurde, war in den vier relevanten Ansätzen gleich und nicht durch MMR-Proteine beeinflussbar. Als Kontrollen dienten wieder Ansätze mit G/C- und G/T-enhaltenden Oligonukleotiden, bei denen keine Abnahme der MGMT-Aktivität zu beobachten war. Die Reaktionsansätze wurden diesmal, im Gegensatz zu Abb. 1 A, in Bandshift-Puffer durchgeführt, um eine Bindung der MMR-Proteine an die Basenfehlpaarung zu gewährleisten; die Aktivität des rekombinanten MGMT war hierbei nahezu unverändert. Eine Darstellung der MGMT-Aktivität nicht als absoluter Wert sondern als relative Angabe zur Kontrolle (kein Kompetitions-Oligonukleotid im Ansatz) diente der besseren Vergleichbarkeit der Versuche.

Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch ein ebensolches Experiment, bei dem anstelle der Kernproteineextrakte MMR-profizienter und -defizienter Zellen rekombinantes, aufgereinigtes MutS α -Protein (Duckett *et al.*, 1996; von Prof. Jiricny, Zürich) im Mikrogramm-Maßstab den Reaktionsansätzen zugefügt wurde (Abb. 1 C). MutS α ist ein Dimer, bestehend aus den MMR-Proteinen MSH2 und MSH6, die den ersten Schritt der MMR, nämlich die Erkennung und die Bindung der Basenfehlpaarung, vollziehen. Auch die Zugabe von 1 μ g MutS α zu den Ansätzen war nicht ausreichend, die MGMT-Aktivität zu beeinflussen. Es war kein Unterschied in der Kompetierbarkeit von MGMT durch Oligonukleotide zwischen den Ansätzen mit und ohne MutS α detektierbar (Abb. 1 C). Daraus kann geschlußfolgert werden, daß trotz der Bindung von MMR-Proteinen an die Basenfehlpaarung (siehe Abb. 2) O⁶-MeG-Läsionen von MGMT erkannt, gebunden und repariert werden, was nicht durch MMR-Proteine beeinflusst wird.

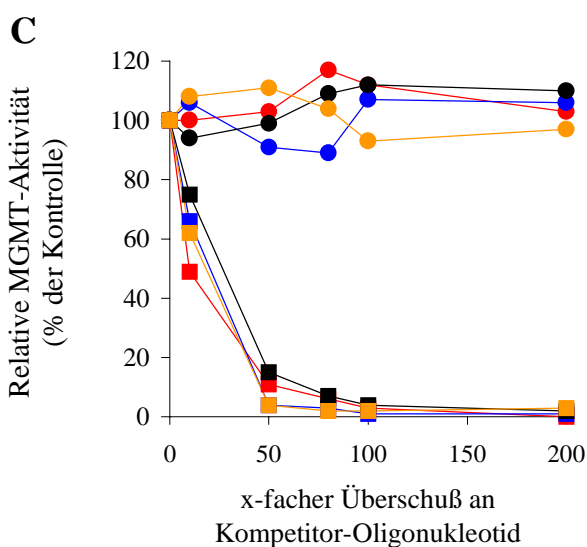
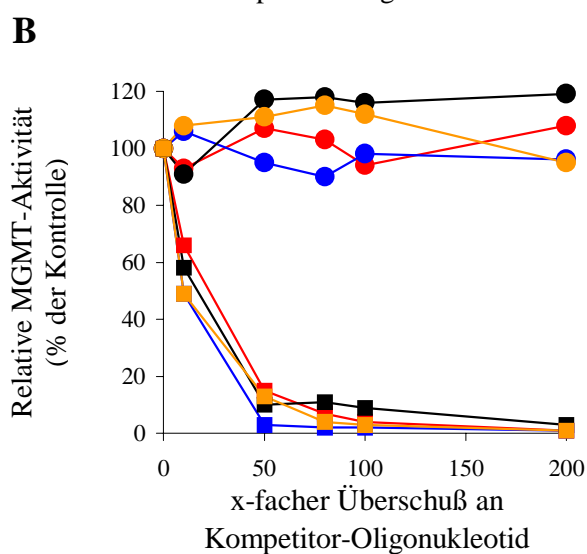
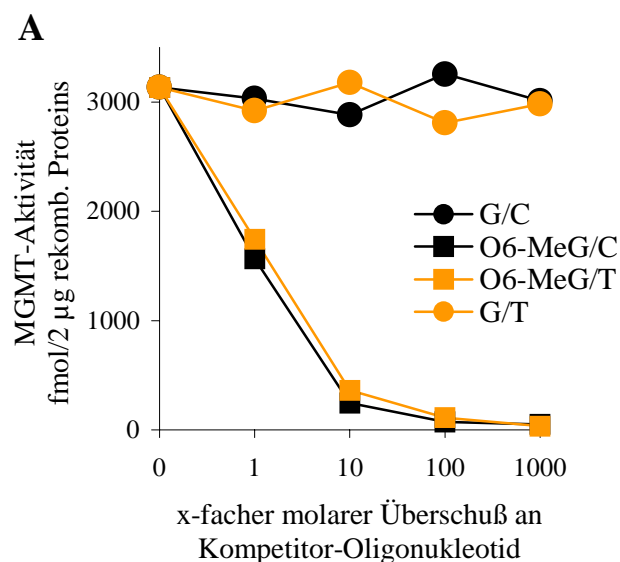


Abb. 1: Reparatureffizienz von rekombinantem MGMT (GST-MGMT) im *in vitro*-MGMT-Aktivitäts-Test. [³H]-gelabelte Methylgruppen am Guanin von Kalbsthymus-DNA wurden auf MGMT übertragen, das mit TCA ausgefällt und im *Liquid Scintillation Analyzer* gemessen wurde. **A)** Die Zugabe von nichtradioaktiv-markierten Oligonukleotiden (29 bp), die in ihrer Sequenz O⁶-MeG/C oder O⁶-MeG/T enthielten, führte zu einer Konkurrenz von MGMT, was in Folge steigender Mengen an Kompetitor zu einer Abnahme der [³H]-enthaltenden Proteine führte und als abnehmende MGMT-Aktivität dargestellt wurde.

Abb.1: Reparatureffizienz von rekombinantem MGMT (GST-MGMT) im *in vitro*-MGMT-Aktivitäts-Test. **B)** Zu den oben beschriebenen *in vitro*-Ansätzen wurden zusätzlich 40 µg Kernproteinextrakt Basenfehlpaarungsreparatur-profizienter (CHO-9neo-C5; mex⁻) bzw. -defizienter, „toleranter“ (CHO-9TK22cos 9/5-1/2-C1M; mex⁻) Zellen gegeben. Die Kernproteinextraktion erfolgte nach der Vorschrift, wie sie auch für die Extraktion von Kernproteinen für den Einsatz in Gelretardationsanalysen verwendet wurde. Als Reaktionspuffer wurde der in der Gelretardationsanalyse eingesetzte Inkubationspuffer verwendet. Die MGMT-Aktivität wurde relativ (zum Kontrollansatz ohne Kompetitor-Oligonukleotid) dargestellt. **C)** Durchführung wie unter B beschrieben; anstelle der Kernproteinextrakte wurde rekombinantes MutS α Protein im Mikrogramm-Maßstab zugesetzt.

3.1.2 Zellen des „Toleranz“-Phänotyps sind defekt in der Bindung der G/T-Basenfehlpaarung

Zellen des „Toleranz“-Phänotyps sind trotz ihrer MGMT-Defizienz resistent gegenüber der zytotoxischen Wirkung von MNNG. Wie Untersuchungen zeigten (Dosch, 1996), ist ein molekularbiologisches Charakteristikum dieser Zellen ihre Unfähigkeit, die G/T-Basenfehlpaarung zu binden. Dies ist der Grund für eine defekte MMR, was ursächlich mit der erhöhten Toleranz gegenüber O⁶-MeG-Läsionen in der DNA in Verbindung gebracht wird. Diese fehlende Bindung der G/T-Basenfehlpaarung der CHO-9TK22cos9/5-1/2-C1M Zellen im Vergleich zu den CHO-9neo-C5 Zellen ist essentieller Bestandteil der mit der Abb. 1 B beschriebenen Versuche der Beeinflussbarkeit der MGMT-Aktivität am O⁶-MeG/T durch MMR-Proteine und wurde mit den von mir verwendeten Zellen nochmals gezeigt. In Abb. 2 ist ein Gelretardationsexperiment („Bandshift“) dargestellt, in dem die Bindung von MMR-Proteinen an die G/T-Basenfehlpaarung überprüft wurde. 5 µg Kernextrakt MMR-profizienter (CHO-9neo-C5) und MMR-defekter „toleranter“ Zellen (CHO-9TK22cos9/5-1/2-C1M) wurden mit 25 fmol [³²P]-markierten Oligonukleotids, welches in der Sequenz G/T oder G/C enthielt, inkubiert. Die Bindungsreaktion erfolgte in dem Puffer, in dem auch der MGMT-Aktivitäts-Test *in vitro* durchgeführt wurde. Ebenso wurden die gleichen Oligonukleotide verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im nativen Gel wurden die Banden der „geschifteten“, Oligonukleotid-gebundenen Proteine nach Autoradiographie sichtbar. Wie in Abb. 2 erkennbar, erfolgte eine spezifische Bindung von Proteinen aus Kernproteinextrakten MMR-profizienter Zellen nur an das G/T-Oligonukleotid, nicht aber an das G/C-Kontrolloligonukleotid. Diese Bindung war mit 5- und 10-fachem molarem Überschuss an ungelabeltem G/T-Oligonukleotid, jedoch nur schwach mit 10-fachem molarem Überschuss an G/C-Oligonukleotid kompetierbar. Kernproteinextrakte aus MMR-defekten „toleranten“ Zellen hingegen zeigten keine Bindung an die G/T-Basenfehlpaarung.

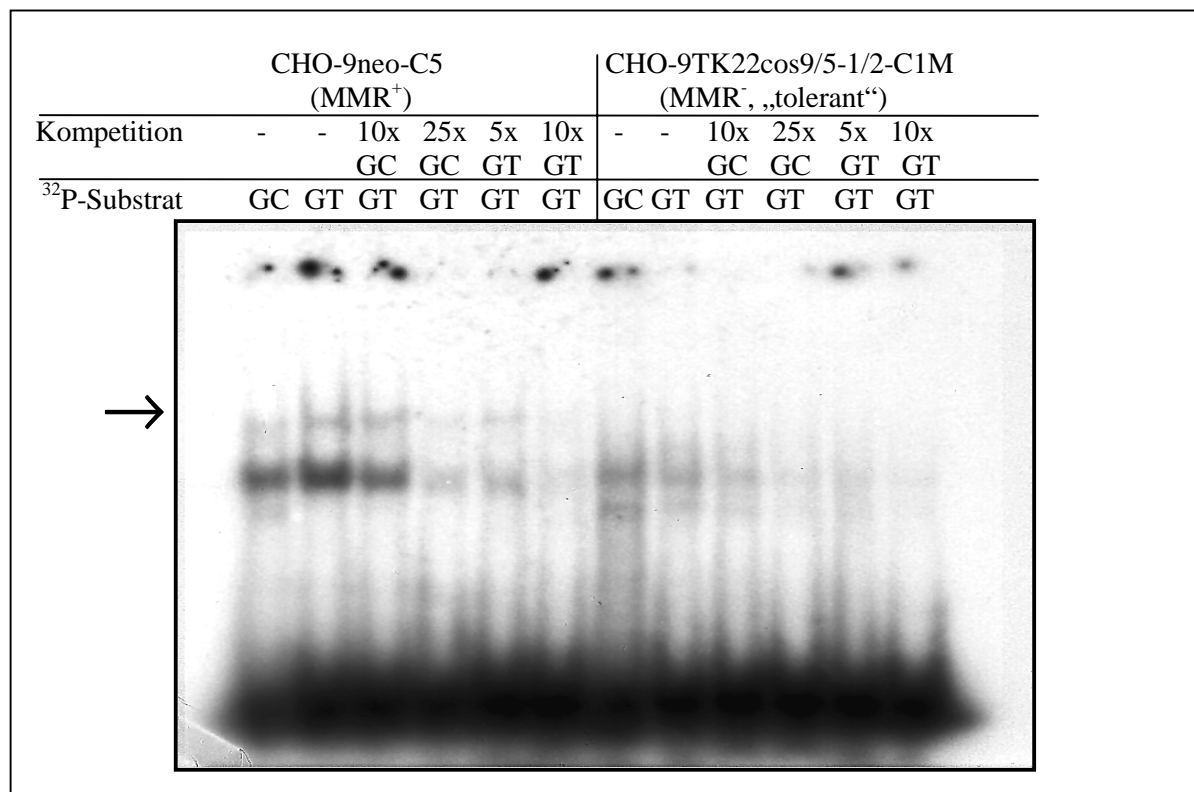


Abb. 2: Gelretardationsanalyse zum Nachweis der G/T-Bindungsaktivität Basenfehlpaarungsreparatur-profizienter (CHO-9neo-C5) Zellen bzw. der defekten G/T-Bindeaktivität Basenfehlpaarungsreparatur-defizienter, sogenannter „toleranter“ (CHO-9TK22cos9/5-1/2-C1M) Zellen. Die Bindung der MMR-Proteine an das [³²P]-markierte G/T-Substrat hat zur Folge, daß dieses im nativen Gel „shiftet“ und den „Bandshift“ auf einer spezifischen Höhe nach Autoradiographie sichtbar werden läßt. Es wurden jeweils 25 fmol [³²P]-Oligonukleotid eingesetzt. Zum Nachweis der Spezifität der Bindung wurde mit angegebenem molarem Überschuß an nicht-markiertem Oligonukleotid kompetiert. Ein G/C- anstatt G/T-enthaltendes Oligonukleotid wird von MMR-Proteinen nicht erkannt und führt zu keinem „Bandshift“.

3.1.3 MGMT ist durch O⁶-Benzylguanin effektiv hemmbar

Die effektive und reversible Hemmung von MGMT durch O⁶-Benzylguanin (O⁶-BG; Dolan *et al.*, 1990), einem Substratanalogon, ist essentieller Bestandteil des unter 3.1.5 beschriebenen Experimentes. Wie in Abb. 3 dargestellt, betrug die Aktivität von 1 mg Gesamtproteinextrakt aus den oben verwendeten CHO-9AT17-C3 Zellen ~700 fmol umgesetztes Substrat. Nach Zugabe von 2,5 µM O⁶-BG war nach einer Stunde keine MGMT-Aktivität mehr meßbar, und MGMT blieb über den beobachteten Zeitraum von 24 h völlig reprimiert (Abb. 3, Kurve A). Eine einmalige Gabe von O⁶-BG für 60 min (effektive Behandlungszeit) war demzufolge ausreichend, die MGMT-Aktivität über 2 Zellzyklen zu hemmen. Wie mit Kurve B dargestellt, stieg nach Ersetzen des O⁶-BG-enthaltenden Mediums durch frisches, vorgewärmtes Medium die MGMT-Aktivität innerhalb kurzer Zeit wieder an, was auf Neusynthese des Proteins zurückzuführen ist. 6 h nach Mediumwechsel betrug die MGMT-Aktivität ca.

$\frac{1}{3}$ der Ausgangsaktivität, die nach 24 h wieder erreicht war. Dieser Anstieg der MGMT-Aktivität war ausreichend, um den protektiven Effekt von MGMT im 2. Zellzyklus (siehe 3.1.5) zu beobachten.

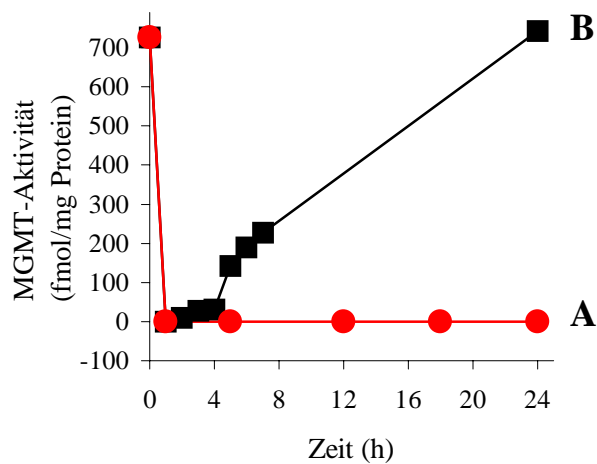


Abb. 3: Effektive und reversible Hemmung von MGMT durch O⁶-BG. Die MGMT-Aktivität MGMT-profizienter Zellen (CHO-9AT17-C3, mex⁺) wurde im MGMT-Aktivitäts-Test *in vitro* bestimmt. Die einmalige Behandlung der Zellen mit 2,5 μ M O⁶-BG hemmte MGMT schon nach 1 h und über einen Zeitraum von 24 h (Kurve A). Die Entfernung von O⁶-BG durch Ersetzen des Mediums durch frisches vorgewärmtes ließ die MGMT-Aktivität innerhalb weniger Stunden wieder ansteigen (Kurve B).

3.1.4 Arretierung von CHO-9 Zellen am Übergang von der G1- zur S-Phase und synchroner Eintritt in den Zellzyklus

Die Synchronisation der Zellen ist essentieller Bestandteil des in Abschnitt 3.1.5 beschriebenen Experiments zur protektiven Wirkung von MGMT im 2. Zellzyklus. Da die Zellen ihre MGMT-Aktivität möglichst genau im 2. Zellzyklus entfalten sollten, war es erforderlich, den synchronen Eintritt in den Zellzyklus sowie den synchronen Zellzyklusverlauf zu beobachten. Wie in Abb. 4 dargestellt, resultierte eine 56 stündige Inkubation der Zellen in Medium ohne FBS und anschließende 14 stündige Inkubation in Medium ohne FBS + 300 μ M Mimosin in einem Arrest von 90% der Zellen in G1. Mimosin bewirkt u. a. eine Depletion des Desoxyribonukleotid-Pools und damit eine Arretierung der Zellen am Ende von G1-Phase (Mosca *et al.*, 1995; Gilbert *et al.*, 1995; Hughes & Cook, 1996). 2 h nach „Release“ der Zellen in den Zellzyklus ist bereits eine G2-Zellpopulation detektierbar. Die Zellen laufen synchron in den ersten Zellzyklus. Die Synchronisation war jedoch bereits nach einem Zellzyklus (nach ~11 h) nicht mehr beobachtbar. Damit die MGMT-Aktivität im 2. Zellzyklus wieder vorhanden war, wurde dieser Zellzyklusanalyse zufolge nach 10 h das O⁶-BG aus dem Medium entfernt, was zu einem sofortigen Anstieg der MGMT-Aktivität führte; nach 6 h betrug die MGMT-Aktivität $\sim\frac{1}{3}$ der Ausgangsaktivität (vergleiche Abb. 3).

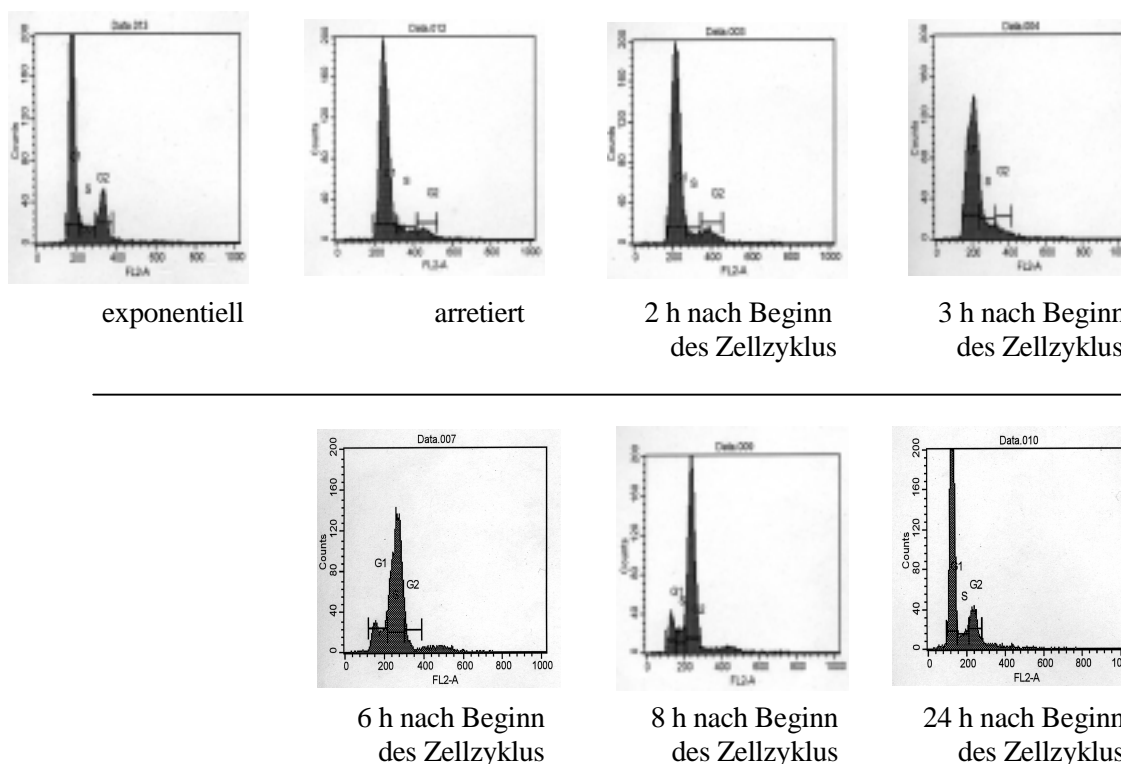


Abb. 4: Kontrolle der Synchronisation von CHO Zellen (CHO-9AT17-C3, mex⁺). Auf 5 cm-Schalen eingesäte und 24 h inkubierte Zellen wurden 56 h in Medium ohne FBS und zusätzlich 14 h in Medium ohne FBS und mit 300 μ M Mimosin am Ende von G1 arretiert. Durch Ersetzen des Mediums durch vorgewärmtes, FBS-enthaltendes Medium, traten die Zellen synchron in den ersten Zellzyklus ein. Die Zellzyklusanalyse der Zellen erfolgte mittels Propidiumiodid-Färbung und FACS-Analyse.

3.1.5 Postreplikative Reparatur von O⁶-Methylguanin durch MGMT hat protektive Wirkung auf das zelluläre Überleben

Da in vorherigen Experimenten gezeigt werden konnte, daß MGMT auch O⁶-MeG/T, eine Läsion, die erst bei der DNA-Replikation entsteht, bindet und repariert und daß dieser Vorgang nicht durch MMR-Proteine beeinflusst wird, stellte sich die Frage nach der biologischen Auswirkung der Entfernung der O⁶-MeG-Läsion nach dem ersten Zell- bzw. Replikationszyklus hinsichtlich der Zytotoxizität dieses Schadens. Hierzu wurde ein Experiment durchgeführt, in dem die Zytotoxizität eines O⁶-MeG-induzierenden Agens (hier: MNNG) *in situ* in Abhängigkeit vom Vorhandensein der MGMT-Aktivität in verschiedenen Zellzyklen bestimmt wurde. Der Versuchsablauf im Detail: Mit humaner MGMT-cDNA stabil transfizierte CHO-Zellen (CHO-9AT17-C3, mex⁺) wurden durch Serumentzug und Mimosin-Behandlung (Mosca *et al.*, 1995; Gilbert *et al.*, 1995) am Übergang von der G1- zur S-Phase arretiert und synchron in den ersten Zellzyklus entlassen (siehe Abb. 4). Durch Behandlung der Zellen mit 2,5 μ M O⁶-BG (Dolan *et al.*, 1990) konnte die MGMT-Aktivität effektiv gehemmt werden (siehe Abb. 3); durch Entfernen des O⁶-BG gegen Ende des 1. Zellzyklus konnte die MGMT-Aktivität

innerhalb weniger Stunden durch Neusynthese restauriert werden, so daß MGMT nur im 2. Zellzyklus aktiv war. Durch Behandlung der Zellen mit MNNG 1 h nach Eintritt in den 1. Zellzyklus für 1 h wurde der O⁶-MeG-Schaden in der DNA induziert, dessen zytotoxische Auswirkungen durch Aussaat der Zellen zum Koloniebildungs-Test am Ende des 2. Zellzyklus' bestimmt werden konnte. Das Ergebnis dieses Zytotoxizitäts-Tests in Abhängigkeit von der Variation des Versuchsparameters „MGMT-Aktivität“ ist in Abb. 5 dargestellt: Überlebenskurve A: Zellen, die MGMT über die Dauer des 1. und 2. Zellzyklus' exprimierten, waren hinsichtlich der Zytotoxizität des O⁶-MeG-Schadens relativ resistent. Überlebenskurve C: Zellen, die über den Zeitraum des 1. und 2. Zellzyklus' keine MGMT-Aktivität infolge der Behandlung mit O⁶-BG aufwiesen, waren relativ sensitiv gegenüber der MNNG-induzierten Zytotoxizität. Überlebenskurve B (Abb. 5, oberes Diagramm): Zellen, die infolge O⁶-BG-Behandlung keine MGMT-Aktivität im 1. Zellzyklus aufwiesen, aber durch Entfernen des O⁶-BG aus dem Medium am Ende des 1. Zellzyklus MGMT-Aktivität im 2. Zellzyklus besaßen, waren resistenter als die Zellen, die keine MGMT-Aktivität im 1. und 2. Zellzyklus aufwiesen, jedoch sensitiver als die Zellen, die MGMT-Aktivität im 1. und 2. Zellzyklus hatten. Überlebenskurve D (Abb. 5, unteres Diagramm): Zellen, die MGMT im 1., nicht aber im 2. Zellzyklus nach Behandlung aufwiesen, waren resistenter gegenüber der Zytotoxizität der O⁶-MeG-Läsion als die Zellen, die MGMT-Aktivität nicht im 1. und 2. Zellzyklus aufwiesen, jedoch sensitiver als die Zellen, die MGMT-Aktivität im 1. und 2. Zellzyklus zeigten. Aus Gründen der Übersicht wurden die Kurven B und D nicht in einem Diagramm gezeigt. Täte man dies, so deutete sich an, daß der prereplikativen Entfernung des O⁶-MeG-Schadens eine größere Bedeutung zukommt als der postreplikativen Entfernung. Jedoch liegen nicht alle Werte der Kurven B und D signifikant auseinander, so daß keine Unterscheidung in der Relevanz des Zeitpunktes der Entfernung von O⁶-BG vorgenommen werden kann.

Abschließend kann geschlußfolgert werden, daß der Entfernung des O⁶-MeG-Schadens durch MGMT auch nach dem ersten Zellzyklus eine protektive Wirkung auf das Zellüberleben zukommt. Verglichen mit Koloniebildungsexperimenten von Kollegen, die MGMT-defiziente CHO-9 Zellen mit MNNG behandelten, liegt die Überlebenskurve C (kein MGMT im 1. und 2. Zellzyklus) relativ hoch. Das wird darauf zurückgeführt, daß nach Ende des 2. Zellzyklus die Zellen zum Koloniebildungsexperiment ohne O⁶-BG ausgesät wurden, so daß MGMT wieder aktiv werden konnte. Das impliziert, daß der Entfernung des O⁶-MeG-Schadens auch nach dem 2. Zellzyklus möglicherweise noch protektive Wirkung auf das Zellüberleben zugeschrieben werden kann.

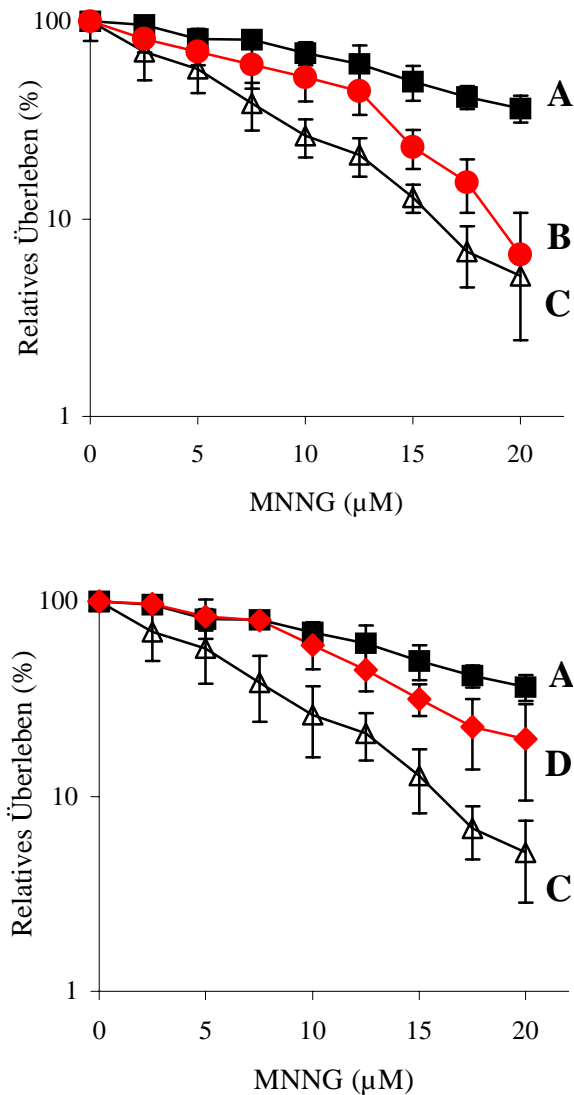


Abb. 5: Protektive Wirkung von MGMT im ersten und zweiten Zellzyklus nach Behandlung. Auf 5 cm-Schalen eingesäte CHO-9AT17-C3 Zellen (mex^+) wurden 24 h inkubiert, 56 h in Medium ohne FBS gehungert, 14 h in Medium ohne FBS + 300 μM Mimosin inkubiert und durch Ersetzen des Mediums durch vorgewärmtes, FBS-enthaltendes Medium synchron in den ersten Zellzyklus entlassen. 1 h danach wurde für 1 h mit den angegebenen Konzentrationen an MNNG behandelt. Zellen, die MGMT-Aktivität nur im 2. Zellzyklus nach Behandlung aufweisen sollten (Überlebenskurve B), wurden für 1 h vor MNNG-Gabe mit 2,5 μM $\text{O}^6\text{-BG}$ behandelt, welches am Ende des ersten Zellzyklus durch Medium-Wechsel entfernt wurde. Zellen, die über die Dauer der ersten beiden Zellzyklen MGMT-Aktivität (Überlebenskurve A) bzw. keine MGMT-Aktivität (Überlebenskurve C) aufweisen sollten, wurden nicht mit $\text{O}^6\text{-BG}$ behandelt bzw. wurden mit 2,5 μM $\text{O}^6\text{-BG}$ behandelt, welches nicht aus dem Medium entfernt wurde. Zellen, die MGMT im 1., nicht aber im 2. Zellzyklus nach Behandlung aufweisen sollten (Überlebenskurve D), wurden am Ende des 1. Zellzyklus mit $\text{O}^6\text{-BG}$ behandelt. Am Ende des zweiten Zellzyklus wurden die Zellen trypsiniert und jeweils 500 Zellen in 5 cm-Schalen eingesät. Nach 7 tägiger Inkubation wurden die gewachsenen Kolonien mit Methanol fixiert, mit Giemsa-Kristallviolett gefärbt, gezählt und die relativen Überlebensdaten als Kurven A, B, C, D (Kolonien zur Anzahl gewachsener Kolonien der Kontrolle: kein MNNG) aufgetragen.

3.2 Der DNA-Doppelstrangbruch als Folge der Einwirkung DNA-schädigender Agenzien

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) sind die Folge zahlreicher DNA-schädigender Agenzien wie ionisierender Strahlung oder genotoxischer Substanzen, zu denen auch die Alkylantien gehören. Die durch diese Agenzien induzierten Primärschäden sind in der Regel keine DSBs sondern zahlreiche DNA-Addukte an unterschiedlichen Positionen in der DNA und, im Falle ionisierender Strahlung, Einzelstrangbrüche, reaktive Sauerstoff- und andere Radikale. Die Entstehung des Doppelstrangbruches erfolgt daher zumeist als Folge der Prozessierung des DNA-Primärschadens oder durch die Reaktion der Radikale mit der DNA. Welcher der durch einen Primärschaden verursachte Sekundär- oder weiterer DNA-Schaden nun tatsächlich die für die Zelle ultimative zytotoxische Läsion darstellt, ist unklar. Auch ist nicht bekannt, welche Art von DNA- oder Zellschaden zu welcher spezifischen Zellantwort, wie z. B. der Apoptose führt. Aufgrund 1) klassischer Arbeiten, die DNA-Doppelstrangbrüchen zytotoxische Wirkung zuschreiben (Schwartz *et al.*, 1988; Giaccia *et al.*, 1992; Ruiz De Almodóvar *et al.*, 1994; Wurm *et al.*, 1994; Zaffaroni *et al.*, 1994; Núñez *et al.*, 1995; Whitaker *et al.*, 1995), 2) der bereits bekannten Klastogenität des DNA-Doppelstrangbruches sowie aus der Tatsache, daß 3) DNA-Doppelstrangbrüche nach Behandlung mit den meisten (wenn nicht allen) genotoxischen Agenzien entstehen, kann vermutet werden, daß DNA-Doppelstrangbrüche der eigentliche, ultimative Auslöser für unterschiedliche Reaktionen der Zelle auf DNA-Schädigung sind. Daher wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, daß DSBs eine, wenn nicht sogar die zentrale Rolle in der alkylierungsinduzierten Zytotoxizität spielen.

3.2.1 Charakterisierung der p53-profizienten (BK4+/+) und p53-defizienten (p53-/-E) Mausfibroblasten

Der Einfluß des Tumorsuppressorproteins p53 auf zahlreiche Reaktionen der Zelle im allgemeinen sowie seine Bedeutung bei der DNA-Reparatur, der Apoptose und der Zellzyklusregulation im besonderen hat mich veranlaßt, die DNA-Doppelstrangbruchreparatur und Apoptose-Induktion auch in Abhängigkeit von p53 zu untersuchen. Dazu wurden zwei Zelllinien herangezogen, die sich in ihrer genetischen Konstitution nur im Vorhandensein des p53-Gens unterschieden. Es handelte sich um etablierte Mausfibroblasten, die aus Embryonen von p53-Wildtyp- (BK4+/+; Prof. Kaina, Mainz) und p53-Knockout (p53-/-E; Donehower *et al.*, 1992; von Prof. Balmain, Glasgow)-Mäusen stammten. Des weiteren fanden Mausfibroblasten Verwendung, die hinsichtlich der Aktivität der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK_{CS}) wildtypartig (Balb/c) oder defekt (Scid) waren. Im folgenden soll eine kurze Charakterisierung der Zellen vorgenommen werden.

Wie in den Westernblot-Analysen der Abb. 6 dargestellt, besitzt die Zelllinie BK4+/+ induzierbares p53, welches nach γ -Bestrahlung (10 Gy) nach 6 h detektierbar war. Die p53-/-E Zellen hingegen besitzen kein p53. Auch von Frau Dr. Lackinger (Insitut für Toxikologie, Universität Mainz) durchgeführte Untersuchungen mit Hilfe der PCR zeigten deutlich, daß die p53-/-E Zellen kein p53-Allel aufwiesen und somit nicht nur p53-mutant sondern tatsächlich p53-knockout waren. Balb/c und Scid Zellen besitzen funktionelles p53, welches durch γ -Bestrahlung induzierbar war. Wie weitere Westernblot-Analysen zeigten, sind sowohl die BK4+/+ als auch die p53-/-E Zellen in der Lage, nach γ -Bestrahlung p21-Protein vermehrt zu exprimieren, was nach ~6-10 h erfolgte. Dies ist in Einklang mit klassischen Arbeiten, die sowohl p53-abhängige (El-Deiry *et al.*, 1993, 1994) als auch p53-unabhängige (Michieli *et al.*, 1994; Macleod *et al.*, 1995; Parker *et al.*, 1995) p21-Aktivierung beschrieben.

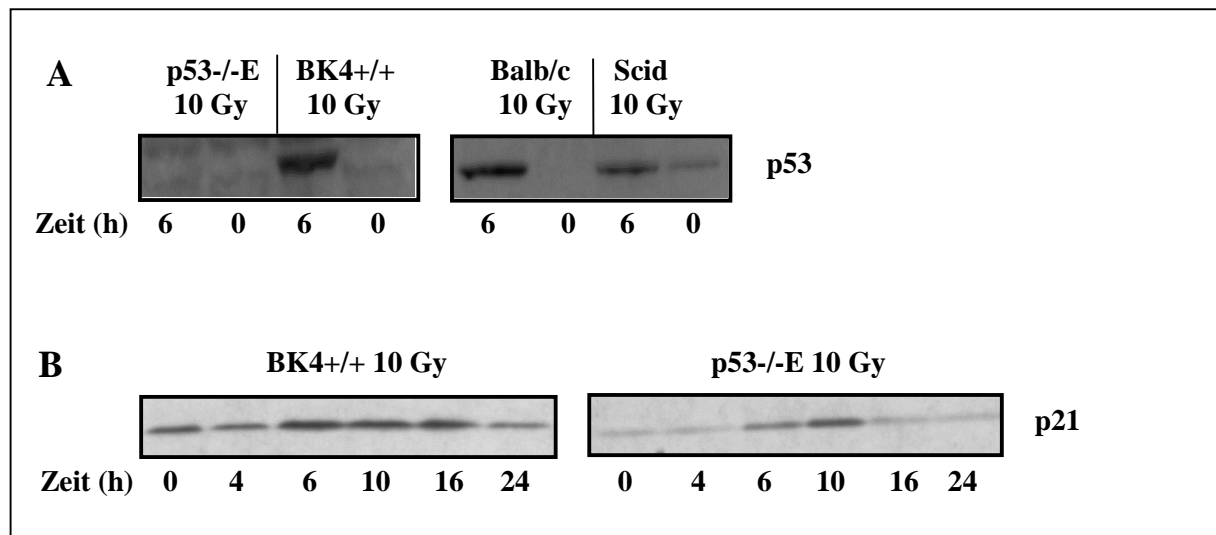


Abb. 6: Westernblot-Analyse zum Nachweis der Funktionalität des p53-Proteins in BK4+/+, Balb/c und Scid Zellen. 30 μ g Kernprotein wurden aus subkonfluenten, entsprechend induzierten Zellen auf ein 10% SDS-PAG aufgetragen, auf Nitrocellulose gebロットet und mit einem monoklonalen p53-Antikörper (A) bzw. einen polyklonalen p21-Antikörper (B) und anschließend mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper behandelt. Die Chemolumineszenzreaktion erfolgte mit dem ECL-Kit, die Autoradiographie mit Hyperfilm ECL. Als Kontrolle wurde Proteinextrakt aus unbehandelten Zellen verwendet.

In Abb. 7 ist die Untersuchung des Zellzyklus' von BK4+/+ und p53-/-E nach γ -Bestrahlung (10 Gy), BrdU-Puls-Markierung und Auswertung im FACS dargestellt. 8 h nach Behandlung war die Zellzyklusverteilung beider Zelllinien deutlich verschoben. Sowohl die BK4+/+ als auch die p53-/-E Zellen haben sich in der G2-Phase angereichert; in der G1-Phase sind fast keine Zellen mehr detektierbar. Dies deutet darauf hin, daß die Zellen einen G2-Block ausgebildet haben, der unabhängig

vom p53-Status erfolgt. Ein G1-Block konnte zu diesem Zeitpunkt nach γ -Bestrahlung nicht mehr nachgewiesen werden.

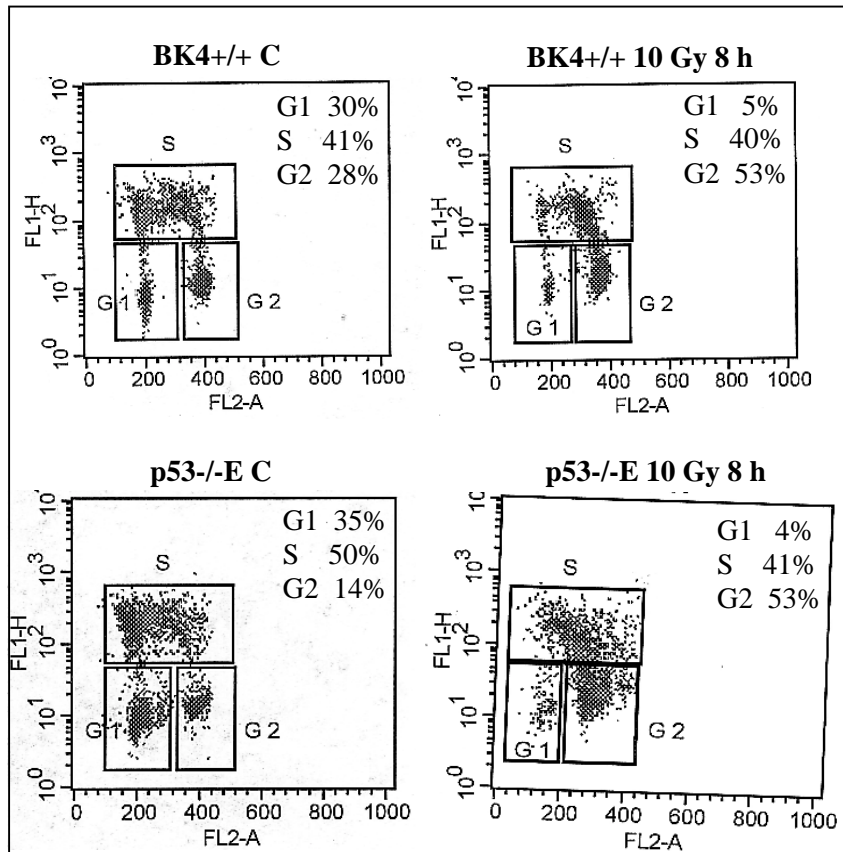


Abb. 7: Zellzyklusanalyse nach BrdU-Puls-Markierung.

