

Untersuchungen zum Einfluss von NBN, ATM und ATR auf die Alkylanzien-induzierte Toxizität

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Marcus Eich

geb. am 18.9.1980 in Langen (Hessen)

Mainz, Juli 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.11

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muß sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das mögliche getan hat.

Johann Wolfgang von Goethe (1787)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einführung	15
1.1. Gentoxine	15
1.1.1. Gentoxische Tumor-Zytostatika	16
1.1.2. Klinisch verwendete Alkylanzien	18
1.2. DNA-Reparatur	22
1.2.1. O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase	22
1.2.2. Basen-Fehlpaarungs-Reparatur	23
1.2.3. Basen-Exzisions-Reparatur	25
1.2.4. DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur	27
1.2.4.1. MRN-Komplex, ATM und ATR	27
1.2.4.2. Homologe Rekombination	30
1.2.4.3. Nicht-Homologe-Endverknüpfung	33
1.2.4.4. Regulation von homologer Rekombination und Nicht-Homologer-Endverknüpfung	34
1.3. Induktion von Zelltod	35
1.3.1. Apoptose	35
1.3.2. Nekrose	38
1.4. Zielsetzung der Arbeit	42
2. Materialien	45
2.1. Zelllinien	45
2.2. Medien und Zellkulturkomponenten	46
2.3. Bakterienstämme	46
2.4. Vektoren	46
2.5. shRNA-Oligonukleotide gegen NBN	46
2.6. DNA-Oligonukleotide für den BER-Aktivitätstest	47
2.7. Primärantikörper	47
2.8. Sekundärantikörper	48

Inhaltsverzeichnis

2.9. Chemikalien	49
2.10. Inhibitoren und Aktivatoren	50
2.11. Enzyme und entsprechende Reaktionspuffer	51
2.12. Biologische Substanzen	51
2.13. Gentoxische Substanzen	52
2.14. Kits und Assays	53
2.15. Puffer und Lösungen	53
2.16. Software	59
2.17. Verbrauchsmaterialien	59
2.18. Geräte	61
3. Methoden	67
3.1. Kultivierung der Zellen	67
3.2. Behandlung der Zellen mit Zytostatika	68
3.3. Herstellung des shRNA-Vektors gegen Nibrin	68
3.4. Stabile Transfektion von Melanomzellen und Fibroblasten	70
3.5. Wachstumskurven	71
3.6. WST-1-Assay	72
3.7. Annexin V/PI-Doppelfärbung und Analyse am FACS	73
3.8. Herstellung von Proteinextrakten	74
3.9. Bestimmung der Proteinkonzentration durch den Bradford-Test	76
3.10. Western-Blot-Verfahren	77
3.11. BER-Aktivitätstest	79
3.12. MGMT-Aktivitätstest	81
3.13. Alkalischer Comet-Assay	82
3.14. Immunfluoreszenz-Färbungen	83
3.15. ATP-Test	84
3.16. Statistiken	85
4. Ergebnisse	87
4.1. Untersuchungen an menschlichen Fibroblasten	87
4.1.1. Allgemeine Charakterisierung der verwendeten Zelllinien	87
4.1.2. Untersuchung der zellulären Sensitivität nach Behandlung mit MNNG und TMZ	89
4.1.3. Analyse apoptotischer Marker nach Behandlung mit MNNG: Aktivierung der Caspase-7 und Spaltung von PARP1	95

4.1.4. Untersuchung des Einflusses von MGMT auf die Sensitivität der Zellen nach Behandlung mit MNNG _____	97
4.1.5. Untersuchung der BER-Kapazität _____	100
4.1.6. Untersuchung des Einflusses der NHEJ auf die Reparatur der MNNG-induzierten DNA-Läsionen _____	101
4.1.7. Untersuchung der Nekrose-Induktion nach Behandlung der Zellen mit MNNG _____	103
4.1.8. Untersuchung der zellulären Sensitivität sowie der Apoptose- und Nekrose-Induktion nach Behandlung mit verschiedenen gentoxischen Agenzien _____	107
4.2. Untersuchungen an menschlichen, lymphoblastoiden Zellen _____	109
4.2.1. Allgemeine Charakterisierung der verwendeten Zelllinien _____	110
4.2.2. Untersuchung der Sensitivität der Zellen nach Behandlung mit MNNG und TMZ _____	112
4.2.3. Analyse apoptotischer Marker nach Behandlung mit MNNG: Aktivierung der Caspase-7 und Spaltung von PARP1 _____	116
4.2.4. Untersuchung des Einflusses von MGMT auf die Sensitivität der Zellen nach Behandlung mit MNNG _____	117
4.2.5. Bestimmung des Einflusses von DPQ auf die Nekrose-Induktion nach Behandlung der Zellen mit MNNG _____	120
4.3. Untersuchungen an menschlichen Melanom-Zelllinien _____	121
4.3.1. Allgemeine Charakterisierung der verwendeten Zelllinie und Analyse des NBN-Knockdowns _____	122
4.3.2. Untersuchung der zellulären Sensitivität nach Behandlung mit TMZ _____	124
4.4. Untersuchungen an ATR-defizienten lymphoblastoiden Zellen _____	125
4.4.1. Charakterisierung des Wachstums der verwendeten Zelllinien _____	126
4.4.2. Untersuchung der Sensitivität der Zellen nach Behandlung mit TMZ _____	127
4.4.3. Untersuchung des Einflusses von MGMT auf die Sensitivität der Zellen nach Behandlung mit TMZ _____	128
5. Diskussion _____	133
5.1. Analyse der erhöhten Sensitivität der NBN-, ATM- und ATR-mutierten Zellen _____	133
5.2. Klinische Bedeutung der erhöhten Sensitivität der NBN-, ATM- und ATR-mutierten Zellen in der Tumorthherapie _____	138
5.3. Analyse der hohen Nekrose-Rate in den NBN- und ATM-defizienten Zellen _____	142
5.4. Hat die hohe Nekrose-Rate in den NBN- und ATM-mutierten Zellen in der Tumorthherapie eine Bedeutung? _____	148

Inhaltsverzeichnis

6. Zusammenfassung	153
Anhang	157
Literaturverzeichnis	167
Liste der Publikationen	187
Publizierte Abstracts	187
Kongressteilnahmen	188

Abbildungsverzeichnis

Einführung

- Abb. 1** Modell zur O⁶-MeG-induzierten Toxizität
- Abb. 2** Model zur N7-MeG- und N3-MeA-induzierten Toxizität
- Abb. 3** Überblick der DSB-Reparatur
- Abb. 4** Übersicht der apoptotischen Signalwege
- Abb. 5** Übersicht der nekrotischen Signalwege

Ergebnisse

- Abb. 6** Allgemeine Charakterisierung der menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4
- Abb. 7** Analyse der Viabilität der menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 mit dem WST-1-Assay
- Abb. 8** Analyse der Zelltod-Induktion mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4
- Abb. 9** Einfluss der NBN-Komplementation auf die TMZ-induzierte Toxizität in den NBS-1LBI-Zellen
- Abb. 10** Analyse der Apoptose- und Nekrose-Induktion mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 nach MNNG-Behandlung

- Abb. 11** Analyse der Apoptose- und Nekrose-Induktion mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 nach TMZ-Behandlung
- Abb. 12** Untersuchung apoptotischer Marker in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit 10 μ M MNNG mittels Western-Blot-Analysen
- Abb. 13** Einfluss von MGMT auf die MNNG-induzierte Toxizität in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4
- Abb. 14** Analyse der BER-Kapazität der menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4
- Abb. 15** Einfluss von NU7026 auf die MNNG-induzierte Toxizität in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4
- Abb. 16** Untersuchung der Nekrose-Induktion nach 10 μ M MNNG-Behandlung in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4
- Abb. 17** Einfluss der AMP-Kinase-Phosphorylierung auf die MNNG-induzierte Toxizität in den GM637- und ATs4-Zellen
- Abb. 18** Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 72 Std. nach Behandlung mit verschiedenen Gentoxinen
- Abb. 19** Allgemeine Charakterisierung der lymphoblastoiden Zelllinien 95P466, 94P247 und 94P126
- Abb. 20** Analyse der Viabilität der lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247 mit dem WST-1-Assay
- Abb. 21** Analyse der Zelltod-Induktion mit der Annexin V/PI-Methode in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247

- Abb. 22** Analyse der Apoptose- und Nekrose-Induktion mit der Annexin V/PI-Methode in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247 nach MNNG-Behandlung
- Abb. 23** Analyse der Apoptose- und Nekrose-Induktion mit der Annexin V/PI-Methode in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247 72 Std. nach Behandlung mit TMZ in verschiedenen Konzentrationen
- Abb. 24** Untersuchung apoptotischer Marker in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit 0,5 μ M MNNG mittels Western-Blot-Untersuchungen
- Abb. 25** Einfluss von MGMT auf die MNNG-induzierte Toxizität in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466, 94P247 und 94P126
- Abb. 26** Einfluss von DPQ auf die MNNG-induzierte Toxizität in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247
- Abb. 27** Allgemeine Charakterisierung der Melanom-Zelllinie D03 nach stabilem NBN-Knockdown
- Abb. 28** Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in der Melanom-Zelllinie D03 nach stabilem NBN-Knockdown 72 Std. nach Behandlung mit 50 μ M TMZ
- Abb. 29** Untersuchung des Zellwachstums in den lymphoblastoiden Zelllinien AG09387 und DK0064
- Abb. 30** Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den lymphoblastoiden Zelllinien AG09387 und DK0064 72 Std. nach Behandlung mit TMZ in verschiedenen Konzentrationen
- Abb. 31** Einfluss von MGMT auf die MNNG-induzierte Toxizität in den lymphoblastoiden Zelllinien AG09387 und DK0064

Diskussion

Abb. 32 Model zur O⁶-MeG-induzierten Toxizität mit Berücksichtigung von NBN, ATM und ATR

Abb. 33 Model zur O⁶-MeG-induzierten Apoptose- und Nekrose-Regulation

Anhang

Abb. 34 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 96 und 120 Std. nach Behandlung mit MNNG in verschiedenen Konzentrationen

Abb. 35 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 96 Std. nach Behandlung mit TMZ in verschiedenen Konzentrationen

Abb. 36 Einfluss der AMP-Kinase-Phosphorylierung auf die MNNG-induzierte Toxizität in NBS-1LBI-Zellen

Abb. 37 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 72 Std. nach Exposition zu IR und UVC in verschiedenen Dosen

Abb. 38 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 72 Std. nach Behandlung mit ETO und TPT in verschiedenen Konzentrationen

Abb. 39 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 72 Std. nach Behandlung mit MMS in verschiedenen Konzentrationen und mit 1 ng/ml HdCDT

- Abb. 40** Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247 24 und 48 Std. nach Behandlung mit MNNG in verschiedenen Konzentrationen
- Abb. 41** Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P126 72 Std. nach Behandlung mit MNNG in verschiedenen Konzentrationen
- Abb. 42** Bestimmung der MGMT-Expression in der Melanom-Zelllinie D03 nach stabilem NBN-Knockdown mittels Western-Blot-Analyse
- Abb. 43** Bestimmung der basalen Apoptose- und Nekrose-Rate in D03 siNBN 19-Zellen mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung
- Abb. 44** Untersuchung der CHK2-Phosphorylierung (pCHK2) zu verschiedenen Zeitpunkten nach 10 μ M MNNG-Behandlung in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 mittels Western-Blot-Analyse

Tabellenverzeichnis

Diskussion

- Tab. 1** Übersicht zum Einfluss von MGMT auf den induzierten Zelltod in den NBN-, ATM- und ATR-mutierten Zelllinien

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Abb.	Abbildung
ACNU	Nimustin
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonucleotid
alk.	alkalisch
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APE	AP-Endonuklease
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Ataxia telangiectasia
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATR	AT and Rad3 related
ATRIP	ATR interacting protein
BAK	BCL2-antagonist/killer 1
BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCNU	Carmustin
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
BID	BH3 interacting domain death agonist
BLEO	Bleomycin
B-NHEJ	alternative NHEJ
bp	Basenpaare
BRCA2	Breast cancer 2
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	centi
ca.	zirka
CCNU	Lomustin
CDDP	Cisplatin
CDT	Cytolethal distending toxin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHK1	CHK1 protein kinase
CHK2	CHK2 protein kinase