Subkonfluente BK4+/+ und p53-/-E Zellen wurden in 5 cm-Schalen ausgesät, μ N inkubiert, mit 10 Gy γ -bestrahlt und nach 7,5 h Inkubation für 30 min mit BrdU markiert. Die Zellen wurden mit Ethanol fixiert, mit einem Rhodamin-gekoppelten Antikörper gegen das in die DNA inkorporierte BrdU behandelt, mit Propidium-iodid gefärbt und am FACS ausgewertet.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der BK4+/+ und p53-/-E Zellen ist in Abb. 8 dargestellt. Nach Aussaat wuchsen die BK4+/+ Zellen besser an (Plattierungseffizienz \sim 90%) als die p53-/-E Zellen (Plattierungseffizienz \sim 80%). Die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen, d. h. die Steilheit der Wachstumskurven, war ab dem 1. Tag nach Aussaat (d. h. nach dem Eintritt in die logarithmische Phase) jedoch identisch. Die Zellen erreichten nach \sim 4 Tagen die stationäre Phase.

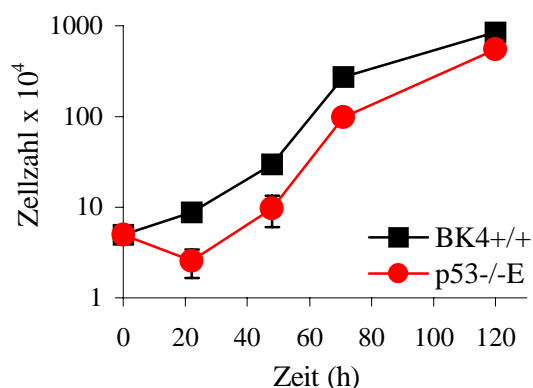


Abb. 8: Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit. 5×10^4 BK4+/+ und p53-/-E Zellen wurden auf 5 cm-Schalen ausgesät und inkubiert. Nach angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen trypsinisiert, in Medium aufgenommen und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

3.2.2 Etablierung der Einzelzellgelelektrophorese (SCGE; „Comet Assay“), neutral und alkalisch

Der Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen erfolgte in der Vergangenheit mit verschiedenen Methoden (Lindahl & Andersson, 1972; Birnboim & Jevcak, 1981; Rydberg, 1980), von denen die alkalische Filterelution (Kohn *et al.*, 1982) große Popularität erlangte. In den letzten Jahren jedoch ist die Methode der Einzelzellgelelektrophorese (SCGE; „Comet Assay“) zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen (neutrale SCGE) bzw. zum Nachweis von DNA-Doppel- und -Einzelstrangbrüchen sowie alkalilabiler Stellen (alkalische SCGE) zur Methode der Wahl geworden (Östling & Johanson, 1984; Singh *et al.*, 1988; Olive, 1989). Die SCGE erfährt DNA-Schädigungen einzelner Zellen und stellt die bis dato sensitivste Methode zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen dar. Je nach Modifikation der Durchführungsparameter „pH-Wert“ und/oder „Elektrophoresezeit“ ist es möglich, schon DNA-Schäden nach 0,3 Gy γ -Bestrahlung zu detektieren (Olive *et al.*, 1992; Erixon & Cedervall, 1995).

Die Methode der SCGE unter alkalischen Bedingungen wurde für das Institut für Toxikologie der Universität Mainz von mir in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. G. Speit (Universität Ulm) etabliert. Die Umstellung von alkalischen auf neutrale Versuchsbedingungen wurde von mir selbst etabliert und ausgetestet. Die Unterscheidung der Spezifität der Schadenserkenkung der beiden SCGE wurde mit H_2O_2 , einem Agens, das bekanntermaßen nur reaktive Sauerstoffspezies, alkalilabile DNA-Stellen und Einzelstrangbrüche aber keine DNA-Doppelstrangbrüche zu verursachen vermag, getestet (Singh *et al.*, 1988). Wie in Abb. 9 dargestellt, ist die alkalische SCGE in der Lage, die durch H_2O_2 verursachten DNA-Schäden zu detektieren, während die neutrale SCGE dazu nicht in der Lage ist. Es wird daher davon ausgegangen, daß die neutrale SCGE, unter den Bedingungen, wie ich sie ausgetestet habe, nur DNA-Doppelstrangbrüche detektiert.

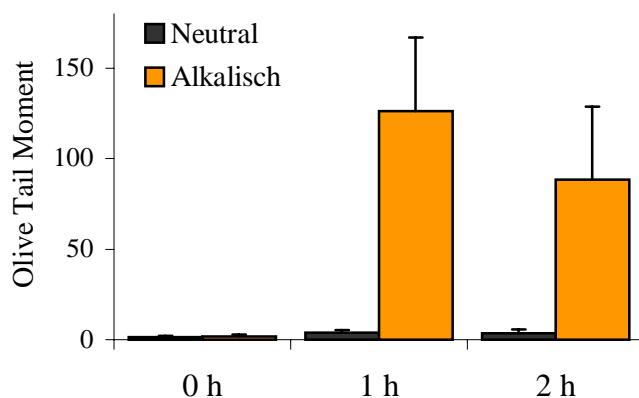


Abb. 9: Neutrale und alkalische SCGE. Nachweis der Art der Schadensinduktion von H_2O_2 . Subkonfluente CHO-9 Zellen wurden mit 0,5 mM H_2O_2 behandelt und für 1 und 2 h inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte nach dem SCGE-Protokoll unter neutralen und alkalischen Bedingungen.

Zur weiteren Etablierung und „Eineichung“ der neutralen und alkalischen SCGE wurden Dosis-Wirkungs-Kurven nach γ -Bestrahlung aufgenommen. Wie die Abb. 10A und 10 B zeigen, war die Zunahme der DNA-Schädigung nach γ -Bestrahlung linear abhängig von der Dosis (nachweisbar sowohl unter neutralen als auch unter alkalischen Bedingungen). Die „Olive Tail Moment“ (OTM)-Werte als Maß der DNA-Schädigung lagen in der alkalischen stets höher als in der neutralen SCGE bei gleicher Behandlung und spiegeln die höhere Sensitivität wider. Die Auswertung der Kometen erfolgte stets mit Hilfe des OTM, einem von der *Kinetic Imaging Komet 4.0.2*-Software (BFI Optilas, Puchheim) ermittelten Parameter, welcher die Helligkeit und Größe des Kometenschweifs in Verhältnis setzt zur Helligkeit und Größe des Kometenkopfes.

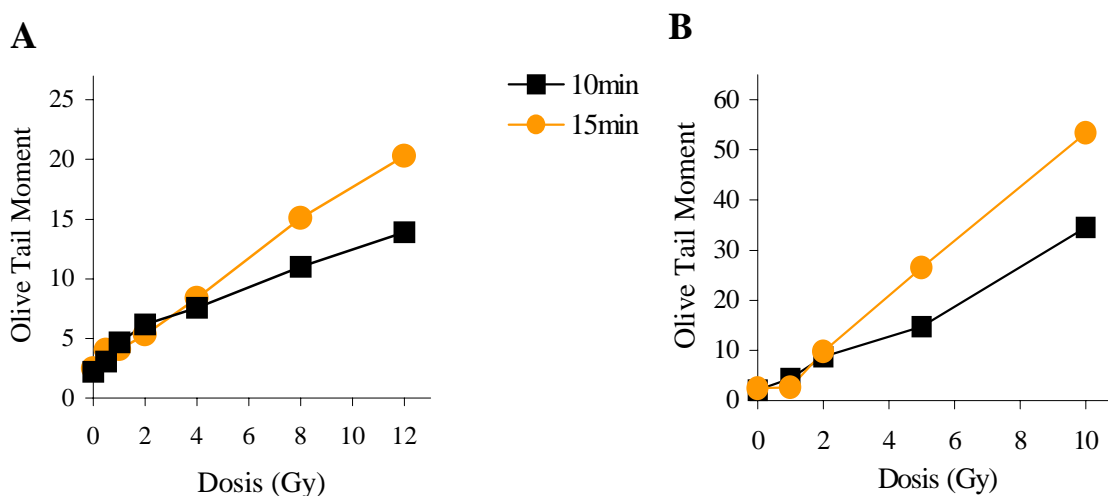


Abb. 10: Vergleich des Versuchsparameters „Elektrophoresezeit“ bei der SCGE. Subkonfluente CHO-9 Zellen wurden trypsinisiert, in Medium aufgenommen und auf Eis mit den angegebenen Dosen γ -bestrahlt. Die Aufarbeitung der Zellen für die SCGE erfolgte direkt im Anschluß unter A) neutralen und B) alkalischen Bedingungen. Die Dauer der Elektrophorese betrug jeweils 10 und 15 min. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

3.2.3 Gentoxische Agenzien induzieren DNA-Doppelstrangbrüche

3.2.3.1 DNA-Doppelstrangbruch-induzierende Wirkung von MNNG und MMS

Um das DNA-Doppelstrangbruch-induzierende Potential der Alkylanzien MNNG und MMS genauer zu untersuchen, wurden BK4+/+, p53-/-E, Balb/c und Scid Zellen mit 1,5 mM MMS und 10 μ M MNNG für jeweils 1 h behandelt und im Zeitraum von 0 - 72 h alle 12 h geerntet und aufgearbeitet. Wie in Abb. 11 A dargestellt, war die applizierte Dosis an MMS ausreichend, DNA-Doppelstrangbrüche in allen vier getesteten Zelllinien zu induzieren. Die p53-defizienten Zellen zeigten dabei die stärkste Induktion, die

sofort nach Behandlung auftrat, nach ~36-48 h ihr Maximum erreichte und nach 72 h fast wieder auf Kontrollniveau angelangt war. DNA-PK_{CS}-defekte Zellen wiesen ebenfalls eine erhöhte DNA-Doppelstrangbruchrate auf, die bei ~24 h nach Behandlung ihren Höhepunkt und nach ~48 h wieder das Kontrollniveau erreicht hatte. Die Kontrollzelllinien BK4^{+/+} und Balb/c wiesen nur direkt nach MMS-Gabe eine erhöhte DNA-Doppelstrangbruchrate auf, die schon ~24 h später nicht mehr detektierbar war. Ein ebensolches Experiment mit MNNG, wie in Abb. 11 B dargestellt, zeigte, daß die applizierte Dosis an MNNG ausreichend war, um DNA-Doppelstrangbrüche zu induzieren. Dies geschah aber nur in den p53-defizienten und DNA-PK_{CS}-defekten Zellen (Scid), nicht aber in den beiden dazugehörigen Kontrollzelllinien BK4^{+/+} und Balb/c. p53 und DNA-PK_{CS} sind demzufolge involviert in die MNNG-induzierte DNA-Doppelstrangbruchprozessierung bzw. -reparatur. Bemerkenswert war zudem, daß ein Anstieg der DNA-Doppelstrangbruchrate in den p53-defizienten Zellen erst nach ~24 h erfolgte, nach ~48 h ein Maximum erreichte und nach ~3 Tagen wieder auf Kontrollniveau angelangt war. DNA-PK_{CS}-defekte Zellen hingegen zeigten einen etwas abweichenden Verlauf: DNA-Doppelstrangbrüche waren bereits nach ~12 h detektierbar, es erfolgte eine stete Zunahme bis ~36 h, und 48 h nach Behandlung waren keine Schäden mehr nachzuweisen.

Diese in Abb. 11 A und B dargestellten Ergebnisse zeigen, daß MNNG und MMS DNA-Doppelstrangbrüche induzieren und daß ein Fehlen von p53 oder DNA-PK_{CS} zu einer erhöhten Induktion aufgrund beeinträchtigter Reparatur MNNG- und MMS-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche führt, so daß sowohl p53 als auch DNA-PK_{CS} Funktionen innerhalb der Strangbruchreparatur zugewiesen werden können.

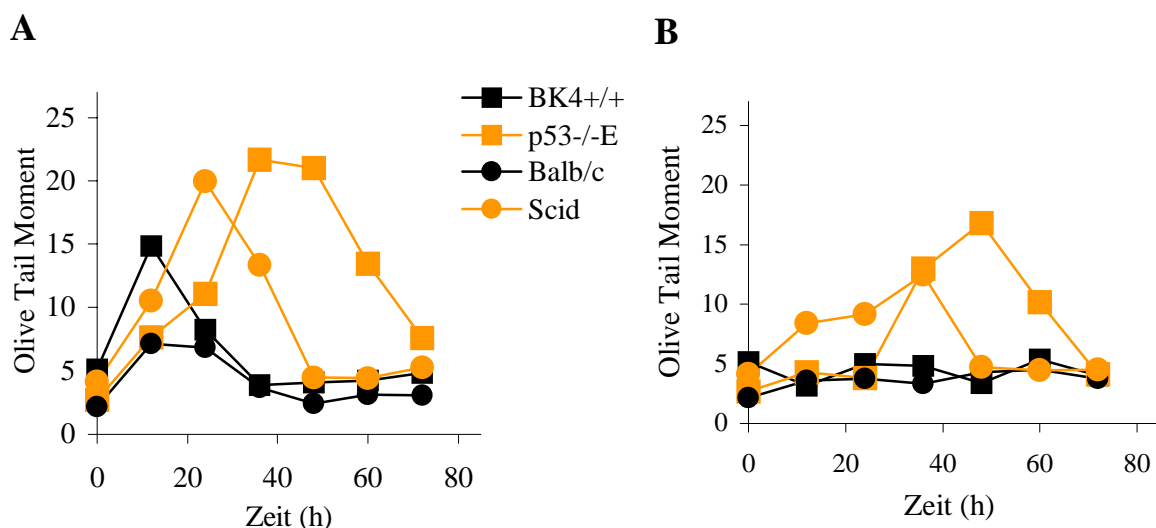


Abb. 11: Neutrale SCGE zum Nachweis der Doppelstrangbruch-Induktion von MMS (A) und MNNG (B). Je 5×10^4 BK4^{+/+}, p53^{-/E}, Balb/c und Scid Zellen wurden auf 5 cm-Schalen eingesät, üN inkubiert und mit 1,5 mM MMS (A) und 10 μ M MNNG (B) für 1 h behandelt. Nach angegebenen Zeitpunkten zwischen 0 und 72 h wurden die Zellen trypsiniert und unter neutralen Versuchsbedingungen aufgearbeitet. Die einzelnen Meßpunkte sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen.

3.2.3.2 Initiale DNA-Schädigung durch MMS

Die Tatsache, daß DNA-Doppelstrangbrüche erst zu relativ späten Zeiten nach MNNG- oder MMS-Behandlung auftraten, führte zu der Annahme, daß nicht die Primärläsion sondern der Vorgang der Schadensprozessierung bzw. dabei entstehende Intermediate zu DNA-Doppelstrangbrüchen führe. Das in Abb. 12 dargestellte Experiment zielte auf diese Unklarheit ab. Die vier beschriebenen Zelllinien wurden mit 0,1 mM MMS für 1 h behandelt und unverzüglich dem alkalischen SCGE-Protokoll unterzogen. Wie zu sehen, war der durch MMS induzierte Primärschaden der DNA in den untersuchten Zelllinien nahezu gleich. Innerhalb von 2 h war fast keine DNA-Schädigung mehr detektierbar. Daß die Zelllinie BK4+/+, die in der neutralen SCGE keine erhöhte MNNG- und MMS-induzierte DNA-Doppelstrangbruchrate aufwies (siehe Abb. 11 A, B), hier eine höhere DNA-Schädigung zeigte, kann nicht erklärt werden; sie korreliert aber nicht mit der Sensitivität der Zelllinie gegenüber MNNG und MMS (siehe Abb. 11, 19 und 20). Es bleibt festzuhalten, daß MMS durch die alkalischen SCGE nachweisbare Primärschäden an der DNA verursacht, daß diese Läsionen innerhalb kurzer Zeit (hier nach 2 h) nicht mehr detektierbar sind und daß zu späteren Zeiten DNA-Doppelstrangbrüche induziert werden.

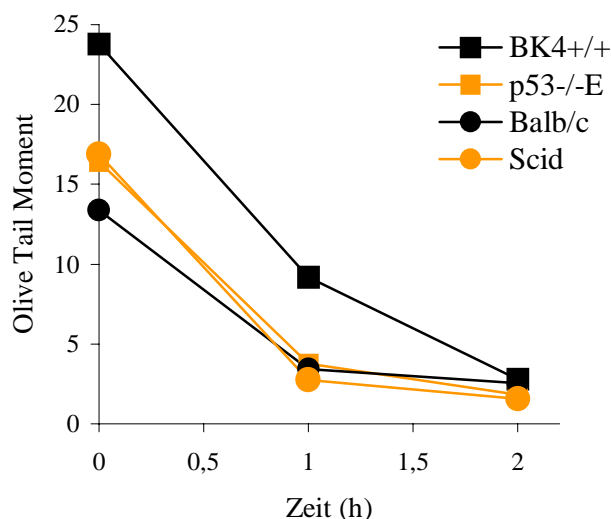


Abb. 12: Alkalische SCGE zum Nachweis durch MMS initial induzierter DNA-Schäden. Je 2×10^5 BK4+/+, p53-/-E, Balb/c und Scid Zellen wurden auf 5 cm-Schalen eingesät, in 10^5 RPMI 1640 Inkubationsmedium inkubiert und mit 0,1 mM MMS für 1 h behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach MMS-Behandlung wurden die Zellen durch Trypsinieren geerntet und unter alkalischen Versuchsbedingungen aufgearbeitet.

3.2.3.3 Protektive Wirkung von MGMT auf MNNG-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche

Wie wir gesehen haben, induziert MNNG DNA-Doppelstrangbrüche (Abb. 11 A). Wäre das durch MNNG verursachte O⁶-MeG der Auslöser, so müßte sich die Doppelstrangbruch-Induktion durch das Vorhandensein bzw. Fehlen des für O⁶-MeG spezifischen Reparaturenzyms MGMT modifizieren lassen. In Abb. 13 ist ein Experiment dargestellt, in dem MGMT-profiziente (mex⁺), MGMT-defiziente (mex⁻) und zusätzlich sogenannte „tolerante“ CHO Zellen (mex⁻, MNNG-„resistent“) mit 10 µM MNNG für 1 h behandelt und zu Zeitpunkten zwischen 0 und 72 h alle ~12 h dem neutralen SCGE-Protokoll unterzogen wurden. Zellen, die kein MGMT exprimierten, waren sensitiver gegenüber der Doppelstrangbruch-induzierenden Wirkung von MNNG. Das Vorhandensein von MGMT wirkte protektiv: es kam zu keiner Erhöhung der DNA-Doppelstrangbruchrate. Daraus kann geschlossen werden, daß die von MNNG induzierten DNA-Doppelstrangbrüche sich vom O⁶-MeG-Schaden herleiten und daß MGMT dieser Wirkung effektiv entgegen wirkt.

Wie es vom O⁶-MeG ausgehend zum DNA-Doppelstrangbruch im einzelnen kommt, ist unklar. Ein Hinweis ist allerdings in den in Abb. 13 dargestellten Ergebnissen zu sehen, nämlich daß die „tolerante“ Zelllinie, die den mex⁻-Phänotyp aufweist, wie die MGMT-profiziente Zelllinie keine Erhöhung in der DNA-Doppelstrangbruchrate nach Behandlung mit 10 µM MNNG für 1 h zeigt. Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, sind diese „toleranten“ Zellen defekt in der Basenfehlpaarungsreparatur (MMR), so daß es als wahrscheinlich angesehen werden kann, daß die Prozessierung des O⁶-MeG misgepaart mit Thymin durch MMR-Proteine an dem Mechanismus der DNA-Doppelstrangbruch-Induktion ursächlich beteiligt ist.

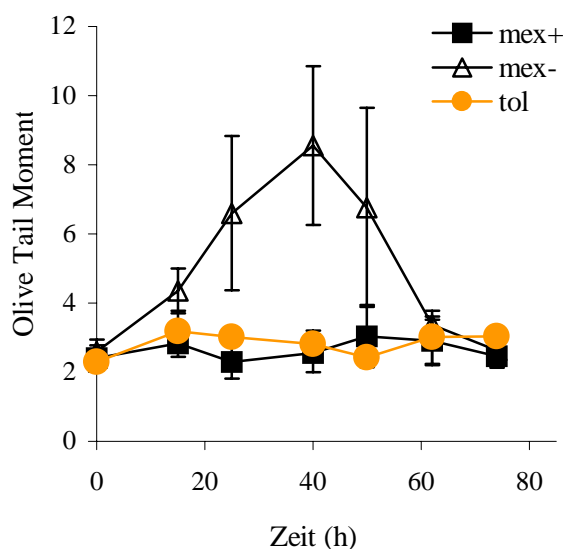


Abb.13: Neutrale SCGE zum Nachweis der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen nach MNNG-Behandlung. Subkonfluente CHO-9 (mex⁻), CHO-9TK47-AT17-C3 (mex⁺) und CHO-9TK22cos9/5-1/2-C1M („Toleranz“-Phänotyp; mex⁻) Zellen wurden für 1 h mit 10 µM MNNG behandelt. Zu angegebenen Zeitpunkten zwischen 0 und 72 h nach Behandlung wurden die Zellen durch Trypsinieren geerntet und dem neutralen SCGE-Protokoll unterzogen. Die Kontrollen wurden direkt nach Behandlung mit MNNG trypsiniert und aufgearbeitet.

3.2.3.4 DNA-Doppelstrangbruch-induzierende Wirkung von β -D-Glucose-Ifosfamid mustard, getestet in V79wt versus V79 CL-V5B Zellen

Ein weiteres Beispiel der DNA-Doppelstrangbruch-Induktion durch ein gentoxisches Agens ist in Abb. 14 dargestellt. Hierin wurde die Wirkung von β -D-Glucose-Ifosfamid mustard (D-19575; Pohl *et al.*, 1995) auf die Mitomycin C-sensitive Hamsterlungenfibroblasten-Zelllinie V79 CL-V5B (Tellemann *et al.*, 1995) im Vergleich zur wildtypartigen V79 Zelllinie (Zdienicka *et al.*, 1989) untersucht (Seker *et al.*, 2000). 0,15 mM Glucose-Ifosfamid mustard wurden für 1 h auf die Zellen gegeben und diese in einem Zeitraum zwischen 0 und 72 h alle \sim 12 h dem neutralen SCGE-Protokoll unterzogen. Die V79 CL-V5B Zelllinie zeigte bei 0,15 mM, die V79wt Zelllinie erst bei 0,4 mM Glucose-Ifosfamid mustard eine Induktion der DNA-Doppelstrangbruchrate, beginnend erst nach \sim 48 h, ihren Höhepunkt bei \sim 60 h erreichend und danach wieder abfallend. Gegen das Argument, daß es sich bei diesen späten Doppelstrangbrüchen um Apoptose-induzierte und nicht durch Glucose-Ifosfamid mustard-induzierte Brüche handeln könne, spricht die Tatsache, daß die Doppelstrangbruchrate nach \sim 60 h wieder abzufallen begann, während eine Erhöhung oder zumindest gleichbleibende Strangbruchrate infolge der Apoptose zu erwarten gewesen wäre und von Ritter & Kaina (unveröffentlichte Daten) auch nicht beobachtet werden konnte. Ebenso spricht gegen eine Induktion dieser Doppelstrangbrüche durch die Apoptose, daß sich die SCGE als recht ungeeignet in der Quantifizierung der Apoptose erwies (Daten nicht gezeigt) aber die hier dargestellten Werte der Abb. 14 signifikant reproduzierbar waren.

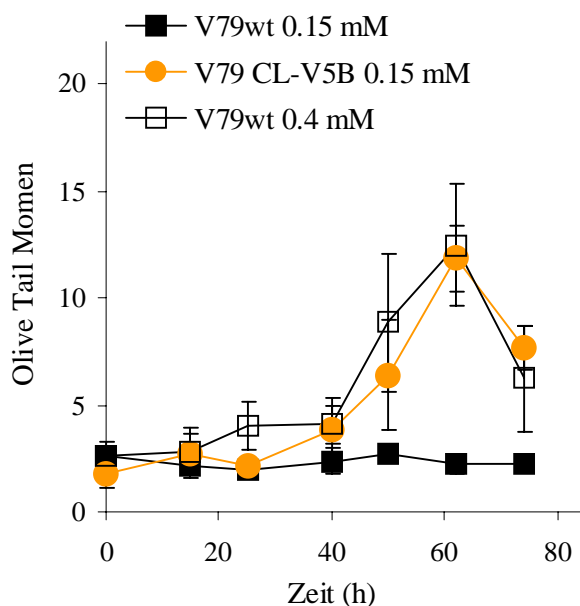


Abb. 14: Neutrale SCGE zum Nachweis β -D-Glucose-Ifosfamid mustard-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche. Subkonfluente V79wt und V79 CL-V5B Hamsterlungenfibroblasten wurden mit 0,15 bzw. 0,15 und 0,4 mM Glucose-Ifosfamid mustard für 1 h behandelt. Zu angegebenen Zeitpunkten zwischen 0 und 72 h nach Behandlung wurden die Zellen durch Trypsinieren geerntet und gemäß SCGE-Protokoll unter neutralen Versuchsbedingungen aufgearbeitet. Als Kontrollen (0-Werte) dienten unmittelbar nach Behandlung mit Glucose-Ifosfamid mustard geerntete und aufgearbeitete Zellen.

3.2.3.5 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen induziert durch γ -Strahlung

Als ein weiteres genotoxisches Agens mit DNA-Doppelstrangbruch-induzierender Wirkung wurde ionisierende Strahlung (γ -Strahlung generiert durch ^{137}Cs) verwendet. γ -Strahlung ist ein Induktor von DNA-Doppelstrangbrüchen, was an BK4+/+ und p53-/-E Zellen 1 h nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen zwischen 0 und 15 Gy (Abb. 15 A) und an BK4+/+, p53-/-E und CHO-9 Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy in Abhängigkeit von der Erholungszeit nach Bestrahlung (Abb. 15 B) gezeigt wurde. Die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (mit der neutralen SCGE 1 h nach Behandlung detektiert) nahm mit der angewendeten Dosis linear zu, und zwar in den p53-profizienten und -defizienten Zellen gleichermaßen. Die Reparatur γ -Strahlungs-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche erfolgte sofort nach Schadensinduktion, die bei den untersuchten Zelllinien gleich war. In der ersten Stunde nach Bestrahlung nahm die Doppelstrangbruchrate sehr schnell, nämlich um die Hälfte ab, danach verlief die Reparatur langsamer. DNA-Doppelstrangbrüche werden demzufolge mit unterschiedlichen Kinetiken repariert, nämlich schnell und langsamer. Allerdings erfolgte die „schnelle“ Reparatur in den untersuchten Zelllinien mit gleicher Geschwindigkeit, BK4+/+, p53-/-E und CHO-9 Zellen wiesen 1 h nach Behandlung gleiche Strangbruchraten auf. Die langsamere Reparatur (ab ca. der zweiten Stunde nach Behandlung) unterschied sich: die p53-defizienten Zellen wiesen zu den Zeitpunkten 3 und 6 h nach Behandlung signifikant höhere Strangbruchraten auf als die p53-profizienten Zellen. In p53-/-E Zellen persistieren also mehr DNA-Doppelstrangbrüche über einen längeren Zeitraum. Daher ist p53 als ein wichtiger Faktor in der „langsameren“ DNA-Doppelstrangbruchreparatur anzusehen.

CHO-9-Zellen, die als p53-profizient angesehen werden können (Dunkern & Kaina, unveröffentlichte Daten) verhalten sich in der Strangbruchreparatur wie die BK4+/+ Mausfibroblasten und sind im Gegensatz zu den p53-/-E Zellen in der Lage, DNA-Doppelstrangbrüche ohne Verzögerung zu reparieren.

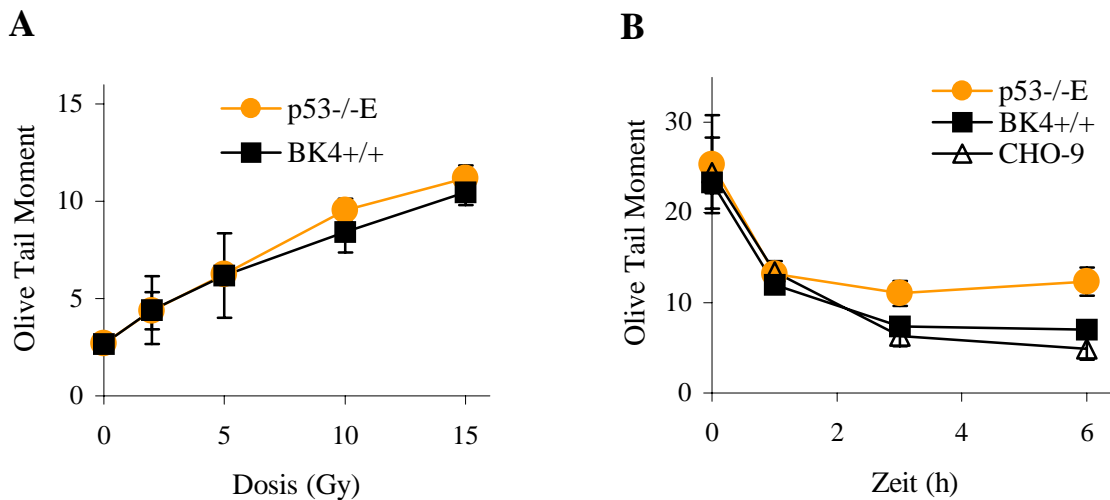


Abb. 15: Neutrale SCGE zum Nachweis γ -Strahlungs-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche. **A)** BK4+/+ und p53-/-E Zellen wurden 1 h nach γ -Bestrahlung mit angegebenen Dosen (0 – 15 Gy) trypsinisiert und gemäß Protokoll unter neutralen Versuchsbedingungen aufgearbeitet. **B)** BK4+/+, p53-/-E und zusätzlich CHO-9 Zellen wurden mit 10 Gy γ -bestrahlt und zu angegebenen Zeitpunkten zwischen 0 und 6 h trypsinisiert und dem neutralen SCGE-Protokoll unterzogen.

3.2.4 Restriktionsendonukleasen induzieren DNA-Doppelstrangbrüche *in vivo*: ein Modellsystem

Gentoxische Agenzien entfalten ihre Wirkung zumeist über die Induktion zahlreicher verschiedener, zum Teil noch undefinierter DNA- und Zellschädigungen sowie Rezeptoraktivierungen. So ist es schwierig, einen biologischen Endpunkt wie die Apoptose ursächlich einer spezifischen Läsion zuzuschreiben oder sie damit quantitativ zu korrelieren. Die Untersuchung des DNA-Doppelstrangbruchs als Ausgangspunkt verschiedener Zellantworten wie Zelltod im allgemeinen oder Apoptose im besonderen gestaltet sich als nicht hinreichend durch die Verwendung von Alkylanzien oder γ -Strahlung. Deshalb wurde ein Modellsystem etabliert, in dem DNA-Doppelstrangbrüche spezifisch enzymatisch induziert wurden. Zellen wurden unter definierten Bedingungen mit Restriktionsendonukleasen inkubiert und kurzzeitig einem elektrischen Feld ausgesetzt, wodurch die Enzyme in die Zelle gelangten und die DNA schnitten. Dieses Verfahren der Elektroporation hat sich als eine für die Zelle schonende, keine Nebeneffekte hervorrufende Methode bewährt und wurde zur Untersuchung von DNA-Doppelstrangbrüchen und deren Auswirkungen auf die Zelle eingesetzt.

3.2.4.1 DNA-Doppelstrangbruch-Induktion durch die Restriktionsendonukleasen PvuII und EcoRI, die DNA-Enden unterschiedlicher Morphologie erzeugen

Abb. 16 zeigt die Induktion und Reparatur PvuII- und EcoRI-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in CHO-9 Zellen. PvuII (Gingeras *et al.*, 1981) und EcoRI (Hedgpeth *et al.*, 1972) erkennen jeweils 6 Basenpaare lange Palindrome; PvuII schneidet die Sequenz 5'-CAG↓CTG-3' so, daß DNA-Doppelstrangbrüche mit stumpfen, nicht-überhängenden Enden („blunt-ends“) entstehen, EcoRI schneidet 5'-G↓AATTC-3' derart, daß DNA-Doppelstrangbrüche mit 4 Basen 5'-überhängenden Enden („cohesive-ends“, „sticky ends“) generiert werden. Sowohl PvuII als auch EcoRI sind in der Lage, die DNA *in vivo* zu schneiden, was in Abb. 16 A in Abhängigkeit von der elektroporierten Enzymdosis dargestellt ist. 3 h nach Behandlung wurden die Zellen nach dem neutralen SCGE-Protokoll aufgearbeitet. Der Einfluß der Zeit auf die Induktion und Reparatur PvuII- und EcoRI-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche ist in Abb. 16 B und C gezeigt. CHO-9 Zellen wurden nach der Elektroporation von jeweils 400 U Enzym 0 - 24 h inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem neutralen (Abb. 16 B) bzw. nach dem alkalischen (Abb. 16 C) SCGE-Protokoll aufgearbeitet. Sowohl PvuII als auch EcoRI induzieren DNA-Doppelstrangbrüche, wobei EcoRI eine höhere Strangbruchrate induziert als PvuII, was sowohl in der neutralen als auch alkalischen SCGE gezeigt werden konnte. Möglicherweise besitzt das EcoRI-Protein im Vergleich zum PvuII-Protein eine höhere Prozessivität im Zellmilieu oder ist resistenter gegenüber Proteasen. Im Gegensatz zu Experimenten mit γ -Bestrahlung erfolgte die Induktion der Doppelstrangbrüche erst nach einigen Stunden mit einem Maximum nach ~3 h, was dadurch erklärt werden kann, daß die Enzyme erst in den Zellkern gelangen müssen. Danach sind Reparaturvorgänge in der Zelle sowie die Inaktivierung des Enzyms vorherrschend, so daß es zum Abfall der DNA-Doppelstrangbruchrate kommt. 24 h nach Inkubation sind nur marginale DNA-Doppelstrangbruchraten nachweisbar wie in den Kontrollzellen, die direkt nach Elektroporation aufgearbeitet wurden. Weitere Kontrollen, bei denen kein Enzym, hitzeinaktiviertes Enzym und BSA in die Zellen elektroporiert wurde, zeigten keine DNA-schädigende Wirkung.

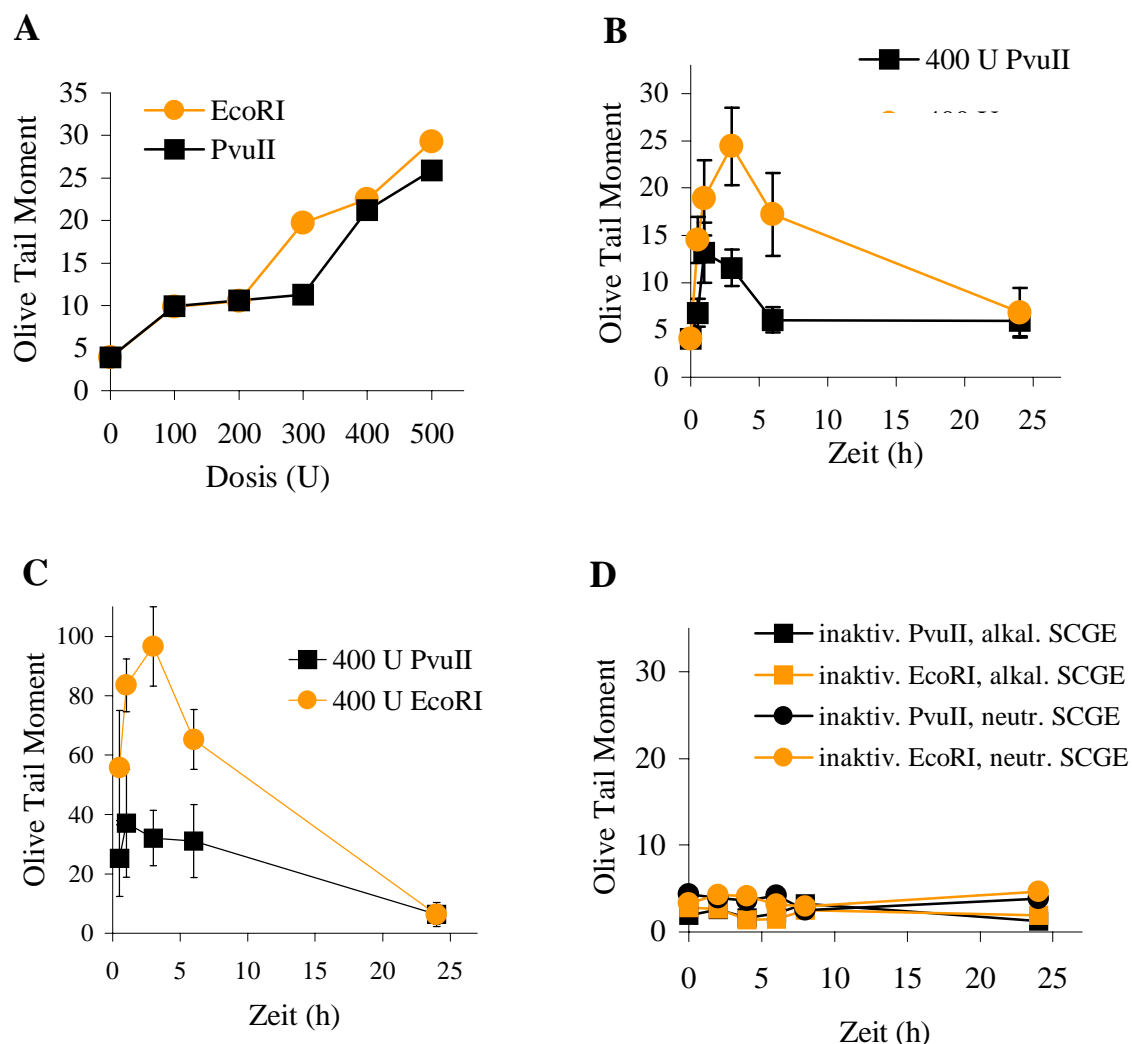


Abb. 16: SCGE zum Nachweis der Induktion von DNA-Strangbrüchen in CHO-9 Zellen nach Elektroporation mit den Restriktionsendonukleasen PvuII und EcoRI. Subkonfluente Zellen wurden mit Enzym elektroporiert, für die angegebene Zeit inkubiert und der neutralen bzw. alkalischen SCGE unterzogen. **A)** Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in Abhängigkeit von der Menge des elektroporierten Enzyms EcoRI bzw. PvuII (0 - 500 U) 3 h nach Behandlung. Es wurde nur 1 Experiment durchgeführt. Als Kontrolle wurden Zellen aufgearbeitet, die mit 500 µg BSA elektroporiert worden waren (0-Wert). **B)** DNA-Doppelstrangbruch-Induktion nach Elektroporation von 400 U EcoRI bzw. PvuII in Abhängigkeit von der Zeit. Die Zellen wurden zu angegebenen Zeitpunkten zwischen 0 und 24 h nach Behandlung geerntet und mit der SCGE unter neutralen Versuchsbedingungen aufgearbeitet. **C)** DNA-Schadens-Detektion mit der alkalischen SCGE nach Elektroporation von 400 U PvuII bzw. EcoRI. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte zu angegebenen Zeitpunkten zwischen 0 und 24 h nach Behandlung. **D)** Kontrollansätze, in denen jeweils 400 U hitzeinaktiviertes Enzym in die Zellen elektroporiert wurde; die Aufarbeitung der Zellen erfolgte zu angegebenen Zeitpunkten unter alkalischen und neutralen Bedingungen. Zur Abbildung 16 A wurde nur 1 Experiment durchgeführt. Daten der anderen Abbildungen sind Mittelwerte aus mindestens 3 Versuchen \pm Standardabweichung.

3.2.4.2 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch PvuII in Abhängigkeit von p53

Neben der Unterscheidung der Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen unterschiedlicher Morphologie durch Elektroporation verschiedener Restriktionsenzyme stand die Unterscheidung der Prozessierung von Doppelstrangbrüchen mit stumpfen Enden in Abhängigkeit vom p53-Status der Zelle im Fokus des Interesses. Hierzu wurden p53-profiziente (BK4+/+) und p53-defiziente Mausfibroblasten (p53-/-E) mit 0, 100 und 400 U PvuII elektroporiert und nach 6 stündiger Inkubation gemäß dem neutralem SCGE-Protokoll aufgearbeitet. Abb. 17 A zeigt, daß p53-defiziente Zellen empfindlicher sind hinsichtlich der DNA-Doppelstrangbruch-induzierenden Wirkung von PvuII im Vergleich zu p53-profizienten Zellen. Die in Abb. 17 B dargestellte Zeitabhängigkeit der Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen zeigt, daß das Maximum der DNA-Doppelstrangbruchrate nach Elektroporation von PvuII erst nach 6 h erreicht wurde, und daß p53-defiziente Zellen 2,5x höhere Doppelstrangbruchraten aufwiesen als p53-profiziente Zellen. 24 h nach Behandlung war keine höhere Doppelstrangbruchrate mehr in den p53-defizienten versus -profizienten Zellen detektierbar. Ebensoles wird mit dem in Abb. 17 C unter alkalischen Bedingungen durchgeführten Versuch bestätigt, in dem p53-defiziente Zellen transient höhere Doppelstrangbruchraten aufwiesen.

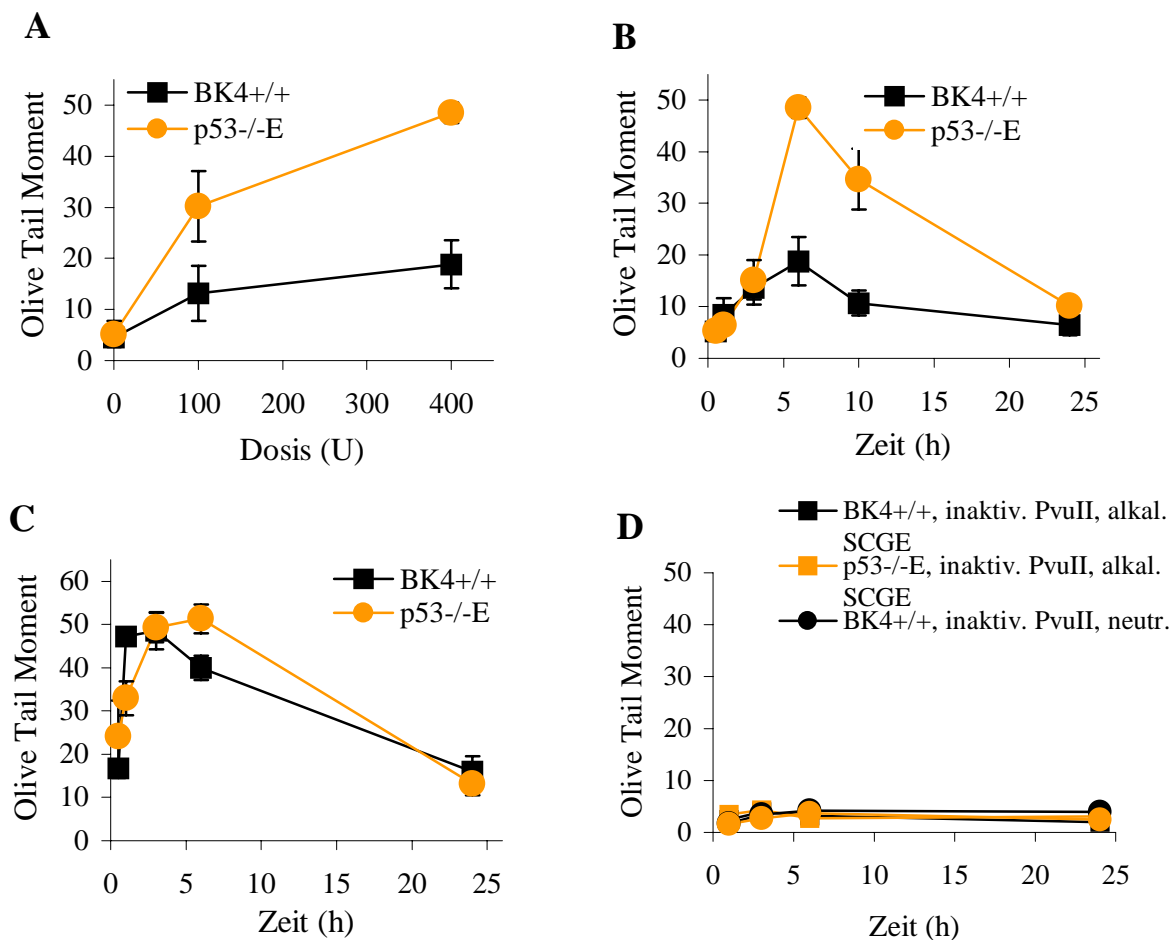


Abb. 17 (vorherige Seite): SCGE zum Nachweis der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch PvuII in BK4+/+ und p53-/-E Zellen. **A)** Dosisabhängige DNA-Doppelstrangbruch-Induktion nach Elektroporation der Zellen mit 0, 100 und 400 U PvuII. Die Zellen wurden nach Behandlung 6 h inkubiert und gemäß dem neutralen SCGE-Protokoll aufgearbeitet. Der 0-Wert diente als Kontrollansatz und wurde mit 500 µg BSA elektroporiert. **B)** Zeitabhängige Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Elektroporation mit 400 U PvuII. Nach Behandlung wurden die Zellen für entsprechende Zeit inkubiert und zu angegebenen Zeitpunkten für die neutrale SCGE aufgearbeitet. **C)** Wie B aber der Nachweis der DNA-Schädigung erfolgte mit der alkalischen SCGE. **D)** Kontrollansätze, in denen jeweils 400 U hitzeinaktiviertes PvuII in die Zellen elektroporiert wurde; die Aufarbeitung der Zellen erfolgte zu angegebenen Zeitpunkten unter alkalischen und neutralen Bedingungen.

3.3 DNA-Doppelstrangbrüche sind potentiell zytotoxisch und klastogen

Nachdem im Abschnitt 3.2 gezeigt wurde, daß gentoxische Agenzien DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) induzieren, befaßt sich dieses Kapitel mit den Auswirkungen von DSBs für die Zelle. In den hier beschriebenen Experimenten wurden DSBs durch alkylierende Agenzien, γ -Strahlung und Restriktionsendonukleasen erzeugt und mit den zytotoxischen und Apoptose-induzierenden sowie den klastogenen Effekten der Agenzien verglichen.

3.3.1 Gentoxische Agenzien entfalten ihre Zytotoxizität über Apoptose und Nekrose

3.3.1.1 MGMT-Aktivität nach MNNG- und MMS-Behandlung

Ein die Zytotoxizität von MNNG wesentlich mitbestimmender Faktor ist das Vorhandensein der Aktivität des Reparaturproteins MGMT in den Zellen. In Abb. 18 sind die MGMT-Aktivitäten der Zelllinien BK4+/+, p53-/-E, Balb/c und Scid sowohl konstitutiv als auch nach Behandlung subkonfluenten Zellen mit 10 µM MNNG und 1 mM MMS für jeweils 1 h und anschließender 6 stündiger Inkubation dargestellt. Während die konstitutive MGMT-Aktivität in den BK4+/+, p53-/-E und Balb/c Zellen annähernd gleich war, wiesen die Scid Zellen weniger MGMT-Aktivität auf. Das könnte der Grund dafür sein, daß, wie in Abb. 11 und 19 A gezeigt, die Scid Zellen eine erhöhte Sensitivität hinsichtlich der MNNG-induzierten DNA-Doppelstrangbruchrate und Zytotoxizität aufweisen. Die Behandlung der Zellen mit MNNG und MMS in angegebenen Dosen führte stets zu einem Abfall der MGMT-Aktivitäten, die nach 6 stündiger Inkubation gemessen wurden. Die Ausnahme stellten die BK4+/+ Zellen dar, die nach Applikation von 10 µM MNNG nach 6 h keinen signifikanten MGMT-Aktivitäts-Abfall zeigten.

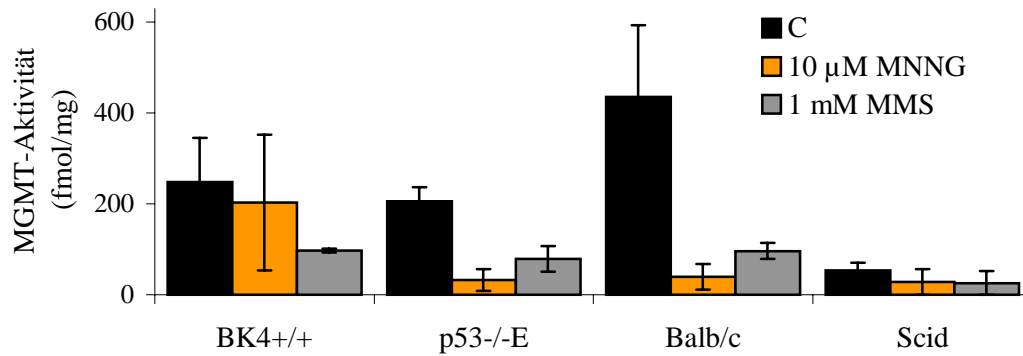


Abb. 18: MGMT-Aktivität in BK4+/+, p53-/-E, Balb/c und Scid Zellen 6 h nach Behandlung mit 10 µM MNNG bzw. 1 mM MMS. Zellen in subkonfluenter Kultur wurden 1 h mit den Alkylanzien behandelt, 6 h inkubiert und durch Trypsinieren geerntet. Nach Gesamtproteinextraktion wurde mit 200 µg Protein der MGMT-Aktivitäts-Test durchgeführt und die Aktivität definiert als die Menge vom Substrat auf MGMT übertragener [³H]-Methylgruppen in fmol pro mg eingesetzten Proteins. Es wurden 3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Zur Kontrolle des MGMT-Aktivitäts-Tests wurden stets als Positivkontrolle HeLa S3- (mex⁺) und als Negativkontrolle HeLa MR- (mex⁻) Proteinextrakte mitgeführt (nicht gezeigt).

3.3.1.2 p53 und DNA-PK_{CS} wirken der MNNG- und MMS-induzierten Zytotoxizität entgegen

Wie in den in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Experimenten gezeigt wurde, waren MNNG und MMS in der Lage, DNA-Doppelstrangbrüche zu induzieren. p53 und DNA-PK_{CS} nehmen in diesem Prozeß eine wichtige Funktion ein, weil das Fehlen dieser Proteine zu erhöhter Sensitivität der Zellen gegenüber der Alkylanzien-induzierten Zytotoxizität führte. Ausgehend von dieser Beobachtung war nun von Interesse, zu sehen, ob die vermehrten DSBs auch zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen im Zytotoxizitätstest führte. Jeweils 500 BK4+/+, p53-/-E, Balb/c und Scid Zellen wurden zum Koloniebildungstest eingesät und mit steigenden Konzentrationen an MNNG (0 - 60 µM) und MMS (0 - 4 mM) für jeweils 1 h behandelt. 7 Tage später wurden die gewachsenen Klone gefärbt, gezählt und das Überleben relativ zur unbehandelten Kontrolle halblogarithmisch aufgetragen. Wie in der Abb. 19 A dargestellt, führt die Behandlung der Zellen mit MNNG zu einer Abnahme des Überlebens in Abhängigkeit von der applizierten Dosis. Die beiden wildtypartigen Kontrollzelllinien BK4+/+ und Balb/c waren relativ resistent gegenüber der zytotoxischen Wirkung von MNNG; bei einer applizierten Dosis von 40 µM bildeten noch ~15% der ausgesäten Zellen Kolonien. Die p53-/-E und Scid Zellen hingegen waren sensitiver gegenüber MNNG. 40 µM MNNG reduzierten das Überleben der p53-defizienten Zellen auf ~1% und der DNA-PK_{CS}-defekten Zellen auf ~0,2%. Ein ähnliches Bild zeigt sich in Abb. 19 B, in der das relative Koloniebildungsvermögen der Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von MMS dargestellt ist. Auch in diesen Versuchen waren die Kontrollzelllinien BK4+/+ und Balb/c resistenter als die p53-/-E und Scid Zellen. Während bei einer applizierten MMS-Dosis von 2,5 mM noch jeweils

~15% der BK4+/+ und Balb/c Zellen Kolonien zu bilden vermochten, waren es bei den p53-/-E und den Scid Zellen jeweils ~1% der Zellen. Die erhöhte Sensitivität der p53-defizienten und DNA-PK_{CS}-defekten Zellen ist offensichtlich auf das Fehlen dieser Proteine zurückzuführen, besonders wenn man sich vor Augen führt, daß sowohl DNA-PK_{CS} als auch p53 direkt an der DNA-Strangbruchreparatur beteiligt sind. Diese Tatsachen sowie die an dieser Stelle und unter 3.2.3 gezeigten Ergebnisse legen die Annahme nahe, daß die erhöhte MNNG- und MMS-induzierte Zytotoxizität in p53-defizienten und DNA-PK_{CS}-defekten Zellen auf eine erhöhte DNA-Doppelstrangbruchrate infolge beeinträchtigter Reparatur kausal zurückzuführen sein könnten. Dies impliziert, daß die zytotoxische Wirkung von alkylierenden Agenzien allgemein möglicherweise auf die Induktion von DSBs zurückzuführen sein könnte.

Der in Abb. 19 A beobachtete Unterschied bei den Zelllinien p53-/-E und Scid hinsichtlich MNNG-induzierter Zytotoxizität (nicht beobachtet bei MMS, Abb. 19 B) ist unter Beachtung der in Abb. 18 dargestellten MGMT-Aktivitäten der Zelllinien erklärbar. Die Scid Zelllinie weist nur ~1/5 der MGMT-Aktivität auf, die in der p53-/-E Zelllinie gemessen wurde. Dies führt zu einer verminderten Reparatur MNNG-induzierter O⁶-MeG-Läsionen und könnte infolgedessen zu einer erhöhten DNA-Doppelstrangbruchrate zu frühen Zeitpunkten nach Behandlung führen (siehe Abb. 11), was sodann in der erhöhten Sensitivität der Zellen im Koloniebildungstest zum Ausdruck käme. Daher kann man sagen, daß MGMT zu einem frühen Zeitpunkt durch Beseitigung des DNA-Primärschadens und p53 und DNA-PK_{CS} zu einem späteren Zeitpunkt durch erhöhte/verbesserte Reparatur des Sekundär- oder Tertiärschadens der zytotoxischen Wirkung der O⁶-MeG-Läsion entgegenwirken.

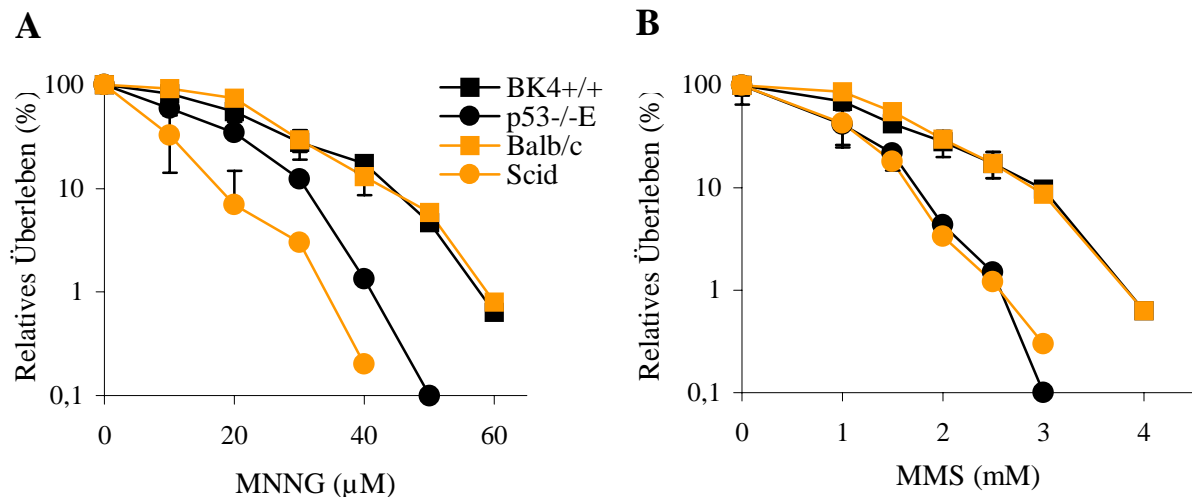


Abb. 19: Koloniebildungsvermögen von BK4+/+, p53-/-E, Balb/c und Scid Zellen nach Behandlung mit A) MNNG und B) MMS. 500 Zellen wurden auf 5 cm-Schalen ausgesät, üN inkubiert und für 1 h mit den angegebenen Konzentrationen an A) MNNG und B) MMS behandelt. Nach 7 tägiger Inkubation wurden die Kolonien mit Methanol fixiert und mit Giemsa-Kristallviolett gefärbt. Die Anzahl gewachsener Zellklone wurde relativ zur Anzahl gewachsener Zellklone des Kontrollansatzes (keine Behandlung) dargestellt. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen zu je 3 Parallelansätzen.

3.3.1.3 Apoptose-induzierende Wirkung von MNNG und MMS

Da der Koloniebildungstest Aufschluß über die Zytotoxizität eines Agens gab, und dabei sämtliche Formen des Zelltods (Apoptose, Nekrose und reproduktiver/mitotischer Zelltod) in das Versuchsergebnis miteingingen, wurde zur näheren Spezifizierung des Zelltods die Apoptose- und Nekroserate bestimmt. BK4+/+, p53^{-/-}-E, Balb/c und Scid Zellen wurden mit MNNG und MMS behandelt, 72 h inkubiert und die Zellen nach Ernte mit FITC-gekoppeltem Annexin-V und Propidiumiodid gefärbt. Die Auswertung am FACS erfolgte gemäß der Färbung der Zellen: Apoptotische Zellen waren nur Annexin-V-FITC und nicht Propidiumiodid gefärbt, weil es im Zuge der Einleitung und Exekution des programmierten Zelltods zu einer Umlagerung von membrangebundenem Phosphatidylserin von der Innen- zur Außenseite der Membran kam. Die Zellintegrität war in diesem Stadium noch nicht beeinträchtigt, sodaß es zu keiner Einlagerung von Propidiumiodid in die DNA kommen konnte. Nekrotische Zellen hingegen beginnen, sich unkoordiniert aufzulösen, was sowohl den Zugang von Propidiumiodid zur DNA als auch eine Präsentation des Phosphatidylserins zur Folge hat. Nekrotische Zellen sind demzufolge zweifach gefärbt und kommen daher bei der Quantifizierung im FACS in anderen Bereichen zu liegen.

Wie in der Abb. 20 A dargestellt, führte die Behandlung der Zellen mit 10 µM MNNG für 1 h zu einer leicht erhöhten Apoptose- und Nekroserate in den DNA-PK_{CS}-defekten Scid aber auch den Balb/c Zellen. Die Apoptose- und Nekroseraten nahmen im selben Maße zu. BK4+/+ und p53^{-/-}-E Zellen unterschieden sich nicht in der MNNG-induzierten Apoptose- und Nekroserate, wahrscheinlich zurückführbar auf eine zu niedrige MNNG-Dosis. Im Vergleich dazu war, wie in Abb. 20 B zu sehen, die applizierte Dosis MMS (1,5 mM, 1 h) potenter in der Induktion der Apoptose. Die Scid Zellpopulation wies 72 h nach Behandlung ~35% apoptotische und ~20% nekrotische Zellen auf während im direkten Vergleich die Kontrollzelle Balb/c < 10% Apoptose- und < 5% Nekroserate aufwies. BK4+/+ und p53^{-/-}-E Zellen unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich MMS-induzierter Apoptose- und Nekroserate.

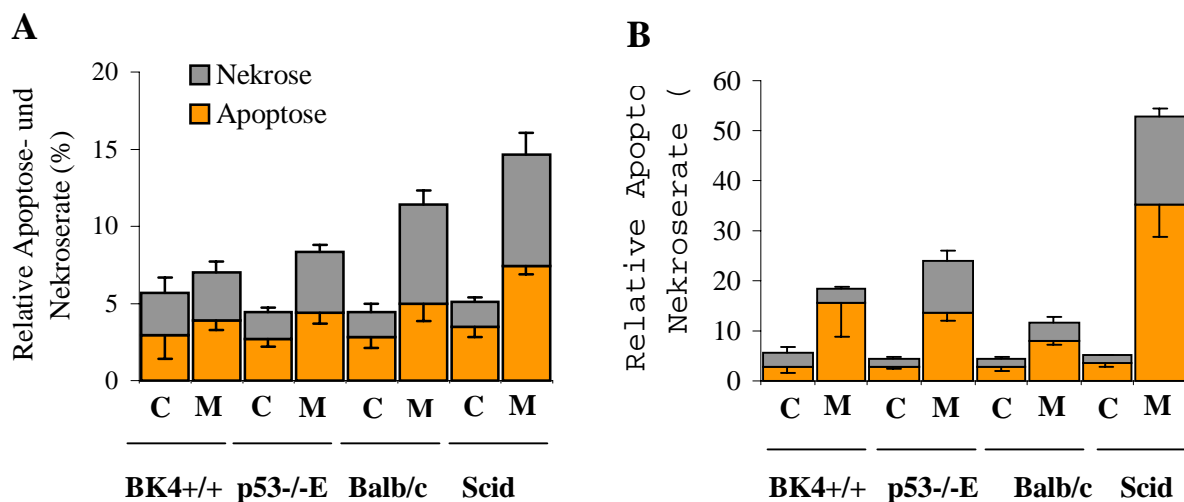


Abb. 20: Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate in BK4+/+, p53-/-E, Balb/c und Scid Zellen. Subkonfluente Zellen in 10 cm-Schalen wurden A) mit 10 μ M MNNG für 1 h und B) mit 1,5 mM MMS für 1 h behandelt, 72 h inkubiert, mit Annexin-V und Propidiumiodid gefärbt und im FACS ausgewertet. Die Prozentangaben entsprechen dem relativen Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen der Gesamtpopulation. Kontrollansätze waren Zellen, die nicht behandelt worden waren. C = Kontrollansatz, M = behandelt mit MNNG (A) und MMS (B).

3.3.1.4 Zytotoxischer Effekt von γ -Strahlung auf p53-profiziente und p53-defiziente Mausfibroblasten

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von γ -Strahlung auf BK4+/+ und p53-/-E Zellen und in diesem Falle zusätzlich auf CHO-9 Zellen wurden diese Zellen mit unterschiedlichen Dosen γ -bestrahlt und die Fähigkeit der Zellen, Klone bilden zu können, im Koloniebildungstest bestimmt. Wie aus Abb. 21 A ersichtlich, waren BK4+/+ und p53-/-E Zellen bis zu einer Bestrahlungsdosis von 7 Gy gleichermaßen resistent/sensitiv, erst bei höheren Dosen wurden die p53-defizienten Zellen sensitiver. Das Vermögen, Kolonien nach γ -Bestrahlung ausbilden zu können, war in den CHO-9 Zellen am geringsten. Mit Bezug zur Abb. 15 B, in der dargestellt ist, daß CHO-Zellen nach γ -Bestrahlung geringere DNA-Doppelstrangbruchraten als BK4+/+ und p53-/-E aufwiesen, korreliert dies nicht mit der hier bestimmten Zytotoxizität der Strahlung. Hierfür könnten zelltypspezifische Faktoren verantwortlich sein und/oder von γ -Strahlung induzierte Schäden, die nicht DNA-Doppelstrangbrüche sind und dennoch den Zelltod einleiten.

Die Beobachtung, daß BK4+/+ Zellen resistenter als p53-/-E Zellen gegenüber der γ -Strahlungs-induzierten Zytotoxizität waren, fand durch Abb. 21 B Bestätigung. Zellen wurden mit 5 und 10 Gy bestrahlt und 48 h später mit MTT versetzt, welches in stoffwechselaktiven Zellen, deren Mitochondrienaktivität intakt war, zu einem Formazan-Farbstoff enzymatisch umgesetzt wurde. Durch

Lyse der Zellen mit Ethanol wurde dieser Farbstoff freigesetzt und im Spektrophotometer quantifiziert. Geschädigte Zellen wiesen infolge beeinträchtigter Enzymaktivität eine geringe Umsetzungsrate von MTT zum Formazan-Farbstoff auf. Auch mit diesem Zytotoxizitätstest war eine schädigende Wirkung von γ -Strahlung an BK4+/+ und p53-/-E Zellen detektierbar. Die p53-profizienten Zellen wiesen erneut eine erhöhte Resistenz gegenüber der γ -Strahlungs-induzierten Zytotoxizität im Vergleich zu den p53-defizienten Zellen auf.

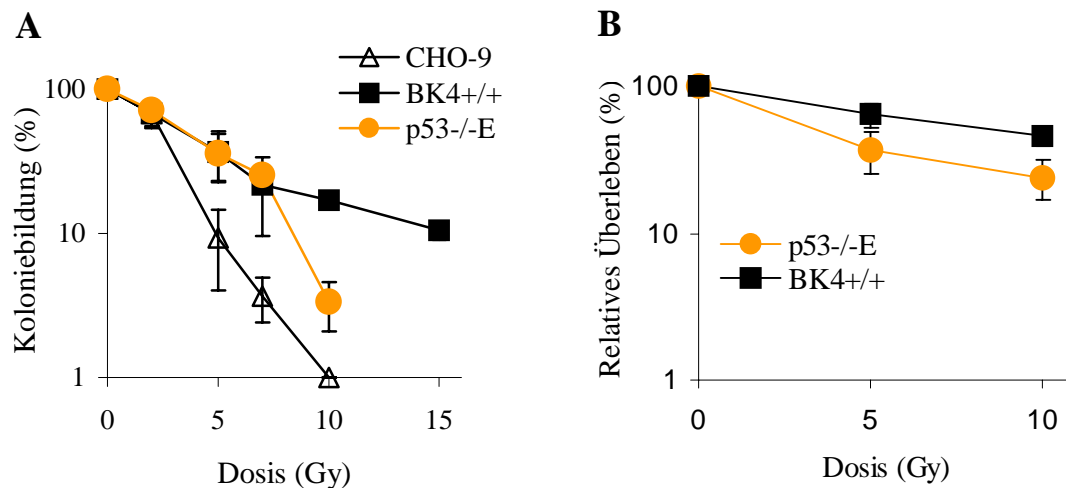


Abb. 21: Zytotoxizität von γ -Strahlung. **A**) BK4+/+, p53-/-E und zusätzlich CHO-9 Zellen wurden mit angegebenen Dosen γ -bestrahlt und jeweils 500 Zellen wurden pro 5 cm-Schale ausgesät. Nach 7 tägiger Inkubation wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit Giemsa-Kristallviolett gefärbt. Die Anzahl gewachsener Zellklone wurde relativ zur Anzahl gewachsener Zellklone des Kontrollansatzes (keine Behandlung) dargestellt. **B**) BK4+/+ und p53-/-E Zellen wurden mit 5 und 10 Gy γ -bestrahlt, in 24-Well-Platten ausgesät und 48 h inkubiert. Nach Zugabe von MTT wurde 4 h inkubiert, das Medium abgesaugt, und die Zellen in Ethanol lysiert. Die Menge des von Stoffwechsel-intakten Zellen zu einem Formazan-Farbstoff umgesetzte MTT gilt als reziprokes Maß für die Schädigung der Zellen. Die Messung der Farbstoffintensität erfolgte im Elisa-Reader bei $\lambda=540\text{nm}$ und $\lambda=690\text{nm}$ und wurde relativ zur der Kontrolle angegeben.

3.3.1.5 γ -Strahlung induziert Apoptose vornehmlich in p53-defizienten Mausfibroblasten

Zur Spezifikation des Zelltods nach γ -Bestrahlung wurden die Apoptose- und Nekroseraten in BK4+/+, p53-/-E und zusätzlich CHO-9 Zellen quantifiziert. Dazu wurden trypsinisierte Zellen mit 10 Gy γ -bestrahlt und nach Aussaat entsprechende Zeit inkubiert. Die Aufarbeitung, Färbung mit FITC-Annexin-V und Propidiumiodid und die Auswertung erfolgte zu angegebenen Zeitpunkten zwischen 0 und 72 h nach Behandlung. Wie in Abb. 22 A dargestellt, sind BK4+/+ Zellen resistent gegenüber der Apoptose-/Nekrose-induzierenden Wirkung von γ -Strahlung (10 Gy); es wurde keine Erhöhung im Vergleich zur bestrahlten und sofort aufgearbeiteten Kontrolle (0-Wert) weder in der Apoptose- noch in

der Nekroserate festgestellt. p53^{-/-}E Zellen hingegen sind sensitiver gegenüber γ -Strahlung als BK4^{+/+} Zellen. Nach 72 h Inkubationszeit waren ~15% apoptotische und ebenso viele nekrotische Zellen in der Population nachweisbar; dieser Anstieg erfolgte erst nach ~48 h. CHO-9 Zellen sind noch sensitiver gegenüber der Apoptose- und Nekrose-induzierenden Wirkung von γ -Strahlung. 72 h nach Behandlung waren 25% der Zellen apoptotisch und 25% nekrotisch. Auch in diesem Fall stieg die Apoptoserate erst nach ~48 h an während erhöhte Nekroseraten bereits ~24 h nach Behandlung detektiert wurden. Die erhöhte Sensitivität der CHO-9 Zellen nach γ -Bestrahlung, bestimmt über die Zunahme der Apoptose- und Nekroserate, deckt sich mit der erhöhten Sensitivität im Koloniebildungs-Test (siehe Abb. 21 A). Bestätigt werden die gemessenen Apoptoseraten durch ein weiteres Experiment, dargestellt in Abb. 22 B, in dem Apoptose über die Zunahme der DNA-Fragmentation, einem Charakteristikum der Apoptose, quantifiziert wird. Aus mit 15 Gy bestrahlten BK4^{+/+}, p53^{-/-}E und CHO-9 Zellen wurde nach 72 stündiger Inkubation die DNA isoliert und elektrophoretisch im Gel aufgetrennt. Wie zu erkennen ist, zeigen nur CHO-9 und p53^{-/-}E Zellen (jeweils im Vergleich zur behandelten und sofort aufgearbeiteten Kontrolle) das sogenannte DNA-Laddering; BK4^{+/+} Zellen zeigen dieses Laddering nicht und sind demzufolge auch nicht apoptotisch.

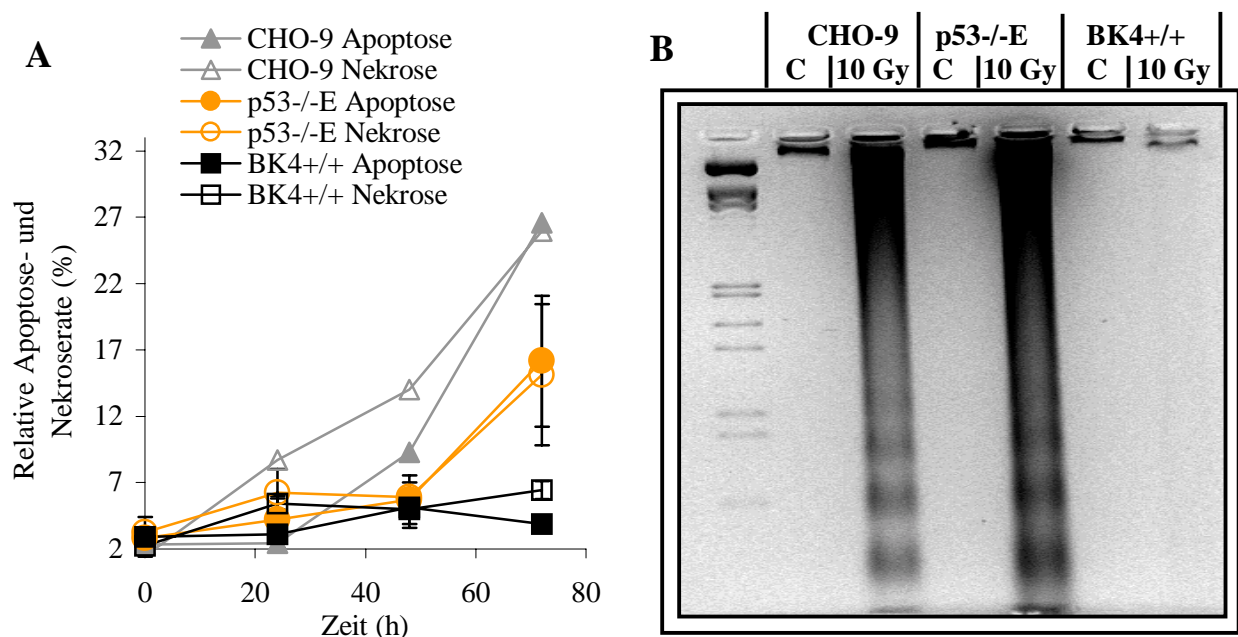


Abb. 22: Induktion von Apoptose und Nekrose in CHO-9 sowie in BK4^{+/+} und p53^{-/-}E Zellen nach γ -Bestrahlung. **A)** Zellen subkonfluenter Kultur wurden trypsinisiert, mit 10 Gy γ -bestrahlt und nach Aussaat entsprechende Zeit inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten zwischen 0 und 72 h wurden die Zellen durch Trypsinieren geerntet, mit Annexin-V und Propidiumiodid gefärbt und im FACS ausgewertet. **B)** Zellen subkonfluenter Kultur wurden mit 15 Gy γ -bestrahlt, nach 72 h Inkubation durch Trypsinieren geerntet und gemäß Protokoll die DNA isoliert; diese wurde im Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die für apoptotische Zellen charakteristische nukleosomale DNA-Fragmentierung ist als sogenanntes „DNA-Laddering“ sichtbar. Kontrollansätze wurden bestrahlt und unverzüglich aufgearbeitet (**A, B**).

3.3.2 DNA-Polymerase β und MGMT wirken der MNNG-induzierten Zytotoxizität gemeinsam entgegen

Ein entscheidender Faktor innerhalb der Basenexzisionsreparatur (BER) ist die DNA-Polymerase β (Pol β), ein Enzym, das die Auffüllung reparaturbedingter Lücken im DNA-Doppelstrang katalysiert. Durch Experimente zur Zytotoxizität an Pol β - und MGMT-defizienten Zellen sollte untersucht werden, ob Pol β und MGMT einen additiven Effekt gegen Alkylanzien-induzierte Zytotoxizität ausüben. Von der Arbeitsgruppe Prof. Wilson (USA) wurden etablierte Pol β ^{+/+} und Pol β ^{-/-} (knockout)-Mausfibroblasten zur Verfügung gestellt, die mit dem Vektor LXS:N:MGM T bzw. dem Vektor alleine stabil transfiziert wurden (Ochs & Kaina, unveröffentlichte Daten). Die 4 verwendeten Klone 3 (Pol β ^{-/-}, mex⁻), 15 (Pol β ^{-/-}, mex⁺), 2 (Pol β ^{+/+}, mex⁻) und 20 (Pol β ^{+/+}, mex⁺) wiesen die in Abb. 23 dargestellten konstitutiven MGMT-Aktivitäten auf. Die mex⁻-Klone 3 und 2 zeigten jeweils ~240 fmol/mg MGMT-Aktivität, während der Klon 15 ~1240 fmol/mg und der Klon 20 ~800 fmol/mg MGMT-Aktivität aufwies. Um die MGMT-Aktivität der Klone 3 und 2 gänzlich zu supprimieren, wurden in den im folgenden beschriebenen Versuchen diese Zellen 1 h vor Alkylanzien-Gabe mit 2,5 μ M O⁶-BG behandelt.

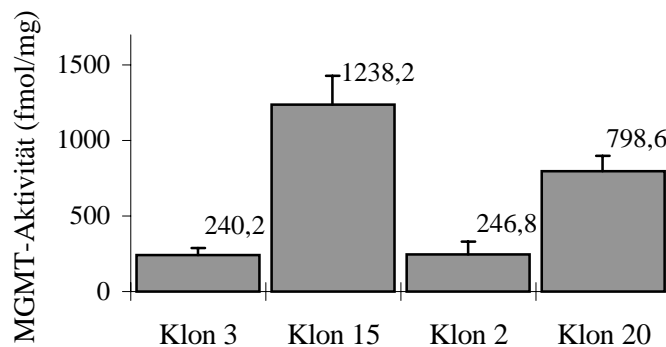


Abb. 23: Bestimmung der MGMT-Aktivität verschiedener Pol β -Klone. Von subkonfluenten Zellen wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt, von denen je 200 μ g in den MGMT-Aktivitäts-Test eingesetzt wurden. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 5 voneinander unabhängigen Versuchen. Als Kontrolle des MGMT-Aktivitäts-Tests wurden stets HeLa S3- (mex⁺) und HeLa MR- (mex⁻) Proteinextrakte mitgeführt. Die Werte sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen. Die durchschnittlichen MGMT-Aktivitätswerte sind angegeben.

3.3.2.1 Alkylanzien-induzierte Zytotoxizität in Abhängigkeit von MGMT und DNA-Polymerase β

Nach Hemmung der Rest-MGMT-Aktivität der Klone 3 und 2 durch O⁶-BG wurden die Zellen mit MNNG (0 - 20 μ M), MMS (0- 2,5 mM) und BCNU (0 - 400 μ M) für jeweils 1 h behandelt, nach 7 tägiger Inkubation die gewachsenen Kolonien gefärbt und das relative Überleben im Verhältnis zur Kontrolle (keine Alkylanzien-Behandlung) aufgetragen. In Abb. 24 A ist das Koloniebildungsvermögen der Zellen in Abhängigkeit von der applizierten MNNG-Dosis dargestellt. Klon 3 (Pol β ^{-/-}, mex⁻)

reagierte am sensitivsten, Klon 15 ($\text{Pol}\beta^{-/-}$, mex^+) war resistenter als Klon 3, aber die Klone 2 ($\text{Pol}\beta^{+/+}$, mex^-) und 20 ($\text{Pol}\beta^{+/+}$, mex^+) zeigten im gleichen Maße größte Resistenz gegenüber der zytotoxischen Wirkung von MNNG. Ein ähnliches Verhalten der Zellen zeigte sich nach Behandlung mit MMS, wie in Abb. 24 B dargestellt ist. Klon 3 war der sensitivste, Klon 15 zeigte schon geringere Sensitivität; die Klone 2 und 20 jedoch waren nicht mehr gleich resistent sondern Klon 20 war signifikant resistenter als Klon 2 gegenüber der zytotoxischen Wirkung von MMS. In Abb. 24 C rückten die Überlebenskurven der Zellen nach BCNU-Behandlung näher zusammen. Aber auch hier war Klon 3 der sensitivste gefolgt von den Klonen 2 und 15, die keinen signifikanten Unterschied zeigten; Klon 20 war wieder am resistentesten gegenüber der zytotoxischen Wirkung von BCNU.

Zusammenfassend sagen die Ergebnisse aus, 1) daß sowohl $\text{Pol}\beta$ als auch MGMT Einfluß auf die durch MNNG-, MMS- und BCNU-induzierte Zytotoxizität haben, 2) daß $\text{Pol}\beta$ - nach dem Ergebnis in Abb. 25 A - eine größere Rolle als MGMT in der MNNG-induzierten Zytotoxizität zukommt, 3) daß BCNU ein anderes Spektrum an DNA-Schäden als MNNG und MMS erzeugt, weil die geringeren Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien auf eine geringere Bedeutung von $\text{Pol}\beta$ und MGMT hindeuten.