Abkürzungsverzeichnis

C-NHEJ	klassische NHEJ
Cpm	Counts per minute
Cs	Cäsium
CtIP	CtBP-interacting protein
Cyt _c	Cytochrom C
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-Oktan
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DD	Todesdomäne
DED	Todeseffektordomäne
DISC	Death inducing signalling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK _{CS}	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DOX	Doxorubicin
DPQ	3,4-Dihydro-5-[4-(1-Piperidiny)-Butoxy]-1(2H)- Isoquinolinon
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DTIC	Dacarbazin
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK2	Extracellular signal-regulated kinase 2
ESB	DNA-Einzelstrangbruch
ETO	Etoposid
f	femto
FADD	Fas-associated death domain protein
FCS	Fetales Kälberserum
FEN1	Flap structure-specific endonuclease 1
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FM	Fotemustin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	Stunde(n)
H2AX	Histon 2AX

Abkürzungsverzeichnis

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HdCDT	<i>Haemophilus ducreyi</i> cytolethal distending toxin
HEPES	2-(4-[2-Hydroxyethyl]-1-Piperazinyl)- Ethansulfonsäure
[³ H]-N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff	[³ H]-MNU
HMGB1	High mobility group box 1 protein
HOP2	Homologous-pairing protein 2 homolog
HR	Homologe Rekombination
HSP70	Hitzeschockprotein 70
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
IR	ionisierende Strahlung
J	Joule
JNK	c-jun N-terminale kinase 1
kompl.	komplementiert
KU70	XRCC6, X-ray repair cross complementing protein 6
KU80	XRCC5, X-ray repair cross complementing protein 5
l	Liter
Lig I	Ligase I
Lig III	Ligase III
LKB1	Liver kinase B1
LMP	lysosomale Membran-Permeabilisierung
LMP-Agarose	Low melting point-Agarose
LP-BER	long-patch BER
μ	mikro
m	Meter
m	milli
M	Molar
mAB	monoklonaler Antikörper
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute(n)
MLH1	MutL homolog 1
MMR	Mismatch-Reparatur, Basen-Fehlpaarungs- Reparatur

Abkürzungsverzeichnis

MMS	Methylmethansulfonat
MND1	Meiotic nuclear divisions 1 homolog
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
MPG	N-Methylpurin-DNA-Glykosylase
MPT	mitochondriale Permeabilitäts-Transition
MPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Poren
MRE11	Meiotic recombination 11 homolog 1
MSH2	MutS homolog 2
MSH3	MutS homolog 3
MSH6	MutS homolog 6
mt	mutiert
mTOR	Mammalian target of rapamycin
n	nano
N3-MeA	N3-Methyladenin
N7-MeG	N7-Methylguanin
NAD	β -Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NBN	Nibrin, alias NBS-1
NBS	Nijmegen-Breakage-Syndrom
neo	Neomycin
NHEJ	Non-homologous end joining, Nicht-Homologe Endverknüpfung
NP-40	Nonylphenylpolyethylen-Glykol
O ⁶ -BG	O ⁶ -Benzylguanin
O ⁶ -ClEtG	O ⁶ -Chlorethylguanin
O ⁶ -MeG	O ⁶ -Methylguanin
OGG1	8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase
p	piko
p53	Tumor protein p53
pAB	polyklonaler Antikörper
PAR	Poly-ADP-Ribosen
PARP1	Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	PBS-Tween-20
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PI	Propidiumiodid
PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases

Abkürzungsverzeichnis

PMS2	Postmeiotic segregation increased 2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol β	Polymerase β
Pol δ	Polymerase δ
Pol ϵ	Polymerase ϵ
RAD50	RAD50 homolog
RAD51	RAD51 homolog
RAD54	RAD54 homolog
RIP1	Receptor-interacting serine-threonine kinase 1
RIP3	Receptor-interacting serine-threonine kinase 3
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
RPA	Replication protein A
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
shRNA	short-hairpin RNA
Spaltpr.	Spaltprodukt
SP-BER	short-patch BER
Std.	Stunde(n)
SV40	Simian-Virus 40
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung-Tween-20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TM	Tail Moment
TMZ	Temozolomid
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TLR4	Toll-like receptor 4
TPT	Topotecan
Tris	Tris [Hydroxymethyl]-Aminomethan

Abkürzungsverzeichnis

U	Units, Einheiten für die Enzymaktivität
UVC	Ultraviolette Strahlung, Wellenlänge 200-280 nm
V	Volt
WST-1	Water soluble tetrazolium 1
Wt	Wildtyp
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4

1. Einführung

In der folgenden Einleitung werden alle Themen behandelt, die für die vorliegende Studie von Bedeutung sind. So werden zuerst Gentoxine, welche die DNA schädigen, diskutiert. Anschließend wird auf die verschiedenen DNA-Reparatur-Mechanismen eingegangen. Diese gewährleisten genomische Stabilität und schützen den Organismus vor Tumor-Entstehung, indem sie DNA-Schäden reparieren. Danach wird die Induktion von Zelltod behandelt. Dieser kann auftreten, wenn die DNA-Reparatur nicht erfolgreich war und der im Genom verbleibende DNA-Schaden eine kritische Schwelle überschreitet. Abschließend wird die Zielsetzung der vorliegenden Studie dargestellt.

1.1. Gentoxine

Als Gentoxine (auch Genotoxine) bezeichnet man alle chemischen Agenzien sowie andere äußere Einflüsse (z.B. ionisierende Strahlung [IR]), welche eine Wirkung auf die DNA, also das Erbgut, haben und dieses schädigen. Die entstehenden DNA-Schäden sind dabei, abhängig von dem einwirkenden Gentoxin, sehr vielfältig und können als Folge DNA-Mutationen induzieren, wenn sie durch entsprechende Schutzmechanismen der Zelle, der DNA-Reparatur, nicht korrekt repariert wurden. Diese Mutationen, das heißt stabile Veränderungen der DNA-Basensequenz, sind potentiell karzinogen und können Tumor-Erkrankungen auslösen, falls während der Proteinbiosynthese aufgrund der Mutation eine veränderte Proteinmenge oder ein funktionsverändertes bzw. funktionsloses Genprodukt gebildet wird. Besonders wichtig sind hierbei Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen.

Gentoxine spielen jedoch nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Tumor-Entstehung, sondern auch bei deren Therapie, da sie unter bestimmten Bedingungen stark zytotoxisch wirken und dadurch Tumorzellen, aber auch gesunde Zellen, abtöten. Daher werden Gentoxine routinemäßig in der Klinik als Zytostatika zur Behandlung verschiedener Tumore verwendet. Weiterhin treten sie auch in der Umwelt und im „alltäglichen Leben“ auf. Aus diesem Grund ist der Mensch ihnen permanent ausgesetzt. So sind Gentoxine zum Beispiel in der Nahrung (Jagerstad and Skog, 2005) und im Sonnenlicht oder in hoher Konzentration im Tabakrauch (Hecht, 1999)

enthalten. Aber auch eine zunehmende Verschmutzung der Umwelt lässt die Konzentration der Gentoxine, denen der Mensch ausgesetzt ist, ansteigen.

Im Folgenden werden Gentoxine, welche in der Klinik als Zytostatika verwendet werden, besprochen. Anschließend wird eine spezielle Klasse der Zytostatika, die alkylierenden Agenzien, detailliert beschrieben, da in der vorliegenden Studie der Fokus der Untersuchungen bei dieser Substanzklasse lag. Zwei weitere Gentoxine, die ebenfalls in der vorliegenden Studie Verwendung fanden, aber in den nachfolgenden Kapiteln nicht weiter besprochen werden, da sie keine Bedeutung in der Tumor-Therapie haben, sind die ultraviolette Strahlung (UVC) und das *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin (HdCDT). UVC ist eine Komponente des Sonnenlichts, die jedoch vollständig von der Atmosphäre absorbiert wird und daher nicht die Erdoberfläche erreicht. Trifft es jedoch auf die DNA wirkt es sehr stark gentoxisch, da es Intrastrang-Quervernetzungen induziert (Pfeifer, 1997). Hier sind vor allem die so genannten Thymindimere, die auftreten wenn sich zwei benachbarte Thyminbasen kovalent miteinander verbinden, von Bedeutung. HdCDT ist ein bakterielles Toxin, das zur Gruppe der CDTs (Cytolethal distending toxins) gehört und von *Haemophilus ducreyi*, dem Auslöser des Weichen Schankers, synthetisiert wird. CDTs besitzen eine Endonuklease-Aktivität und sind in der Lage, nach Kontakt mit Nukleinsäuren DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) zu induzieren (Frisan et al., 2003; Thelestam and Frisan, 2004).

1.1.1. Gentoxische Tumor-Zytostatika

In der Klinik werden verschiedene Klassen von Zytostatika zur Tumor-Therapie eingesetzt. Obwohl Zytostatika darauf abzielen, Tumorzellen entweder zu töten oder eine replikative Seneszenz zu induzieren, ist der zelluläre Angriffspunkt der Zytostatika jedoch sehr unterschiedlich. Im Folgenden wird lediglich die Gruppe der Zytostatika besprochen, welche entweder direkt oder indirekt die genomische DNA der Zellen schädigen und dementsprechend den Gentoxinen zuzuordnen sind.

Eine wichtige Klasse der Zytostatika sind die so genannten Topoisomerase-Hemmer, deren Wirkung vorwiegend auf der Inhibition der DNA-Topoisomerasen basiert. Hier unterscheidet man zwischen Inhibitoren der Topoisomerase I und II. Ein häufig

verwendeter Vertreter der Topoisomerase I-Hemmer ist Topotecan (TPT), das bei Eierstockkrebs (Peng et al., 2008) und bei Lungenkarzinomen (Nicum and O'Brien, 2007) eingesetzt wird, falls die Primärtherapien nicht wirken. Zu den Topoisomerase II-Hemmern zählt zum Beispiel Etoposid (ETO), welches unter anderen bei Lungenkarzinomen (Ganti et al., 2007) und Hodenkrebs (Flechon et al., 2008) aber auch zur Behandlung des Ewing-Sarkoms (Balamuth and Womer, 2010) verwendet wird. Beide Zytostatika wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Eine weitere sehr häufig eingesetzte Gruppe von Zytostatika sind die Platinanaloga, zu denen auch Cisplatin (CDDP) zählt. Der Hauptwirkmechanismus von CDDP, aber auch von anderen Vertretern dieser Gruppe, beruht auf der Bildung von Inter- und Intrastrang-Quervernetzungen der DNA, was zur Blockierung der DNA-Replikation und der Transkription führt (Jamieson and Lippard, 1999). CDDP wird unter anderem bei Hoden- (Flechon et al., 2008), Gebärmutterhals- (Pectasides et al., 2008) und Eierstockkrebs (Steer, 2009) sowie bei Tumoren der Kopf- und Halsregion (Specenier and Vermorken, 2009) eingesetzt. Weiterhin haben so genannte „Interkalanzien“ eine große Bedeutung in der Klinik. Sie interkalieren in die DNA und verursachen durch diese nicht-kovalente DNA-Bindung ebenfalls eine Blockierung der DNA-Replikation und der Transkription. Hierzu zählt Doxorubicin (DOX), das neben der Wirkung als interkalierendes Agens zusätzlich die Topoisomerase II hemmt und bei der Behandlung verschiedener Tumore, wie Blasen- (Yafi et al., 2011), Brust- (Andreetta et al., 2010) oder Magentumore (Scartozzi et al., 2007), eine Bedeutung hat.

Außerdem finden auch Antibiotika in der Tumorthherapie Anwendung. Ein solches Antibiotikum ist das Glykosid Bleomycin (BLEO), das von dem Actinobakterium *Streptomyces verticillus* synthetisiert wird und DNA-Strangbrüche induziert (Chen et al., 2008). In der Klinik wird es häufig in Kombination mit CDDP oder ETO eingesetzt. Auch physikalische Gentoxine werden in der Tumorthherapie angewendet. Hier ist vor allem IR von Bedeutung. Sie wird bei verschiedenen Tumoren, wie zum Beispiel dem malignen Hodgkin-Lymphom (Gocheva, 2010), angewendet und erzeugt neben anderen Läsionen DNA-Einzel- sowie -Doppelstrangbrüche (ESBs, DSBs) (Jeggo and Lobrich, 2006). Als Vertreter der IR wurde in der vorliegenden Studie γ -Strahlung eingesetzt, welche durch eine [^{137}Cs]-Quelle erzeugt wurde.

1.1.2. Klinisch verwendete Alkylanzien

Eine spezielle Klasse der klinisch verwendeten Zytostatika ist die Gruppe der alkylierenden Agenzien. Hierzu zählen alle chemischen Substanzen, die bei Kontakt mit der DNA Alkylgruppen auf diese übertragen. In der Regel sind hiervon vor allem die Basen der Nukleinsäuren betroffen. Eine Reihe dieser Verbindungen wird ebenfalls in der Tumorthherapie eingesetzt. Hierbei sind besonders die so genannten Chlorethylanzien und die Methylanzen von Bedeutung. Die Chlorethylanzien sollen nur am Rande erwähnt werden, da sie in der vorliegenden Studie nicht verwendet wurden.

Zu den in der Klinik verwendeten Substanzen dieser Gruppe gehört zum Beispiel Fotemustin (FM), das unter anderem zur Behandlung von malignen Melanomen (Li and McClay, 2002) und Glioblastomen (Addeo et al., 2009) eingesetzt wird. Dabei wird die toxische Wirkung dieser Verbindungen durch die Bildung von O⁶-Chlorethylguanin (O⁶-CIeTG) als kritische DNA-Läsion vermittelt. Nach der Induktion von O⁶-CIeTG kommt es über verschiedene Zwischenschritte zur Bildung von DNA-Interstrang-Quervernetzungen als sekundäre und toxische DNA-Schäden (Tong et al., 1982). Diesem Mechanismus entgegen wirkt das DNA-Reparaturenzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), welches O⁶-CIeTG unmittelbar nach dessen Induktion durch Entfernen der Chlorethylgruppe repariert (Kaina et al., 2007). In diesem Fall kommt es weder zur Bildung der DNA-Interstrang-Quervernetzungen noch zur toxischen Wirkung der Substanzen.

Ähnlich den chlorethylierenden Agenzien verhalten sich die Methylanzen. Sie methylieren die Basen der DNA an insgesamt 13 verschiedenen Positionen (Beranek, 1990; Kaina et al., 2007). Dabei ist – abhängig von der Alkylierungs-Position – die biologische Relevanz der verschiedenen induzierten DNA-Läsionen sehr unterschiedlich. Die Alkylanzien lassen sich entsprechend dem bei der Alkylierung zugrunde liegenden Substitutions-Mechanismus in S_N1- und S_N2-Alkylanzien (S_N1 bzw. S_N2 steht dabei für nukleophile Substitution 1. bzw. 2. Ordnung) unterteilen.

S_N1-Agenzien induzieren neben anderen Läsionen die O⁶-Methylguanin-Läsion (O⁶-MeG), welche als besonders kritisch anzusehen ist. Zu dieser Gruppe zählen zum Beispiel Temozolomid (TMZ) und Dacarbazin (DTIC). Während TMZ in der Klinik als Therapeutikum gegen Glioblastome und maligne Melanome eingesetzt wird (Bei et al.,

2010), findet DTIC vor allem bei Weichteilsarkomen (Maki et al., 1989) sowie Hodgkin-Lymphomen (Kuruvilla, 2009) und ebenfalls bei malignen Melanomen (Mouawad et al., 2010) Verwendung. Ein weiterer Vertreter ist das Model-Agens N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) (Gichner and Veleminsky, 1982), das nicht in der Klinik eingesetzt wird, jedoch vergleichbare DNA-Schäden induziert. Sowohl TMZ als auch MNNG wurden in der vorliegenden Doktorarbeit verwendet. Die S_N2 -Alkylationen induzieren nur in sehr geringem Maße die O^6 -MeG-Läsion. Sie sind aus diesem Grund weniger toxisch als die S_N1 -Alkylationen. Jedoch haben sie eine hohe Affinität zum Stickstoff in den DNA-Basen. Dadurch verursachen sie stärker als die S_N1 -Alkylationen Alkylierungen an den Stickstoffatomen der heterozyklischen Ringsysteme, welche ebenfalls eine biologische Relevanz aufweisen und in hoher Frequenz toxisch wirken. Als Vertreter der S_N2 -Alkylationen ist zum Beispiel Methylmethansulfonat (MMS) zu nennen (Wyatt and Pittman, 2006), das allerdings keine klinische Bedeutung hat. Es wurde ebenfalls in dieser Studie verwendet.

Der DNA-Schaden O^6 -MeG wirkt sehr toxisch. Dabei ist der für die Toxizität verantwortliche Mechanismus sehr komplex (Abb. 1). O^6 -MeG wird ähnlich dem O^6 -CIeG durch MGMT repariert und ist in diesem Fall weder toxisch noch mutagen (Lees et al., 2002). Wird die Läsion jedoch nicht durch MGMT repariert, weil die entsprechende Zelle das Enzym nicht exprimiert, geht O^6 -MeG im nächsten DNA-Replikationszyklus mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine Fehlpaarung mit Thymin anstelle von Cytosin ein (Toorchen and Topal, 1983). Unmittelbar danach erfolgt die Erkennung der gebildeten Basen-Fehlpaarung durch die Proteine der Basen-Fehlpaarungs-Reparatur (Mismatch-Reparatur, MMR). Diese ist absolut unerlässlich für die Induktion der Toxizität durch O^6 -MeG (Karran and Bignami, 1994).

Von der (durch die MMR erkannte) Basen-Fehlpaarung ausgehend sind zwei Modelle beschrieben worden, welche den Mechanismus der O^6 -MeG-induzierten Toxizität erklären (Kaina et al., 2007). Der so genannten DSB-Hypothese zufolge kommt es aufgrund der MMR zur Elimination des Thymins. Da auf dem ursprünglich geschädigten DNA-Strang jedoch immer noch O^6 -MeG vorliegt, paart es während des Verschlusses der Lücke erneut mit Thymin. Die Folge sind sich wiederholende MMR-Zyklen und ein Kollaps der DNA-Replikationsgabel während der nächsten Replikation (Ochs and Kaina, 2000). Als ultimativ toxische und sekundäre DNA-Schäden entstehen auf diese Weise DSBs, die im zweiten Zellzyklus nach der O^6 -MeG-Induktion auftreten (Quiros et al., 2010) und vorwiegend durch die homologe Rekombination (HR) repariert

werden (Roos et al., 2009). Ist die Reparatur-Kapazität jedoch erschöpft, induzieren diese DSBs sehr effektiv Apoptose.

In einem alternativen Modell führt die Erkennung der Basen-Fehlpaarung nicht zur Induktion von DSBs, sondern zur direkten Rekrutierung und Aktivierung von ATR (AT and Rad3 related) durch das MMR-System (Yoshioka et al., 2006). Als Folge dessen kommt es über die Aktivierung von CHK1 (CHK1 protein kinase) und p53 (Tumor protein p53) zur Induktion von Apoptose. Wird die Basen-Fehlpaarung zwischen O⁶-MeG und Thymin von den MMR-Proteinen nicht erkannt, paart das fehlerhaft-eingebaute Thymin während der darauf folgenden DNA-Replikation mit Adenin. Somit kommt es zum Basenaustausch (eine Transition wird induziert) und damit zu einer potenziell karzinogenen DNA-Mutation im Genom, die eine maligne Transformation auslösen kann (Branch et al., 1993).

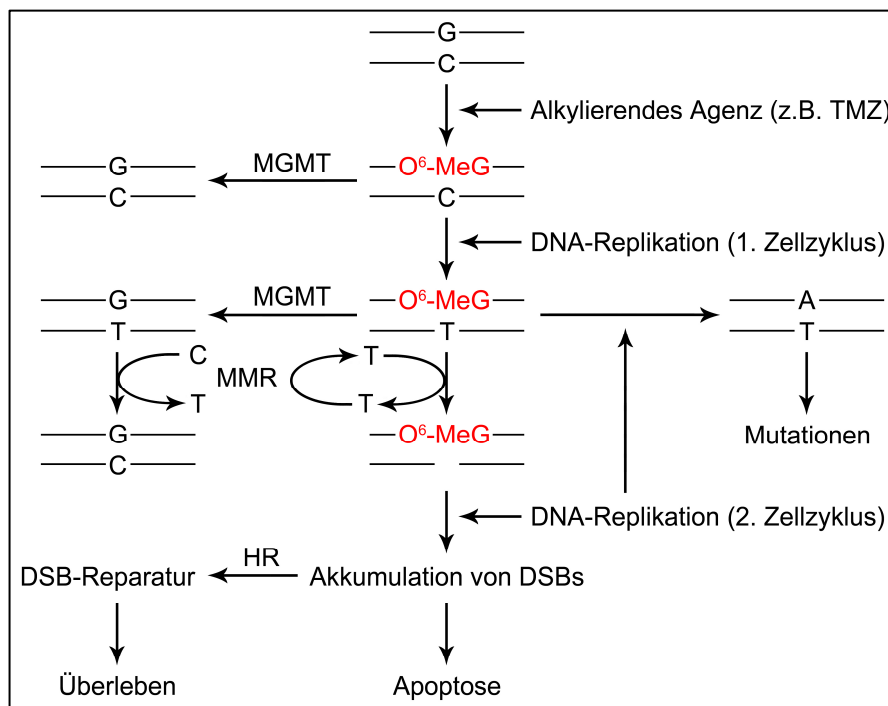


Abb. 1 Modell zur O⁶-MeG-induzierten Toxizität. Vereinfachte Darstellung der verschiedenen Signalwege, die zur Induktion von Mutationen, DNA-Reparatur oder Apoptose führen. Das alternative Modell, in welchem die Aktivierung von ATR ein zentrales Ereignis darstellt, wird hier nicht berücksichtigt.

In der Klasse der so genannten N-Alkylierungen spielen vor allem das N7-Methylguanin (N7-MeG) sowie das N3-Methyladenin (N3-MeA) eine wichtige Rolle (Abb. 2). Beide Läsionen werden gewöhnlich über die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) sehr effizient repariert. Findet jedoch die Reparatur beider Läsionen aufgrund einer Sättigung der BER-Kapazität nur unzureichend statt, können sie die DNA-Replikation blockieren. Während die N3-MeA-Läsion dabei *per se* einen Replikationsblock verursacht, unterliegt N7-MeG einer spontanen Depurinierung, dessen Konsequenz daraufhin ebenfalls eine Blockade der DNA-Replikation sein kann (Nikolova et al., 2010; Roos and Kaina, 2006). Die Folge ist – wie im Fall von O⁶-MeG – eine Akkumulation von DSBs als sekundäre DNA-Schäden, die toxisch wirken, falls sie nicht effizient repariert werden.

Weiterhin können ESBs oder apurine Stellen, die während des BER-Reparaturprozesses als Reparaturintermediate entstehen, während der DNA-Replikation zu DSBs führen und Apoptose induzieren (Ochs et al., 2002; Wyatt and Pittman, 2006). Außerdem ist es denkbar, dass überlappende ESBs zu DSBs führen, wenn sie auf beiden Seiten des DNA-Stranges gegenüber liegend, in einer Entfernung von etwa zehn Nukleotiden, lokalisiert sind.

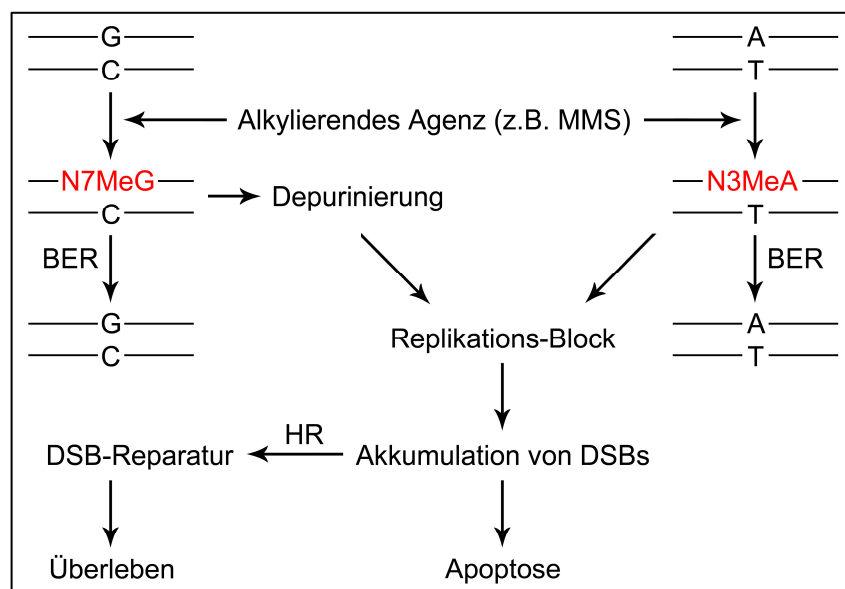


Abb. 2 Model zur N7-MeG- und N3-MeA-induzierten Toxizität. Vereinfachte Darstellung der verschiedenen Signalwege, die zur Induktion von DNA-Reparatur oder Apoptose führen.