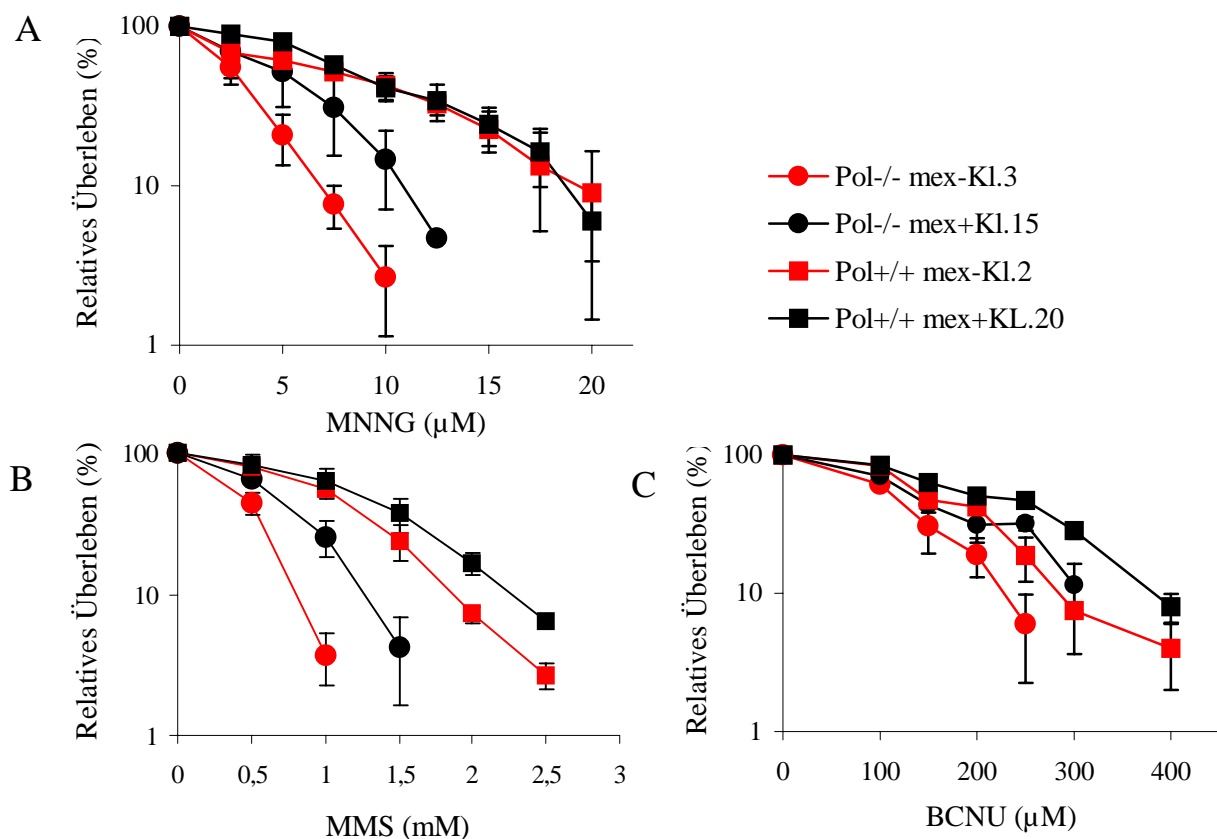


Abb. 24: Koloniebildungsvermögen von $\text{Pol}\beta$ -profizienten und -defizienten (je mex^+ und mex^-) Zellen nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien. 500 bis 1500 Zellen wurden auf 5 cm-Schalen ausgesät, in inkubiert und mit angegebenen Konzentrationen an **A)** MNNG, **B)** MMS und **C)** BCNU für 1 h behandelt. Zellen des mex^- -Phänotyps wurden 1 h vor Alkylanzien-Gabe mit $2,5 \mu\text{M}$ $\text{O}^6\text{-BG}$ behandelt. Nach 7 tägiger Inkubation wurden die Kolonien mit Methanol fixiert und Giemsa-Kristallviolett gefärbt. Aufgetragen ist das relative Überleben der Zellen, bestimmt aus der Anzahl gewachsener Klone des behandelten Ansatzes im Verhältnis zur Anzahl gewachsener Klone im Kontrollansatz (unbehandelt).

3.3.2.2 Apoptose- und Nekrose-induzierende Wirkung von MNNG in Abhängigkeit von MGMT und DNA-Polymerase β

Zur weiteren Untersuchung des Zelltods bei den beschriebenen Pol β -MGMT-Klonen nach MNNG-Behandlung wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an MNNG für 1 h behandelt, nach 72 h mit Annexin-V und Propidiumiodid gefärbt und am FACS ausgewertet. Die Induktion der Apoptose ist in Abb. 25 A dargestellt. 20 μ M MNNG führten in Zellen des Klons 3 zu ~38% Apoptoserate, in Zellen des Klon 15 zu ~15% Apoptoserate. Die Klone 2 und 20 wiesen selbst bei einer MNNG-Dosis von 40 μ M nur einen Anstieg der apoptotischen Zellen in der Population auf ~10% auf. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Quantifizierung der Nekrose der Zellen nach der selben Behandlung (Abb. 25 B). Zellen des Klon 3 zeigten bei 20 μ M MNNG nach 72 h ~23% Nekroserate, Zellen des Klon 15 ~13% Nekroserate. Zellen der Klone 2 und 20 wiesen nach 40 μ M MNNG ~15% Nekroserate auf.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die aus der Abb. 24 A ersichtlichen Ergebnisse durch die Apoptosedaten bestätigt werden. Denn in diesen Versuchen zeigte sich, daß der Klon 2 (Pol β +/, mex-) resistenter gegenüber der Apoptose-/Nekrose-induzierenden Wirkung von MNNG war als Klon 15 (Pol β -/, mex+). Es zeigt sich, daß sowohl MGMT als auch Pol β Einfluß auf die durch MNNG verursachte Apoptose-Induktion haben und daß Pol β - gemäß dem Ergebnis in Abb. 25 A - eine größere Rolle als MGMT in der MNNG-induzierten Apoptose zukommt.

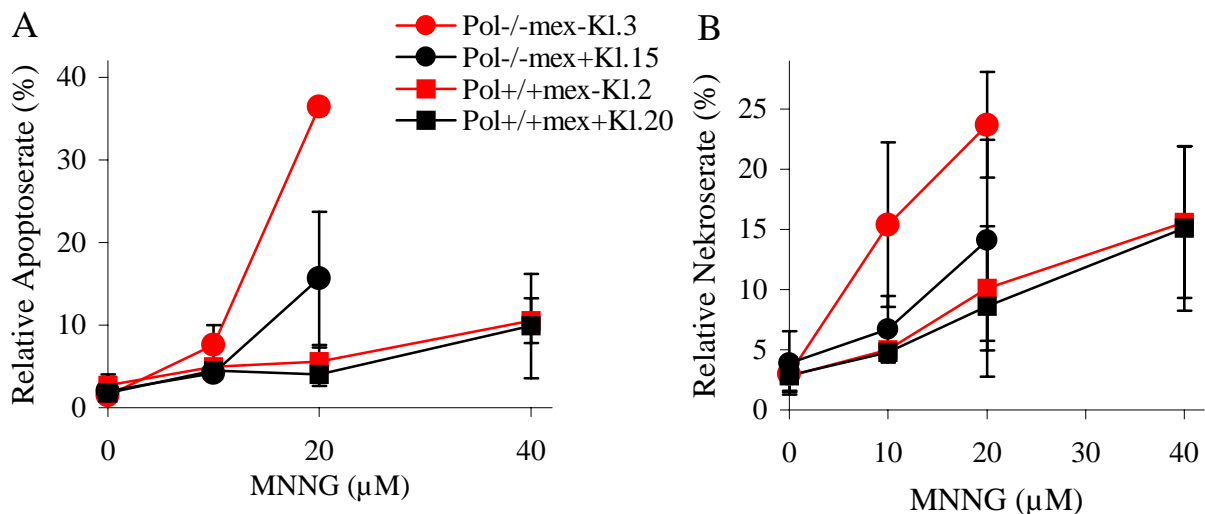


Abb. 25: Induktion von Apoptose und Nekrose in Pol β -profizienten und -defizienten Zellen (je mex⁺ und mex⁻) nach Behandlung mit MNNG. 2×10^5 Zellen wurden auf 10 cm-Schalen ausgesät, in inkubiert und mit den angegebenen Konzentrationen an MNNG für 1 h behandelt. Zellen des mex⁻-Phänotyps wurden 1 h vor MNNG-Gabe mit 2,5 μ M O⁶-BG behandelt. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte durch Färbung mit Annexin-V und Propidiumiodid und anschließender durchflußzytometrischer Auswertung. **A)** Apoptotische Zellen sind nur mit Annexin-V gefärbt, während die nekrotische Zellfraktion **(B)** sich durch die zusätzliche Färbung mit Propidiumiodid von der apoptotischen abtrennt.

3.3.3 Restriktionsendonuklease-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche sind zytotoxisch und führen zu Apoptose

Als ein Modellsystem der DNA-Doppelstrangbruchinduktion hat sich die Elektroporation von Zellen mit Restriktionsenzym (wie im Abschnitt 3.2.4 beschrieben) bewährt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß nicht-erwünschte und unbekannte Nebeneffekte der γ -Bestrahlung ausbleiben, so daß die induzierten Zellantworten direkt mit dem DNA-Doppelstrangbruch in Verbindung gebracht werden können. Wichtigste Effekte nach Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen sind die Induktion der Apoptose und Nekrose und die Zytotoxizität allgemein, auf die im folgenden im Detail eingegangen werden soll.

3.3.3.1 Die zytotoxische Wirkung von PvuII versus EcoRI

Die Bestimmung der Zytotoxizität von PvuII- und EcoRI-induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen erfolgte mit Hilfe des Koloniebildungstests (Abb. 26 A) und des MTT-Tests (Abb. 26 B). CHO-9 Zellen wurden mit 0, 100 und 400 U Enzym elektroporiert, und 500 Zellen zum Koloniebildungstest bzw. 1000 Zellen zum MTT-Test ausgesät. Nach entsprechender Auswertung der Experimente zeigte sich, daß die EcoRI-induzierten DNA-Doppelstrangbrüche im Koloniebildungstest signifikant weniger Klone wachsen ließen und somit zytotoxischer waren als PvuII-induzierte Strangbrüche (400 U PvuII: ~30% Überleben, 400 U EcoRI: ~15% Überleben). Dieser Unterschied war mit dem MTT-Test nicht zu detektieren (400 U PvuII und 400 U EcoRI: jeweils ~20% Zellen, die noch stoffwechselaktiv waren).

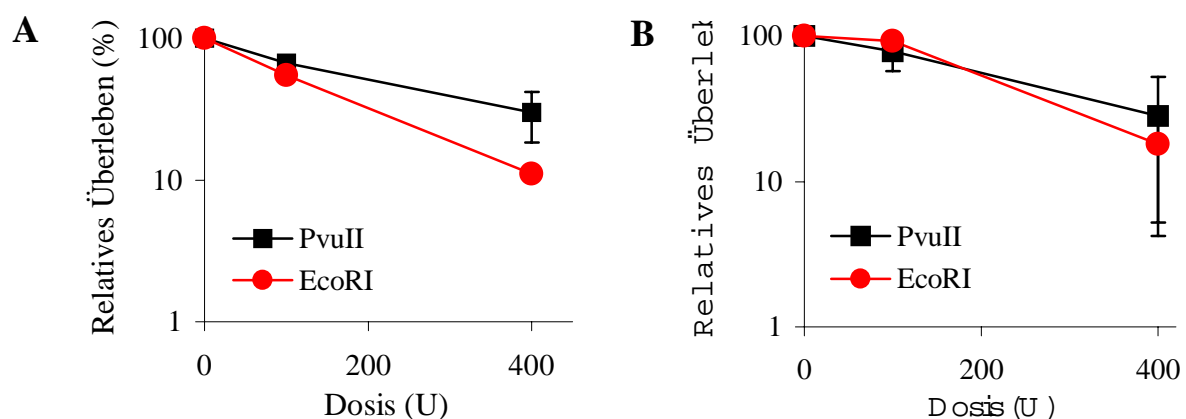


Abb. 26: Zytotoxizität der Elektroporation von PvuII und EcoRI in CHO-9 Zellen. Nach Behandlung wurden **A**) 500 Zellen auf 5 cm-Schalen und **B**) 1000 Zellen auf 24-Well-Platten ausgesät. **A**) Das Koloniebildungsvermögen wurde nach 7 tägiger Inkubation nach Fixieren der Zellen mit Methanol und Färben mit Giemsa-Kristallviolett bestimmt. Die Anzahl gewachsener Kolonien wurde im Verhältnis zu der Kontrolle (mit hitzeinaktiviertem Enzym elektroporiert) aufgetragen. **B**) 48 h nach Behandlung wurde der Zellkultur MTT zugesetzt, 4 h inkubiert, und die Zellen mit Ethanol lysiert. Der austretende Formazan-Farbstoff wurde im Elisa-Reader bei Wellenlängen von $\lambda=540\text{nm}$ und $\lambda=690\text{nm}$ quantifiziert und relativ zum Kontrollwert dargestellt.

3.3.3.2 Apoptose-Induktion durch verschiedene Restriktionsendonukleasen

Die Induktion der Apoptose durch das Schneiden von DNA *in vivo* durch verschiedene Restriktionsendonukleasen ist in Abb. 27 dargestellt. Subkonfluente CHO-9 Zellen wurden mit angegebenen Mengen an Enzym behandelt, 72 h inkubiert und die Apoptose- und Nekroserate nach Färbung mit Annexin-V und Propidiumiodid am FACS bestimmt. PvuII schneidet die Sequenz 5'-CAG↓CTG-3', EcoRI schneidet 5'-G↓AATTC-3' HindIII schneidet 5'-A↓AGCTT-3', ApaI schneidet 5'-GGGCC↓C-3' und AluI schneidet 5'-AG↓CT-3'. Wie zu sehen, induzieren nur die „blunt-end“-schneidenden Enzyme PvuII und AluI Apoptose. Die überhängende Enden produzierenden Enzyme EcoRI, HindIII und ApaI zeigen ebenso wie die mit hitzeinaktiviertem Enzym behandelten Zellen keine nennenswerte Erhöhung der Apoptose- und Nekroserate. Das ist umso erstaunlicher, als in Abb. 16 A, B und C gezeigt wurde, daß EcoRI gleichhohe oder höhere DNA-Doppelstrangbruchraten erzeugt als PvuII. Weiterhin fällt bei den in Abb. 27 gezeigten Experimenten auf, daß der Apoptose eine größere Bedeutung zukommt als der Nekrose, wobei die als nekrotisch identifizierten Zellen teilweise ein spätes Stadium der Apoptose darstellen könnten.

Die Experimente mit verschiedenen Restriktionsenzymen zeigten einen deutlichen Unterschied der Induktion der Apoptose in Abhängigkeit zur Morphologie des DNA-Doppelstrangbruches („blunt-end“ versus „cohesive-end“). Im folgenden wurden die Effekte der Enzyme PvuII und EcoRI miteinander verglichen.

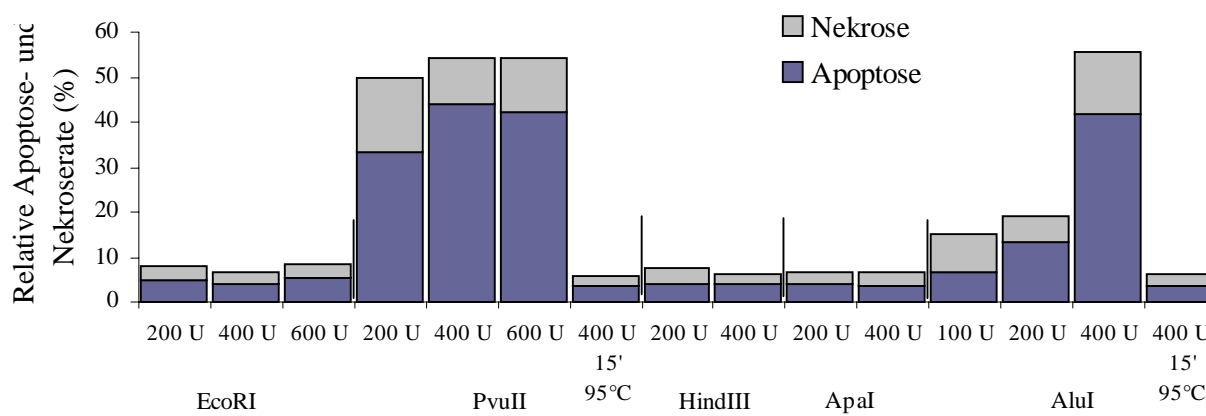


Abb. 27: Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate in CHO-9 Zellen nach Restriktion der DNA *in vivo* durch Restriktionsendonukleasen. Subkonfluente Zellen wurden für die Elektroporation vorbereitet und mit der angegebenen Menge des entsprechenden Enzyms elektroporiert. Nach Aussaat wurden die Zellen für 72 h inkubiert und mit Annexin-V und Propidiumiodid gefärbt. Die Trennung und Auswertung der unterschiedlich gefärbten Populationen erfolgte im FACS. Die Menge apoptotischer und nekrotischer Zellen wurde relativ zur Gesamtpopulation aufgetragen. Als Kontrolle für die Spezifität der Apoptose-Induktion wurde hitzeinaktiviertes PvuII und AluI in Zellen elektroporiert.

3.3.3.3 Apoptose-induzierende Wirkung von PvuII versus EcoRI

Um die Apoptose- und Nekrose-induzierende Wirkung der Restriktionsenzyme PvuII und EcoRI im Detail zu vergleichen, wurden CHO-9 Zellen mit den Enzymen elektroporiert und die Auswirkung im FACS bestimmt. Wie in der Abb. 28 A dargestellt, induzierte PvuII dosisabhängig nahezu linear Apoptose. 72 h nach Elektroporation mit 400 U Enzym wiesen die Zellen ~22% Apoptoserate auf. Die Nekroserate lag im selben Versuch bei ~11% (Abb. 28 B). Im Vergleich dazu führte die Elektroporation von EcoRI zu keiner Erhöhung der Apoptose- und der Nekroserate, auch nicht nach Behandlung mit der höchsten Dosis (400 U) EcoRI (Abb. 28 C). Zusätzlich zu diesen Versuchen wurde eine Zeitabhängigkeit der Apoptose-Induktion nach Elektroporation mit jeweils 400 U Enzym durchgeführt. Wie in Abb. 28 B zu sehen ist, stieg die Apoptoserate nach Behandlung mit PvuII erst nach ~48 h stark an und erreichte ihr Maximum nach ~72 h (~22% Apoptoserate). Die Nekroserate erhöhte sich ebenfalls erst nach ~48 h, jedoch nur auf ~11%. Ein weiterer signifikanter Anstieg sowohl der Apoptose- als auch der Nekroserate zu einem späteren Zeitpunkt (96 h) war nicht zu beobachten. Der direkte Vergleich mit EcoRI, wie in Abb. 28 D dargestellt wurde, zeigte, daß EcoRI auch im Zeitabhängigkeits-Experiment keine Erhöhung der Apoptose- und der Nekroserate nach Elektroporation mit 400 U Enzym zu keinem der gemessenen Zeitpunkte bewirkte. Ein weiteres Experiment, in dem die Apoptose-induzierende Wirkung der beiden Enzyme untersucht wurde, ist in Abb. 28 E dargestellt. Nach Elektroporation der Enzyme und 72 stündiger Inkubation wurde die DNA aus den Zellen isoliert und im Agarose-Gel aufgetrennt. Das nach Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gewordene sogenannte „DNA-Laddering“ als Zeichen der Apoptose war in beiden Ansätzen nach Elektroporation sowohl mit PvuII als auch mit EcoRI erkennbar. Ob die Behandlung mit PvuII im Gegensatz zu EcoRI zu einer höheren Apoptoserate führte, konnte aufgrund dieses Tests, der zwar eine qualitative aber nur eine eingeschränkte quantitative Aussage erlaubt, nicht entschieden werden.

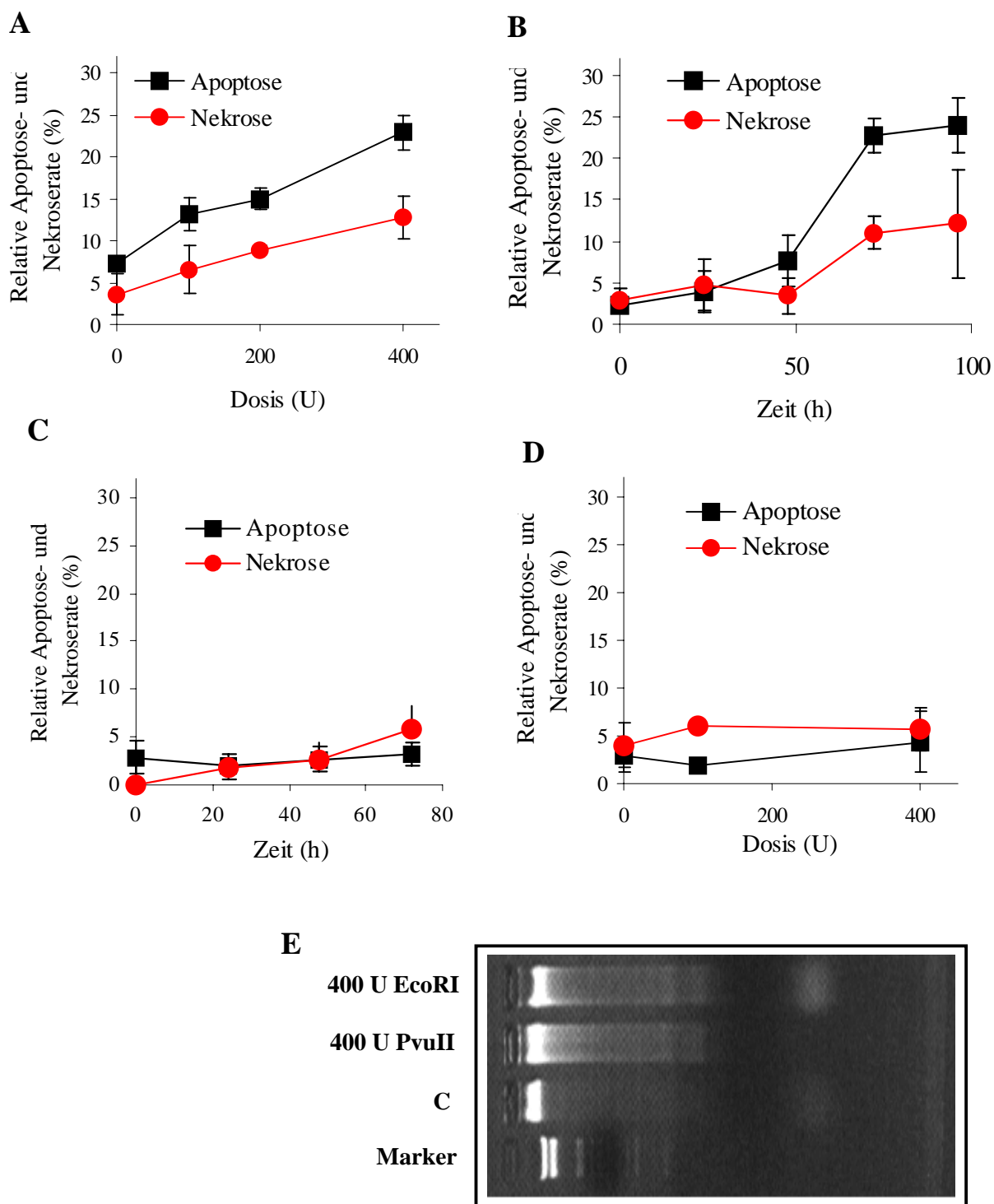


Abb. 28: Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate in CHO-9 Zellen nach Elektroporation der Restriktionsendonukleasen PvuII und EcoRI. Zellen wurden mit PvuII- und EcoRI-Enzym elektroporiert und **A, C**) 72 h bzw. **B, D**) über einen Zeitraum von 0 – 72 h nach Behandlung trypsiniert und mit Annexin-V und Propidiumiodid gefärbt. **A)** Dosisabhängige Induktion der Apoptoserate durch PvuII. **B)** Zeitabhängige Induktion der Apoptoserate durch PvuII. **C)** Dosisabhängige Induktion der Apoptoserate durch EcoRI. **D)** Zeitabhängige Induktion der Apoptoserate durch EcoRI. **E)** Apoptotisches „DNA-Laddering“ als Maß für die nukleosomale Fragmentierung nach Elektroporation von CHO-9 Zellen mit 400 U PvuII und EcoRI. DNA der Zellen wurde 72 h nach Behandlung isoliert und nach Auftrennung im Agarose-Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Kontrollen der Versuche zur Dosisabhängigkeit (**A, C**) waren mit hitzeinaktiviertem Enzym elektroporiert worden; die Kontrollen der Zeitabhängigkeitsversuche (**B, D**) waren mit 400 U Enzym elektroporiert und unverzüglich aufgearbeitet worden.

3.3.3.4 Die PvuII-induzierte Zytotoxizität in Abhängigkeit von p53

Da wie in oben beschriebenen Versuchen PvuII als „blunt-end-cutter“ Apoptose in CHO-9 Zellen zu induzieren vermochte, interessierte uns im folgenden die Abhängigkeit der PvuII-induzierten zytotoxischen Effekte allgemein und der Apoptose im besonderen vom Tumorsuppressorprotein p53, das wichtige Funktionen innerhalb der DNA-Strangbruchreparatur und Apoptose einnehmen kann (siehe Abschnitt 1.3).

Der Vergleich der Zytotoxizität PvuII-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in BK4+/+ und p53-/-E Zellen mit Hilfe des Koloniebildungstests und des MTT-Tests ergab, wie in den Abb. 29 A und B dargestellt, keine signifikanten Unterschiede. Weder auf das Vermögen, nach Doppelstrangbruch-Induktion Kolonien bilden zu können, noch auf die mitochondriale Aktivität hatte der p53-Status signifikanten Einfluß. Die Elektroporation von 400 U PvuII führte in BK4+/+ und p53-/-E Zellen zu Überlebensraten von jeweils ca. 40%, was mit beiden Testsystemen ermittelt wurde.

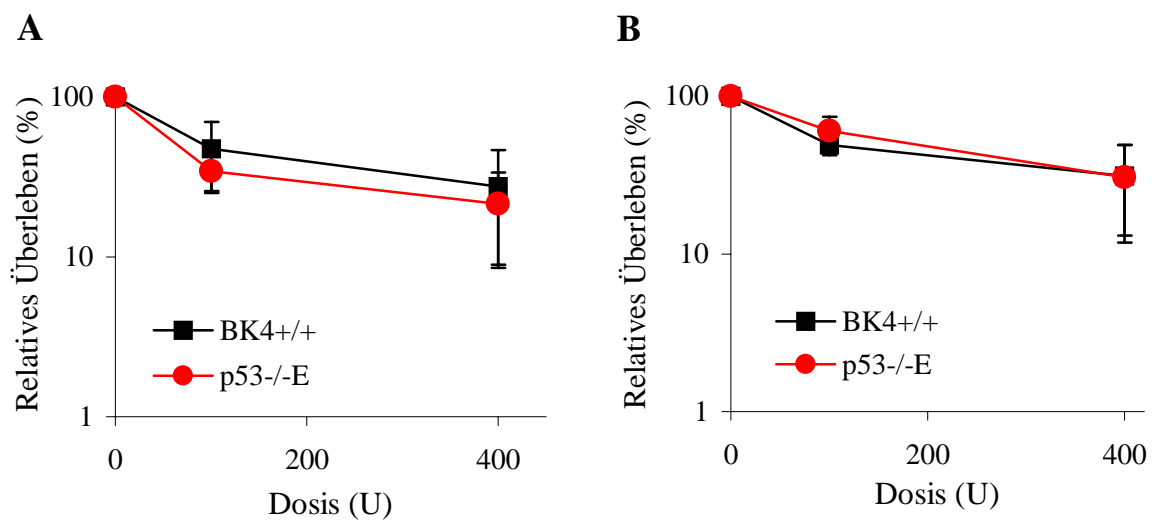


Abb. 29: Zytotoxizität der Elektroporation von PvuII in BK4+/+ und p53-/-E Zellen. Nach Behandlung wurden **A)** 500 Zellen auf 5 cm-Schalen und **B)** 1000 Zellen auf 24-Well-Platten ausgesät. **A)** Das Koloniebildungsvermögen wurde nach 7 tägiger Inkubation nach Fixieren der Zellen mit Methanol und Färben mit Giemsa-Kristallviolett bestimmt. Die Anzahl gewachsener Kolonien wurde im Verhältnis zu der Kontrolle (mit hitzeinaktiviertem PvuII elektroporiert) aufgetragen. **B)** 48 h nach Behandlung wurde der Zellkultur MTT zugesetzt, 4 h inkubiert, und die Zellen mit Ethanol lysiert. Der austretende Formazan-Farbstoff wurde im Elisa-Reader bei Wellenlängen von $\lambda=540\text{nm}$ und $\lambda=690\text{nm}$ quantifiziert und relativ zum Kontrollwert angegeben.

3.3.3.5 Apoptose-induzierende Wirkung von PvuII in Abhängigkeit von p53

Nachdem beobachtet wurde, daß DNA-Doppelstrangbrüche in Abhängigkeit vom p53-Status prozessiert werden (siehe Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4), war die Frage nach der Auswirkung dieser unterschiedlichen DNA-Doppelstrangbruchraten hinsichtlich der Apoptose-Induktion und Zytotoxizität von Interesse. BK4^{+/+} und p53^{-/-}E Zellen wurden mit PvuII elektroporiert und nach Annexin-V und Propidiumiodid-Färbung am FACS die apoptotischen und nekrotischen Fraktionen quantifiziert. Wie in Abb. 30 A dargestellt, führte die PvuII-induzierte DNA-Doppelstrangbruchinduktion dosisabhängig zu einem Anstieg der Apoptoserate in den p53 defizienten Zellen; 400 U PvuII führten zu einer Apoptoserate von ~60% 72 h nach Elektroporation. Die Nekroserate war nicht erhöht. p53 profiziente Zellen zeigten keine ebensolche Erhöhung der Apoptose- und der Nekroserate; sie wiesen 72 h nach Behandlung mit 400 U PvuII eine Apoptoserate von ~10% auf. Die in Abb. 30 B dargestellte zeitabhängige Apoptose-Induktion zeigte, daß die p53^{-/-}E Zellen nach ~48 h begannen, die apoptotischen Merkmale auszuprägen; nach 72 h waren ~60 % der Zellen apoptotisch. Die Nekroserate war zu keinem der gemessenen Zeitpunkte in beiden Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle erhöht. BK4^{+/+} Zellen zeigten nach 72 h einen Anstieg der Apoptoserate auf ~10%. Bestätigung fanden diese Ergebnisse durch die Quantifizierung der Sub-G1-Fraktion als Maß der Apoptose. Nach Elektroporation von 400 U PvuII wurden die Zellen zu angegebenen Zeitpunkten zwischen 0 und 72 h aufgearbeitet und mit Propidiumiodid gefärbt. Auch diese Methode zeigte, daß die p53^{-/-}E Zellen sensitiver hinsichtlich der PvuII-induzierten Apoptoserate sind (Abb. 30 C). Auch durch eine weitere Methode, der Bestimmung der nukleosomalen Fragmentierung nach Auftrennung der DNA im Agarose-Gel, konnten obige Ergebnisse bestätigt werden. Wie in Abb. 30 D dargestellt ist, zeigten p53^{-/-}E Zellen 72 h nach Elektroporation mit PvuII das für die Apoptose charakteristische „DNA-Laddering“; nach Elektroporation von EcoRI war dieses Muster schwächer ausgeprägt. Die BK4^{+/+} Zellen hingegen zeigten weder nach Elektroporation von PvuII noch von EcoRI dieses DNA-Schädigungsmuster.

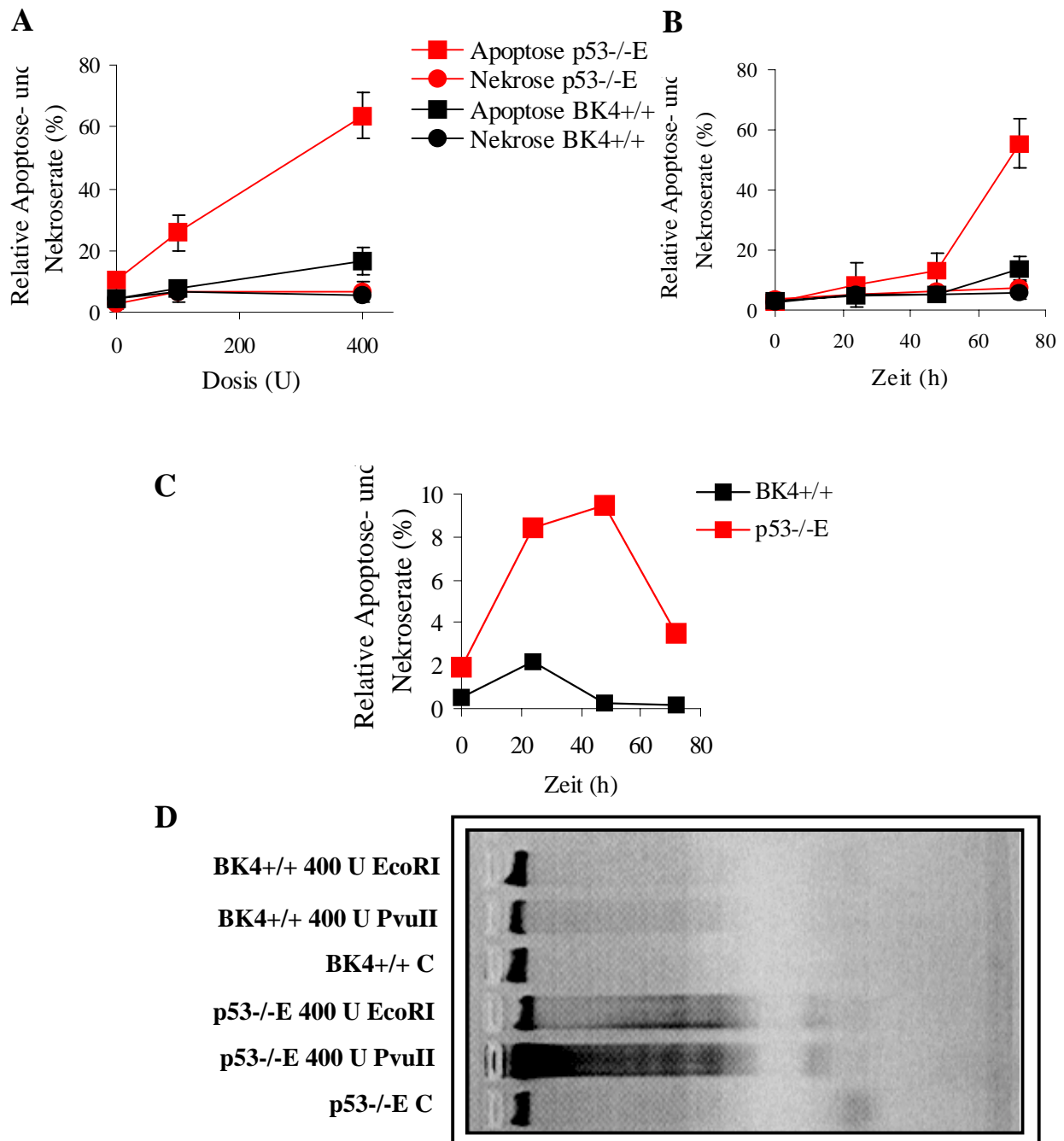


Abb. 30: Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate in BK4+/+ und p53-/-E Zellen nach Elektroporation von PvuII. **A)** Induktion der Apoptose in Abhängigkeit von der elektroporierten Enzymmenge (0 – 400 U) 72 h nach Behandlung; der Kontrollwert wurde mit 400 U hitzeinaktiviertem Enzym elektroporiert. **B)** Zeitliche Abhängigkeit (0 – 72 h) der Induktion der Apoptoserate nach Elektroporation von 400 U PvuII; der Nullwert wurde mit 400 U Enzym elektroporiert und sofort aufgearbeitet. Die Zellen wurden nach Behandlung für eine entsprechende Zeit inkubiert, gemäß Protokoll mit Annexin-V und Propidiumiodid gefärbt und im FACS ausgewertet. **C)** Zeitliche Induktion der Apoptoserate 72 h nach Elektroporation von PvuII. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt der Aufarbeitung (0 - 72 h nach Behandlung) mit Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Bei der Auswertung im FACS kommt die apoptotische Zellfraktion aufgrund des geringeren DNA-Gehalts vor der G1-Population zum liegen. **D)** Apoptose-Induktion nach Elektroporation der Zellen mit PvuII (hier zusätzlich mit EcoRI). Die Zellen wurden 72 h nach Behandlung durch Trypsinieren geerntet, die DNA isoliert und nach Auftrennung im Agarose-Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Kontrollen wurden mit hitzeinaktiviertem Enzym elektroporiert.

3.3.3.6 Zusammenhang zwischen DNA-Doppelstrangbruch- und Apoptose-Induktion nach Behandlung der Zellen mit PvuII und γ -Strahlung

Da in den vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde, daß sowohl PvuII als auch γ -Strahlung in der Lage sind, sowohl DNA-Doppelstrangbrüchen als auch Apoptose zu induzieren, interessierte im Folgenden die Frage, ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen diesen Ereignissen gibt. Wie in Abb. 31 dargestellt, läßt sich die DSB-Rate mit der Apoptose-Rate sowohl nach PvuII- als auch nach γ -Strahlung korrelieren.

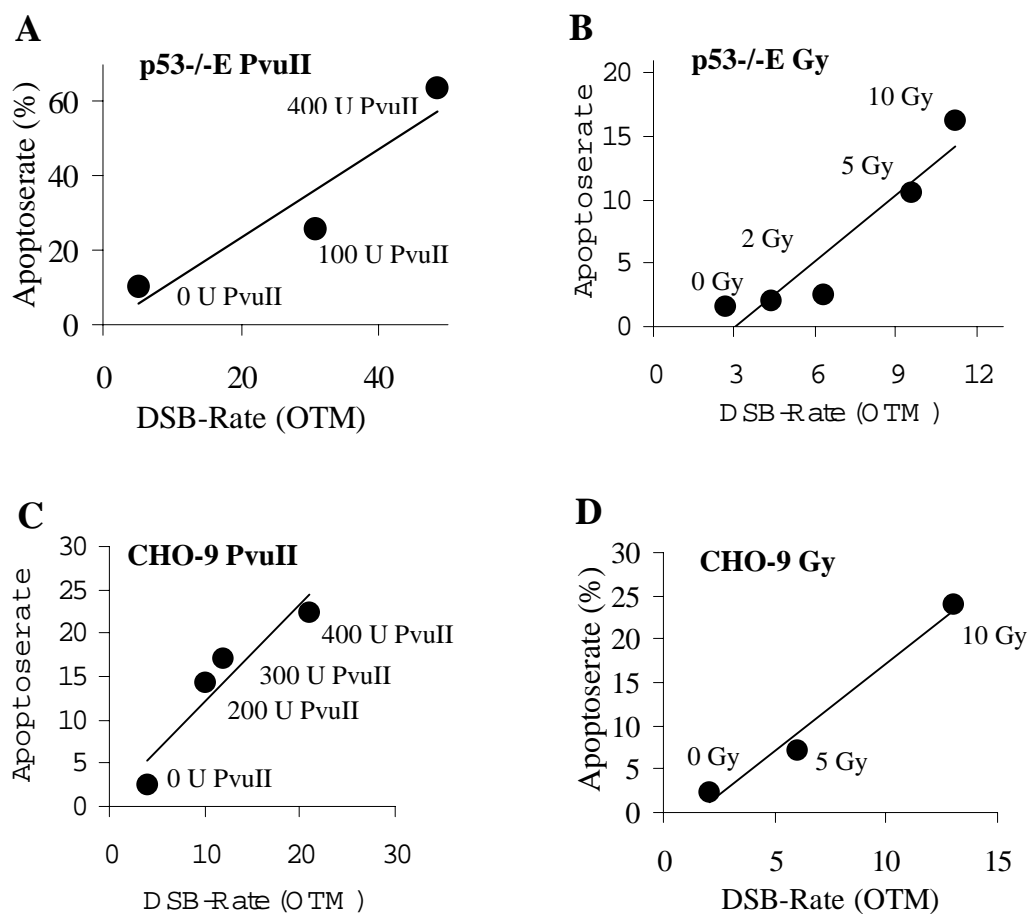


Abb. 31: Korrelation von DSB- und Apoptose-Induktion nach PvuII-Behandlung und nach γ -Bestrahlung in p53-/-E und in CHO-9 Zellen. Die Werte der DSB-Raten entsprechen den in den entsprechenden Experimenten ermittelten Olive Tail Moment-Werten. Abgebildet sind: **A)** p53-/-E Zellen, die mit PvuII elektroporiert wurden, **B)** p53-/-E Zellen, die γ bestrahlt wurden, **C)** CHO-9 Zellen, die mit PvuII elektroporiert wurden und **D)** CHO-9 Zellen, die γ -bestrahlt wurden. Die Korrelationskoeffizienten betragen bei: **A)** 0,9436, **B)** 0,9400 **C)** 0,9382 und **D)** 0,9895.

3.3.4 Die Induktion der Apoptose in Mausfibroblasten und Zellen des Chinesischen Hamsters geht einher mit einer Verringerung der Bcl-2-Proteinmenge

3.3.4.1 Verringerung der Bcl-2-Proteinmenge nach Elektroporation von PvuII versus EcoRI und nach γ -Bestrahlung in CHO-9 Zellen

Die Untersuchung der Bcl-2- und Bax-Proteinmengen in CHO-9 Zellen erfolgte nach Elektroporation mit PvuII (Abb. 32 A) und EcoRI (Abb. 32 B) sowie nach γ -Strahlung (Abb. 32 C). Jeweils 30 μ g Protein entsprechend behandelter Zellen wurde für angegebene Zeiten inkubiert und im Westernblot aufgearbeitet. Dabei zeigte sich, daß die Elektroporation von PvuII zu einem frühen Zeitpunkt (nach 24 h) zum Absinken der Bcl-2-Menge führte, wohingegen EcoRI keinem Abfall der Bcl-2-Proteinmenge zu den gemessenen Zeitpunkten nach sich zog. Ionisierende Strahlung (10 Gy) führte zu einer sich langsam verringern Menge an Bcl-2-Protein, so daß nach 72 h ~20% der Ausgangsproteinmenge vorhanden war. Die Membranen wurden zusätzlich mit ERK2-Antikörper als Lade- und Blotkontrolle gefärbt. Die Quantifizierung erfolgte mit dem GelDoc1000-System (Bio-Rad).

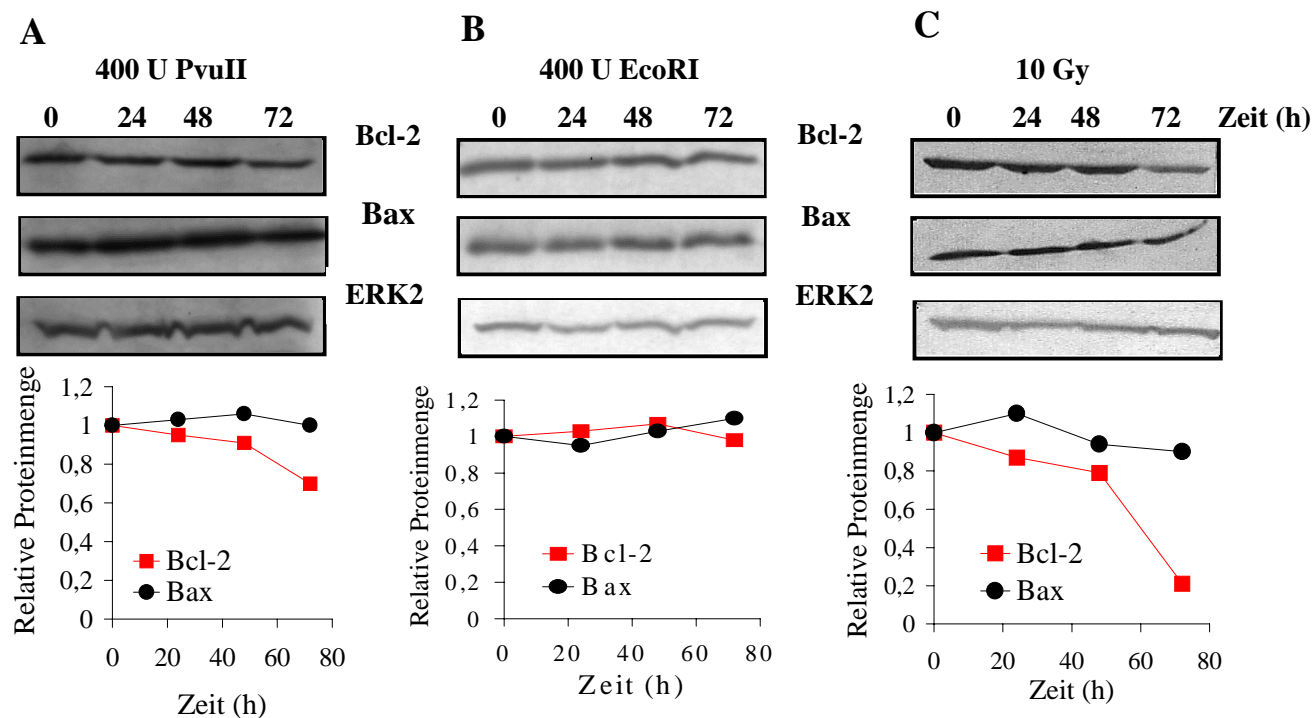


Abb. 32: Westernblot-Analyse zum Nachweis der Bcl-2- und Bax-Proteinmengen in CHO-9 Zellen. Je 30 μ g Gesamtproteinextrakt wurden auf einem 10%igen SDS-PAG elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran gebロットet und mit Primärantikörper gegen Bcl-2 und Bax inkubiert. Zur Lade- und Blotkontrolle wurde mit ERK2-Antikörper gegengefärbt. **A)** Zellen wurden mit 400 U PvuII elektroporiert, **B)** Zellen wurden mit 400 U EcoRI elektroporiert und **C)** Zellen wurden mit 10 Gy γ -bestrahlt. Die Proteinextraktion erfolgte in zeitlicher Abhängigkeit (0 - 72 h nach Behandlung).

3.3.4.2 Verringerung der Bcl-2-Proteinmenge nach Elektroporation von PvuII und nach γ -Bestrahlung in Abhängigkeit von p53

Nachdem Ochs & Kaina (1999; z. T. unveröffentlichte Daten) gezeigt haben, daß die Bcl-2-Proteinmenge nach Behandlung von Zellen mit alkylierenden Agenzien nach 60-72 h abfällt und daß andere Proteine der Bcl-2-Familie wie z. B. Bax in ihrer Menge nicht verändert waren, interessierten in vorliegenden Untersuchungen die Fragen, ob PvuII-induzierte DSBs sowie γ -Strahlung ebenfalls zu einem Abfall an Bcl-2-Protein führen. Da bekannt ist, daß p53 Bax transkriptionell aktivieren und den Fas-vermittelten Apoptoseweg induzieren kann, was mit einem Abfall an Bcl-2 einhergeht, sollte der Einfluß von p53 auf PvuII- und γ -Strahlungs-induzierte DNA-Schäden in Abhängigkeit von p53 untersucht werden. Dazu wurden BK4^{+/+} und p53^{-/-}E Zellen mit 400 U PvuII elektroporiert (Abb. 33 A und B) oder mit 10 Gy γ -bestrahlt (Abb. 33 C und D), zu den angegebenen Zeiten nach Behandlung das Protein extrahiert und mit jeweils 30 μ g Protein Westernblot-Analysen durchgeführt. Wie in den Abb. 33 A und C zu sehen ist, führte eine DNA-Schädigung in den BK4^{+/+} Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der Expression der Proteine Bcl-2 und Bax. In den p53^{-/-}E Zellen hingegen war eine Abnahme von Bcl-2 Protein mit zunehmender Inkubationszeit nach Behandlung zu detektieren. Ionisierende Strahlung führte sofort nach Behandlung zu einem starken Bcl-2-Proteinmengen-Abfall in den p53^{-/-}E Zellen, so daß nach 72 h Inkubation fast kein Protein mehr nachweisbar war. PvuII führte zu einer etwas verzögerten und nicht so drastischen Reduktion der Bcl-2-Proteinmenge; 72 h nach Elektroporation war noch etwa 20% der Bcl-2-Ausgangsproteinmenge nachweisbar. Die Menge an Bax-Protein blieb in den p53^{-/-}E Zellen nach Behandlung über den beobachteten Zeitraum unbeeinflusst. Die Autoradiographien der Westernblots wurden jeweils mit dem GelDoc1000-System quantifiziert und relativ zur Kontrolle (Zeitpunkt 0 h nach Behandlung) und dem ERK2-Signal aufgetragen (dargestellt als Graphik).

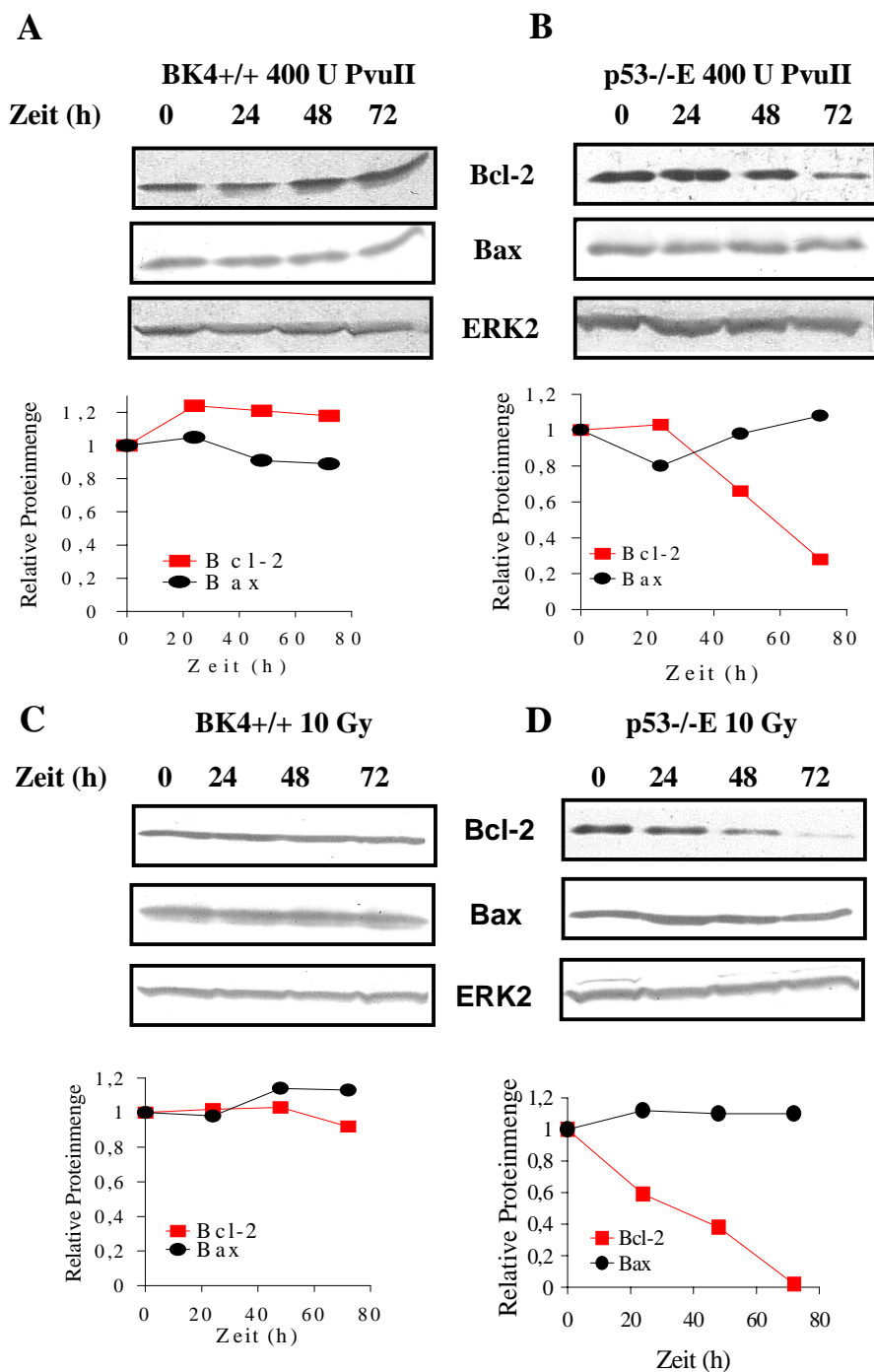


Abb. 33: Westernblot-Analyse zum Nachweis der Bcl-2- und Bax-Proteinmengen in BK4+/+ und p53-/-E Zellen. Je 30 µg Gesamtproteinextrakt (0 - 72 nach Behandlung) wurden auf einem 10%igen SDS-PAG elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran geblotet und mit Primärantikörper gegen Bcl-2 und Bax inkubiert. Zur Lade- und Blotkontrolle wurde mit ERK2-Antikörper gegengefärbt. **A)** Gesamtproteinextrakte aus BK4+/+ Zellen, die mit 400 U PvuII elektroporiert wurden, **B)** Gesamtproteinextrakte aus p53-/-E Zellen, die mit 400 U PvuII elektroporiert wurden, **C)** Gesamtproteinextrakte aus BK4+/+ Zellen, die mit 10 Gy γ -bestrahlt wurden und **D)** Gesamtproteinextrakte aus p53-/-E Zellen, die mit 10 Gy γ -bestrahlt wurden. Zu den Autoradiographien wurde jeweils eine Quantifizierung mit dem GelDoc1000-System (Bio-Rad) vorgenommen (jeweils unter den Blots dargestellt). Nullwerte waren mit 400 U PvuII elektroporiert bzw. mit 10 Gy γ -bestrahlt und unverzüglich aufgearbeitet worden.

3.3.5 Induktion von Chromosomenaberrationen durch unterschiedliche Noxen

Nachdem gezeigt wurde, daß in die Zelle elektroporierte Restriktionsendonukleasen DSBs induzieren und infolgedessen die Apoptoserate ansteigt, wurde die chromosomenschädigende Wirkung von MMS als Beispiel für ein alkylierendes Agens sowie von den Restriktionsendonukleasen PvuII und EcoRI getestet. Da die oben beschriebenen Versuche der Apoptose-Induktion durch PvuII und EcoRI an CHO-9 Zellen erfolgte, wurde das klastogene Potential dieser Enzyme ebenfalls an diesen Zellen getestet. Der Unterschied der Aberrations-Induktion durch PvuII in Abhängigkeit von p53 wurde analog zu den Apoptose-Experimenten in den p53-profizienten und -defizienten Mausfibroblasten (BK4^{+/+}, p53^{-/-}E) untersucht.

3.3.5.1 Chromosomen-schädigende Wirkung von MMS

Nachdem Arbeiten von Haas & Kaina (1995), Haas (1997) und Kaina *et al.* (1997b) dem Produkt des Proto-Onkogens c-Fos eine protektive Wirkung auf die Alkylanzien-induzierte Chromosomenschädigung nachgewiesen haben, sollten analoge Experimente mit c-Jun-defizienten Zellen erfolgen. c-Jun kann mit c-Fos den heterodimeren Transkriptionsfaktors AP-1 bilden, der durch gentoxische Stimuli induzierbar ist und unter anderem an der Regulation von Genen der Zellzyklusprogression und Apoptose beteiligt ist (Bossy-Wetzel *et al.*, 1997; Schreiber *et al.*, 1999; Kolbus *et al.*, 2000). Wie von Johnson *et al.* (1993) und Hilberg *et al.* (1993) beschrieben wurde, ist c-Jun für die normale Entwicklung des Embryos unentbehrlich, weshalb mit primären Fibroblasten aus Mausembryonen, die nicht älter als 12 Tage waren, gearbeitet wurde. So wie kürzlich von Wisdom *et al.* (1999) gezeigt und auch selbst beobachtet wurde, sind c-jun-knockout Zellen nicht kultivierbar, da sie nach 1-2 Tagen in der Kultur absterben. Zur Untersuchung von Chromosomenschäden nach Alkylanzien-induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen in Abhängigkeit vom c-Jun-Status wurden daher primäre Mausfibroblasten, die homozygot bzw. heterozygot hinsichtlich des c-jun-Allels waren (JLMz^{+/+} versus JLMz^{+/-}), mit MMS behandelt, nach 18 h mit Colcemid (Levan, 1938) in der Mitose arretiert und hieraus Chromosomenpräparate hergestellt. Die Zellen wurden innerhalb der ersten vier Passagen einem Experiment unterzogen, so daß sie als primäre Zellen angesehen werden können. Wie in Abb. 34 dargestellt ist, führte die Behandlung mit 0,5 und 1 mM MMS zu einem Anstieg der Aberrationsrate (Abb. 34 A) und der Aberrationsausbeute (Abb. 34 B) unabhängig vom c-Jun-Status der Zellen. Nach Behandlung mit 1 mM MMS wurde eine Aberrationsrate von jeweils ~70% und eine Aberrationsausbeute von jeweils ~3,3 pro Zelle ermittelt. Primäre heterozygote c-jun Zellen zeigen also kein verändertes Verhalten hinsichtlich MMS-induzierter Chromosomenschädigung im Vergleich zu primären homozygoten c-jun Zellen (wt).

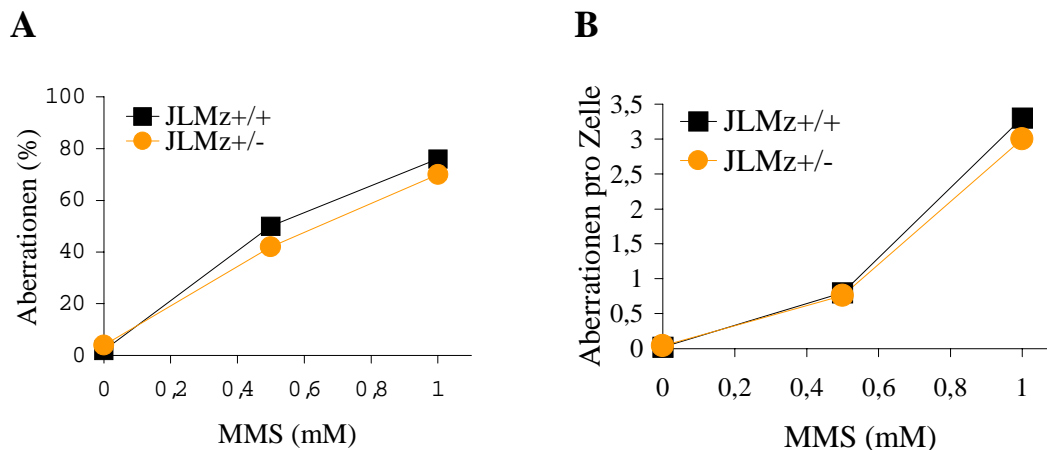


Abb. 34: Induktion von Chromosenschäden in primären *c-jun*^{+/+} (wt) und *c-jun*^{+/-} Mausfibroblasten 18 h nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen an MMS für 1 h. Zellen wurden 18 h nach Behandlung für 2 h mit 50 ng/ml Colcemid behandelt. Dargestellt sind **A)** die relative Anzahl an Aberrationen im Verhältnis zur Gesamtzahl ausgewerteter Zellen und **B)** die Aberrationen pro Zelle. Es wurden jeweils 100 Metaphasen von verschiedenen Objektträgern ausgewertet.

3.3.5.2 Chromosomen-schädigende Wirkung von PvuII versus EcoRI

Wie in klassischen Arbeiten beschrieben wurde (Winegar & Preston, 1988; Moses *et al.*, 1990; Costa & Bryant, 1991), hat die Morphologie des durch Restriktionsendonukleasen induzierten DNA-Doppelstrangbruchs Einfluß auf die Entstehung von Chromosomenaberrationen. Diese Ergebnisse wurden hier bestätigt, was in Abb. 35 dargestellt ist. CHO-9 Zellen wurden mit 0, 100 und 400 U PvuII und EcoRI elektroporiert, 18 h nach Behandlung mit Colcemid in der Mitose arretiert und hieraus Chromosomenpräparate hergestellt. Sowohl die Darstellung der ausgezählten Chromosomenaberrationen als Aberrationsrate in Prozent (Abb. 35 A) als auch als Aberrationsausbeute pro Zelle (Abb. 35 B) zeigte, daß EcoRI-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche zu deutlich weniger Chromosomenschäden führen als PvuII-induzierte DSBs. Die Aberrationsrate betrug nach Behandlung mit 400 U PvuII ~80% und mit EcoRI ~30%. Die Aberrationsausbeute nach Elektroporation von 400 U PvuII lag bei ~6 pro Zelle und nach Elektroporation von 400 U EcoRI bei ~0,8 pro Zelle. Interessanterweise war EcoRI effizienter in der Induktion von DNA-Strangbrüchen als PvuII (vergleiche Abb. 16), so daß eine unterschiedlich aufgenommene Menge an Enzym oder ein Unterschied in der Aktivität der Enzyme als Ursache für die hier beobachteten Unterschiede in der Aberrations-Induktion als unwahrscheinlich anzusehen sind. Des weiteren entsprechen hier bestimmte Aberrationsraten/-ausbeuten denen der klassischen Arbeiten.

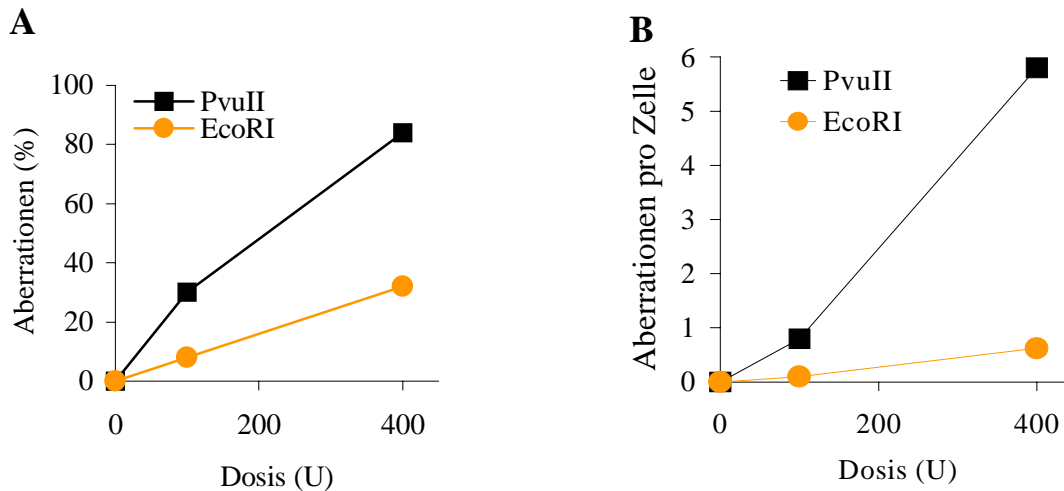


Abb. 35: Induktion von Chromosomenschäden in CHO-9 Zellen 18 h nach Elektroporation von 0, 100 und 400 U PvuII und EcoRI. Zellen wurden 18 h nach Behandlung für 2 h mit 50 ng/ml Colcemid behandelt. Dargestellt sind **A)** die relative Anzahl an Aberrationen im Verhältnis zur Gesamtzahl ausgewerteter Zellen und **B)** die Aberrationen pro Zelle. Es wurden jeweils 100 Metaphasen von verschiedenen Objektträgern ausgewertet.

3.3.5.3 Chromosomen-schädigende Wirkung von PvuII in Abhängigkeit von p53

Wie von Lackinger & Kaina (2000) gezeigt wurde und wie in Abb. 36 dargestellt ist, hat der p53-Status Einfluß auf die DNA-schadensinduzierte Chromosomenschädigung. BK4+/+ und p53-/-E Zellen wurden in vorliegenden Versuchen mit 0, 100 und 400 U PvuII elektroporiert, 18 h nach Behandlung mit Colcemid in der Mitose arretiert und hieraus Chromosomenpräparate hergestellt. Sowohl die Darstellung der ausgezählten Chromosomenaberrationen als Aberrationsrate in % (Abb. 37 A) als auch als Aberrationsausbeute pro Zelle (Abb. 37 B) zeigte, daß p53-profiziente Zellen resistenter als p53-defiziente Zellen sind hinsichtlich der PvuII-induzierten Chromosomenschädigung. Die Abberationsrate betrug nach Behandlung mit 400 U PvuII in den p53-defizienten Zellen ~60% und in den p53-profizienten Zellen ~25%. Die Aberrationsausbeute nach Elektroporation von 400 U PvuII lag in den p53-/-E Zellen bei ~1,6 pro Zelle und in den BK4+/+ bei ~0,3 pro Zelle. Dies zeigt, daß p53 eine wichtige Funktion ausübt innerhalb der Aufrechterhaltung der genomischen Unversehrtheit. Es kann mit diesen Versuchen jedoch nicht geklärt werden, ob dieser beobachtete Effekt von p53 auf dessen Rolle innerhalb der DNA-Reparatur oder der Apoptose-Induktion/-Prävention zurückzuführen ist.

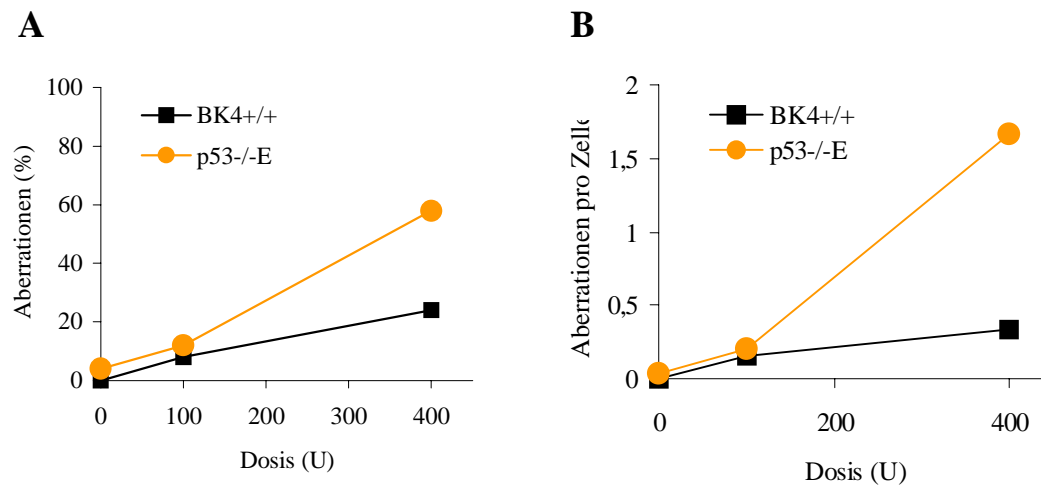


Abb. 36: Induktion von Chromosenschäden in BK4+/+ und p53-/-E Zellen 18 h nach Elektroporation von 0, 100 und 400 U PvuII. Zellen wurden 18 h nach Behandlung für 2 h mit 50 ng/ml Colcemid behandelt. Dargestellt sind **A)** die relative Anzahl an Aberrationen im Verhältnis zur Gesamtzahl ausgewerteter Zellen und **B)** die Aberrationen pro Zelle. Es wurden 100 Mitosen ausgewertet.

3.3.6 Einfluß von p53 auf PvuII-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit Wortmannin und 3-Aminobenzamid

Wie in vorangegangenen Experimenten beobachtet wurde (siehe Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4), ist p53 ein Faktor in der DNA-Doppelstrangbruchreparatur, der bei Fehlen zu einer erhöhten Strangbruchrate über einen längeren Zeitraum führt. Es ist bekannt, daß die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Protein-Kinase (DNA-PK_{CS}) direkt in der DNA-Doppelstrangbruchreparatur involviert ist, und es gibt Hinweise (Wang *et al.*, 2000), daß p53 und DNA-PK_{CS} gemeinsam oder zumindest auf einer Linie an der DNA-Doppelstrangbruchreparatur beteiligt sind. Dies sollte mit Hilfe p53-profizienter und -defizienter Zellen, in denen DNA-PK_{CS} durch Wortmannin (WM) gehemmt und in denen gleichzeitig DSBs mit PvuII induziert wurden, mit Hilfe der SCGE näher untersucht werden. Ein weiterer Faktor, der direkt an der DNA-Doppelstrangbrucherkenkung und -reparatur beteiligt ist, nämlich die Poly(ADP-Ribosyl)-Polymerase (PARP), sollte in die weiteren Untersuchungen miteinbezogen werden. In diesen Experimenten wurde PARP in den Zellen durch 3-Aminobenzamid (3-AB) gehemmt.

3.3.6.1 Einfluß von p53 auf die Prozessierung PvuII-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit Wortmannin und 3-Aminobenzamid

In diesen Experimenten wurde der Frage nachgegangen, wie sich die Induktion und die Abnahme PvuII-induzierter DSBs in p53-profizienten (BK4+/+) und -defizienten Zellen (p53-/-E) bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit dem DNA-PK_{CS}-Inhibitor Wortmannin (WM; Boulton *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1996) und mit dem PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-AB; Durkacz *et al.*, 1980; Bürkle *et al.*, 1987) verhalten. 12 h vor und entsprechende Zeit nach der Elektroporation von PvuII wurden die Zellen mit den Hemmstoffen behandelt. Nach DNA-Doppelstrangbruch-Induktion durch PvuII wurden die Zellen entsprechende Zeit inkubiert und zu angegebenen Zeitpunkten der alkalischen SCGE unterzogen. Wie in den Abb. 37 A und B dargestellt, führte die Behandlung mit WM zu einer beeinträchtigten DSB-Reparatur nur in den p53-profizienten Zellen. Bei den p53-defizienten Zellen war kein Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne WM detektierbar. Das deutet darauf hin, daß p53 und DNA-PK_{CS} gemeinsam oder zumindest auf einer Ebene am DNA-Doppelstrangbruch agieren. Ein anderes Bild zeigt sich in den Abb. 37 C und D. Hier führt die Behandlung der Zellen mit 3-AB zu keiner veränderten DNA-Doppelstrangbruchreparatur in den p53-profizienten Zellen aber zu einer beeinträchtigten Reparatur in den p53-defizienten Zellen. Das deutet auf einen additiven Effekt des Fehlens von p53 und PARP-Aktivität im Rahmen der Reparatur PvuII-induzierter DSBs hin. Wenn p53 jedoch vorhanden und aktiv ist, dann hat die Hemmung von PARP keinen meßbaren Einfluß auf die Reparatur.

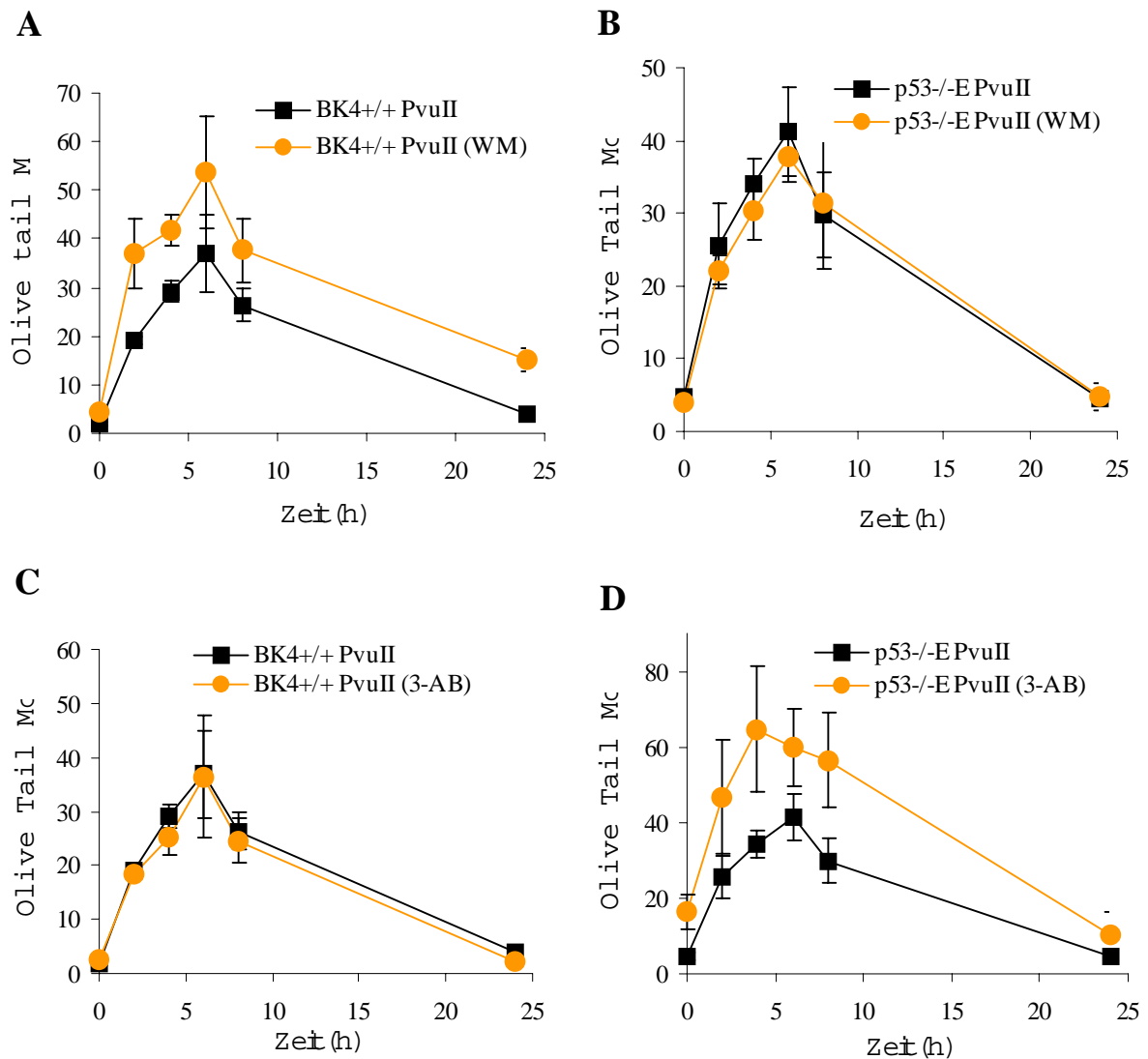


Abb. 37: Alkalische SCGE zum Nachweis PvuII-induzierter Strangbrüche in BK4+/+ und p53-/-E Zellen nach Behandlung der Zellen mit WM und 3-AB. Zellen wurden mit PvuII elektroporiert und für die SCGE unter alkalischen Bedingungen aufgearbeitet. Kontrollwerte waren a) nicht behandelt, b) nur mit WM oder 3-AB behandelt und c) nur mit 400 U PvuII elektroporiert und sofort aufgearbeitet worden (es war jeweils keine erhöhte DSB-Rate detektierbar). **A)** BK4+/+ Zellen und **B)** p53-/-E Zellen wurden 12 h vor und nach PvuII-Elektroporation mit 5 μ M WM behandelt. **C)** BK4+/+ Zellen und **D)** p53-/-E Zellen wurden 12 h vor und nach PvuII-Elektroporation mit 2 mM 3-AB behandelt.

3.3.6.2 Einfluß von p53 auf die PvuII-induzierte Apoptose bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit Wortmannin und 3-Aminobenzamid

Nachdem beobachtet wurde, daß die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zumindest von p53 und DNA-PK_{CS} beeinflußt wird, stellte sich die Frage nach der physiologischen Auswirkung der DNA-Doppelstrangbruchreparatur in An- bzw. Abwesenheit von p53 und gleichzeitiger Hemmung von DNA-PK_{CS} und PARP hinsichtlich der Apoptose-Induktion. Wie die Abb. 38 A und B zeigen, hat die Hemmung von DNA-PK_{CS} durch WM keinen Einfluß auf die DNA-Doppelstrangbruch-induzierte Apoptose in BK4+/+ Zellen, die ohnehin unter diesen Versuchsbedingungen nur marginal Apoptoseinduktion aufwiesen (siehe auch Abb. 20). Die Hemmung von DNA-PK_{CS} in p53^{-/-}E Zellen hingegen führte nach PvuII-Behandlung zu einer um ~50% erniedrigten Apoptoserate im Vergleich zu nicht mit WM behandelten Zellen. Die Nekroserate war nicht verändert. Die Ergebnisse lassen sich daher interpretieren, daß p53 in Zellen mit DNA-PK_{CS}-Aktivität eine antiapoptotische Wirkung hat und daß diese Wirkung bei Hemmung von DNA-PK_{CS} vermindert wird. In der p53-profizienten Zelle hingegen kommt der Apoptose-Induktion keine große Bedeutung zu, weil p53 vorhanden ist und übergeordnete Funktionen wahrnimmt.

Ein ähnliches Bild ergab sich wie in Abb. 38 C und D dargestellt. Die Behandlung der Zellen mit dem PARP-Inhibitor 3-AB hatte keine Auswirkung auf die PvuII-induzierte Apoptose in den p53-profizienten BK4+/+ Zellen. In den p53^{-/-}E Zellen war die Apoptoserate hingegen um ~50% verringert. Die Nekroserate blieb jeweils unverändert. Diese Ergebnisse zur Grundlage nehmend, könnte man spekulieren, daß durch die Hemmung von PARP die DSB-Reparatur beeinträchtigt wird, daß mehr DSBs persistieren und daß dies zu einer Verzögerung des Zellzyklus' führt. Letzteres könnte daher der Grund sein, daß eine geringere Apoptoserate gemessen wurde. Diese Hypothese hat jedoch keine Bedeutung in den BK4+/+ Zellen, da hier p53 übergeordnete Funktionen ausübt.

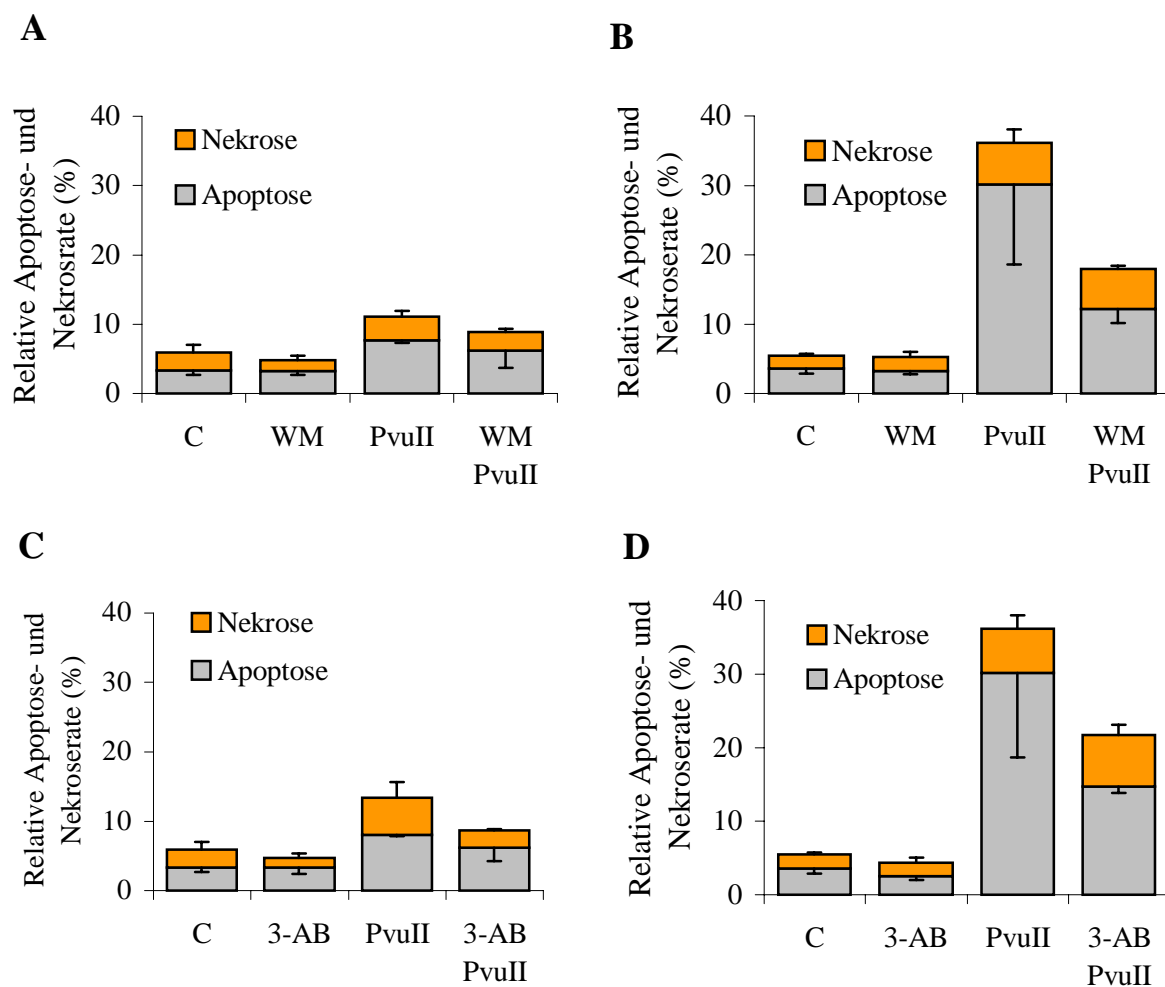


Abb. 38: Quantifizierung der PvuII-induzierten Apoptose- und Nekrose rate in BK4+/+ und p53-/E Zellen nach Behandlung mit WM und 3-AB. Die Zellen wurden 72 h nach Elektroporation mit PvuII durch Trypsinieren geerntet, mit Annexin-V und Propidiumiodid gefärbt und im FACS quantifiziert. **A)** BK4+/+ und **B)** p53-/E Zellen wurden 12 h vor und nach der Elektroporation mit 5 μ M WM behandelt. **C)** BK4+/+ und **D)** p53-/E Zellen wurden 14 h vor und nach der Elektroporation mit 2 mM 3-AB behandelt. Kontrollansätze waren mit entsprechender Menge DMSO behandelt worden.