1.2. DNA-Reparatur

DNA-Reparatur ist ein Sammelbegriff für eine Reihe von Schutzmechanismen, die prokaryotische und eukaryotische Zellen entwickelt haben, um Schäden der DNA zu reparieren. Dabei sind die DNA-Reparatur-Mechanismen auf spezifische DNA-Läsionen abgestimmt und im Laufe der Evolution konserviert worden. Im Folgenden wird auf die DNA-Reparatur-Mechanismen eingegangen, welche bei der zellulären Reaktion auf Alkylanzien-induzierte DNA-Läsionen von Bedeutung sind.

1.2.1. O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

Das DNA-Reparatur-Enzym MGMT ist ein 22 kDa großes Protein, dessen zelluläre Funktion das Entfernen von Alkylierungen an der O⁶-Position des Guanins von Nukleinsäuren ist (Pegg, 2000). Die Reparatur findet in einer einstufigen Reaktion statt, während der die Alkylgruppe vom Sauerstoff des Guanins auf einen Cystein-Rest in der katalytischen Tasche des Enzyms übertragen wird (Kaina et al., 2007). Dabei nimmt die Transfer-Rate mit zunehmender Größe der Alkylgruppe ab, so dass beispielsweise Methylgruppen des O⁶-MeG schneller entfernt werden als Ethyl- und Propylgruppen (Pegg, 1990). Während der Katalyse der oben beschriebenen Reaktion wird das Enzym inaktiviert, wobei ein Alkylrest auf ein MGMT-Molekül übertragen wird. Das hat zur Folge, dass die Anfangsmenge an MGMT-Molekülen, die in der Zelle zum Zeitpunkt der Alkylanzien-Exposition vorliegt, sowie die Rate der MGMT-Neusynthese die MGMT-Reparatur-Kapazität determiniert. Abschließend wird das inaktivierte MGMT-Protein ubiquitiniert und daraufhin proteosomal degradiert (Srivenugopal et al., 1996; Xu-Welliver and Pegg, 2002).

Aufgrund der beschriebenen Enzym-Aktivität ist MGMT ein wichtiger zellulärer Schutzfaktor gegenüber Alkylierungen an der O⁶-Position des Guanins. Es verhindert zum Einen O⁶-Alkylguanin-induzierte Mutationen (Hansen et al., 2007; Kaina et al., 1991) und schützt dadurch vor der Entstehung von Tumoren (Becker et al., 1997; Dumenco et al., 1993; Nakatsuru et al., 1993). Zum Anderen verleiht es Zellen Resistenz gegenüber alkylierenden Agenzien (Meikrantz et al., 1998; Tominaga et al., 1997).

Aufgrund der klinischen Verwendung von Alkylanzien, wie zum Beispiel TMZ, das vorwiegend zur Therapie von Glioblastomen eingesetzt wird, besitzt MGMT eine klinische Bedeutung, da das Enzym einen Erfolg der Tumortherapie beeinflusst. So mildert es nicht erwünschte Nebenwirkungen, welche durch die systemische Applikation von TMZ und anderen Alkylanzien (zum Beispiel Carmustin [BCNU]) ausgelöst werden und determiniert zusammen mit anderen Faktoren die Sensitivität des Tumors gegenüber dem Zytostatikum. Dies ist bei der Planung der Therapie von Bedeutung, da die MGMT-Expression aufgrund epigenetischer Regulationen sehr variabel ist (Costello et al., 1994). So variiert die Expression nicht nur in großem Maße Gewebe-abhängig, wobei im Gehirn in der Regel sehr wenig zelluläres MGMT-Protein vorliegt, sondern auch inter-individuell (Gerson et al., 1986; Grafstrom et al., 1984). Die Variabilität der Expression in Tumoren ist sogar noch größer. Hier zeigen beispielsweise Brust-, Darm- oder Lungentumore eine sehr hohe MGMT-Expression, während in Gliomen, malignen Melanomen und Pankreaskarzinomen sehr wenig MGMT exprimiert wird (Chen et al., 1992; Margison et al., 2003; Preuss et al., 1996). Insgesamt besitzen 5 % der soliden Tumore unabhängig vom Ursprung überhaupt kein MGMT, in der Gruppe der Gliome sind es sogar 17 bis 30 % (Citron et al., 1993; Preuss et al., 1995).

Die Wichtigkeit dieser Daten wird durch klinische Studien verdeutlicht, welche eine Korrelation der MGMT-Expression und des Ansprechens der Gliomzellen auf die Behandlung mit BCNU (Belanich et al., 1996) beziehungsweise Lomustin (CCNU) und TMZ (Glas et al., 2009) nachweisen. Weiterhin sind beachtliche Variationen in der Expression innerhalb individueller Tumore möglich, da einige Tumorzellen MGMT exprimieren und andere Zellen desselben Tumors nicht (Lees et al., 2002).

1.2.2. Basen-Fehlpaarungs-Reparatur

Die MMR eliminiert Basen-Fehlpaarungen, welche einerseits spontan aufgrund fehlerhafter DNA-Replikation entstanden sind oder andererseits durch Basen-Deaminierung, Oxidation oder Methylierungen induziert wurden (Modrich and Lahue, 1996; Umar and Kunkel, 1996). Somit stellt die MMR einen sehr wichtigen zellulären Schutzmechanismus dar, welcher die Mutationsfrequenz im Genom reduziert und daher die genomische Stabilität erhält. Verdeutlicht wird dies durch das Lynch-

Syndrom (oder hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom), einer autosomal-dominant vererbten Form des Darmkrebses, bei der essentielle Gene der MMR mutiert sind (Fishel et al., 1994; Papadopoulos et al., 1994).

Der molekulare Mechanismus der MMR kann in drei funktionelle Abschnitte unterteilt werden (Christmann et al., 2003). Zuerst findet die Erkennung der DNA-Läsion statt, danach erfolgt die DNA-Strang Diskriminierung und abschließend die Basen-Exzision und Neusynthese der DNA. Die Erkennung der DNA-Läsion (zum Beispiel ein G/T-Fehlpaarung) wird durch den MutS α -Komplex, bestehend aus den Proteinen MSH2 (MutS homolog 2) und MSH6 (MutS homolog 6), gewährleistet. Dieser ändert Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)-abhängig die Konformation, so dass der Komplex mit der Nukleinsäure assoziieren und auf ihr hinweg gleiten kann (Gradia et al., 1999). Anschließend bindet der MutL α -Komplex, der aus den beiden MutL-homologen Proteinen MLH1 (MutL homolog 1) und PMS2 (Postmeiotic segregation increased 2) aufgebaut ist (Li and Modrich, 1995), ebenfalls ATP-abhängig an den MutS α -Komplex.

Die nun folgende DNA-Strang-Diskriminierung, bei der der DNA-Tochterstrang, der die fehlerhaft eingebaute Base trägt, detektiert wird, erfolgt durch das Wandern des Reparaturkomplexes entlang der DNA entweder bis zu einer Nukleotid-Lücke zwischen zwei Okazaki-Fragmenten auf dem Tochterstrang oder bis zum freien 3'-Terminus des parentalen DNA-Strangs. Liegt die fehlerhaft eingebaute Base auf dem Tochterstrang ausgehend vom Reparaturkomplex strangabwärts in 3'-Richtung, beginnt die Basen-Exzision durch Assoziation der Exonuklease I an den Reparaturkomplex. Danach entfernt diese Exonuklease I, welche ausschließlich eine 5' \rightarrow 3' Nuklease-Aktivität besitzt, bis zu mehrere hundert Basen des Tochterstrangs, wobei der dadurch entstandene einzelsträngige DNA-Bereich durch Bindung von RPA-Proteinen an den parentalen DNA-Strang stabilisiert wird. Die Basen-Exzision wird so lange fortgeführt, bis die fehlerhaft eingebaute Base ausgeschnitten wurde (Stojic et al., 2004). Abschließend erfolgt die Neusynthese des Tochterstrangs durch die Polymerase δ (Pol δ) (Longley et al., 1997) und der Verschluss der Lücke durch eine DNA-Ligase.

Die Schadens-Erkennung kann anstelle des MutS α -Komplexes ebenfalls durch den MutS β -Komplex erfolgen (Palombo et al., 1996). In diesem Fall geht MSH2 eine Bindung mit MSH3 (MutS homolog 3) ein. Beide Komplexe unterscheiden sich in der Bindungsaffinität zu spezifischen Fehlpaarungen, wobei der MutS α -Komplex an Basen-Basen-Fehlpaarungen und Insertions- bzw. Deletions-Fehlpaarungen bindet

(Umar and Kunkel, 1996), während der MutS β -Komplex ausschließlich Insertions- bzw. Deletions-Fehlpaarungen erkennt (Genschel et al., 1998; Palombo et al., 1996).

1.2.3. Basen-Exzisions-Reparatur

Die BER ist für die Reparatur von geschädigten Basen, die zum Beispiel durch Oxidation, Alkylierung oder Deaminierung entstehen, verantwortlich. Aber auch apurine Stellen, welche durch spontane Hydrolyse entstehen, werden vom BER-System erkannt und repariert. Unter den alkylierten Basen werden vor allem N-alkylierte Purine über den BER-Signalweg eliminiert. Diese werden zum Beispiel durch MMS oder TMZ induziert. Die Exekution der BER erfolgt über zwei verschiedene Mechanismen, die SP-BER (short-patch BER) und die LP-BER (long-patch BER) (Christmann et al., 2003), wobei die Unterschiede beider Signalwege hauptsächlich in der Anzahl der substituierten Nucleotide liegen. Während bei der SP-BER nur das geschädigte Nucleotid ausgetauscht wird, werden während der LP-BER hingegen zusätzlich einige Nucleotide in 5'-Richtung der Läsion substituiert. Obwohl verschiedene Hypothesen formuliert wurden, ist die Frage, welcher Mechanismus Anwendung findet, noch weitestgehend ungeklärt (Robertson et al., 2009). Eine der Hypothesen schlägt beispielsweise vor, die Entscheidung sei abhängig vom ATP-Gehalt in der Nähe der DNA-Läsion (Petermann et al., 2003).

Durch die SP-BER wird eine zuvor induzierte Basen-Schädigung durch eine DNA-Glykosylase erkannt. Mittlerweile sind 11 DNA-Glykosylasen beschrieben, die in Abhängigkeit ihrer Enzymaktivität in Typ I und Typ II Glykosylasen unterteilt werden. Typ I Glykosylasen katalysieren ausschließlich die Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung. Ein Vertreter dieser Gruppe ist die N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) (O'Connor and Laval, 1991), welche N-alkylierte Purine (zum Beispiel N7-MeG) detektiert. Typ II Glykosylasen, zu denen die 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase (OGG1) (Rosenquist et al., 1997) zählt, die 8-Oxoguanin erkennt, besitzen zusätzlich eine AP-Lyase-Aktivität. Durch die Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung durch die DNA-Glykosylase wird eine apurine oder apyrimidine Stelle gebildet. Erfolgte diese Hydrolyse durch eine Typ I Glykosylase, spaltet anschließend eine AP-Endonuklease (APE) das DNA-Rückgrad durch Lösen der Phospho-Diester-Bindung, so dass ein ESB in 5'-Richtung der abasischen Stelle entsteht (Robson and Hickson, 1991; Wilson

and Barsky, 2001). Analog zur Spaltung der DNA durch die APE erfolgt die Spaltung des DNA-Rückgrats durch die Typ II Glykosylase (O'Connor and Laval, 1989). In diesem Fall ist der ESB jedoch in 3'-Richtung zum geschädigten Bereich lokalisiert. Anschließend wird die abasische Stelle ausgeschnitten und nachfolgend ein neues funktionelles Nukleotid eingefügt. Beide Reaktionen werden durch die Polymerase β (Pol β) katalysiert (Matsumoto and Kim, 1995; Singhal and Wilson, 1993; Sobol et al., 1996). Abschließend erfolgt die Ligation der ESB-Enden durch die Ligase III (Lig III) (Wei et al., 1995).