3.3.6.3 Vergleich DNA-PK_{CS}-profizienter (Balb/c) und -defizienter (Scid) Mausfibroblasten hinsichtlich der Prozessierung PvuII-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche

Nach der Untersuchung der Reparaturkapazität und der Apoptose-Induktion nach PvuII-induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen in Abhängigkeit vom p53-Status sowie der gleichzeitigen Hemmung von DNA-PK_{CS} oder PARP erfolgte im weiteren die Untersuchung von DNA-PK_{CS}-profizienten und -defekten Mausfibroblasten-Zelllinien Balb/c und Scid. In der Abb. 39 ist die PvuII-induzierte DNA-Doppelstrangbruchrate in Balb/c und Scid Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt. DNA-PK_{CS}-defekte Zellen wiesen in den ersten 8 h nach Behandlung höhere Strangbruchraten auf als die Kontrollzelle Balb/c. Nach 24 h war kein Unterschied mehr zwischen Balb/c und Scid Zellen zu

detektieren. DNA-PK_{CS} ist folglich ein wichtiger Faktor in der DNA-Strangbruchreparatur, jedoch kann eine Reparatur von DNA-Strangbrüchen offenbar auch in Abwesenheit von DNA-PK_{CS} erfolgen.

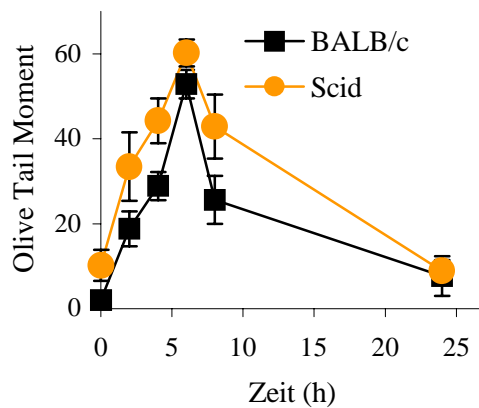


Abb. 39: Alkalische SCGE zum Nachweis PvuII-induzierter Strangbrüche in Balb/c und Scid Mausfibroblasten. Zellen wurden mit 400 U PvuII elektroporiert und zu angegebenen Zeitpunkten für die alkalische SCGE aufgearbeitet.

Des Weiteren wurde die PvuII-induzierte Apoptose in den Zelllinien Balb/c und Scid gemessen. Wie in Abb. 40 dargestellt, führten DNA-Doppelstrangbrüche 72 h nach Behandlung zu ~20% Apoptose- und ~7% Nekroserate sowohl in den Balb/c als auch den Scid Zellen. Da kein Unterschied in der Apoptose-Induktion zu detektieren war, und da bekannt ist, daß beide Zelllinien intaktes p53 besitzen (siehe Abb. 6), kann geschlußfolgert werden, daß DNA-PK_{CS} zwar Einfluß auf die Strangbruchreparatur nicht jedoch auf die Apoptose-Induktion ausübt.

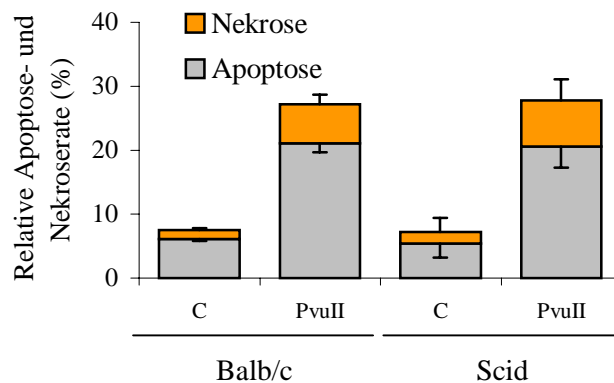


Abb. 40: Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate in Balb/c und Scid Mausfibroblasten. Die Zellen wurden 72 h nach Elektroporation mit PvuII durch Trypsinieren geerntet, mit Annexin-V und Propidiumiodid gefärbt und im FACS quantifiziert. Kontrollen waren mit hitzeinaktiviertem PvuII elektroporiert worden.

4. Diskussion

4.1 Postreplikative Reparatur am O⁶-Methylguanin-DNA-Schaden

Zur Substratspezifität von MGMT und der Beeinflussbarkeit durch MMR-Proteine

Die Reparatur der durch alkylierende Agenzien verursachten O⁶-Methylguanin (O⁶-MeG)-Läsionen in der DNA ist für die Integrität der Zelle von entscheidender Bedeutung. Das Reparaturprotein O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) entfernt in einer Ein-Schritt-Reaktion die Methylgruppe vom Guanin und beugt damit den zytotoxischen, mutagenen und klastogenen Auswirkungen dieses Schadens effektiv vor. In vorliegender Arbeit wurde untersucht, ob die Reparatureffizienz von MGMT an O⁶-MeG verändert ist, wenn diese Base mit Thymin fehlgepaart ist, wie es im Zuge der Replikation geschieht (Snow *et al.*, 1984; Spratt & Levy, 1997). Vorliegende unter 3.1.1 beschriebene Untersuchungen zeigen, daß die Reparatureffizienz von MGMT *in vitro* an der O⁶-MeG/C- und O⁶-MeG/T-Basen(fehl)paarung gleich ist. Das Helix-Turn-Helix-Motif von MGMT, welches potentielle hydrophile und elektrostatische DNA-Binde-Bereiche aufweist (Daniels *et al.*, 2000), wird offenbar nicht von der dem O⁶-MeG gegenüberliegenden Base in der Weise beeinflusst, daß das katalytische Zentrum von MGMT beeinträchtigt wird. Des weiteren wurde experimentell überprüft, ob es durch die gleichzeitige Bindung von MMR-Komponenten und MGMT an O⁶-MeG/T zu einer eventuell sterischen Behinderung von MGMT am Substrat kommt, so daß hierdurch die Reparatureffizienz von MGMT beeinträchtigt wird. Daß Proteine der Basenfehlpaarungsreparatur (MMR) sowohl G/T als auch O⁶-MeG/T im MGMT-profizienten Zellsystem erkennen und reparieren, wurde bereits von Sibghat-Ullah & Day III (1992) gezeigt. Mit vorliegenden Arbeiten, die den MGMT-*in vitro*-Aktivitätstest zur Grundlage haben, wurde versucht, die MGMT-Aktivität an den Substraten O⁶-MeG/C und O⁶-MeG/T durch Zugabe von MMR-Proteinen zu beeinflussen. Weder die Zugabe von MMR-Proteinen in Kernproteinextrakten noch gereinigtes MuS α -Protein, was nachweislich an Basenfehlpaarungen bindet (Duckett *et al.*, 1996), konnten die MGMT-Aktivität beeinträchtigen. Daraus kann geschlossen werden, daß die MGMT-Aktivität zumindest *in vitro* nicht von MMR-Proteinen beeinflusst wird und daß folglich beide Reparaturprozesse gleichzeitig stattfinden können.

Protektive Wirkung von MGMT im 2. Zellzyklus nach Behandlung

Oben diskutierte Ergebnisse zur Grundlage nehmend, stellte sich die Frage, ob einer postreplikativen Reparatur der O⁶-MeG-Läsion protektive physiologische Auswirkungen auf das Zellüberleben zukommt. Dazu wurde MGMT in synchronisierten CHO-9AT17-C3 Zellen (mex⁺) mit O⁶-Benzylguanin (O⁶-BG) depletiert (Dolan *et al.*, 1990) und die MGMT-Aktivität quasi induziert, indem am Ende des ersten Zellzyklus das O⁶-BG entfernt wurde. Der zu Beginn des ersten Zellzyklus durch MNNG induzierte O⁶-MeG-Schaden konnte somit im ersten Zellzyklus persistieren und war nur im zweiten Zellzyklus Gegenstand der Reparatur durch MGMT. Die Zytotoxizität der verbleibenden O⁶-MeG-Läsionen wurde mit Hilfe des Koloniebildungs-Tests ermittelt, nachdem die Zellen am Ende des zweiten Zellzyklus trypsiniert und ausgesät wurden. Wie in Abschnitt 3.1.3 dargestellt, kommt auch der postreplikativen Entfernung von O⁶-MeG protektive Wirkung auf das Zellüberleben zu. Das steht im Einklang mit oben beschriebenen Ergebnissen, daß eine Reparatur von O⁶-MeG auch bei Fehlpaarung mit Thymin ungehindert stattfinden kann. Überlebenskurven von CHO-9 Zellen nach MNNG-Behandlung, wie sie von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kaina oftmals ermittelt und bestätigt wurden, wiesen CHO-9 Zellen (mex⁻) bei einer MNNG-Konzentration von 1µM eine Überlebensrate von weniger als 10% zu. Die in vorliegenden Versuchen ermittelten Überlebensraten von CHO-9AT17-C3 Zellen (mex⁺), bei denen MGMT in den ersten zwei Zellzyklen durch O⁶-BG depletiert wurde, waren demhingegen resistenter gegenüber MNNG. Das legt den Schluß nahe, daß der Reparatur von O⁶-MeG möglicherweise auch nach dem zweiten Zellzyklus protektive Wirkung auf das Zellüberleben zukommt.

Was sind die ultimativen Auslöser für die O⁶-MeG-induzierte Klastogenität und Zytotoxizität?

Einerseits sind die molekularen Mechanismen, die infolge der O⁶-MeG-Läsion zur Entstehung von Mutationen und infolgedessen zur onkogenen Transformation führen, bekannt: O⁶-MeG fehlpaart aufgrund veränderter Basenpaarungseigenschaften mit Thymin, was im zweiten Zellzyklus zu einer G/C → A/T Transitionsmutation in 50% der Nachkommen-Zellen führt. Andererseits existieren über die Mechanismen, die ausgehend von O⁶-MeG zur Initiierung von Chromosomenaberrationen bzw. des Zelltodes führen nur Hypothesen (Kaina *et al.*, 1997a, 1998; Kaina, 1998).

Erste Hinweise auf diese molekularen Mechanismen in der Zelle nach Alkylanzien-Exposition gaben Studien, die zeigten, daß die Entstehung von SCEs und Chromosomenaberrationen fast ausschließlich im zweiten Zellzyklus nach Behandlung entstehen (Kaina & Aurich, 1985; Kaina *et al.*, 1993, 1995). Daraus wird geschlußfolgert, daß der O⁶-MeG-Primärschaden nicht direkter Auslöser der Klastogenität ist, und daß weiteren Prozeßintermediaten dieses Schadens Bedeutung innerhalb der Signalkaskade zukommen muß. Diese Beobachtungen decken sich mit dem zeitlichen Erscheinen der O⁶-MeG/T-Fehlpaarungen, die erst im Zuge der ersten Replikation nach Behandlung entstehen. O⁶-MeG/T ist Substrat der MMR (Snow *et al.*, 1984; Spratt & Levy, 1997). Mit diesen Ergebnissen wird die MMR mit der Klastogenität und Zytotoxizität der O⁶-MeG-Läsion kausal in Zusammenhang gebracht (Karran & Bignami, 1992).

Weitere Hinweise auf das eigentliche klastogene Moment des O⁶-MeG-Primärschadens geben unter anderem eigene Untersuchungen, in denen Chromosomenaberrationen durch Restriktionsendonukleasen erzeugt wurden und somit nachgewiesen werden konnte, daß es zur Entstehung von Aberrationen des DNA-Doppelstrangbruches (DSB) bedarf (siehe Abschnitt 3.3.5; Natarajan & Obe, 1978; Natarajan *et al.*, 1980; Obe *et al.*, 1982; Nowak & Obe, 1984). Wenn die Prozessierung der O⁶-MeG-Läsion sowohl MMR als auch DSBs als Intermediate involviert, so kann man spekulieren, daß die MMR am O⁶-MeG/T zu DSBs führt.

Einen zusätzlichen Hinweis auf die Bedeutung eines Sekundärschadens als Folge der O⁶-MeG-Läsion geben die Arbeiten von Zhukovskaya *et al.* (1994), die zeigten, daß es infolge von γ -Strahlung und DNA-Ethylierung zu einem unverzüglichen Replikationsarrest, nach Methylierungsschaden aber erst nach einem Zellzyklus zum Replikationsblock kommt. Eine sich aufzwingende Parallelität ist die Beobachtung, daß DSBs klassische Replikationsblock-induzierende Läsionen sind (Nelson & Kastan, 1994).

Weitere wichtige Indizien für den eigentlichen zytotoxischen und klastogenen Auslöser infolge der O⁶-MeG-Läsion erhielt man aus Untersuchungen MMR-defekter Tumorzelllinien (Branch *et al.*, 1993; Kat *et al.*, 1993; Branch *et al.*, 1995; Risinger *et al.*, 1995) und Zellen des „Toleranz“-Phänotyps (Goldmacher *et al.* 1986; Karran & Bignami, 1992; Dosch *et al.*, 1998). Wie von Dosch *et al.* (1998) detailliert beschrieben, weist der auch von mir verwendete „tolerante“ CHO-Zellklon TK22cos9/5-1/2-C1M (Fritz *et al.*, 1993) eine stark verringerte G/T-Bindungsaktivität auf, was für die erhöhte Resistenz gegenüber O⁶-MeG-generierenden Agenzien und verändertem Wachstumsverhalten dieser Zelllinie verantwortlich gemacht wird. Auch Goth-Goldstein & Hughes (1987), Aquilina *et al.* (1989), Grenn *et al.* (1989) und Galloway *et al.* (1995) haben gezeigt, daß MMR-defekte „tolerante“ Zellen resistenter sind hinsichtlich der klastogenen und zytotoxischen Wirkung von alkylierenden

Substanzen wie MNNG. Zudem zeigen die in Abschnitt 3.2.3.3 beschriebenen Experimente, daß „tolerante“ Zellen keine erhöhte DSB-Rate nach MNNG-Behandlung aufweisen, womit sich diese Zellen in der Einzelzellgelelektrophorese wie MGMT-profiziente/MMR-profiziente Zellen verhalten; in MGMT-defizienten/MMR-profizienten Zellen hingegen kommt es nach ungefähr einem Zellzyklus nach Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der DSB-Rate. Ein ausgezeichnetes Modellsystem zur Trennung der zytotoxischen und tumorigenen Effekte der O⁶-MeG-Läsion haben Kawate *et al.* (1998) mit MGMT-MLH1-Doppelknockout-Mäusen geschaffen (MLH1 ist Bestandteil der MMR): Nach MNU-Exposition zeigten MGMT^{+/+}/MLH1^{+/+}-Mäuse gutes Überleben und keine Tumore, zeigten MGMT^{-/-}/MLH1^{-/-}-Mäuse gutes Überleben und ca. ¾ aller Tiere Tumore, zeigten MGMT^{+/+}/MLH1^{-/-}-Mäuse gutes Überleben und ca. 50% aller Tiere Tumore und hatten MGMT^{-/-}/MLH1^{+/+}-Mäuse sehr schlechte Überlebenschancen.

Zusätzlich zeigten Wu *et al.* (1999), daß MMR-defekte Zellen resistenter sind hinsichtlich der Apoptose-Induktion durch aromatische Amine und polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe; daher könne der MMR eine initiiierende Funktion innerhalb der Signalkaskade der Apoptose zugewiesen werden, so die Autoren. Auch Meikrantz *et al.* (1998) konnten zeigen, daß Alkylierungen am O⁶-Guanin Apoptose induzieren. Aus diesen Ergebnissen kann man ersehen, daß zumindest ein Teil des Alkylanzien-induzierten, MMR-vermittelten Zelltodes auf Apoptose zurückzuführen ist. Wie aus eigenen Untersuchungen hervorgeht, macht die Apoptose jedoch nur einen Teil des Zelltodes aus. Alkylanzien führen auch zu Nekrose und mitotischem Zelltod, was im Hinblick auf eigene Ergebnisse, daß DSBs selektiv Apoptose induzieren (siehe Abschnitt 3.3.3), darauf schließen läßt, daß alkylierende Agenzien ihre Zytotoxizität nicht ausschließlich über DSBs entfalten.

Weitere Hinweise auf den eigentlichen Auslöser der Klastogenität und Zytotoxizität gaben Untersuchungen von Chen & Jinks-Robertson (1998), die der MMR regulatorische Funktion innerhalb der mitotischen Rekombination in Hefe zuweisen - einem Prozeß, in dem DSBs transient entstehen (Würgler & Fahrig, 1993; Pfeiffer *et al.*, 2000). Diese Arbeiten werden unterstützt von Versuchsergebnissen von Dudenhöfer *et al.* (1998) und Süsse *et al.* (2000), die eine Beteiligung von p53 an der MMR-beeinflußten homologen Rekombination propagieren. Daß die Wirkweise von p53 hauptsächlich auf das Vorhandensein von Strangbrüchen ausgerichtet ist, und sich damit eine weitere Parallele zu DSBs aufzeigt, ist durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt worden (Ko & Prives, 1996).

Alle hier beschriebenen Indizien zusammenfassend, kann man sagen, daß es nicht der O⁶-MeG-Primärschaden ist, der als ultimativer Auslöser der Klastogenität und Zytotoxizität in Frage kommt. Für die Entstehung von Chromosomenaberration sind DSBs Voraussetzung. Diese könnten im Zuge

der MMR entstehen und zwar, wie die hier vorliegende Arbeit (Abschnitt 3.2.3.3) zeigt, frühestens zu Beginn des zweiten Zellzyklus nach Behandlung mit MNNG. Der genaue Mechanismus, wie die MMR am O⁶-MeG/T zum DSB führt, ist unbekannt. Es wird spekuliert, daß repetitive Basenfalscheinbauten und darauffolgende MMR-Prozesse zum DSB führen könnten. Als ultimatives zytotoxisches Signal, welches die Apoptose-Induktion einleitet, kommen Komponenten der MMR oder der DSB an sich in Frage. DSBs sind, wie in Abschnitt 3.3 ausführlich experimentell untermauert, ultimatives zytotoxisches Signal und Apoptose-Induktor (Lips & Kaina, 2000). Wie Duckett *et al.* (1999) zeigten, ist die DNA-Methylierungsschaden-induzierte p53-Phosphorylierung und somit p53-Aktivierung abhängig von hMutS α und hMutL α . Dies könnte den Zellzyklusarrest und die Apoptose induzieren. Arbeiten von Hickman & Samson (1999), Wu *et al.* (1999) und Ochs & Kaina (2000) zeigten, daß die O⁶-MeG-induzierte Apoptose auch oder hauptsächlich p53-unabhängig erfolgen kann. Diese Ergebnisse stehen in engem Zusammenhang mit eigenen, hier dargelegten Versuchsergebnissen, die p53 eine protektive/antiapoptotische Wirkung zuschreiben und klar gezeigt haben, daß es eine p53-unabhängige Apoptose-Induktion nach DNA-Schädigung gibt. Somit erhärten sich die Indizien, daß es sich beim ultimativen Zytotoxizitäts- und Apoptosesignal um den DSB handelt. Es ist aber nicht auszuschließen, daß die Entstehung von Chromosomenaberrationen und das Signal zum Absterben der Zelle über unterschiedliche Wege verlaufen.

4.2 Die Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Säuger-Zellen

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) werden mit dieser Arbeit ins Zentrum genotoxischer Agenzien-induzierter Zytotoxizität, Apoptose und Klastogenität gestellt. Entscheidende Voraussetzung für diese Arbeit ist die sichere Verwendung einer anerkannten, sensitiven Methode zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen und -Schäden. Große Bedeutung kommt deshalb der von mir für das Institut für Toxikologie etablierten Einzelzellgelelektrophorese (SCGE, „Comet Assay“) unter neutralen und alkalischen Versuchsbedingungen zu. 1984 von Östling & Johanson erstmals beschrieben, wurde die SCGE, vielfach modifiziert, zur sensitivsten Methode, Strangbrüche zu detektieren (Fairbairn *et al.*, 1995; Anderson & Plewa, 1998; Henderson *et al.*, 1998). Wie eigene Experimente zeigten, detektiert die neutrale SCGE nur DSBs wohingegen der alkalische Assay zusätzlich DNA-Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen in der DNA zu detektieren vermag und somit eine erhöhte Sensitivität aufweist.

Gentoxische Agenzien induzieren DNA-Doppelstrangbrüche

Ionisierende Strahlung ist eine klassische gentoxische Noxe. γ -Strahlung induziert dosisabhängig einen linearen Anstieg der Strangbruchrate, wie in der neutralen und alkalischen SCGE, auch von Vijayalaxmi *et al.* (1992, 1993) und Erixon & Cedervall (1995), gezeigt wurde. Dahm-Daphi *et al.* (1994) und Dahm-Daphi & Dikomey (1995) berechneten, daß 1 Gy Röntgenstrahlung initial zu ~1000 SSBs und ~40 DSBs pro Zelle führt. Wie von Dikomey *et al.* (1998) beschrieben, nimmt nach Röntgenbestrahlung sowohl die SSB- als auch DSB-Rate in Abhängigkeit von der Zeit annähernd exponentiell ab, so daß nach ~16-24 h nur noch marginale Strangbruchraten zu detektieren sind; diese Abnahme ist als Maß der DNA-Reparaturkapazität der Zelle erklärbar. Verglichen mit den unter streng standardisierten Bedingungen der neutralen und alkalischen SCGE erhaltenen linear ansteigenden Olive Tail Moment (OTM)-Werten als Maß der DNA-Schädigung nach γ -Bestrahlung kann extrapoliert werden, daß 10 Gy einem OTM von 12 bzw. 35 im neutralen bzw. alkalischen Assay entsprechen. OTM=12 entspräche demzufolge 400 DSBs in der neutralen SCGE und OTM=35 400 DSBs und 10.000 SSBs in der alkalischen SCGE. Auch in vorliegender Arbeit konnte, wie zuvor von Dikomey *et al.* (1998) beschrieben, eine Abnahme der γ -Strahlungs-induzierten Strangbruchrate in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet werden. Dabei fällt auf, daß in der ersten Stunde nach Bestrahlung eine sehr hohe Abnahme der DSB-Rate in Folge von DNA-Reparatur stattfindet, die sich im weiteren Verlauf stark verlangsamt. Der Grund für diese Beobachtung ist, daß direkt nach Bestrahlung eine große Anzahl an DSBs vorliegt, die als Substrat für DSB-Reparaturenzyme dienen; die Kinetik verlangsamt sich automatisch durch Abnahme der Substratmenge bzw. durch Sättigung des Reparatursystems.

Eine veränderte DSB-Induktions- und Reparaturkinetik ist nach Behandlung von Zellen mit alkylierenden Agenzien zu beobachten. Sowohl MMS als auch MNNG induzieren nach einer Inkubationszeit von 12 bis 24 h nach Exposition DSBs (siehe Abschnitt 3.2.3). Die initiale DNA-Schädigung, mit der alkalischen SCGE untersucht, ist in allen untersuchten Zelllinien innerhalb von 2 h nach Exposition auf Kontrollniveau abgesunken. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß der durch diese Agenzien induzierte Primärschaden erst nach Prozessierung durch Reparaturproteine oder durch Behinderung der Replikationsmaschinerie zum Doppelstrangbruch wird. Welche Zwischenprodukte dabei von Bedeutung sind, eventuell SSBs, ist unklar.

Die protektive Wirkung des Reparaturenzyms MGMT auf MNNG-induzierte DNA-Schädigung konnte mit Hilfe der neutralen SCGE gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.2.3.3). MGMT-defiziente Zellen sind nicht wie MGMT-profiziente Zellen in der Lage, den durch MNNG induzierten O⁶-MeG-

Schaden effektiv zu reparieren, so daß es in den mex⁻-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der DSB-Rate frühestens nach 12 h Inkubationszeit nach Behandlung kommt. MGMT kann somit eine protektive Wirkung auf die DSB-induzierende Wirkung von MNNG zugeschrieben werden. Einem DSB-Maximum von OTM=9 der MGMT-defizienten Zelllinie 40 h nach Behandlung mit 10 µM MNNG würde nach oben beschriebener Abschätzungsgrundlage ~300 DSBs pro Zelle entsprechen. Ebenfalls protektive Wirkung zeigen Zellen des „Toleranz“-Phänotyps, die nachgewiesenermaßen MGMT-defizient und MMR-defekt sind. In diesen Zellen kommt es nach MNNG-Behandlung wie in den MGMT-profizienten Zellen unter den gegebenen Behandlungsbedingungen zu keinem Zeitpunkt zu einem Anstieg in der DSB-Rate. Dieses Ergebnis weist demzufolge dem MMR-System eine Beteiligung an der MNNG-induzierten DSB-Generierung zu.

Wie von Seker *et al.* (2000) beschrieben, ist Glucose-Ifosfamid mustard zytotoxisch für Zellen. Schon 1986 zeigte Hemminki, daß das durch Metabolisierung von Glucose-Ifosfamid entstehende Ifosfamid mustard ein starkes monfunktionell-alkylierendes und quervernetzendes (*cross-link*) Agens ist, so daß die Frage aufgeworfen wurde, ob diese Substanz, wie andere Alkylanzien auch, ihre zytotoxische Wirkung über die Generierung von DSBs entfaltet. Ein Indiz dafür, daß Glucose-Ifosfamid mustard DSBs induzieren könnte, ist die von Seker *et al.* (2000) beschriebene Aktivierung von PARP, einem Reparaturenzym, welches DNA-Strangbrüche erkennt und bindet. DNA-*Cross-link*-Reparatur-profiziente (V79wt) und -defiziente (V79 CL-V5B) Zellen wurden daher nach Glucose-Ifosfamide mustard-Behandlung mit der neutralen SCGE untersucht. Detektierbare DNA-Schäden wurden zu späten Zeitpunkten (ab dem 2. Tag) nach Behandlung sichtbar, erreichten nach 60 h einen Höhepunkt und fielen wieder ab. Dieser transiente Anstieg der DSB-Rate könnte durch Prozessierung der durch Glucose-Ifosfamid mustard-induzierten DNA-Schäden entstehen und somit einen zytotoxischen Impuls für die Zelle darstellen. Die ab dem Zeitpunkt 60 h nach Behandlung wieder abfallende DSB-Rate ist ein Zeichen dafür, daß es sich hierbei nicht um Apoptose/Nekrose-induzierte DNA-Schäden handelt, da in diesem Falle weiter ansteigende oder zumindest gleichbleibende DSB-Raten hätten erwartet werden können.

Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen unterschiedlicher End-Morphologie

Die Tatsache, daß Strahlung und chemische Agenzien nicht nur DSBs sondern auch SSBs, alkalilabile Stellen, Basenmodifikationen und Rezeptorvermittelte Signalwege induzieren, machte es notwendig, eine Methode zu etablieren, die nur DSBs und keine weiteren pleiotropen Effekte induziert. Durch die Elektroporation von Restriktionsendonukleasen in die Zellen werden DSBs mit definierter End-Morphologie gesetzt und, wie Kontrollexperimente zeigten, keine weiteren Schäden verursacht.

Die Elektroporation der unterschiedlich-schneidenden Enzyme PvuII (stumpfe Enden) und EcoRI (überhängende Enden) in CHO-9 Zellen zeigte, daß beide Enzyme in der Lage sind, DSBs zu induzieren. EcoRI ist effektiver in der DSB-Induktion als PvuII, was mit einer erhöhten Aktivität des Enzyms aufgrund langsameren Abbaus durch Proteasen oder aufgrund der Tatsache, daß das Zellmilieu eher den optimalen Reaktionsbedingungen entspricht, möglicherweise erklärt werden könnte. Das Maximum der DSB-Induktion wird in Abhängigkeit von den verwendeten Zelllinien nach 3-6 h erreicht. Danach überwiegen die DNA-Reparaturprozesse, so daß nach 24 h nur noch marginale DSB-Raten, die sich den Kontrollwerten annähern, zu detektieren sind. Der Vergleich der Reparaturkinetiken der durch PvuII und EcoRI induzierten DSBs zeigt, daß beide Arten von DSBs von CHO-9 Zellen mit gleicher Effektivität repariert werden. Somit kann die vermehrte Chromosomenaberrationsfrequenz in mit PvuII im Gegensatz zu mit EcoRI elektroporierten Zellen nicht auf eine verlangsamte Reparatur von stumpfen versus überhängenden DNA-Enden zurückgeführt werden. Beide DSB-Arten sind vermutlich Gegenstand der NHEJ-Reparatur, deren Komponenten stumpfe aber auch überhängende DNA-Enden miteinander verknüpfen können und die für die rasche DSB-Reparatur in Säuger-Zellen hauptverantwortlich sein sollen. Daher kann man spekulieren, daß DNA-Enden mit stumpfer Morphologie zwar repariert werden, daß diese Reparatur aber nicht so präzise und fehlerfrei verläuft wie die von DNA-Enden mit überhängender Morphologie, was infolgedessen zu erhöhter Klastogenität, Zytotoxizität und Apoptose-Induktion nach Behandlung mit PvuII führt (siehe Abschnitt 4.3). Eine weitere Erklärung könnte sein, daß die durch EcoRI erzeugten überhängenden Enden zusätzlich von Proteinen der HR, die auf homologe DNA-Sequenzen angewiesen sind, erkannt und repariert werden, was bekanntermaßen mit einer geringeren Fehlerfrequenz einhergeht und somit zu weniger Aberrationen und verminderter Zytotoxizität führt. So könnte auch spekuliert werden, daß eine Reparatur durch HR, die relativ fehlerfrei ist, langsamer ist, und es infolgedessen zu der insgesamt verlangsamten Reparaturkinetik nach EcoRI-Elektroporation kommt.

Einfluß von p53 und DNA-PK_{CS} auf die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

Wie gezeigt werden konnte, sind genotoxische Agenzien wie γ -Strahlung, MMS, MNNG und besonders die Elektroporation von Restriktionsendonukleasen DSB-Induktoren. Die parallele Verwendung der Zelllinien BK4^{+/+} (p53 wildtyp) und p53^{-/-}E (p53 knockout) ermöglichte hierbei eine Differenzierung DSB-induzierter Zellantworten in Abhängigkeit von p53. Zwar wird p53 weder den Proteinen der HR noch des NHEJ direkt zugerechnet, aber jüngste Untersuchungen unterstützen Hypothesen, daß p53 mehr ist als ein akzessorisches Protein innerhalb der DSB-Reparatur. Im

Gegensatz dazu ist die entscheidende Funktion der DNA-abhängigen Proteinkinase bzw. deren katalytische Untereinheit (DNA-PK_{CS}) innerhalb des NHEJ unbestritten.

Wie vorliegende Untersuchungen zeigen, führt ein Fehlen von p53 oder DNA-PK_{CS} zu erhöhter DSB-Rate mit Maxima zu späten Zeitpunkten sowohl nach MNNG- als auch nach MMS-Behandlung. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß sowohl p53 als auch DNA-PK_{CS} indirekt an der Protektion Alkylanz-vermittelter Zytotoxizität beteiligt sind. Nach Entstehung der DSBs kommt es zu einer länger anhaltenden Persistenz dieser DNA-Schäden, was für die erhöhte Sensitivität p53- und DNA-PK_{CS}-defekter Zellen mitverantwortlich sein könnte. Der Vergleich der Reparaturkinetiken der p53-profizienten und -defizienten Zellen nach DSB-Induktion durch PvuII weist p53 eine essentielle Funktion innerhalb dieser DSB-Reparatur zu. Das Fehlen von p53 führt zu einer 2,5 fach höheren DSB-Rate 6 h nach Elektroporation von PvuII, so daß erheblich mehr DSBs über längere Zeit persistieren. Wie auch von Dikomey *et al.* (1998) ausgeführt, könnten diese nicht-reparierten DSBs die eigentliche Ursache für die zytotoxischen und klastogenen Auswirkungen sein. Die Annahme zur Grundlage nehmend, daß die Reparatur dieser DSBs hauptsächlich durch das Protein-System des NHEJ erfolgt, sind diese Hypothesen der verlangsamten Reparatur der p53-defizienten Zellen ein Hinweis auf eine direkte Beteiligung von p53 am NHEJ. Die Ergebnisse der Reparaturkinetiken nach γ -Bestrahlung und PvuII-Elektroporation betrachtend, fällt auf, daß sich p53-profiziente und -defiziente Zelllinien hinsichtlich der DSB-Rate in der ersten (γ -Strahlung) bzw. den ersten drei (PvuII) Stunden nach Behandlung nicht unterscheiden. Das könnte als ein Hinweis darauf gedeutet werden, daß die sofortige Reparatur von DSBs p53-unabhängig erfolgt und erst in Folge anderer oder später einsetzender Mechanismen p53 seine Bedeutung entfaltet. Diese anderen Mechanismen könnten unter Umständen durch Proteine der HR vermittelt sein, die mit p53 auf mannigfaltige Weise interagieren können, so daß gemutmaßt werden kann, daß p53 auch direkte Funktionen innerhalb der HR einnimmt.

Einen interessanten Aspekt zeigen die mit der alkalischen SCGE erhaltenen Ergebnisse auf, daß die Behandlung von Zellen mit Wortmannin, welches in den hier angewendeten Dosen vornehmlich DNA-PK_{CS} hemmt, nur in p53-profizienten nicht aber in p53-defizienten Zellen zu einer beeinträchtigten PvuII-induzierten DSB-Reparatur führt. Dies ist ein starker Hinweis darauf, daß p53 und DNA-PK_{CS} gemeinsam oder zumindest auf einer Linie an der DSB-Reparatur beteiligt sind, was bereits von Wang *et al.* (2000) postuliert wurde. Demhingegen führt die Behandlung dieser Zelllinien mit dem PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid nicht zu einer verminderten DSB-Reparatur in den p53-profizienten Zellen.

4.3 Zellphysiologische Auswirkungen von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die durch unterschiedliche, umweltbedingte Noxen in Zellen entstehenden DSBs sind Läsionen, die schwere Folgen für die Zelle und den Organismus haben können. Das führte im Laufe der Evolution zu einer zellulären Adaptation in der Weise, daß sich sowohl effektive DSB-Reparatursysteme (Yu *et al.*, 1999) als auch die Apoptose zum Schutz des Organismus' vor persistierenden DNA-Schäden (Aravind *et al.*, 1999) entwickelt haben. So werden DSBs von der Zelle erkannt, was zu einer transienten Arretierung des Zellzyklus` führen kann, wodurch die Zeit der präreplikativen DNA-Reparatur vergrößert wird. Alternativ zum Zellzyklusarrest und als Folge nicht-reparierbarer und/oder nicht-reparierter DNA-Schäden kann die Zelle Signale entwickeln, die den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleiten (Schmitt & Lowe, 1999). Kommt es zu ineffizienter oder fehlerbehafteter DNA-Reparatur, können Mutationen entstehen, die, wenn sie Tumorsuppressorgene inaktivieren oder Proto-Onkogene aktivieren, unkontrolliertes Zellwachstum und Tumorbildung zur Folge haben können (Weinberg, 1988; Bryant & Ritches, 1989; Pierotti *et al.*, 1992; Weinberg, 1991; Mitelman *et al.*, 1997; Cheng & Loeb, 1997; Cho & Hendrick, 1997; Hagmar *et al.*, 1998). Andere physiologische Auswirkungen sollen im folgenden diskutiert werden.

DNA-Doppelstrangbrüche sind klastogen

Klassische Arbeiten von Bryant (1984), Obe *et al.* (1985) und Winegar *et al.* (1989), bei denen Restriktionsendonukleasen in Zellen hineingebracht wurden, haben gezeigt, daß DSBs die Voraussetzung für die Entstehung von Chromosomenaberrationen sind. Diese Beobachtungen konnten in eigenen Experimenten bestätigt werden. Sowohl die Elektroporation von PvuII und EcoRI als auch die Behandlung von Zellen mit MMS führte zu einem Anstieg der Chromosomenaberrationsrate. PvuII stellte sich dabei, wie bereits von Winegar & Preston (1988), Moses *et al.* (1990) und Costa & Bryant (1991) beschrieben wurde, als erheblich Chromosomen-schädigender heraus als EcoRI. Wie mit durchgeführten Versuchen auf Grundlage der SCGE gezeigt wurde (vergleiche Abschnitt 3.2.4.1), ist dies offenbar nicht die Folge einer verlangsamten oder ineffizienteren Reparatur von DSBs mit stumpfen Enden im Gegensatz zu DSBs mit überhängenden Enden. Mit Hilfe der SCGE können nur Aussagen über die Quantität nicht aber über die Qualität der reparierten DSBs abgeleitet werden. Vielmehr kann unter Berücksichtigung hier geschilderter Versuche vermutet werden, daß die Reparatur von DSBs mit stumpfen Enden ähnlich rasch erfolgt, möglicherweise aber fehlerbehafteter und ungenauer als es bei DSBs mit überhängender End-Morphologie der Fall ist. So könnte man spekulieren, daß überhängende Enden, die noch über

Wasserstoffbrückenbindungen der Basen zusammenhängen können oder nicht zu weit voneinander entfernt liegen, auch oder vornehmlich von Proteinen der HR erkannt und repariert werden, was zu geringerer Fehlerrate bei der DNA-Reparatur und somit seltener zu Chromosomenaberrationen führt. DSBs mit stumpfen Enden besitzen keine Sequenzhomologie mehr, sind gänzlich voneinander getrennt und somit definitionsgemäß keine Substrate für Proteine der HR. Die Reparatur müßte demzufolge ausschließlich mit Hilfe von Proteinen des NHEJ erfolgen. Diese Reparatur ist effizient, weil sie rasch DNA-Enden miteinander verbindet, geht aufgrund der fehlenden Sequenzhomologien aber vermutlich mit einer höheren Fehlerrate vonstatten, was zu erhöhter Aberrationsfrequenz führt.

Die Exposition von Zellen mit MMS als Beispiel eines monofunktionell-alkylierenden Agens führte ebenfalls zu einer erhöhten Chromosomenaberrationsfrequenz (Dosch & Kaina, 1996; Kaina *et al.*, 1997b; Ochs *et al.*, 1999). In den hier beschriebenen Versuchen sollte zusätzlich auf die Bedeutung von c-Jun innerhalb der alkylierungsinduzierten Chromosomenschädigung fokussiert werden, so wie es in analoger Weise mit c-Fos-Knockout-Zellen durchgeführt wurde (Haas & Kaina, 1995; Kaina *et al.* 1997b). Um von vornherein auszuschließen, daß die Chromosomen, die -stabilität oder der Karyotyp der Zellen verändert ist, so wie es häufig bei etablierten Zelllinien beobachtet werden kann, sollte mit primären Mausfibroblasten (der ersten 4 Passagen) gearbeitet werden.

c-Jun kann mit c-Fos den heterodimeren Transkriptionsfaktor AP-1 bilden, der durch gentoxische Stimuli induzierbar und unter anderem an der Regulation von Genen der Zellzyklusprogression und Apoptose beteiligt ist (Bossy-Wetzel *et al.*, 1997; Schreiber *et al.*, 1999; Kolbus *et al.*, 2000). Wie von Johnson *et al.* (1993) und Hilberg *et al.* (1993) beschrieben wurde, ist c-Jun für die normale Entwicklung des Embryos unentbehrlich, weshalb mit Fibroblasten aus Mausembryonen, die nicht älter als 12 Tage waren, gearbeitet wurde. In vorliegenden Experimenten wurde versucht, primäre Fibroblasten unterschiedlichen c-jun-Genotyps hinsichtlich ihrer klastogenen Antwort auf Alkylanzien-Behandlung zu charakterisieren. Da keine c-jun-knockout-Fibroblasten (c-jun^{-/-}) kultiviert werden konnten, weil sie nach 1-2 Zellzyklen das Wachstum einstellten und auch Wisdom *et al.* (1999) schilderten, daß Zellen des c-jun^{-/-} -Genotyps nach 2-3 Tagen die Apoptose einleiten, wurden die Aberrationsexperimente mit primären Zellen des c-jun^{+/+} (wt) und c-jun^{+/-} -Genotyps der Passagen 3-4 durchgeführt. Da keine Unterschiede in der MMS-induzierten Aberrationsfrequenz zwischen den primären c-jun-homozygoten (wt) und den primären c-jun-heterozygoten Zellen detektiert werden konnten, kann vermutet werden, daß c-Jun entweder keinen Einfluß auf die Chromosomenstabilität hat oder daß ein c-jun-Allel ausreicht, um das Fehlen des anderen Allels zu kompensieren.

DNA-Doppelstrangbrüche induzieren Apoptose

Ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Beweis, daß die Elektroporation von PvuII in Säuger-Zellen selektiv Apoptose induziert (Lips & Kaina, 2000). Sowohl CHO-9 Epithelzellen als auch p53^{-/-}E Mausfibroblasten wiesen nach PvuII-Behandlung zum Teil stark erhöhte Apoptoseraten auf, die erst nach ca. 48-72 h nach Elektroporation stark anzusteigen begannen. Die Nekroserate war nach PvuII-Behandlung der Zellen nicht erhöht. γ -Strahlung hingegen verursacht einen Anstieg sowohl der Apoptose- als auch der Nekroserate, was darauf zurückzuführen ist, daß γ -Strahlung nicht nur die DNA sondern auch wahllos andere Zellbestandteile (Membranen, Proteine, u. a.) schädigt und Rezeptoren zu aktivieren vermag (von Sonntag, 1987; Hallahan *et al.*, 1991). So können die vorliegenden Daten so interpretiert werden, daß PvuII-induzierte DSBs mit stumpfen Enden spezifisch Apoptose induzieren und daß die Methode der Elektroporation so schonend für die Zellen ist, daß weder Apoptose noch Nekrose induziert werden. Demhingegen verursachen alkylierende Substanzen und γ -Strahlung unterschiedliche Schadensmuster in der Zelle, so daß es zur Apoptose-Induktion aber auch zur Bildung nekrotischer Zellen kommt. Die Induktion der Apoptose durch genotoxische Agenzien könnte kausal auf die Entstehung von DSBs zurückzuführen sein.

Grundsätzlich können alkylierende Agenzien über die Aktivierung der sogenannten „Todes“-Rezeptoren wie TNFR-1, Fas und DR5 (Sheik *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1998 und Wu *et al.*, 1999) und über Mitochondrien-Destruktion (Tepper *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999) die Apoptose induzieren. In vorliegenden Untersuchungen konnte mit Hilfe der SCGE gezeigt werden, daß O⁶-MeG-DNA-Schäden zu DSBs führen können, und zwar nicht sofort sondern nach einer Dauer von ca. 1-2 Tagen nach Behandlung. In weitergehenden Experimenten haben Ochs & Kaina (2000) gezeigt, daß der Signaltransduktionsweg vom DSB zur Apoptose von Bcl-2 und Caspase-9/-3 reguliert wird aber nicht über die p53-abhängige Aktivierung von Fas/Caspase-8 verläuft. Somit kommt dem DSB an sich eine initiale Funktion innerhalb der alkylierungsinduzierten Apoptose zu. Im Vergleich zu Studien von Friesen *et al.* (1996), Herr *et al.* (1997) und Kolbus *et al.* (2000), die DNA-Schadens-induzierte Apoptose von funktionellem p53 und dem Fas-Rezeptor/Caspase-8-Signalweg abhängig machen, bleibt die Frage offen, ob der DSB an sich die Aktivierung dieser Rezeptoren bedingt und (auch) so die Apoptose einleiten kann.

Die Nekrose ist die Folge unspezifischer, lethaler Zellschädigungen, die bei der Induktion von DSBs durch Restriktionsendonukleasen nicht in Erscheinung treten. Daraus könnte geschlossen werden, daß beispielsweise Ganciclovir, welches in die DNA inkorporiert und vornehmlich Apoptose induziert (Thust *et al.*, 2000), seine zytostatische Wirkung über die Bildung von DSBs entfaltet.

Die interessante Beobachtung, daß DSBs mit stumpfen Enden (PvuII-induziert) selektiv Apoptose induzieren, DSBs mit überhängenden Enden (EcoRI-induziert) jedoch keine Apoptose (und auch

keine Nekrose) zu induzieren vermögen, stellt ein Phänomen dar, welches zuvor nicht beschrieben wurde. In Zusammenhang mit den Ergebnissen, daß die Elektroporation von EcoRI mindestens ebensoviele DSBs verursacht wie PvuII, die mit ähnlicher Kinetik repariert werden und daß EcoRI im Gegensatz zu PvuII weniger Chromosomenaberrationen erzeugt, kann der DSB als solches vermutlich nicht als alleinige Ursache für die Apoptose-Induktion herangezogen werden. Wie Dikomey *et al.* (1998) beschrieben, sind es nicht die DSBs sondern die persistierenden, nicht- oder falsch-reparierten DSBs, die zum Zelltod führen. In vorliegendem Falle würde das bedeuten, daß PvuII zu einer höheren nicht-reparierten DSB-Rate führen würde als EcoRI. Ebenso wäre es möglich, daß die Reparatur von PvuII-induzierten DSBs fehlerbehafteter ist als die von EcoRI-induzierten DSBs, so daß es aufgrund dessen zu erhöhter Apoptose- und Aberrationsrate kommen könnte.

Wichtiges anti-apoptotisches Protein ist Bcl-2, dessen Expression nach γ -Bestrahlung und nach Elektroporation mit PvuII in CHO-9, p53^{-/-}E und BK4^{+/+} Zellen untersucht wurde. Die Experimente zeigten, daß die Behandlung von Zellen mit PvuII und γ -Strahlung eine Verringerung der Bcl-2-Proteinmenge bewirkt, was zuvor von Ochs & Kaina (2000) nach Behandlung von Zellen mit MNNG beobachtet wurde. Die Verringerung der Bcl-Proteinmenge erfolgte jedoch nur in Zellen, die Apoptose induzierten, nicht in den p53-profizienten BK4^{+/+} Zellen. Somit kann die Abnahme von Bcl-2 als ein Vorgang nach DSB- bzw. bei/vor Apoptose-Induktion angesehen werden. Die antiapoptotische Bedeutung von Bcl-2 innerhalb der Apoptose wird durch Arbeiten von Strasser *et al.* (1994), Chao *et al.* (1995), Zhang *et al.* (1999) und Ochs & Kaina (2000) verdeutlicht. In diesen Arbeiten wird mit einer Überexpression von Bcl-2 die gentoxische Agenzien-induzierte Apoptose gehemmt. Der Mechanismus, über den es durch eine verringerte Bcl-2-Proteinmenge zur Einleitung der Apoptose kommt, wurde in den letzten Jahren untersucht: Eine Abnahme an Bcl-2-Protein führt dazu, daß weniger Raf-1-Kinase-Protein zu den Mitochondrien geleitet wird, so daß Bad-Protein vermehrt in hypophosphorylierter Form vorliegt, dadurch mit Bcl_{XL} dimerisiert, proapoptotisches Bax verdrängt, dieses homodimerisiert und somit aktiviert wird (Yang *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996; Zha *et al.*, 1996). Das führt zu einem erhöhten Cytochrom c-Efflux aus den Mitochondrien, was zur Aktivierung der Caspase-Maschinerie und zur Exekution der Apoptose führt (Liu *et al.*, 1996). Wie von Ochs & Kaina (2000) demonstriert, führt auch die O⁶-MeG-vermittelte Bcl-2-Proteinmengenverringerng zu erhöhtem Cytochrom c-Ausstrom aus den Mitochondrien und folglich zur Aktivierung der Caspase-9 und -3 (Kluck *et al.*, 1997), geht aber nicht einher mit einer Veränderung der Bax- und Bcl_{XL}-Proteinmengen (Reed, 1997). Auch in vorliegender Arbeit konnte nach DSB-Induktion durch γ -Strahlung und Elektroporation von PvuII keine Veränderung von Bax-Proteinmengen beobachtet werden, so daß spekuliert werden kann, daß O⁶-MeG-vermittelte Apoptose

durchaus von DSBs induziert werden könnte und über den von Ochs & Kaina (2000) propagierten Signalweg verläuft.

Daß nicht nur MGMT sondern auch DNA-Polymerase β (Pol β) als Bestandteil der BER der zytotoxischen Wirkung genotoxischer Agenzien entgegenwirken kann, haben Arbeiten von Ochs *et al.* (1999) und Horton *et al.* (2000) demonstriert. Diese Reparatursysteme stellen daher besonders kritische Determinanten in der Tumorthherapie mit alkylierenden Agenzien dar, weil eine Überexpression von MGMT, zum Beispiel durch Dexamethason hervorgerufen, den Erfolg der Behandlung in Frage stellen kann (Matijasevic *et al.*, 1993; Grombacher *et al.*, 1996). Die Untersuchung der additiven Rolle von MGMT und Pol β in der MNNG-, MMS- und BCNU-induzierten Zytotoxizität bzw. in der MNNG-vermittelten Apoptose wurde deshalb mit Hilfe von Zellen durchgeführt, die im Genotyp Pol β^{++}/mex^+ , Pol β^{++}/mex^- , Pol β^{--}/mex^+ und Pol β^{--}/mex^- sind. Erstaunlicherweise zeigten die Pol β^{++}/mex^- und Pol β^{++}/mex^+ -Zellen in gleichem Maße Resistenz gegenüber der MNNG-vermittelten Zytotoxizität und Apoptose-Induktion und sind deutlich resistentere als die Pol β^{--}/mex^+ und die Pol β^{--}/mex^- -Zellen. Aus diesen Ergebnissen kann demzufolge geschlossen werden, daß nicht nur der Aktivität von MGMT sondern auch von Pol β als Teil der BER große Bedeutung innerhalb der Protektion Alkylanzien-induzierter Zytotoxizität zukommt.

p53 wirkt der DNA-Doppelstrangbruch-induzierten Klastogenität und Zytotoxizität entgegen

Da p53 ein Protein ist, welches an zahlreichen zellphysiologischen Vorgängen im allgemeinen und an unterschiedlichen DNA-Reparaturprozessen und der Apoptose im besonderen beteiligt ist, wurden Experimente mit p53-profizienten (BK4+/+) und p53-defizienten (p53-/E) Mausfibroblasten durchgeführt, um konkretere Hinweise auf die Funktion von p53 innerhalb der DSB-induzierten Klastogenität, Zytotoxizität und Apoptose-Einleitung zu erhalten. Wie von Lackinger & Kaina (2000) an primären p53-Knockout-Zellen untersucht wurde, wirkt p53 der direkten und indirekten DSB-induzierten Chromosomen-Schädigung effektiv entgegen, was auf die mannigfaltigen Funktionen von p53 innerhalb der HR (Stürzbecher *et al.*, 1996; Marmorstein *et al.*, 1998; Süsse *et al.*, 2000), des NHEJ (Bristow *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000), der NER (Abramova *et al.*, 1998; Ford *et al.*, 1998; McKay *et al.*, 1999) und sonstiger in die Reparatur involvierte Prozesse zurückgeführt werden kann (Oberosler *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1996; Mummenbrauer *et al.*, 1996; Grombacher *et al.*, 1998).

Im Gegensatz dazu ist die Funktion von p53 in dem Prozeß der Apoptose nicht klar. Arbeiten, die der Apoptose eine p53-Abhängigkeit zuweisen, was zumeist in lymphblastoiden Zellen untersucht wurde (Yonish-Rouach *et al.*, 1991; Clarke *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1993a, b; Lu & Lane, 1993; Strasser *et al.*, 1994; Symonds *et al.*, 1994; Polyak *et al.*, 1997), werden von Arbeiten ergänzt, die klar zeigen, daß der p53-unabhängigen Apoptose in Fibroblasten nach DNA-Schädigung eine ebenso große Bedeutung zukommt (Berges *et al.*, 1993; Kelley *et al.*, 1994; Strasser *et al.*, 1994; Zhuang *et al.*, 1995; Kruyt *et al.*, 1996; Shao *et al.*, 1997; Aladjem *et al.*, 1998; Casenghi *et al.*, 1999; Schmitt & Lowe, 1999; Lackinger & Kaina, 2000). So zeigt vorliegende Arbeit, daß p53 protektiv wirkt, d. h. das Überleben nach Behandlung mit PvuII, γ -Strahlung und Alkylanzien fördert. p53-defiziente Zellen zeigen nach DNA-schädigenden Stimuli eine höhere Apoptoserate als p53-profiziente Zellen. Das kann mit der qualitativ und quantitativ verbesserten DNA-Reparatur in Anwesenheit von p53 erklärt werden, so daß weniger Apoptose-induzierende DNA-Schädigungen persistieren. Demhingegen sollte die Induktion und Exekution der Apoptose von der DNA-Reparatur getrennt werden. p53 ist, zumindest in Mausfibroblasten, nicht erforderlich für die DSB-induzierte Apoptose und kann somit auch nicht als direkter Auslöser der Apoptose in Frage kommen (Malcomson *et al.*, 1995).

Mit diesen Beobachtungen kommen die von Friesen *et al.* (1996), Herr *et al.* (1997), Muller *et al.* (1998) und Kolbus *et al.* (2000) gemachten Aussagen, daß p53, durch DNA-Schädigung aktiviert, über Induktion des FAS/CD95/Apo-1-Systems die Apoptose stimuliert, nicht als alleinige Erklärung in Frage. Da vorliegende Arbeit zeigt, daß DSB-induzierte Apoptose hauptsächlich in p53-defizienten Zellen erfolgt, kann daraus geschlußfolgert werden, daß die Apoptose nicht durch Hochregulation des FAS/CD95/Apo-1-Rezeptors vermittelt wird. Ein wichtiger Hinweis, wie die p53-unabhängige Apoptose induziert und weitergeleitet wird, ist die Beobachtung, daß die Menge des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 mit zunehmender Dosis an DNA-schädigendem Agens abnimmt. Wie von Ochs & Kaina (2000) ausgeführt und bereits oben beschrieben, kann es aufgrund abnehmender Bcl-2-Menge zum mitochondrialen Cytochrom c-Efflux und damit zur Caspase-9/-3-Aktivierung kommen, was den programmierten Zelltod exekutiert. Möglicherweise ist es vom Zellsystem abhängig, welcher Apoptose-Weg beschritten wird (Midgley *et al.*, 1995). Die vorliegende Arbeit unterstützt somit die von Malcomson *et al.* (1995) postulierte Sichtweise, daß p53 protektiv wirkt auf die DSB-induzierte DNA-Reparatur, es aber offensichtlich geringe Bedeutung hat in der DSB-induzierten Apoptose.

Der DSB ist Substrat zahlreicher Enzyme und akzessorischer Proteine, so daß es von Interesse ist, die DSB-Reparatur und die DSB-induzierte Apoptose in p53-profizienten und -defizienten Mausfibroblasten bei gleichzeitiger Hemmung der DNA-PK_{CS} durch Wortmannin oder von PARP durch 3-Aminobenzamid zu untersuchen. Sowohl das alleinige Fehlen von p53 als auch von DNA-PK_{CS} führt zu einer verlangsamten DSB-Reparatur. Im Gegensatz dazu scheinen die Proteine p53 und DNA-PK_{CS} unterschiedliche Funktionen in der DSB-vermittelten Apoptose-Induktion zu haben:

Während p53-defiziente Zellen erheblich höhere DSB-induzierte Apoptoseraten als p53-profiziente Zellen aufweisen, ist kein Unterschied zwischen DNA-PK_{CS}-profizienten (Balb/c) und -defizienten (Scid) Zellen zu beobachten. Die Hemmung von DNA-PK_{CS} durch Wortmannin führte in p53-profizienten nicht aber p53-defizienten Zellen zu einer verlangsamten DSB-Reparatur, was aber keine Auswirkung auf die Apoptose-Induktion durch DSBs in p53-profizienten Zellen hat. Im Gegensatz dazu kommt es in den p53-defizienten Zellen zu einer Verringerung der PvuII-induzierten Apoptose bei DNA-PK_{CS}-Inhibition. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß sowohl p53 als auch DNA-PK_{CS} an der DSB-Reparatur direkt beteiligt sind und daß diese Proteine eine gemeinsame Funktion in der DSB-Reparatur aufweisen, wie bereits von Wang *et al.* (2000) beschrieben. Die Hemmung von PARP durch 3-Aminobenzamid hingegen führte zu keiner veränderten Prozessierung der PvuII-induzierten DSBs in p53-profizienten Zellen. p53-defiziente Zellen, in denen PARP gehemmt wurde, reparieren DSBs noch schlechter als die entsprechenden Kontrollzellen, was auf einen additiven Effekt des Fehlens zweier wichtiger Reparaturproteine zurückgeführt werden kann.

5. Literatur

Abbott, P.J., Saffhill, R. (1979) DNA synthesis with methylated poly(dC-dG) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O⁶-methylguanine. *Biochim. Biophys. Acta* **562**: 51-61

Abramova, N.A., Russell, J., Botchan, M., Li, R. (1997) Interaction between replication protein A and p53 is disrupted after UV damage in a DNA repair-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 7186-7191

Adams, J.M. & Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**: 1322-1326

Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., Stark, G.R. (1995) p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8493-8497

Agarwal, M.L., Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B., Stark, G.R. (1998) The p53 network. *J. Biol. Chem.* **273**: 1-4

Aladjem, M.I., Spike, B.T., Rodewald, L.W., Hope, T.J., Klemm, M., Jaenisch, R., Wahl, G.M. (1998) ES cells do not activate p53-dependent stress response and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Current Biol.* **8**: 145-155

Althaus F.R. & Richter, C. (1987) ADP-ribosylation of proteins - enzymology and biological significance. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* **37**: 1-125

Anderson, D. & Plewa, M.J. (1998) The international comet assay workshop. *Mutagenesis* **13**: 67-73

Aquilina, G., Zijono, A., Moscufo, N., Dogliotti, E., Bignami, M. (1989) Tolerance to methylnitrosourea-induced DNA damage is associated with 6-thioguanine resistance in CHO cells. *Carcinogenesis* **10**: 1219-1223

Aquilina, G., Biondo, R., Dogliotti, E., Meuth, M., Bignami, M. (1992) Expression of the endogenous O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase protects Chinese hamster ovary cells from spontaneous G:C to A:T transitions. *Cancer Res.* **52**: 6471-6475

Aravind, L., Dixit, V.M., Koonin, E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 47-53

Arlett, C.F., Lowe, J.E., Harcourt, S.A., Waugh, A.P.W., Cole, J., Roza, L., Diffey, B.L., Mori, T., Nikaïdo, O., Green, M.H.L (1993) Hypersensitivity of human lymphocytes to UV-B and solar irradiation. *Cancer Res.* **53**: 609-614

Balmain, A., Pragnell, I.B. (1983) Mouse skin carcinomas induced *in vivo* by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. *Nature* **303**: 72-74

Bayle, J.H., Elenbaas, B., Levine, A.J. (1995) The carboxylterminal domain of the p53 protein regulates sequence-specific DNA binding through its nonspecific nucleic acid-binding activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 5729-5733

- Becker, K., Dosch, J., Gregel, C.M., Martin, B.A., Kaina, B. (1996) Targeted expression of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis. *Cancer Res.* **56**: 3244-3249
- Becker, K., Gregel, C.M., 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. *Mutation Res.* **231**: 11-30
- Berges, R.R., Furuya, Y., Remington, L., English, H.F., Jacks, T., Isaacs, J.T. (1993) Cell proliferation, DNA repair, and p53 function are not required for programmed death of prostatic glandular cells induced by androgen ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8910-8914
- Bernofsky, C. (1991) Nucleotide chloramines and neutrophil-mediated cytotoxicity. *FASEB J.* **5**: 295-300
- Bezzubova, O.Y., Shinohara, A., Mueller, R.G., Ogawa, H., Buerstedde, J.M. (1993a) A chicken RAD51 homologue is expressed at high levels in lymphoid and reproductive organs. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1577-1580
- Bezzubova, O.Y., Schmidt, H., Ostermann, K., Heyer, W.D., Buerstedde, J.M. (1993b) Identification of a chicken RAD52 homologue suggests conservation of the RAD52 recombination pathway throughout the evolution of higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5945-5949
- Bhattacharyya, D., Tano, D., Bunick, G.J., Uberbacher, E.C., Behnke, W.D., Mitra, S. (1988) Rapid, large-scale purification and characterization of „ada-protein“ (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6397-6410
- Biedermann, K.A., Sun, J., Giaccia, A.J., Tosto, L.M., Brown, J.M. (1991) Scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1394-1397
- Birnboim, H.C. & Jevcak, J.J. (1981) Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation. *Cancer Res.* **41**: 1889-1892
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcona, M., Nicotera, P., Lipton, S.A. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7162-7166
- Bossy-Wetzel, E., Bakiri, L., Yaniv, M. (1997) Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *EMBO J.* **16**: 1695-1709
- Bouffler, S.D., Kemp, C.J., Balmain, A., Cox, R. (1995) Spontaneous and ionizing radiation-induced chromosomal abnormalities in p53-deficient mice. *Cancer Res.* **55**: 3883-3889
- Boulton, S., Kyle, S., Yalcintepe, L., Durkacz, B.W. (1996) Wortmannin is a potent inhibitor of DNA double-strand break but not single-strand break repair in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* **17**: 2285-2290
- 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., Karran, P. (1993) Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. *Nature* **362**: 652-654
- Branch, P., Hampson, R., Karran, P. (1995) DNA mismatch binding defects, DNA damage tolerance, and mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Cancer Res.* **55**: 2304-2309
- Brennand, J. & Margison, G.P. (1986a) Expression in mammalian cells of a truncated *Escherichia coli* gene coding for O⁶-alkylguanine alkyltransferase reduces the toxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* **7**: 20811-2084
- Brennand, J. & Margison, G.P. (1986b) Reduction of the toxicity and mutagenicity of alkylating agents in mammalian cells harboring the *Escherichia coli* alkyltransferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6292-6296
- Bristow, R.G., Hu, Q., Jang, A., Chung, S., Peacock, J., Benchimol, S., Hill, R. (1998) Radioresistant MTP53-expressing rat embryo cell transformants exhibit increased DNA-dsb rejoining during exposure to ionizing radiation. *Oncogene* **16**: 1789-1802
- Britten, R.J. (1997) Mobile elements inserted in the distant past have taken on important functions. *Gene* **205**: 177-182
- Bryant, P.E. (1984) Enzymatic restriction of mammalian cell DNA using PvuII and BamHI: evidence for the double-strand break origin of chromosomal aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.* **46**: 57-65
- Bryant, P.E. (1985) Enzymatic restriction of mammalian cell DNA: evidence for the double-strand breaks as potentially lethal lesions. *Int. J. Radiat. Res.* **48**: 55-60
- Bryant, P.E. & Ritches, A.C. (1989) Oncogenic transformation of murine C3H10T1/2 cells resulting from DNA double-strand breaks induced by a restriction endonuclease. *Br. J. Cancer* **60**: 852-854
- Bryant, P.E. & Liu, N. (1994) Responses of radiosensitive repair-proficient cell lines to restriction endonucleases. *Int. J. Radiat. Res.* **66**: 597-601
- Bürkle, A., Meyer, T., Hilz, H., zur Hausen, H. (1987) Enhancement of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced DNA amplification in a Simian virus 40-transformed Chinese hamster cell line by 3-aminobenzamide. *Cancer Res.* **47**: 3632-3636
- Bursch, W., Oberhammer, F., Schulte-Hermann, R. (1992) Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**: 245-251
- Caelles, C., Helmberg, A., Karin, M. (1994) p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53 target genes. *Nature* **370**: 220-224
- Cannon, C.E., Golmer, T.M., Coutts, S.B., Kastan, M.B. (1995) Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis. *Genes Dev.* **9**: 600-611
- Casenghi, M., Mangiacasa, R., Tuynder, M., Caillet-Fauquet, P., Elhajouji, A., Lavia, P., Mousset, S., Kirsch-Volders, M., Cundari, E. (1999) p53-independent apoptosis and p53-dependent block of DNA replication following mitotic spindle inhibition in human cells. *Exp. Cell Res.* **250**: 339-350
- Catena, C., Villani, P., Conti, D., Righi, E. (1994) Micronuclei and 3AB index in X-irradiated human lymphocytes in G0 and G1 phases. *Mutation Res.* **311**: 231-237

- Chao, D.T., Linette, G.P., Boise, L.H., White, L.S., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. (1995) Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. *J. Exp. Med.* **182**: 821-828
- Chen, W. & Jinks-Robertson, S. (1998) Mismatch repair proteins regulate heteroduplex formation during mitotic recombination in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 6525-6537
- Cheng, K.C. & Loeb, L.A. (1997) Genomic stability and instability: a working paradigm. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **221**: 5-18
- Cho, K.R. & Hendrick, L. (1997) Genetic alterations in human tumors. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **221**: 149-176
- Chomczynski, P. (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochemistry* **201**: 134-139
- Chowdhury, K. (1991) One step „miniprep“ method for the isolation of plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **19**: 2792
- Church, G.M., Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1991-1995
- Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L., Wyllie, A.H. (1993) Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* **362**: 849-852
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H., Helling (1973) Construction of biologically functional plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 3240-3244
- Conus, S., Kaufmann, T., Fellay, I., Otter, I., Rosse, T., Borner, C. (2000) Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints. *EMBO J.* **19**: 1534-1544
- Costa, N.D. & Bryant, P.E. (1991) Differences in accumulation of blunt- and cohesive-ended double-strand breaks generated by restriction endonucleases in electroporated CHO cells. *Mutation Res.* **254**: 239-246
- Costa, N.D., Masson, W.K., Thacker, J. (1993) The effectiveness of restriction endonucleases in cell killing and mutations. *Somat. Cell Mol Genet.* **19**: 479-490
- Costa, N.D. & Thacker, J. (1996) Mutations induced by DNA double-strand breaks: the influence of genomic site. *Somat. Cell Mol. Genet.* **22**: 249-259
- Critchlow, S.E., Bowater, R.P., Jackson, S.P. (1997) Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr. Biol.* **7**: 588-598
- Cross, S.M., Sanchez, C.A., Morgan, C.A., Schimke, M.K., Ramel, S., Idzerda, R.L., Raskind, W.H., Reid, B.J. (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* **267**: 1353-1356
- Croteau, D.L. & Bohr, V.A. (1997) Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 25409-25412
- Cryns, V. & Yuan, J. (1998) Proteases to die for. *Genes Dev.* **12**: 1551-1570
- Cunningham, R.P. (1997) DNA repair: caretakers of the genome? *Curr. Biol.* **7**: R576-R579

- Dahm-Daphi, J., Dikomey, E., Pyttlik, C. (1994) Relationship between non-reparable strand breaks and cell survival in CHO, CHO K1 and the radiosensitive mutants xrs1 and xrs5. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**: 657-663
- Dahm-Daphi, J. & Dikomey, E. (1995) Separation of DNA fragments induced by ionizing radiation using a graded-field gel electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* **67**: 161-168
- Damalas, A., Ben-Ze'ev, A., Simcha, I., Shtutman, M., Leal, J.F., Zhurinsky, J., Geiger, B., Oren, M. (1999) Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *EMBO J.* **18**: 3054-3063
- Daniels, D.S., Mol, C.D., Arvai, A.S., Kanugula, S., Pegg, A.E., Tainer, J.A. (2000) Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *EMBO J.* **19**: 1719-1730
- Day III, R.S., Ziolkowski, C.H.J., Scudiero, D.A., Meyer, S.A., Mattern, M.R. (1980) Human tumor cell strains defective in the repair of alkylation damage. *Carcinogenesis* **1**: 21-32
- Debbas, M. & White, E. (1993) Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes & Dev.* **7**: 546-554
- Debrauwere, H., Buard, J., Tessier, J., Aubert, D., Vergnaud, G., Nicolas, A. (1999) Meiotic instability of human minisatellite CEB1 in yeast requires DNA double-strand breaks. *Nature Genet.* **23**: 367-371
- Del Sal, G., Guidalberto, M., Schneider, C. (1988) A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucl. Acids Res.* **16**: 9878
- Demple, B. & Karran, P. (1983) Death of an enzyme: suicide repair in DNA. *Trends Biol. Sci.* **8**: 137-139
- de Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., te Riele, H. (1995) Inactivation of the mouse msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell* **82**: 321-330
- Difilippantonio, M.J., Zhu, J., Chen, H.T., Meffre, E., Nussenzweig, M.C., Max, E.E., Ried, T., Nussenzweig, A. (2000) DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature* **404**: 510-514
- Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., Brammer, I., Martensen, R., Kaina, B. (1998) Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* **73**: 269-278
- D'Incalci, M., Citti, L., Taverna, P., Catapano, C.V. (1988) Importance of the DNA repair enzyme O⁶-alkylguanine alkyltransferase (AT) in cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.* **15**: 279-292
- Ding, R., Pommier, Y., Kang, V.H., Smulson, M. (1992) Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression results in a delay in DNA strand break rejoining. *J. Biol. Chem.* **267**:12804-12812
- Dolan, M.E., Moschel, R.C., Pegg, A.E. (1990) Depletion of mammalian O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O⁶-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5368-5372

- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., Mc Arthur, M.J., Montgomery Jr., C.A., Butel, J.S., Bradley, A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**: 215-221
- Dosch, J. (1996) Induzierbare und konstitutive Mechanismen der Resistenz von Säugerzellen gegenüber alkylierenden Mutagenen. Dissertation, Universität Mainz
- Dosch, J. & Kaina, B. (1996) Induction of c-fos, c-jun, junB, junD mRNA and AP-1 by alkylating mutagens in cells deficient and proficient for the repair protein O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and its relationship to cell death, mutation induction and chromosomal instability. *Oncogene* **13**: 1927-1935
- Dosch, J., Christmann, M., Kaina, B. (1998) Mismatch G-T binding activity and MSH2 expression is quantitatively related to sensitivity of cells to methylating agents. *Carcinogenesis* **19** (4): 567-573
- Doutriaux, M.P., Wagner, R., Radman, M. (1986) Mismatch-stimulated killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 2576-2578
- Duckett, D.R., Drummond, J.T., Murchie, A.I.H., Reardon, J.T., Sancar, A., Lilley, D.M.J., 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. USA* **93**: 6443-6447
- Duckett, D.R., Bronstein, S.M., Taya, Y., Modrich, P. (1999) hMutS α - and hMutL α -dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 12384-12388
- Dudenhöffer, C., Rohaly, G., Will, K., Deppert, W., Wiesmüller, L. (1998) Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 5332-5342
- Dumenco, L.L., Allay, E., Norton, K., Gerson, S.L. (1993) The prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Science* **259**: 219-222
- Dunn, W.C., Tano, K., Horesovsky, G.J., Preston, R.J., Mitra, S. (1991) The role of O⁶-alkylguanine in cell killing and mutagenesis in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* **12**: 83-89
- Durkacz, B.W., Omidiji, O., Gray, D.A., Shall, S. (1980) (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature* **283**: 593-596
- Dutta, A., Ruppert, J.M., Aster, J.C., Winchester, E. (1993) Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature* **365**: 79-82
- Eadie, J.S., Conrad, M., Toorchen, D., Topal, M.D. (1984) Mechanism of mutagenesis by O⁶-methylguanine. *Nature* **308**: 201-203
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**: 817-825
- El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpool, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., Wiman, K.G., Mercer, W.E., Kinzler, K.W.,

- Vogelstein, B. (1994) WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* **54**: 1169-1174
- Erickson, R.P. & Lewis, S.E. (1995) The new human genetics. *Environ. Mol. Mutagen.* **25** (suppl. 26): 7-12
- Erixon, K. & Cedervall, B. (1995) Linear induction of DNA double-strand breakage with X-ray dose, as determined from DNA fragment size distribution. *Radiat. Res.* **142**: 153-162
- Evan, G. & Littlewood, T. (1998) A matter of life and cell death. *Science* **281**: 1317-1321
- Fadeel, B., Zhivotovsky, B., Orrenius, S. (1999) All along the watchtower: on the regulation on apoptosis regulators. *FASEB J.* **13**: 1647-1657
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Res.* **339**: 37-59
- Farzaneh, F., Panayotou, G.N., Bowler, L.D., Hardas, B.D., Broom, T., Walther, C., Shall, S. (1988) ADP-ribosylation is involved in the integration of foreign DNA into the mammalian cell genome. *Nucleic Acids Res.* **16**: 11319-11326
- Featherstone, C. & Jackson, S.P. (1998) DNA repair: the Nijmegen breakage syndrome protein. *Curr. Biol.* **8**: R622-R625
- Feldmann, E., Schmiemann, V., Goedecke, W., Reichenberger, S., Pfeiffer, P. (2000) DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in nonhomologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res.* **28**: 2585-2596
- Fiers, W., Beyeaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P. (1999) More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* **18**: 7719-7730
- Finnegan, D.J. (1994) Retroviruses and transposons: wandering retroviruses? *Curr. Biol.* **4**: 641-643
- Fiscella, M., Ullrich, S.J., Zambrano, M., Shields, M.T., Lin, D., Lees-Miller, S.P., Anderson, C.W., Mercer, W.E., Appella, E. (1993) Mutation of the serine 15 phosphorylation site of human p53 reduces the ability of p53 to inhibit cell cycle progression. *Oncogene* **8**: 1519-1528
- Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M., Kolodner, R. (1993) The human mutator gene MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* **75**: 1027-1038
- Ford, J.M., Baron, E.L., Hanawalt, P.C. (1998) Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation. *Cancer Res.* **58**: 599-603
- Forrester, K., Ambs, S., Lupold, S.E., Kapust, R.B., Spillare, E.A., Weinberg, W.C., Felleybosco, E., Wang, X.W., Geller, D.A., Tzeng, E., Billiar, T.R., Harris, C.C. (1996) Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2442-2447
- Fraker, P.J., King, L.E., Lill-Elghanian, D., Telford, W.G. (1995) Quantification of apoptotic events in pure and heterogenous populations of cells using flow cytometer. *Methods. Cell. Biol.* **46**: 57-76

- Frankenberg-Schwager, M. & Frankenberg, D. (1990) DNA double-strand breaks: their repair and relationship to cell killing in yeast. *Int. J. Radiat. Biol.* **58**: 569-575
- Frenkel, J., Sherman, D., Fein, A., Schwartz, D., Almog, N., Kapon, A., Goldfinger, N., Rotter, V. (1999) Accentuated apoptosis in normally developing p53 knockout mouse embryos following genotoxic stress. *Oncogene* **18**: 2901-2907
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. (1995) DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P.H., Debatin, K.-M. (1996) Involvement of the CD95 (Apo-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Med.* **2**: 574-577
- Fritz, G., Tano, K., Mitra, S. Kaina, B. (1991) Inducibility of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4660-4668
- Fritz, G., Dosch, J., Thielmann, H.W., Kaina, B. (1993) Molecular and cellular characterization of mex-/methylation-resistant phenotype. *J. Biol. Chem.* **268**: 21102-21112
- Fukuhara, M., Hayakawa, K., Sakumi, K., Sekiguchi, M. (1992) Induced synthesis of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in rat hepatoma cells exposed to DNA-damaging agents. *J. Cancer Res.* **83**: 72-77
- Fulop, G.M. & Phillips, R.A. (1991) The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature* **347**: 479-482
- Galloway, S.M., Greenwood, S.K., Hill, R.B., Bradt, C.I., Bean C.L. (1995) A role for mismatch repair in production of chromosome aberrations by methylating agents in human cells. *Mutation Res.* **346**: 231-245
- Gedik, C.M., Ewen, S.W.B., Collins, A.R. (1992) Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **62**: 313-320
- Gellert, M. (1992) V(D)J recombination gets a break. *Trends Genet.* **8**: 408-412
- Giaccia, A.J., Schwartz, J., Shieh, J., Brown, J.M. (1992) The use of asymmetric-field inversion gel electrophoresis to predict tumor cell radiosensitivity. *Radiotherapy and Oncology* **24**: 231-238
- Gilbert, D.M., Neilson, A., Miyazawa, H., DePamphilis, M.L., Burhans, W.C. (1995) Mimosine arrests DNA synthesis at replication forks by inhibiting deoxyribonucleotide metabolism. *J. Biol. Chem.* **270**: 9597-9606
- Gingeras, T.R., Grennough, L., Schildkraut, I., Roberts, R.J. (1981) Two new restriction endonucleases from *Proteus vulgaris*. *Nucl. Acids Res.* **9**: 4525-4536
- Goedecke, W., Eijpe, M., Offenbergh, H.H., van Aalderen, M., Heyting, C. (1999) Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nature Genet.* **23**: 194-198
- Goldmacher, V.S., Cuzick, R.A., 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

- Goth-Goldstein, R. & Hughes, M. (1987) Charakterization of a CHO variant in respect to alkylating agent-induced biological effects and DNA repair. *Mutation Res.* **184**: 139-146
- Gottlieb, R.A., Nordberg, J., Skowronski, E., Babior, B.M. (1996) Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 654-658
- Gottlieb, T.M. & Jackson, S.P. (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigens. *Cell* **72**: 131-142
- Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W., Giaccia, A.J. (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* **379**: 88-91
- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M., Lieber, M.R. (1997) Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* **388**: 492-495
- Grawunder, U., West, R.B., Lieber, M.R. (1998) Antigen receptor rearrangement. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 172-180
- Green, D.R., & Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312
- Green, M.H.L., Lowe, J.E., Petit-Frère, C., Karran, P., Hall, J., Kataoka, H. (1989) Properties of N-methyl-N-nitrosourea-resistant, mex^r derivatives of an SV40-immortalized human fibroblast cell line. *Carcinogenesis* **10**: 893-898
- Green, M.H.L., Lowe, J.E., Harcourt, S.A., Akinluyi, P., Rowe, T., Cole, J., Anstey, A.V., Arlett, C.F. (1992) UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: a potential diagnostic technique. *Mutation Res.* **273**: 137-144
- Green, M.H.L., Waugh, A.P.W., Lowe, J.E., Harcourt, S.A., Cole, J., Arlett, C.F. (1994) Effect of deoxyribonucleosides on the hypersensitivity of human peripheral blood lymphocytes to UV-B and UV-C irradiation. *Mutation Res.* **315**: 25-32
- Greener, A. (1990) *E. coli sure* strain: Clone unclonable DNA. *Strategies* **3**: 5-6
- Grombacher, T., Mitra, S., Kaina, B. (1996) Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes. *Carcinogenesis* **17**: 2329-2336
- Grombacher, T., Eichhorn, U., Kaina, B. (1998) p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. *Oncogene* **17**: 845-851
- Gross, A., Jockel, J., Wie, M.C., Korsmeyer, S.J. (1998) Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* **17**: 3878-3885
- Gu, X.-Y., Bennett, R.A.O., Povirk, L.F. (1996) End-joining of free radical-mediated DNA double-strand breaks *in vitro* is blocked by the kinase inhibitor wortmannin at a step preceding removal of damaged 3' termini. *J. Biol. Chem.* **271**: 19660-19663

- Haas, S. & Kaina, B. (1995) c-fos is involved in the cellular defence against the genotoxic effect of UV radiation. *Carcinogenesis* **16**: 985-991
- Haas, S. (1997) Einfluß des Proto-Onkogens c-fos auf reproduktiven Zelltod, Apoptose, genomische Stabilität und DNA-Reparatur nach Exposition von Zellen mit DNA schädigenden Agenzien. Dissertation, Universität Mainz
- Haber, J.E. (1992) Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Genet.* **8**: 446-452
- Haber, J.E. (1998) The many interfaces of Mre11. *Cell* **95**: 583-586
- Haber, J.E. (1999) DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 271-275
- Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C. (1998) Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and health (ESCH). *Cancer Res.* **58**: 4117-4121
- Hall, R.M. & Collis, C.M. (1995) Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **15**: 593-600
- Hallahan, D.E., Sukhatme, V.P., Sherman, M.L., Virudachalam, S., Kufe, D., Weichselbaum, R.R. (1991) Protein kinase C mediates X-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2156-2160
- Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D., White, E. (1996) The inducible E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes. Dev.* **10**: 461-476
- Harris, L.C., Remack, J.S., Houghton, P.J., Brent, T.P. (1996) Wild-Type p53 suppress transcription of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Research* **56**: 2029-2032
- Hartmann, A. & Speit, G. (1994) Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ. Mol. Mutagen.* **23**: 299-305
- Hartmann, A. & Speit, G. (1995) Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutation Res.* **346**: 49-56
- Hedgpeth, J., Goodman, H.M., Boyer, H.W. (1972) DNA nucleotide sequence restricted by the RI endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 3448-3452
- Hemminki, K. (1986) Reactions of nitrogen mustards with DNA. *IARC Scientific Publication. IARC Lyon* **78**: 55-70
- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., Windebank, S. (1998) The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* **13**: 89-94
- Hendrickson, E., Qin, X.Q., Bump, E., Schatz, D., Oettinger, M., Weaver, D. (1991) A link between double-strand break-related repair and V(D)J recombination: the scid mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4061-4065