Weiterhin hat XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1) während der SP-BER eine wichtige, koordinierende Rolle (Robertson et al., 2009). Es interagiert mit der APE (Vidal et al., 2001), der Pol β und der Lig III (Robertson et al., 2009). Da es selbst keine enzymatische Aktivität besitzt, wirkt es vorwiegend als Gerüstprotein, welches den Reparatur-Prozess koordiniert.

Während der LP-BER kommt es nach dem Abspalten der Pol β zu einer zusätzlichen DNA-Synthese durch die Polymerasen δ oder ϵ (Pol δ , Pol ϵ) (Stucki et al., 1998). Dadurch wird der ursprüngliche DNA-Strang, der die Läsion trug, teilweise verdrängt und nachfolgend abgespalten. Die Abspaltung des ausgeklappten DNA-Bereichs erfolgt dabei durch die Endonuklease FEN1 (Flap structure-specific endonuclease 1) (Kim et al., 1998). Ein weiterer essentieller Faktor des LP-BER ist PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) (Frosina et al., 1996), welches mit FEN1 (Wu et al., 1996) und auch mit den entsprechenden Polymerasen interagiert und diese koordiniert. Die Ligation des zurückbleibenden ESB erfolgt während der LP-BER vorwiegend durch die Ligase I (Lig I) (Srivastava et al., 1998).

Weiterhin ist das DNA-Reparaturenzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1 (PARP1) ein wichtiger Modulator, der die BER stimuliert. Einem weitgehend akzeptierten Modell zufolge bindet PARP1 nach der Induktion von übermäßigem DNA-Schaden, der über das normale Maß hinausgeht, an die gebildeten ESBs und schützt diese vor der Degradation, wenn die BER-Kapazität erschöpft ist (Woodhouse and Dianov, 2008). Das aktive PARP1 katalysiert dann die Poly-ADP-Ribosylierung verschiedener Zielproteine, zu denen auch PARP1 selbst zählt. Dies ermöglicht die Dissoziation von PARP1 von der DNA, wenn wieder ausreichend BER-Proteine zur Verfügung stehen, und die bessere Rekrutierung von BER-Proteinen zum Schadensort. Außerdem interagiert PARP1 mit der Lig III (Leppard et al., 2003), der Pol β (Dantzer et al., 2000)

und XRCC1 (Caldecott et al., 1996; Masson et al., 1998). Die Rekrutierung von XRCC1 zum DNA-Schaden ist reduziert, wenn beide Proteine aufgrund einer Mutation in PARP1 nicht miteinander interagieren können (El-Khamisy et al., 2003).

1.2.4. DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

Die DSB-Reparatur ist ein sehr wichtiger Mechanismus zum Schutz der Zellen gegen DSBs, welche, wie schon in den vorangegangenen Kapiteln diskutiert wurde, bei unzureichender Reparatur zu Chromosomen-Aberrationen oder zum Zelltod führen können. Die Reparatur der DSBs findet über zwei verschiedene Mechanismen statt, die als HR und Nicht-Homologe-Endverknüpfung (Non-homologous end joining, NHEJ) bekannt sind (Jackson, 2002). Im Folgenden wird zuerst auf den MRN-Komplex sowie auf ATM (Ataxia telangiectasia mutated) und ATR eingegangen. Alle drei Faktoren spielen bei der DSB-Reparatur eine wichtige Rolle und sind für die vorliegende Studie von besonderer Bedeutung. Danach werden beide Signalwege im Überblick und getrennt voneinander diskutiert. Dabei wird auch die frühe Erkennung der DSBs thematisiert. Dieser Prozess bildet die Grundlage zur darauf folgenden DSB-Reparatur. Abschließend wird auf die Regulation der DSB-Reparatur eingegangen.

1.2.4.1. MRN-Komplex, ATM und ATR

Der MRN-Komplex besteht aus den DNA-Reparatur-Proteinen MRE11 (Meiotic recombination 11 homolog 1), RAD50 (RAD50 homolog) und Nibrin (NBN, alias NBS-1) und besitzt vor allem wichtige Funktionen während der frühen Erkennung der DSBs. Der Kern des Komplexes besteht aus zwei Molekülen MRE11, welche ein stabiles Homodimer bilden. Anschließend bindet an jedes der beiden MRE11-Proteine ein Molekül NBN und RAD50, so dass jeder MRN-Komplex aus jeweils zwei Molekülen der drei Proteine aufgebaut ist (Lamarche et al., 2010).

MRE11 besitzt eine Exo- und Endonuklease-Aktivität gegen einzel- und doppelsträngige DNA sowie eine intrinsische DNA-Binde-Aktivität (de Jager et al., 2001a), die über zwei C-terminale DNA-Bindedomänen vermittelt wird (Rupnik et al., 2008). Dies ermöglicht eine direkte Verknüpfung von zwei DSB-Enden. Dabei binden

die beiden MRE11-Moleküle, welche in einem MRN-Komplex enthalten sind, jeweils ein DSB-Ende. Da diese Fixierung über kurze Distanzen erfolgt, wird sie als so genanntes „Kurzstrecken-Halten“ bezeichnet (Lamarche et al., 2010).

NBN hingegen besitzt am N-Terminus eine FHA- und eine BRCT-Domäne, die phospho-spezifische Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, und am C-Terminus eine MRE11-Bindedomäne und ein ATM-Interaktions-Motiv (Rupnik et al., 2008). Weiterhin sind im zentralen Bereich diverse SQ-Motive, Konsensus-Sequenzen für ATM und ATR, lokalisiert, an denen NBN während der DNA-Schadensantwort phosphoryliert wird (Kobayashi et al., 2002). NBN selbst besitzt keine Enzymaktivität und wirkt daher im gesamten Prozess der DSB-Reparatur als Modulator für verschiedene Proteine. Wenn beide Allele betroffen sind, verursachen hypomorphe Mutationen im NBN-Gen, die zur Bildung von verkürzten Proteinen mit residualen Funktionen führen, das Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) (Carney et al., 1998; Matsuura et al., 1998; Varon et al., 1998). Patienten dieser Erbkrankheit zeigen ein gestörtes Immunsystem, Microzephalie, die in der Regel nicht mit einer geistigen Retardation einhergeht, Wachstums- und Entwicklungsverzögerungen, sowie eine starke Prädisposition zu verschiedenen Tumor-Erkrankungen bereits im Jugendalter. Auf zellulärer Ebene wurden eine erhöhte Chromosomen-Brüchigkeit und eine Hypersensitivität gegenüber IR beobachtet (The-Nijmegen-Breakage-Syndrome-Study-Group, 2000).

RAD50, die dritte Komponente des MRN-Komplexes, besitzt ein N-terminales Walker A- und ein C-terminales Walker B-Nukleotid-Bindemotiv, die beide stabil miteinander assoziieren und eine ATP-Bindekassette/ATPase-Domäne formen (Hopfner et al., 2001; Hopfner et al., 2000), welche ATP-abhängig mit dem zweiten RAD50-Molekül im MRN-Komplex assoziieren und anschließend an die DNA binden (de Jager et al., 2001b). Durch die Interaktion der beiden Walker-Motive faltet sich das Protein, wobei der mittlere Bereich einen flexiblen Arm bildet, an dessen Ende sich ein Zinkfinger-Motiv befindet (Hopfner et al., 2002). Über dieses Zinkfinger-Motiv können zusätzlich Interaktionen zu RAD50-Proteinen anderer MRN-Komplexe erfolgen. Somit wird einerseits eine Assoziation eines schon fixierten DSB mit einem homologen DNA-Molekül möglich und andererseits können zwei DSB-Enden durch die Interaktion verschiedener MRN-Komplexe miteinander verknüpft werden (Lamarche et al., 2010). Beide RAD50-vermittelte Interaktionen werden als „Langstrecken-Halten“ bezeichnet, da hier eine Assoziation über größere Entfernungen möglich ist (Lamarche et al., 2010).

ATM spielt, wie der MRN-Komplex, eine wichtige Rolle während der DSB-Reparatur. Homozygote Mutationen im ATM-Gen verursachen das Louis-Bar-Syndrom (auch Ataxia telangiectasia [AT]) (Gatti et al., 1988; Savitsky et al., 1995), eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, die zahlreiche klinische und zelluläre Eigenschaften mit dem NBS teilt (Shiloh, 1997). Als Serine/Threonin-abhängige Proteinkinase ist ATM ein Mitglied der so genannten PIKK (Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases)-Familie, zu der insgesamt sechs Proteinkinasen zählen. Am N-terminalen Bereich besitzt ATM so genannte HEAT-Wiederholungen, über die eine direkte Bindung mit NBN vermittelt werden kann (You et al., 2005). Am C-Terminus sind jeweils eine PI3-K-, eine FAT- und eine FATC-Domäne lokalisiert (Lavin, 2008). Dabei besitzt die PI3-K-Domäne eine enzymatische Aktivität und gewährleistet die Kinase-Funktion von ATM, wobei dessen Aktivierung durch die Auto-Phosphorylierung von drei Serin-Resten (Serin-367, Serin-1893 und Serin-1981) erfolgt. Im Gegensatz dazu haben die anderen beiden Domänen modulatorische Eigenschaften. Während die FAT-Domäne stabilisierend auf den C-terminalen Bereich wirkt, indem sie mit der PI3-K-Domäne interagiert, reguliert die FATC-Domäne die Kinase-Aktivität der PI3-K-Domäne (Iijima et al., 2008).

ATR, ein weiterer Vertreter der PIKK-Familie, ist ebenfalls eine Serine/Threonin-abhängige Proteinkinase (Cimprich and Cortez, 2008), die anders als ATM eine hohe Affinität zu ESBs aufweist, dennoch aber in der DSB-Erkennung und -Reparatur involviert ist (Shiotani and Zou, 2009). Wie ATM besitzt ATR jeweils eine PI3-K-, eine FAT- und eine FATC-Domäne am C-Terminus, die vergleichbare Funktionen besitzen (Cimprich and Cortez, 2008). Im Gegensatz dazu ist der mittlere Bereich sowie der N-Terminus, auf dem Interaktionsmotive für Co-Faktoren wie zum Beispiel NBN oder ATRIP (ATR interacting protein) lokalisiert sind, im Vergleich zu ATM und anderen Mitgliedern der PIKK-Familie wenig konserviert. Änderungen im ATR-Gen führen zu einer Erbkrankheit, dem autosomal-rezessiv vererbten Seckel-Syndrom, das vor allem durch extreme Kleinwüchsigkeit gekennzeichnet ist. In diesem Fall liegen hypomorphe Mutationen vor, welche veränderte Splice-Varianten verursachen und die Expression des Wildtyp-Proteins stark reduzieren (O'Driscoll et al., 2003). Ein kompletter Verlust des ATR-Proteins ist hingegen schon während der Embryonalentwicklung letal (Brown and Baltimore, 2000).

1.2.4.2. Homologe Rekombination

Die HR ist ein wichtiger Mechanismus zur Reparatur von DSBs (Abb. 3). Sie ist evolutionär stark konserviert und daher sowohl in pro- als auch in eukaryotischen Zellen zu finden. Im Zellzyklus besitzt sie vorwiegend in der S- und G2-Phase des Zellzyklus eine große Bedeutung und spielt eher eine untergeordnete Rolle in der G1- und der G0-Phase des Zellzyklus. Bedingt durch den Reparatur-Mechanismus, bei dem entweder ein homologes Chromosom oder ein Schwesterchromatid als Vorlage für die Reparatur verwendet wird, führt die HR zu einer Rekombination der DNA-Stränge und damit zu einer fehlerfreien Reparatur des DSB.