- Hermeking, H. & Eick, D. (1994) Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* **265**: 2091-2093
- Herr, I., Wilhelm, D., Böhler, T., Angel, P., Debatin, K.-M. (1997) Action of CD95 (Apo-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO J.* **16**: 6200-6208
- Hickman, M.J. & Samson, L.D. (1999) Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10764-10769
- Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N., Wagner, E.F. (1993) c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* **365**: 179-181
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.-M., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**: 241-251
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* **253**: 49-53
- Horton, J.K., Prasad, R., Hou, E., Wilson, S.H. (2000) Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase β -dependent long patch base excision repair. *J. Biol. Chem.* **275**: 2211-2218
- Huang, L.-C., Clarkin, K.C., Wahl, G.M. (1996) p53-dependent cell cycle arrests are preserved in DNA-activated protein kinase-deficient mouse fibroblasts. *Cancer Res.* **56**: 2940-2944
- Hughes, T.A. & Cook, P.R. (1996) Mimosine arrests the cell cycle after cells enter S-phase. *Exp. Cell Res.* **222**: 275-280
- Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., Lane, D.P. (1992) Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* **71**: 875-886
- Huschtscha, L.I., Jeitner, T.M., Andersson, C.E., Bartier, W.A., Tattersall, M.H.N. (1994) Identification of apoptotic and necrotic human leucemic cells by flow cytometry. *Exp. Cell Res.* **212**: 161-165
- Ioannou, Y.A. & Chen, F.W. (1996) Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis. *Nucleic Acids Res.* **24**: 992-993
- Ishizaki, K., Tsujimura, T., Yawata, H., Fujio, C., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., Ikenaga, M. (1986) Transfer of the E. coli O⁶-methylguanine methyltransferase gene into repair-deficient human cells and restoration of cellular resistance to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin. *Mutation Res.* **166**: 135-141
- Jackson, H. (1964) The effects of alkylating agents on fertility. *Br. Med. Bull.* **20**: 107-114
- Jackson, S.P. & Jeggo, P.A. (1995) DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 412-415
- Jeffreys, A.J., Neil, D.L., Neumann, R. (1998) Repeat instability at human minisatellites arising from meiotic recombination. *EMBO J.* **17**: 4147-4157
- Jeggo, P.A. (1990) Studies on mammalian mutants defective in rejoining double-strand breaks in DNA. *Mutation Res.* **239**: 1-16

- Jeggo, P.A. (1997) DNA-PK: at the cross-roads of biochemistry and genetics. *Mutation Res.* **384**: 1-14
- Jeggo, P.A. (1998a) Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat. Res.* **150**: S80-S91
- Jeggo, P.A. (1998b) DNA repair: PARP - another guardian angel? *Curr. Biol.* **8**: R49-R51
- Johnson, R.S., van Lingen, B., Papaioannou, V.E., Spiegelman, B.M. (1993) A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev.* **7**: 1309-1317
- Jones, M. & Wagner, R. (1981) N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine sensitivity of *E. coli* mutants deficient in DNA methylation and mismatch repair. *Mol. Gen. Genet.* **184**: 562-563
- Jostes, R.F., Hui, T.E., Cross, F.T. (1993) Single-cell gel technique supports hit probability calculations. *Health Physics* **64**: 675-693
- Jürgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., Reed, J.C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4997-5002
- Kaina, B. & Aurich, O. (1985) Dependency of the yield of sister chromatid exchanges induced by alkylating agents on fixation time. Possible involvement of secondary lesions in sister chromatid exchange induction. *Mutation Res.* **149**: 451-461
- Kaina, B. (1987) Correction of alkylation hypersensitivity of CHO-W-27-1 cells by transfection with human DNA. *Carcinogenesis* **8**: 1935-1938
- Kaina, B., van Zeeland, A.A., Backendorf, C., Thielmann, H.W., van de Putte, P. (1987) Transfer of human genes conferring resistance to methylating mutagens, but not UV irradiation and cross-linking agents, into Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2024-2030
- Kaina, B., Fritz, G., Mitra, S., 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** (10): 1857-1867
- Kaina, B., Fritz, G., Coquerelle, T. (1993) Contribution of O⁶-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations: new insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines. *Environ. Mol. Mutagen.* **22**: 283-292
- Kaina, B., Fritz, G., Eschbach, E., Dosch, J., Preuss, I. (1995) Transfer of genes affecting resistance of mammalian cells to alkylating drugs - implications for cancer chemotherapy. In: Zeller, W.J., Eisenbrand, G., Hellmann, K. (eds.) Reduction of anticancer drug toxicity. Pharmacologic, biologic, immunologic and gene therapeutic approaches. *Contrib. Oncol.* Basel, Karger, **48**: 125-141
- Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K., Coquerelle, T. (1997a) Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O⁶-methylguanine in Mex⁻, Mex⁺ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutation Research* **381**: 227-241
- Kaina, B., Haas, S., Kappes, H. (1997b) A general role for c-Fos in cellular protection against DNA-damaging carcinogens and cytostatic drugs. *Cancer Res.* **57**: 2721-2731

- Kaina, B. (1998) Critical steps in alkylation-induced aberration formation. *Mutation Res.* **404**: 119-124
- Kaina, B., Fritz, G., Ochs, K., Haas, S., Grombacher, T., Dosch, J., Christmann, M., Lund, P., Gregel, C.M., Becker, K. (1998) Transgenic systems in studies on genotoxicity of alkylating agents: critical lesions, thresholds and defense mechanisms. *Mutation Res.* **405**: 179-191
- Kamiya, H., Miura, K., Ohtomo, M., Nishimura, S., Ohtsuka, E. (1991) Transforming activity of a c-Ha-ras gene containing O⁶-methylguanine in codon 12. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**: 996-1002
- Kanaar, R., Troelstra, C., Swagemakers, S.M., Essers, J., Smit, B. (1996) Human and mouse homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 DNA repair gene: evidence for functional conservation. *Curr. Biol.* **6**: 828-838
- Kanaar, R., Hoeijmakers, J.H.J., van Gent, D.C. (1998) Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends Cell Biol.* **8**: 483-489
- Karran, P. & Marinus, M.G. (1982) Mismatch correction at O⁶-methylguanine residues in *E. coli* DNA. *Nature* **296**: 868-869
- Karran, P. & Stephenson, C. (1990) Mismatch binding proteins and tolerance to alkylating agents in human cells. *Mutation Res.* **236**: 269-275
- Karran, P. & Bignami, M. (1992) Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage. *Nucleic Acids Res.* **20**: 2933-2940
- Kastan, M.B., Oneykwe, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W. (1991) Participation of p53 in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* **51**: 6304-6311
- Kat, A., Thilly, W.G., Fang, W.H., Longley, M.J., Li, G.-M., Modrich, P. (1993) An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6424-6428
- Kataoka, H., Hall, J., Karran, P. (1986) Complementation of sensitivity to alkylating agents in *Escherichia coli* and Chinese hamster ovary cells by expression of a cloned bacterial DNA repair gene. *EMBO J.* **5**: 3195-3200
- Kawate, H., Sakumi, K., Tsuzuki, T., Nakatsuru, Y., Ishikawa, T., Takahashi, S., Takano, H., Noda, T., Sekiguchi, M. (1998) Separation of killing and tumorigenic effects of an alkylating agent in mice defective in two of the DNA repair genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5116-5120
- Keeney, S., Giroux, C.N., Kleckner, N. (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**: 375-384
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. Currie, A.R. (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in time kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239-357
- Kerr, J.F., Winterford, C.M., Harmon, B.V. (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**: 2013-2026
- King, J.S., Valcarel, E.R., Rufer, J.T., Philips, J.W., Morgan, W.F. (1993) Noncomplementary DNA double-strand break rejoining in bacterial and human cells. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1055-1059

- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**: 1132-1136
- Knudsen, C.M., Tung, K.S., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A., Korsmeyer, S.J. (1995) Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* **270**: 96-99
- Ko, L.J. & Prives, C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* **10**: 1054-72
- Kohn, P.H., Kraemer, K.H., Buchanan, J.K. (1982) Influence of ataxia telangiectasia gene dosage on bleomycin-induced chromosome breakage and inhibition of replication in human lymphoblastoid cell lines. *Exp. Cell Res.* **137**: 387-395
- Kolbus, A., Herr, I., Schreiber, M., Debatin, K.-M., Wagner, E.F., Angel, P. (2000) c-Jun-dependent CD95-L expression is a rate limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 575-582
- Kolenko, V., Uzzo, R.G., Bukowski, R., Bander, N.H., Novick, A.C., Hsi, E.D., Finke, J.H. (1999) Dead or dying: necrosis versus apoptosis in caspase-deficient human renal cell carcinomas. *Cancer Res.* **59**: 2838-2842
- Kruyt, F.A.E., Dijkmans, L.M., van den Berg, T.K., Joenje, H. (1996) Fanconi anemia genes act to suppress a cross-linker-inducible p53-independent apoptosis pathway in lymphoblastoid cell lines. *Blood* **87**: 938-948
- Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V., Kastan, M.B. (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7491-7495
- Labrador, M. & Corces, V.G. (1997) Transposable element-host interactions, regulation of insertion and excision. *Annu. Rev. Genet.* **31**: 381-404
- Lackinger, D. & Kaina, B. (2000) Primary mouse fibroblasts deficient for c-Fos, p53 or for both proteins are hypersensitive to UV light and alkylating agent-induced chromosomal breakage and apoptosis. *Mutation Res.*, in press
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lane, D.P. & Crawford, L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**: 261-263
- Lane, D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-16
- Lavin, M.F., Concannon, P., Gatti, R.A. (1999) Eighth International Workshop on Ataxia-Telangiectasia (ATW8). *Cancer Res.* **59**: 3845-3849
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**: 346-347
- Lees-Miller, S.P., Sakaguchi, K., Ullrich, S.J., Appella, E., Anderson, C.W. (1992) Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5041-5049
- Levan, A. (1938) The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Heredity* **24**: 471-486

- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gateskeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323-331
- Li, R. & Botchan, M.R. (1993) The acidic transcriptional activation domain of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate *in vitro* BPV-1 DNA replication. *Cell* **73**: 1207-1221
- Li, Z., Otevrel, T., Gao, Y., Cheng, H.L., Seed, B., Stamato, T.D., Taccioli, G.E., Alt, F.W. (1995) The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell* **83**: 1079-1089
- Lieber, M.R., Hesse, J.E., Lewis, S., Bosma, G.C., Rosenberg, N., Mizuuchi, K., Bosma, M.J., Gellert, M. (1988) The defect in murine severe combined immunodeficiency: joining of signal sequences but not coding segments in V(D)J recombination. *Cell* **55**: 7-16
- Lieber, M.R. (1997) The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair. *Bioessays* **15**: 233-240
- Lim, J.K. & Simmons, M.J. (1994) Gross chromosomal rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* **16**: 269-275
- Lindahl, T. & Andersson, A. (1972) Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **11**: 3618-3623
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709-715
- Linke, S.P., Clarkin, K.C., Di, L.A., Tsou, A., Wahl, G.M. (1996) A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of a detectable DNA damage. *Genes Dev.* **10**: 934-947
- Lips, J. & Kaina, B. (2000) DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53 deficient fibroblasts. Submitted for publication.
- Lowe, S.W., Earl Ruley, H., Jacks, T., Housman, D.E. (1993a) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* **74**: 957-967
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., Jacks, T. (1993b) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* **362**: 847-849
- Lu, X. & Lane, D.P. (1993) Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: Defects in chromosome instability syndromes? *Cell* **75**: 765-778
- Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., Jacks, T. (1995) p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.* **9**: 935-944
- Malcomson, R.D.G., Oren, M., Wyllie, A.H., Harrison, D.J. (1995) p53-independent death and p53-dependent protection against apoptosis in fibroblasts treated with chemotherapeutic drugs. *Br. J. Cancer* **72**: 952-957
- Maltzman, W. & Czyzyk, L. (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1689-1694

- Marmorstein, L.Y., Ouchi, T., Aaronson, S.A. (1998) The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13869-13874
- Martin, S., Reutlingsperger, C., McGahon, A., Rader, J., van Schie, R., LaFace, D., Gree, D. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **182**: 1545-1556
- Matijasevic, Z., Boosalis, M., Mackay, W., Samson, L., Ludlum, D.B. (1993) Protection against chloroethylnitrosourea by eucaryotic 3-methyladenin DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11855-11859
- Maze, R., Carney, J.P., Kelley, M.R., Glassner, B.J., Williams, D.A., Samson, L. (1996) Increasing DNA repair methyltransferase levels via bone marrow stem cell transduction rescues mice from the toxic effects of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, a chemotherapeutic alkylating agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 206-210
- McKay, B.C., Ljungman, M., Rainbow, A.J. (1999) Potential roles for p53 in nucleotide excision repair. *Carcinogenesis* **20**: 1389-1396
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P., Collins, A. (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A european review. *Mutation. Res.* **288**: 47-63
- McKim, K.S. & Hayashi-Hagihara, A. (1998) mei-W68 in *Drosophila melanogaster* encodes a Spo11 homolog: evidence that the mechanism for initiating homologous recombination is conserved. *Genes Dev.* **12**: 2932-2942
- Meikrantz, W., Bergom, M.A., Memisoglu, A., Samson, L. (1998) O⁶-alkylguanine DNA lesions trigger apoptosis. *Carcinogenesis* **19**: 369-372
- Melcher, A., Gough, M., Todryk, S., Vile, R. (1999) Apoptosis or necrosis for tumor immunotherapy: what's in a name? *J. Mol. Med.* **77**: 824-833
- Mello Filho, A. & Meneghini, R. (1984) *In vivo* formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **781**: 56-63
- Michalek, K., Pool-Zobel, B.L., Rehner, G. (1993) Application of the single cell microgel electrophoresis to detect genotoxic effects in rat pancreatic cells. *Mutation Res.* **291**: 256
- Michieli, P., Chedid, M., Lin, D., Peirce, J.H., Mercer, W.E., Givol, D. (1994) Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res.* **54**: 3391-3395
- Midgley, C.A., Owens, B., Briscoe, C.V., Brynmor Thomas, D., Lane, D.P. (1995) Coupling between gamma irradiation, p53 induction and the apoptotic response depends upon cell type *in vivo*. *J. Cell Science* **108**: 1843-1848
- Mitelman, F., Mertens, F., Johannson, B. (1997) A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature Genet.* (Special Issue): 417-474
- Mitra, G., Pauly, G.T., Kumar, R., Pei, G.K., Hughes, S.H., Moschel, R.C., Barbacid, M. (1989) Molecular analysis of O⁶-substituted guanine-induced mutagenesis of ras oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8650-8654

- Mitra, S. & Kaina, B. (1993) Regulation of repair of alkylation damage in mammalian genomes. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **44**: 109-142
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C. (1994a) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* **9**: 1799-1805
- Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., Reed, J.C. (1994b) Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res.* **54**: 3131-3135
- Miyashita, T. & Reed, J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**: 293-299
- Morita, T., Yoshimura, Y., Yamamoto, A., Murata, K., Mori, M., Yamamoto, H., Matsuhira, A (1993) A mouse homolog of the *Escherichia coli* recA and *Saccharomyces cerevisiae* RAD51 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6577-6580
- Mosca, P.J., Lin, H.-B., Hamlin, J.L. (1995) Mimosine, a novel inhibitor of DNA replication, binds to a 50 kDa protein in Chinese hamster cells. *Nucleic Acids Res.* **23**: 261-268
- Moses, S.A.M., Christie, A.F., Bryant, P.E. (1990) Clastogenicity of PvuII and EcoRI in electroporated CHO cells assayed by metaphase chromosomal aberrations and by micronuclei using cytokinesis-block technique. *Mutagenesis* **5**: 599-603
- Moynahan, M.E., Chiu, J.W., Koller, B.H., Jasin, M. (1999) Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol. Cell* **4**: 511-518
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M., Krammer, P.H. (1998) p53 activates the CD95 (Apo-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med.* **188**: 2033-2045
- Mummenbrauer, T., Janus, F., Müller, B., Wiesmüller, L., Deppert, W., Grosse, F. (1996) p53 protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* **85**: 1089-1099
- Murray, V. (1987) O⁶-methylguanine specifically induces GC → AT transition mutations. *Mutation Res.* **190**: 267-270
- Nakagawa, K., Taya, Y., Tamai, K., Yamaizumi, M. (1999) Requirement of ATM phosphorylation of the human p53 protein at serine 15 following DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2828-2834
- Nakatsuru, Y., Matsukuma, S., Nemoto, N., Sugano, H., Sekiguchi, M., Ishikawa, T. (1993) O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase protects against nitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6468-6472
- Narayanan, P.K., Goodwin, E.H., Lehnert, B.E. (1997) α-Particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res.* **57**: 3963-3971
- Natarajan, A.T. & Obe, G. (1978) Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. I. Utilization of neurospora endonuclease for the study of aberration production in G2 stage of the cell cycle. *Mutation Res.* **52**: 137-149

- Natarajan, A.T., Obe, G., van Zeeland, A.A., Palitti, F., Meijers, M., Verdegaal-Immerzeel, E.A.M. (1980) Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. II. Utilization of neurospora endonuclease for the study of aberration production by X-rays in G1 and G2 stage of the cell cycle. *Mutation Res.* **69**: 293-305
- Natarajan, A.T. & Obe, G. (1984) Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. III. Restriction endonucleases. *Chromosoma* **90**: 120-127
- Natarajan, A.T., Simons, J.W.I.M., Vogel, E.W., van Zeeland, A.A. (1994) Relationship between cell killing, chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and point mutations induced by monofunctional alkylating agents in Chinese hamster cells. A correlation with different ethylation products in DNA. *Mutation Res.* **128**: 31-40
- Nelson, W.G. & Kastan, M.B. (1994) DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1815-1823
- Nicholson, D.W. & Thornberry, N. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 299-306
- Nowak, C. & Obe, G. (1984) On the origin of chromosomal aberrations in human peripheral lymphocytes *in vitro*: I. Experiments with neurospora endonuclease and polyethylene glycol. *Hum. Genet.* **66**: 335-343
- Núñez, M.I., Villalobos, M., Olea, N., Valenzuela, M.T., Pedraza, V., McMillan, T.J., Ruiz De Almodóvar, J.M. (1995) Radiation-induced DNA double-strand break rejoining in human tumour cells. *Br. J. Cancer* **71**: 311-316
- Obe, G., Natarajan, A.T., Palitti, F. (1982) Role of DNA double-strand breaks in the formation of radiation-induced chromosomal aberrations. *Prog. Mutation Res.* **4**: 1-9
- Obe, G., Palitti, F., Tanzarella, C., Degrassi, F., De Salvia, R. (1985) Chromosomal aberrations induced by restriction endonucleases. *Mutation Res.* **150**: 359-368
- Obe, G., Johannes, C., Schulte-Frohlinde, D. (1992) DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* **7**: 3-12
- Obe, G., Eke, P., Johannes, C. (1995) Exposure of CHO cells to AluI: comparison of chromosomal aberrations and cell survival. *Mutation Res.* **362**: 171-174
- Obersler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., Stahl, H. (1993) p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *EMBO J.* **12**: 2389-2396
- Ochs, K., Sobol, R., Wilson, S.H., Kaina, B. (1999) Cells deficient in DNA polymerase β are hypersensitive to alkylating agent-induced apoptosis and chromosomal breakage. *Cancer Res.* **59**: 1544-1551
- Ochs, K. & 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.*, in press
- Ohnishi, T., Wang, X.J., Ohnishi, K., Matsumoto, H., Takahashi, A. (1996) p53-dependent induction of WAF1 by heat treatment in human glioblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 14510-14513

- Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E. (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA-damage and repair in tumor and normal cells measured using the 'comet assay'. *Radiat. Res.* **122**: 86-94
- Olive, P.L., Wlodek, D., Durand, R.E., Banath, J.P. (1992) Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell Res.* **198**: 259-267
- Olive, P.L. & Banath, J.P. (1993) Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and ¹²⁵I dUrd. *Int. J. Radiat. Biol.* **64**: 349-358
- Oltvai, Z.N., Milliman, C., Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates cell death. *Cell* **74**: 609-619
- Oltvai, Z.N. & Korsmeyer, S.J. (1994) Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* **79**: 189-192
- Östling, O. & Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**: 291-298
- Östling, O. & Johanson, K.J. (1987) Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. *Int. J. Radiat. Biol.* **52**: 683-691
- Parker, S.B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A.T., Bradley, A., Olson, E.N., Harper, J.W., Elledge, S.J. (1995) p53-independent expression of p21^{CIP1} in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* **267**: 1024-1027
- Patek, P.Q., Collins, J.L. (1978) Transformed cell lines susceptible or resistant to *in vivo* surveillance against tumorigenesis. *Nature* **276**: 510-511
- Paull, T.T. & Gellert, M. (1998) The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates the repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* **1**: 969-979
- Pegg, A.E. (1990) Mammalian O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.* **50**: 6119-6129
- Pegg, A.E., Dolan, M.E., Moschel, R.C. (1995) Structure, function, and inhibition of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **51**: 167-223
- Pellegata, N.S., Antoniono, R.J., Redpath, J.L., Stanbridge, E.J. (1996) DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: A reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 15209-15214
- Pellicer, A., Robins, D., Wold, B., Sweet, R., Jackson, J., Lowy, I., Roberts, J.M., Sim, G.K., Silverstein, S. (1980) Altering genotype and phenotype by DNA-mediated gene transfer. *Science* **209**: 1414-1422
- Pero, R.W., Sheng, Y., Olsson, A., Bryngelsson, C., Lund-Pero, M. (1996) Hypochlorous acid/N-chloramines are naturally produced DNA repair inhibitors. *Carcinogenesis* **17**: 13-18
- Perucho, M., Hanahan, D., Wigler, M. (1980) Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells. *Cell* **22**: 309-317
- Pfeiffer, P. (1998) The mutagenic potential of DNA double-strand break repair. *Toxicol. Lett.* **96-97**: 119-129

- Pfeiffer, P., Goedecke, W., Obe, G. (2000) Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* **15**: 289-302
- Philips, J.W. & Morgan, W.F. (1994) Illegitimate recombination induced by DNA double-strand breaks in a mammalian chromosome. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5794-5803
- Pierotti, M.A., Santoro, M., Jenkins, R.B., Sozzi, G., Bongarzone, I., Grieco, M., Monzini, N., Miozzo, M., Herrmann, M.A., Fusco, A., Hay, I.D., Della Porta, G., Vecchio, G. (1992) Charakterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and RET and creating the oncogenic sequence RET/PTC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1616-1620
- Pletsa, V., Gentil, A., Margot, A., Armier, J., Kyrtopoulos, S.A., Sarasin, A. (1992) Mutagenesis by O⁶-meG residues within codon 12 of the human Ha-ras proto-oncogene in monkey cells. *Nucleic Acids Res.* **20**: 4897-4901
- Pohl, J., Bertram, B., Hilgard, P., Nowrousian, M.R., Stüben, J., Wießler, M. (1995) D-19575 - a sugar-linked isophosphoramidate mustard derivative exploiting transmembrane glucose transport. *Cancer Chemothe. Pharmacol.* **35**: 364-370
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**: 300-305
- Pool-Zobel, B.L., Klein, R.G., Liegibel, U.M., Kuchenmeister, F., Weber, S., Schmezer, P. (1992) Systemic genotoxic effects of tobacco-related nitrosamines following oral and inhalation administration to Sprague-Dawley rats. *Clin. Invest.* **70**: 299-306
- Potter, P.M., Wilkinson, M.C., Fitton, J., Brennan, J., Cooper, D.P., Margison, G.P. (1987) Charakterization and nucleotide sequence of ogt, the O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase gene of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **15**: 9177-9193
- Prasad, R., Singhal, R.K., Srivastava, D.K., Molina, J.T., Tomkinson, S.H., Wilson, S.H. (1996) Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. *J. Biol. Chem.* **271**: 16000-16007
- 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
- Reed, J.C. (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* **387**: 773-776
- Reed, J.C. (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**: 3225-3236
- Resnick, M.A. & Martin, P. (1976) The repair of double-strand breaks in the nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae* and its genetic control. *Mol. Gen. Genet.* **143**: 119-129
- Risinger, J.I., Umar, A., Barrett, J.C., Kunkel, T.A. (1995) A hPMS2 mutant cell line is defective in strand-specific mismatch repair. *J. Biol. Chem.* **270**: 18183-18186
- Romanienko, P.J. & Camerini-Otero, R.D. (1999) Cloning, characterization and localization of mouse and human SPO11. *Genomics* **61**: 156-169
- Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C. (1998) Bcl-2 prolongs cell survival after bax-induced release of cytochrome c. *Nature* **391**: 496-499

- Roth, D.B. & Wilson, J.H. (1988) Illegitimate recombination in mammalian cells. In: Kucherlapati, R. and Smith, G. (eds.) *Genetic Recombination*. ASM Press, Washington, DC, pp. 621-653
- Roth, D.B. & Craig, N.L. (1998) V(D)J recombination: a transposase goes to work. *Cell* **94**: 411-414
- Ruiz De Almodóvar, J.M., Núñez, M.I., McMillan, T.J., Olea, N., Mort, C., Villalobos, M., Pedraza, V., Steel, G.G. (1994) Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *Br. J. Cancer* **69**: 457-462
- Rydberg, B. (1980) Detection of induced DNA strand breaks with improved sensitivity in human cells. *Radiat. Res.* **81**: 492-495
- Sachs, L. (1991) *Angewandte Statistik*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York)
- Saffhill, R., Margison, G.P., O'Connor, P.J. (1985) Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biochim. Biophys. Acta* **823**: 111-145
- Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1997) Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**: 443-446
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Satoh, M.S. & Lindahl, T. (1992) Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* **356**: 356-358
- Savill, J., Facok, V., Henson, P., Haslett, C. (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *C. Immunol. Today* **14**: 131-136
- Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M. (1997) Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5113-5118
- Schmitt, C.A. & Lowe, S.W. (1999) Apoptosis and therapy. *J. Pathology* **187**: 127-137
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Möhle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P., Wagner, E.F. (1999) Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev.* **13**: 607-619
- Schwartz, J.L., Rotmensch, J., Giovanazzi, S., Cohen, M.B., Weichselbaum, R.R. (1988) Faster repair of DNA double-strand breaks in radioresistant human tumor cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **15**: 907-912
- Schwartz, J.L., Turkula, T., Sagher, D., Strauss, B. (1989) The relationship between O⁶-alkylguanine alkyltransferase activity and sensitivity to alkylation induced sister chromatid exchanges in human lymphoblastoid cell lines. *Carcinogenesis* **10**: 681-685
- Scudiero, D.A., Meyer, S.A., Clatterbuck, B.E., Mattern, M.R., Ziolkowski, C.H.J., Day III, R.S. (1984) Relationship of DNA repair phenotypes of human fibroblasts and tumor strains to killing by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res.* **44**: 961-969
- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., Livingston, D.M. (1997) Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* **88**: 265-275

- Seker, H., Bertram, B., Bürkle, A., Kaina, B., Pohl, J., Koepsell, H., Wießler, M. (2000) Mechanistic aspects of the cytotoxic activity of glufosfamide, a new tumour therapeutic agent. *Br. J. Cancer* **82**: 629-634
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., Lowe, S.W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**: 593-602
- Shall, S. (1995) ADP-ribosylation reactions. *Biochimie* **77**: 313-318
- Shao, R.-G., Shimizu, T., Pommier, Y. (1997) 7-Hydroxystaurosporine (UCN-01) induces apoptosis in human colon carcinoma and leukemia cells independently of p53. *Exp. Cell Res.* **234**: 388-397
- Sheik, M.S., Antimore, M.J., Huang, Y., Fornance Jr., A.J. (1998) Ultraviolet-irradiation-induced apoptosis is mediated via ligand independent activation of tumor necrosis factor receptor 1. *Oncogene* **17**: 2555-2563
- Sheng-Tanner, X., Bump, E.A., Hedley, D.W. (1999) An oxidative stress-mediated death pathway in irradiated human leukemia cells mapped using multilaser flow cytometry. *Radiat. Res.* **150**: 636-647
- Shinohara, A., Ogawa, H., Matsuda, Y., Ushio, N., Ikeo, K., Ogawa, T. (1993) Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nature Genet.* **4**: 239-243 [Published erratum in *Nature Genet.* **5**: 312]
- Sibghat-Ullah & Day III, R.S. (1992) Incision at O⁶-methylguanine:thymine mispairs in DNA by extracts of human cells. *Biochemistry* **31**: 7998-8008
- Siede, W. (1995) Cell cycle arrest in response to DNA damage: lessons from yeast. *Mutation Res.* **337**: 73-84
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**: 184-191
- Sklar, R.M. & Strauss, B. (1981) Removal of O⁶-methylguanine from DNA of normal and xeroderma pigmentosum-derived lymphoblastoid lines. *Nature* **289**: 417-420
- Snow, E.T., Foote, R.S., Mitra, S. (1984) Base-pairing properties of O⁶-methylguanine in template DNA during *in vitro* DNA replication. *J. Biol. Chem.* **259**: 8095-8100
- Sobol, R.W., Horton, J.K., Shinghai, R.K., Prasad, R., Kühn, R., Gu, H., Rajewski, K., Wilson, S.H. (1995) Requirement of mammalian DNA polymerase β in base excision repair. *Nature* **376**: 1-8
- Speit, G., Trenz, K., Schutz, P., Rothfuss, A., Merk, O. (1999) The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicol. Lett.* **110**: 73-78
- Spratt, T.E. & Levy, D.E. (1997) Structure of the hydrogen bonding complex of O⁶-methylguanine with cytosine and thymine during DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3354-3361
- Srivastava, D.K., Vande Berg, B.J., Prasad, R., Molina, J.T., Beard, W.A., Tomkinson, A.E., Wilson, S.H. (1998) Mammalian abasic site base excision repair. *J. Biol. Chem.* **273**: 21203-21209

- Steirum, R.H., van Herwijnen, M.H., Pasma, P.C., Hageman, G.J., Kleinjans, J.C., van Agen, B. (1995) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase increases (+/-)-anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-induced micronuclei formation and p53 accumulation in isolated human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* **16**: 2765-2771
- Strasser, A., Harris, A.W., Jacks, T., Cory, S. (1994) DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* **79**: 329
- Strathern, J.N., Shafer, B.K., McGill, C.B. (1995) DNA synthesis errors associated with double-strand break repair. *Genetics* **140**: 965-972
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dudendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89
- Stürzbecher, H.-W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U., Buchhop, S. (1996) p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J.* **15**: 1992-2002
- Sukumar, S., Notario, V., Martin, Z.D., Barbacid, M. (1983) Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methyl ureas involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature* **306**: 658-661
- Sun, H., Treco, D., Schultes, N.P., Szostak, J.W. (1989) Double-strand breaks at the initiation site for meiotic gene conversion. *Nature* **338**: 87-90
- Süsse, S., Janz, C., Janus, F., Deppert, W., Wiesmüller, L. (2000) Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53. *Oncogene* (in press)
- Sutherland, G.R., Baker, E., Richards, R.I. (1998) Fragile sites still breaking. *Trends Genet.* **14**: 501-506
- Swartz, L.M., Smith, S.W., Jones, M.E.E., Osborne, B.A. (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 980-984
- Swenson, D.H. (1983) Significance of electrophilic reactivity and especially DNA alkylation in carcinogenesis and mutagenesis. In: Hayes, A.W., Schnell, R.C., Miya, T.S (eds.), *Developments in the Science and Practice of Toxicology*, Elsevier, Amsterdam: 247-254
- Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T., Van Dyke, T. (1994) p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression *in vivo*. *Cell* **78**: 703-711
- Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, C.I., Weinberg, R.A., Papageorge, A.G., Scolnik, E.M., Dhar, R., Lowy, D.R., Chan, E.H. (1982) Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* **300**: 143-149
- Tang, W., Willers, H., Powell, S.N. (1999) p53 directly enhances rejoining of DNA double-strand breaks with cohesive ends in γ -irradiated mouse fibroblasts. *Cancer Res.* **59**: 2562-2565
- Tellemann, P., Overkamp, W.J.I., van Wessel, N., Studzian, K., Wetselaar, L., Natarajan, A.T., Zdienicka, M.Z. (1995) A new complementation group of mitomycin C-hypersensitive Chinese hamster cell mutants that closely resembles the phenotype of Fanconi anaemia cells. *Cancer Res.* **55**: 3412-3416

- Tepper, A.D., de Vries, E., van Blitterswijk, W.J., Borst, J. (1999) Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis. *J. Clin. Invest.* **103**: 971-978
- Thacker, J. (1994) The study of responses to 'model' DNA breaks induced by restriction endonucleases in cells and cell-free systems: achievements and difficulties. *Int. J. Radiat. Biol.* **66**: 591-596
- Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**: 1312-1316
- Thust, R., Tomicic, M., Klöcking, R., Voutilainen, N., Wutzler, P., Kaina, B. (2000) Comparising of the genotoxic and apoptosis-inducing properties of ganciclovir and penciclovir in Chinese hamster ovary cells transfected with the thymidine kinase gene of herpes simplex virus-1: implications for gene therapeutic approaches. *Cancer Gene Therapy* **7**: 107-117
- Tishkoff, D.X., Filosi, N., Gaisa, G.M., Kolodner, R.D. (1997) A novel mutation avoidance mechanism dependent on *S. cerevisiae* RAD27 is distinct from DNA mismatch repair. *Cell* **88**: 253-263
- Tong, W.P., Kohn, K.W., Ludlum, D.B. (1982) Modification of DNA by different haloethylnitrosoureas. *Cancer Res.* **42**: 4460-4464
- Truijillo, K.M., Yuan, S.S., Lee, E.Y., Sung, P. (1998) Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11 and p95. *J. Biol. Chem.* **273**: 21447-21450
- Tsukamoto, Y., Ikeda, H. (1998) Double-strand break repair mediated by end-joining. *Genes Cells* **3**: 135-144
- Uberti, D., Schwartz, D., Almog, N., Goldfinger, N., Harmelin, A., Memo, M., Rotter, V. (1999) Epithelial cells of different organs exhibit distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis following DNA insult. *Exp. Cell Res.* **252**: 123-133
- van Zeeland, A.A., Mohn, G.R., Neuhäuser-Klaus, A., Ehling, U.H. (1985) Quantitative comparison of genetic effects of ethylating agents on the basis of DNA adduct formation. Use of O⁶-ethylguanine as molecular dosimeter for extrapolation from cells to the mouse. *Environ. Health Perspect.* **62**: 163-169
- Vaux, D.L. (1993) Toward an understanding of the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 786-789
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutlingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Met.* **184**: 39-51
- Vijayalaxmi, Tice, R.R., Strauss, G.S.H. (1992) Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutation Res.* **271**: 243-252
- Vijayalaxmi, Strauss, G.S.H., Tice, R.R. (1993) An analysis of gamma-ray-induced DNA damage in human blood leucocytes, lymphocytes and granulocytes. *Mutation Res.* **292**: 123-128
- Vogt Sionov, R. & Haupt, Y. (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* **18**: 6145-6157

- Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.A. (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**: 350-351
- von Sonntag, C. (1987) The chemical basis of radiation biology. Taylor and Francis, London
- Wang, H.-G., Rapp, U.R., Reed, J.C. (1996) Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* **87**: 629-638
- Wang, J.C. (1996) DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 635-692
- Wang, S., Guo, M., Ouyang, H., Li, X., Cordon-Cardo, C., Kurimasa, A., Chen, D.J., Fuks, Z., Ling, C.C., Li, G.C. (2000) The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 1584-1588
- Wang, X.W. (1999) Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis. *Anticancer Res.* **19**: 4759-4771
- Ward, J.F. (1985) Biochemistry of DNA lesions. *Radiat. Res.* **104**: 103-111
- Wei, Y.-H. (1998) Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human ageing. *Society Experimental Biol. Med.* **217**: 53-63
- Weinberg, R.A. (1988) Finding an anti-oncogene. *Sci. Am.* **259**: 44-51
- Weinberg, R.A. (1991) Tumor suppressor genes. *Science* **254**: 1138-1146
- Whitacre, C.M., Hashimoto, H., Tsai, M.-L., Chatterjee, S., Berger, S.J., Berger, N.A. (1995) Involvement of NAD-poly(ADP-ribose) metabolism in p53 regulation and its consequences. *Cancer Res.* **55**: 3697-3701
- Whitaker, S.J., Ung, Y.C., McMillan, T.J. (1995) DNA double-strand break induction and rejoining as determinants of human tumour cell radiosensitivity. A pulsed-field gel electrophoresis study. *Int. J. Radiat Biol.* **67**: 7-18
- White, G.R.M., Ockey, C.H., Brennand, J., Margison, G.P. (1986) Chinese hamster cells harbouring the *Escherichia coli* O⁶-alkylguanine alkyltransferase gene are less susceptible to sister chromatid exchange induction and chromosome damage by methylating agents. *Carcinogenesis* **7**: 2077-2080
- Wilson, D.M. & Thompson, L.H. (1997) Life without DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 12754-12757
- Winckler, K., Bach, B., Obe, G. (1988) Survival of *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with the restriction endonucleases AluI. *Int. J. Radiat. Biol.* **54**: 563-566
- Winegar, D.M. & Preston, R.J. (1988) The induction of chromosome aberrations by restriction endonucleases that produce blunt-end or cohesive-end double-strand breaks. *Mutation Res.* **197**: 141-149
- Winegar, R.A., Philips, J.W., Youngbloom, J.H., Morgan, W.F. (1989) Cell electroporation is a highly efficient method for introducing restriction endonucleases into cells. *Mutation Res.* **225**: 49-53
- Winegar, R.A., Lutze, L.H., Rufer, J.T., Morgan, W.F. (1992) Spectrum of mutations introduced by specific types of restriction enzyme-induced double-strand breaks. *Mutagenesis* **7**: 439-445

- Wisdom, R., Johnson, R.S., Moore, C. (1999) c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J.* **18**: 188-197
- Wolkowicz, R., Peled, A., Elkind, N.B., Rotter, V. (1995) Augmented DNA-binding activity of p53 protein encoded by a carboxyl-terminal alternatively spliced mRNA is blocked by p53 protein encoded by the regularly spliced form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6842-6846
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinant. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3469-3478
- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald III, E.R., Meng, R.D., Kao, G., Muschel, R., Yen, T., El-Deiry, W.S. (1999) Induction of TRAIL receptor KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis, but not growth arrest. *Oncogene* **18**: 6411-6418
- Wu, J., Wang, H., Geacintov, N.E., Li, G.-M. (1999) Mismatch repair processing of carcinogen-DNA adducts triggers apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 8292-8301
- Würgler, F.E. & Fahrig, R. (1993) Rekombination. In: Fahrig, R. (Hrsg.), Mutationsforschung und genetische Toxikologie, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, ISBN 3-534-11611-9. Seiten 36-49
- Wurm, R., Burnet, N.G., Duggal, N., Yarnold, J.R., Peacock, J.H. (1994) Cellular radiosensitivity and DNA damage in primary human fibroblasts. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **30**: 625-633
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D. (1984) Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* **142**: 66-77
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, L.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
- Yang, J., Xuesong, L., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.-I., Jones, D.P., Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**: 1129-1132
- Yates, B.L. & Morgan, W.F. (1993) Nonhomologous DNA end joining in chromosomal aberration formation. *Mutation Res.* **285**: 53-60
- Yoakum, G.H., Lechner, J.F., Korba, B.E., Malan-Shibley, L., Wiley, J.C., Valerio, M.G., Shamsuddin, A.K.M., Trump, B.F., Harris, C.C. (1985) Transformation of human bronchial epithelial cells transfected by Harvey ras oncogene. *Science* **227**: 1174-1179
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, K., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., Oren, M. (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352**: 345-347
- Yu, Z., Chen, J., Ford, B.N., Brackley, M.E., Glickman, B.W. (1999) Human DNA repair systems: an overview. *Environ. Mol. Mutagen.* **33**: 3-20

- Zaffaroni, N., Orland, L., Villa, R., Bearzatto, A., Rofstad, E.K., Silvestrini, R. (1994) DNA double-strand break repair and radiation response in human tumour primary cultures. *Int. J. Radiat. Biol.* **66**: 279-285
- Zazami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., Kroemer, G. (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* **183**: 1533-1544
- Zdzienicka, M.Z., Jaspers, N.G., van-der-Schans, G.P., Natarajan, A.T., Simons, J.W. (1989) Ataxia-telangiectasia-like Chinese hamster V 79 cell mutants with radioresistant DNA synthesis, chromosomal instability, and normal DNA strand break repair. *Cancer Res.* **49**: 1481-1485
- Zdzienicka, M.Z. (1999) Mammalian X-ray sensitive mutants which are defective in non-homologous (illegitimate) DNA double-strand break repair. *Biochimie* **81**: 107-116
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S.J. (1996) Serine phosphorylation of death antagonist Bad in response to survival factors results in binding to 14-3-3 not Bcl_{XL}. *Cell* **87**: 619-628
- Zhang, H., Tomblin, G., Weber, B.L. (1998) BRCA1, BRCA2 and DNA damage response: collision or collusion? *Cell* **92**: 433-436
- Zhao, Q.L., Kondo, T., Noda, A., Fujiwara, Y. (1999) Mitochondrial and intracellular free-calcium regulation of radiation induced apoptosis in human leucemic cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**: 493-504
- Zhong, Q., Chen, C.-F., Li, S., Chen, Y., Wang, C.-C., Xiao, J., Chen, P.-L., Sharp, D., Lee, W.-H. (1999) Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* **285**: 747-750
- Zhuang, S.M., Shvarts, A., Ormond, H.V., Jochemsen, A.J., van der Ev, A.J., Notenborn, M.H.M. (1995) Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* **55**: 486-489
- Zhukovskaya, N., Branch, P., Aquilina, G., Karran, P. (1994) DNA replication arrest and tolerance to DNA methylation damage. *Carcinogenesis* **15**: 2189-2194