DNA-Doppelstrangbruch-Erkennung

Die ersten Schritte der zellulären Schadensantwort, mit welcher die Erkennung der DSBs beginnt, ist die Rekrutierung des MRN-Komplexes in die unmittelbare Nähe der Bruchstelle und die darauf folgende Bindung an das Histon 2AX (H2AX) (Kobayashi et al., 2002), was zur Folge hat, dass die DSB-Enden von Beginn an in räumlicher Nähe zusammengehalten werden. Während der Rekrutierung des MRN-Komplexes zum DSB erfolgt die Translokation des Komplexes vom Zytoplasma in den Nukleus NBN-abhängig, denn sie ist aufgehoben, wenn NBN funktionslos ist (Desai-Mehta et al., 2001). Danach erfolgt in Abhängigkeit vom MRN-Komplex die Rekrutierung und Aktivierung von ATM (Lee and Paull, 2005). Aufgrund der Aktivierung kommt es zur Dissoziation der vorher inaktiven Homodimere in ihre Monomere (Bakkenist and Kastan, 2003).

Das aktive ATM bindet an den MRN-Komplex und phosphoryliert eine Vielzahl von Zielproteinen, die verschiedene biologische Funktionen besitzen. Hierzu zählen zum Beispiel CHK2 (CHK2 protein kinase) (Matsuoka et al., 2000), das die Zellzykluskontrolle reguliert und p53 (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998), das das Apoptose-Programm induzieren kann. Weitere Zielproteine sind NBN (Canman et al., 1998; Gatei et al., 2000) und H2AX (Burma et al., 2001), das an der DNA in unmittelbarer Nähe zum DSB angelagert ist. Durch Phosphorylierung von H2AX kommt es im Bereich des DSB zur Bildung so genannter γ -H2AX-Foci, welche nach Immun-Färbung im Fluoreszenz-Mikroskop als „Spots“ zu erkennen sind und eine Quantifizierung der DSBs ermöglichen (Sedelnikova et al., 2002). Die Bildung der γ -H2AX-Foci in der Nähe des DSB induziert zum Einen die Rekrutierung zusätzlicher

MRN-Komplexe (Kobayashi et al., 2002), wodurch es zur Signalamplifikation kommt, und festigt andererseits die Interaktion der MRN-Komplexe, welche schon am DSB assoziiert waren.

Als nächster wichtiger Schritt erfolgt die End-Resektion, bei der Überhänge an beiden 3'-Enden der Bruchstelle gebildet werden, indem an den 5'-Enden mehrere Hundert Nukleotide durch Nukleasen entfernt werden (Lamarche et al., 2010). Hierbei spielen CtIP (CtBP-interacting protein) und der MRN-Komplex eine wichtige Rolle, wobei CtIP nach dessen Aktivierung an NBN bindet und die Katalyse der Nukleotid-Abspaltung stimuliert (Sartori et al., 2007; You and Bailis, 2010). Dies bereitet die DSB-Enden auf die HR vor und ist unabkömmlich für dessen Initiation. Die hierbei entstehenden einzelsträngigen DNA-Bereiche werden anschließend durch die Anlagerung von RPA (Replication protein A) stabilisiert und die Einzelstrang-Enden von ATR erkannt. ATR bindet an diese und wird ATM-abhängig phosphoryliert (Jazayeri et al., 2006). Das aktive ATR phosphoryliert analog zu ATM ebenfalls verschiedene Zielproteine wie zum Beispiel CHK1 (Guo et al., 2000; Zhao and Piwnica-Worms, 2001) oder auch p53 (Tibbetts et al., 1999), die verschiedene biologische Funktionen haben.

Homologe Rekombination

Die eigentliche HR beginnt nun mit der Bindung der RAD51-Rekombinase (RAD51 homolog), die im inaktiven Zustand als Hexa- oder Heptamer vorliegt (Shin et al., 2003), an die DSB-Enden. Die Bildung dieses so genannten Nukleoprotein- oder auch präsynaptischen Filaments wird durch den Rekombinations-Mediator BRCA2 (Breast cancer 2) verstärkt und führt zur Verdrängung von RPA, das von der Nukleinsäure dissoziiert (San Filippo et al., 2008). Danach erfolgt die Suche homologer Bereiche auf den homologen Chromosomen oder dem Schwesterchromatid und nachfolgend der DNA-Strang-Austausch bzw. die Bildung des synaptischen Komplexes. Hierbei spielt der HOP2 (Homologous-pairing protein 2 homolog)-MND1 (Meiotic nuclear divisions 1 homolog)-Komplex eine modulierende Funktion, wobei er das präsynaptische Filament stabilisiert und dessen Bindung an den homologen DNA-Bereich und somit die Bildung des synaptischen Komplexes fördert (Chi et al., 2007; Pezza et al., 2007). Weiterhin hat das RAD54-Protein (RAD54 homolog) an verschiedenen Schritten der HR eine große Bedeutung, da es mit RAD51 interagiert (Heyer et al., 2006). In diesem Zusammenhang ist es beispielweise an der Wiederbereitstellung zusätzlicher RAD51-Moleküle beteiligt, indem es die Bindung zwischen RAD51 und doppelsträngigen DNA-Bereichen wieder löst nachdem die

1. Einführung

Rekombination stattgefunden hat. Abschließend erfolgt die Auflösung des synaptischen Komplexes und damit die Beendigung des Rekombinationsprozesses durch das klassische Modell von Holliday (Holliday, 2007).

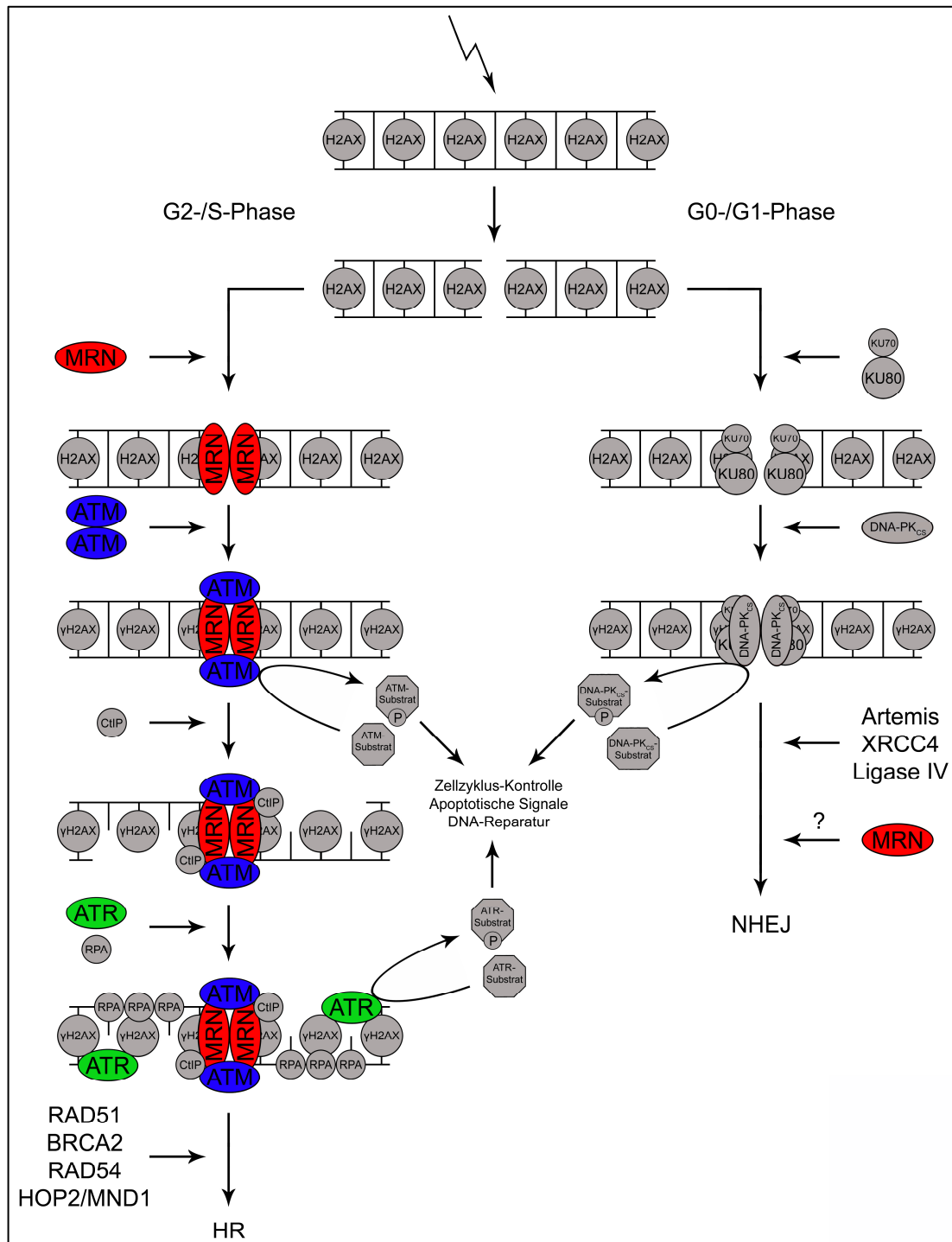


Abb. 3 Überblick der DSB-Reparatur. Vereinfachte Darstellung der HR und der C-NHEJ mit Fokus auf die frühen Ereignisse beider Signalwege.

1.2.4.3. Nicht-Homologe-Endverknüpfung

Die NHEJ tritt im Gegensatz zur HR hauptsächlich während der G1- und der G0-Phase auf (Shrivastav et al., 2008) und lässt sich in die klassische NHEJ (C-NHEJ), bei dem die DSB-Enden nur minimal prozessiert werden, und die alternative NHEJ (B-NHEJ), bei dem größere Modifikationen der DSB-Enden stattfinden, unterteilen (Lamarque et al., 2010). Da bei beiden Prozessen die DSB-Enden ohne die Verwendung einer homologen DNA-Sequenz, welche als intakte Matrize fungiert, wieder aneinander gefügt werden, ist dieser Mechanismus fehlerbehaftet und kann zu Deletionen bzw. Insertionen führen oder zu Chromosomen-Translokationen, wenn verschiedene Chromosomen miteinander verknüpft werden. Im Folgenden wird vorwiegend auf die C-NHEJ eingegangen (Abb. 3).

Die Erkennung der DSBs durch das NHEJ-System beginnt mit der Bindung des KU70 (XRCC6)/KU80 (XRCC5)-Komplexes an die Bruchstelle. Daraufhin wird die DNA-PK_{CS} (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) zum DSB-Ende rekrutiert und assoziiert mit KU70/KU80, wodurch das aktive DNA-PK-Holoenzym gebildet wird (Gottlieb and Jackson, 1993; Smith and Jackson, 1999). Dies bewirkt eine Fixierung der DSB-Enden, so dass sie bis zum Verschluss der Bruchstelle in räumlicher Nähe zusammengehalten werden. Die aktive DNA-PK phosphoryliert nun ähnlich wie ATM und ATR zahlreiche Zielproteine, die eine Rolle in der Zellzykluskontrolle, Apoptose-Induktion und der DNA-Reparatur spielen (Meek et al., 2004). Anschließend assoziiert Artemis, das sowohl eine Exo- als auch eine Endonuklease-Aktivität besitzt, an den Enden der DSBs und glättet diese durch den Abbau von Einzelstrang-Überhängen (Yannone et al., 2008). Abschließend erfolgt die Re-Ligation der DSB-Enden durch den XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4)-Ligase IV-Komplex, der ebenfalls mit den DSB-Enden assoziiert und diese miteinander verknüpft (Lee et al., 2003).

Während die Funktionen der eben erwähnten Proteine gut beschrieben sind, ist die Rolle des MRN-Komplexes in der NHEJ noch relativ unklar. Jedoch gibt es Befunde, die auf eine Funktion des MRN-Komplexes in beiden Signalwegen, der C-NHEJ und der B-NHEJ, hinweisen. So wurde beispielsweise gezeigt, dass der MRN-Komplex aufgrund der Nuklease-Aktivität von MRE11 einen Einfluss auf das Prozessieren der DSB-Enden, das bei der B-NHEJ in größerem Maße stattfindet als bei der C-NHEJ, ausübt (Xie et al., 2009).

1.2.4.4. Regulation von homologer Rekombination und Nicht-Homologer-Endverknüpfung

Wie schon oben erwähnt wurde, ist die Zellzyklusphase, in der sich die entsprechende Zelle zum Zeitpunkt der Induktion von DNA-Schäden befindet, ein wichtiger Faktor, der die Wahl des DNA-Reparatur-Mechanismus beeinflusst (Branzei and Foiani, 2008). Ein Grund hierfür ist beispielsweise der Mangel an Schwesterchromatiden in der G1- und in der G0-Phase, da diese während der HR als Matrize für die Reparatur-Reaktion dienen. Somit ist ein korrekter Ablauf der HR nur während der G2- und der S-Phase gewährleistet, wenn Schwesterchromatiden zur Verfügung stehen. Dies erfordert eine Regulation der Wahl des Reparatur-Mechanismus in Abhängigkeit vom Zellzyklus. Hierbei spielt vor allem die in der HR essentielle End-Resektion eine wichtige Rolle, wobei nach deren Aktivierung die Reparatur durch HR stattfindet und im Fall des Ausbleibens die DSBs über die NHEJ repariert werden. So werden die im Rahmen der End-Resektion gebildeten 3'-Einzelstrang-Überhänge von HR-spezifischen Proteinen als Substrate erkannt (Huertas, 2010). Gleichzeitig besitzt der KU70/KU80-Komplex eine geringe Affinität zu diesen einzelsträngigen DNA-Bereichen (Dyanan and Yoo, 1998).

Die Regulation der End-Resektion wird vorwiegend durch CtIP, das nach der Induktion von DSBs phosphoryliert wird und in Abhängigkeit des MRN-Komplexes die End-Resektion vermittelt, kontrolliert (You and Bailis, 2010). Diese Kontrolle wird durch eine Zellzyklus-abhängige Expression von CtIP gewährleistet, wobei das Protein in der G1- und in der G0-Phase nur sehr schwach exprimiert wird, während die Expression in der G2- und in der S-Phase sehr stark ist (Yu and Baer, 2000). Ein weiterer Faktor ist der Phosphorylierungs-Status von CtIP, das nur im phosphorylierten Zustand aktiv ist. Auch dieser ist während der G2- und der S-Phase begünstigt. Die Konsequenz dieses Zellzyklus-abhängigen Auftretens von CtIP ist eine Inhibition der End-Resektion während der G1- und der G0-Phase. In diesem Fall kann der KU70/KU80-Komplex an den DSB binden, was eine zusätzliche Inhibition der für die HR benötigte End-Resektion zur Folge hat (Zhang et al., 2007). Im Gegensatz dazu führt ein Verlust des KU70/KU80-Komplexes zu einer erhöhten Frequenz der HR (Pierce et al., 2001).

Als Modell wurde daher vorgeschlagen, dass der MRN- und der KU70/KU80-Komplex um die Bindung an den DSB konkurrieren (Lamarche et al., 2010). In diesem Rahmen

wurden jedoch noch keine Mechanismen identifiziert, welche die Bindung von KU70/KU80 und dem MRN-Komplex an den DSB während der korrekten Zellzyklusphase fördern oder während der falschen Zellzyklusphase inhibieren. So ist zum Beispiel auch während der G1- und der G0-Phase eine Bindung des MRN-Komplexes möglich. Dies führt aus oben beschriebenen Gründen, jedoch nicht zur Bildung von 3'-Einzelstrang-Überhängen.

1.3. Induktion von Zelltod

Überschreitet der durch ein Gentoxin-induzierte DNA-Schaden einen Schwellenwert und wird er nicht ausreichend durch einen entsprechenden DNA-Reparaturweg repariert, so kann die betroffene Zelle mit der Induktion ihres eigenen Todes reagieren. Dies ist für den gesamten Organismus von Vorteil, da auf diese Weise potentiell genetisch veränderte Zellen und damit Tumorerkrankungen verhindert werden, wenn sich stark geschädigte Zellen selbst eliminieren. Bei der Exekution des angesprochenen Zelltods haben sich während der Evolution verschiedene Wege entwickelt, denen verschiedene Mechanismen zu Grunde liegen und die unterschiedliche Vor- und Nachteile für das umliegende Gewebe besitzen. Zwei dieser Zelltod-Mechanismen, Apoptose und Nekrose, werden im Folgenden vorgestellt. Beide Signalwege sind für die vorliegende Studie von spezieller Bedeutung.

1.3.1. Apoptose

Die Apoptose zählt sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten zu den wichtigsten zellulären Todes-Mechanismen und wird oft auch als der programmierte Zelltod bezeichnet. Sie spielt schon während der Embryonalentwicklung verschiedener Organismen eine wichtige Rolle (Saunders, 1966; Truman, 1984). So ist zum Beispiel bei *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) sehr genau festgelegt, welche Zellen während der Entwicklung zum adulten Wurm durch die Induktion von Apoptose absterben und welche Zellen weiter proliferieren und somit letztlich den Bauplan des adulten Tieres determinieren (Sulston and Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983). Ein weiteres Beispiel ist die Entwicklung der äußersten Extremitäten im Menschen, aber auch in anderen Wirbeltieren. Während der Embryonalentwicklung werden die Finger durch

apoptotisches Absterben von Zellen zwischen den Gliedmaßen gebildet (Penaloza et al., 2006). Bleibt die Induktion der Apoptose aus, so kommt es zur Syndaktylie, einem Entwicklungsdefekt, bei dem einzelne Finger der Betroffenen miteinander verwachsen sind. In adulten Organismen besitzt die Apoptose unter anderem eine große Bedeutung bei der Homöostase des Immunsystems (Giovannetti et al., 2008) oder von Organen, wie zum Beispiel der Leber, wo eine Deregulation der Apoptose-Rate mit verschiedenen Krankheiten assoziiert ist (Schattenberg et al., 2006).

Weiterhin spielt die Induktion der Apoptose in Zellen, deren DNA durch Gentoxine geschädigt wurde, eine wichtige Rolle (Roos and Kaina, 2006). Dies ist einerseits wichtig, da durch diesen Mechanismus entartete Zellen eliminiert werden, die potentiell Tumor-Erkrankungen auslösen können. Daher weisen einige Tumore Defekte in der Apoptose-Regulation auf, die durch Mutationen in Proto-Onko- oder Tumorsuppressorgenen verursacht wurden. Andererseits werden Patienten während der Krebstherapie mit Zytostatika behandelt, welche die DNA schädigen. Hier besteht das Ziel darin, durch DNA-Schädigungen Apoptose in den Tumorzellen zu induzieren.

Während der Exekution der Apoptose treten verschiedene Ereignisse auf, die die Apoptose von anderen Todes-Mechanismen unterscheidet. Ein wichtiges Kennzeichen der Apoptose ist die Aktivierung von Cystein-abhängigen Proteasen, den so genannten Caspasen (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). Sie sind die wichtigsten Proteine der Apoptose und gewährleisten die Spaltung zelleigener Proteine. Weitere Merkmale sind die Fragmentierung der genomischen DNA durch Nukleasen (Wyllie, 1980) und den Erhalt der intakten Zellmembran während des Voranschreitens der Apoptose. Zum Ende des Apoptose-Prozesses zerfällt die Zelle dann in apoptotische Vesikel, die durch Makrophagen eliminiert werden (Hacker, 2000; Kerr et al., 1972). Aufgrund dieses Mechanismus induzieren apoptotische Zellen keine verstärkte Immunantwort. Daher bleiben Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe aus. Dies ist im Rahmen der Tumor-Therapie ein wichtiger Vorteil, da Entzündungsreaktionen als Nebenwirkung minimiert werden.

Bei der Induktion der Apoptose existieren verschiedene Signalwege (Lawen, 2003), von denen zwei besonders wichtig sind: Der intrinsische und der extrinsische Signalweg (Abb. 4). Der intrinsische Signalweg wird auch als mitochondrialer Signalweg bezeichnet. In diesem Fall wird ausgehend von einem apoptotischen Stimulus Cytochrom C (Cyt_c) aus dem Intermembran-Raum der Mitochondrien

freigesetzt. Die Freisetzung erfolgt über die Diffusion der Cyt_c-Moleküle durch verschiedene Transmembran-Kanäle, die in erster Linie durch Modulation von Mitgliedern der BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2)-Proteinfamilie induziert werden (Youle and Strasser, 2008). Dies ist auch der Fall, wenn O⁶-MeG-induzierte DSBs als apoptotische Stimuli wirken (Ochs and Kaina, 2000). Prominentestes Beispiel der BCL2-Familie ist BCL2, aber auch Bcl-x_L ist ein Mitglied dieser Proteinfamilie. Beide Proteine wirken anti-apoptotisch und sind daher als Proto-Onkogene einzustufen. Weitere wichtige Vertreter dieser Gruppe, die jedoch pro-apoptotisch wirken, sind unter anderem BID (BH3 interacting domain death agonist), BAK (BCL2-antagonist/killer 1) und BAX (BCL2-associated X protein), das nach Induktion durch einen apoptotischen Stimulus durch Oligomerisierung selbst Poren innerhalb der äußeren Mitochondrien-Membran formt und auf diese Weise die Freisetzung von Cyt_c ermöglicht (Antonsson et al., 1997; Antonsson et al., 2000). Durch die Freisetzung von Cyt_c kommt es durch Interaktion mit APAF1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) und der Pro-Caspase-9 zur Ausbildung des Apoptosoms (Riedl and Salvesen, 2007). Die Bildung dieses Multi-Proteinkomplexes ist ATP-abhängig und induziert die Aktivierung der Pro-Caspase-9. Die aktive Caspase-9 aktiviert nun Effektor-Caspasen wie die Caspase-3, indem sie diese proteolytisch in ihre aktiven Fragmente spaltet (Li et al., 1997). Der Aktivierung der Effektor-Caspasen folgen die Spaltung der zahlreichen Zielproteine und damit der Beginn der eigentlichen Apoptose-Exekution.

Der extrinsische Signalweg verläuft über Mitglieder der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Familie und der „Todesrezeptoren“ zu denen auch der FAS-Rezeptor (alias Apo-1 oder CD95) gehört (Guicciardi and Gores, 2009). Diese Rezeptoren werden durch apoptotische Stimuli aktiviert. Im Fall des FAS-Rezeptors kann dies zum Beispiel über den FAS-Liganden erfolgen oder, im Fall von O⁶-MeG-induzierten DSBs, durch p53, welches durch die schon beschriebene DNA-Schadensantwort in Abhängigkeit von ATM und ATR bzw. CHK2 und CHK1 stabilisiert und phosphoryliert wird (Roos and Kaina, 2006). Nach Aktivierung des FAS-Rezeptors kommt es zur Trimerisierung des Komplexes und zur Bindung des Adaptormoleküls FADD (Fas-associated death domain protein) an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors. Diese Interaktion wird über so genannte Todesdomänen (DD) beider Proteine vermittelt. FADD interagiert nun über seine Todeseffektordomäne (DED) mit der Pro-Caspase-8 und vervollständigt dadurch den so genannten DISC (Death inducing signaling complex) bestehend aus FAS-Rezeptor, FADD und Pro-Caspase-8. Es kommt dann zur Transaktivierung der Pro-Caspase-8, wobei die aktive

Caspase-8 in das Cytosol entlassen wird und analog zur Caspase-9 die Effektor-Caspasen-3 bzw. -7 und andere Zielproteine aktiviert (Lawen, 2003).

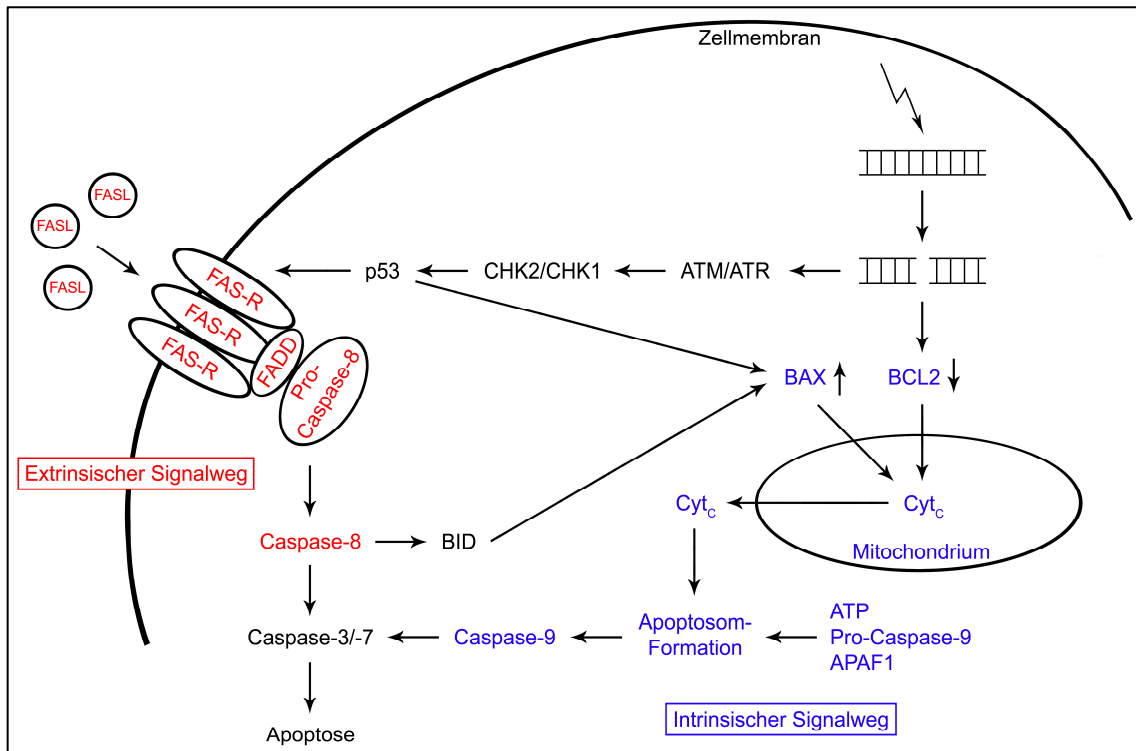


Abb. 4 Übersicht der apoptotischen Signalwege. Vereinfachte Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalwegs der Apoptose am Beispiel von DSBs als apoptotischer Stimulus.

1.3.2. Nekrose

Die Nekrose galt im Gegensatz zur Apoptose lange Zeit als die nicht regulierte, pathologische Form des Zelltods, die in der Regel unbeabsichtigt stattfindet. Untersuchungen in den letzten Jahren zeigten jedoch, dass neben der Apoptose auch die Nekrose durch verschiedene Signalwege reguliert werden kann und meist nicht regellos stattfindet. In diesem Fall wird die Nekrose durch verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel einer massiven Schädigung der DNA, physiko-chemischer Stress, Nährstoffmangel oder auch durch eine Reihe von pathologischen Zuständen (zum Beispiel bei der Ischämie), induziert. Außerdem ist beschrieben, dass die Nekrose

schon während der frühen Embryonalentwicklung auftritt (Chautan et al., 1999) und auch für das Aufrechterhalten der inneren Homöostase, das heißt zur Konstanthaltung von Gewebe- und Organfunktionen, wichtig ist (Barkla and Gibson, 1999; Roach and Clarke, 2000).

Charakteristische Erscheinungen der Nekrose sind das Anschwellen der betroffenen Zellen und darauf folgend der Verlust der Zellmembran-Integrität, wodurch intrazelluläre Bestandteile in das Milieu der Umgebung entlassen werden (Festjens et al., 2006). Da durch diesen Mechanismus auch inflammatorische Substanzen wie zum Beispiel HMGB1 (High mobility group box 1 protein) (Bianchi and Manfredi, 2004; Scaffidi et al., 2002), das Hitzeschockprotein 70 (HSP70) (Basu et al., 2000) und Harnsäure (Shi et al., 2003) freigesetzt werden, kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems und als Folge dessen zu Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe. Die abschließende Eliminierung der nekrotischen Zellreste durch Phagozyten erfolgt ähnlich, jedoch weniger effektiv als im Fall der Apoptose (Brouckaert et al., 2004).

Die zuvor erwähnten Signalwege, welche bei der Nekrose involviert sind, sind in Abb. 5 im Überblick dargestellt. Häufig spielen bei der Nekrose die Mitochondrien eine zentrale Rolle (Vanlangenakker et al., 2008). Diese untergehen unter „Stress“-Bedingungen die so genannte mitochondriale Permeabilitäts-Transition (MPT). In diesem Fall öffnen sich spezielle Proteinkanäle, die so genannten mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren (MPTP), welche die mitochondriale Matrix mit dem Cytosol verbinden. Dies hat eine Depolarisierung der inneren Mitochondrien-Membran zur Folge. Die mitochondriale Matrix schwillt an und die äußere Mitochondrien-Membran wird zerstört (Javadov and Karmazyn, 2007). Letztlich gehen die betroffenen Mitochondrien zu Grunde. Ist eine kritische Anzahl von Mitochondrien betroffen, so stirbt die Zelle durch Nekrose.

Die Auslösung der MPT kann verschiedene Ursachen haben. Ein Beispiel ist eine unzureichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff, wie es bei der Ischämie auftritt. Hier kommt es nacheinander zu einem mitochondrialen ATP-Mangel und zu einer vermehrten Laktat-Produktion sowie einem damit verbundenen Absinken des pH-Wertes, da eine anaerobe Glykolyse induziert wird, um erneut Energie bereitzustellen (Dennis et al., 1991). Die Folge sind eine dramatische Erhöhung der intrazellulären und auch der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration, da verschiedene

Ionen-Pumpen aktiviert werden, um dem absinkenden pH-Wert entgegenzuwirken (Gunter et al., 2000; Sapolsky et al., 1996). Dieser Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration begünstigt die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), welche durch eine wiederkehrende Sauerstoff-Versorgung weiter verstärkt werden kann. Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration und die Produktion von ROS induzieren schließlich im Zusammenspiel, aber auch einzeln, die MPT (Duchen, 2000; Halestrap, 2006).

Eine weitere wichtige Rolle bei Nekrose-Induktion spielen die Lysosomen, wenn deren Membran permeabilisiert wird (Vanlangenakker et al., 2008). Die so genannte lysosomale Membran-Permeabilisierung (LMP) wird zum Beispiel durch Calpain, welches ebenfalls durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wird, induziert (Yamashima et al., 1998). Die darauf folgende Entlassung spezifischer Proteasen, den Cathepsinen, ins Zytoplasma führt zur Induktion von Nekrose.

Nekrose kann aber auch durch Aktivierung verschiedener Rezeptoren wie zum Beispiel den „Todesrezeptoren“ oder den TNFRs induziert werden, falls eine Inhibition der Caspasen vorliegt. In diesem Fall besitzen RIP1 (Receptor-interacting serine-threonine kinase 1) aber auch RIP3 (Receptor-interacting serine-threonine kinase 3) Schlüsselfunktionen (Festjens et al., 2007; Vandenabeele et al., 2010). Zusammen sind sie wichtige Faktoren bei der Bildung des Nekrosom-Signal-Komplexes, welcher die Nekrose initiieren kann. So induziert beispielsweise aktiviertes RIP1 ROS-abhängig sowohl die MPT als auch die LMP. Die Aktivierung von RIP1 kann aber auch ohne Beteiligung der Mitochondrien oder der Lysosomen, ebenfalls über die Bildung von ROS, zur Nekrose-Induktion führen (Vanlangenakker et al., 2008).

Weiterhin spielt eine Hyperaktivierung von PARP1 bei der Induktion von Nekrose eine wichtige Rolle (Ha and Snyder, 1999). Sie ist bei einer extensiven Schädigung der DNA oder wenn die BER gestört ist von Bedeutung und induziert ein Absinken des β -Nikotinamid-Adenin-Dinukleotids (NAD) und des ATPs als kritisches Ereignis. Dies wiederum führt über eine RIP1- und JNK (c-jun N-terminale kinase 1)-Aktivierung zur MPT und letztlich zur Induktion von Nekrose (Festjens et al., 2006). So induziert beispielsweise MNNG in embryonischen Mausfibroblasten PARP1-abhängig sehr stark Nekrose, wenn es in sehr hohen Konzentrationen verabreicht wird (Zong et al., 2004). Außerdem können Zellen nach Erhalt eines apoptotischen Stimulus durch Nekrose sterben, wenn zuvor eine ATP-Depletion induziert wurde. Dies macht deutlich, dass

der zelluläre ATP-Gehalt die Wahl des Todes-Mechanismus determiniert (Leist et al., 1997).

Analog zur Apoptose, die auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird, wird aufgrund der vielfältigen Signalwege, denen die Nekrose unterliegen kann, heute häufig der Begriff der „programmierten Nekrose“ verwendet, falls die Induktion über einen dieser Signalwege stattfindet. Dies soll die komplexen Regulationsmechanismen, die auch in diesem Zelltodmechanismus auftreten, verdeutlichen. Eine weitere begriffliche Differenzierung wird vorgenommen, wenn die Induktion der „programmierten Nekrose“ Rezeptor-vermittelt (zum Beispiel durch den FAS-Rezeptor oder durch TNFRs) und in Abhängigkeit von RIP1 stattfindet. In diesem Fall wird von „Nekroptose“ gesprochen (Galluzzi and Kroemer, 2008; Kroemer et al., 2009). Der Begriff reflektiert hierbei eine spezielle Form der „programmierten Nekrose“ und wurde erstmals 2005 eingeführt (Degterev et al., 2005).

induzieren primär Basenschäden, welche jedoch während der Replikation in DSBs überführt werden können. Daher ist es legitim anzunehmen, dass eine Beeinträchtigung der Funktionen von NBN, ATM und ATR durch Mutationen in diesen Genen eine Reduktion der Reparatur der DSBs, welche indirekt durch Methylnanzen induziert werden, zur Folge hat. Es wird von der Arbeitshypothese ausgegangen, dass Zellen, die Mutationen in einem dieser Gene tragen, sensitiver gegenüber diesen methylierenden Agenzien reagieren als Zellen, die diesbezüglich „wildtypisch“ sind.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung soll die Toxizität von Methylnanzen in menschlichen Fibroblasten und lymphoblastoiden Zellen, die aus Patienten mit NBS, AT oder dem Seckel-Syndrom isoliert wurden, untersucht werden. Die Sensitivitäten dieser Zellen sollen mit der Sensitivität von Zellen verglichen werden, welche bezüglich NBN, ATM und ATR dem Wildtyp entsprechen. Dabei wird zur Induktion des Zelltods das methylierende Mutagen MNNG und das als Chemotherapeutikum eingesetzte TMZ verwendet. Im Rahmen dieser Untersuchungen soll mit der Annexin V/PI-Methode zwischen Apoptose- und Nekrose-Induktion unterschieden und nachfolgend die entsprechenden der Apoptose und Nekrose zu Grunde liegenden Signalwege analysiert werden. Um die Daten zu verifizieren, soll in Tumorzellen mittels RNA-Interferenz (RNAi) ein stabiler Knockdown dieser Proteine erzeugt werden.

Weiterhin soll untersucht werden, welche Rolle das DNA-Reparaturenzym MGMT in der zellulären Protektion einnimmt bzw. welche DNA-Läsionen für die Induktion des Zelltods verantwortlich sind und ob das Fehlen von NBN, ATM und ATR die Effizienz der BER beeinträchtigt. Da Methylnanzen-induzierte DNA-Schäden auch durch BER repariert werden (siehe Kapitel 1.1.2.), ist dieser Reparaturweg für die hier untersuchten Fragestellungen ebenfalls von großer Bedeutung. Abschließend soll untersucht werden, wie sich die mutierten Zelllinien gegenüber einer Reihe von weiteren Gentoxinen, die andere DNA-Läsionen induzieren, hinsichtlich Apoptose- und Nekrose-Induktion verhalten.

2. Materialien

2.1. Zelllinien

Menschliche Fibroblasten, Simian-Virus 40 (SV40)-transformiert

GM637	Wt	RPMI 1640 + 10 % FCS
NBS-1LBI	NBN mt	RPMI 1640 + 10 % FCS
LB1+LXIN	NBN mt	DMEM + 10 % FCS + 0,4 mg/ml G418
LB1+NBS1	NBN kompl.	DMEM + 10 % FCS + 0,4 mg/ml G418
ATs4	ATM mt	RPMI 1640 + 10 % FCS

Menschliche lymphoblastoide Zelllinien, Epstein-Barr-Virus (EBV)-transformiert

95P466	Wt	RPMI 1640 + 10 - 15 % FCS
94P247	NBN mt	RPMI 1640 + 10 - 15 % FCS
94P126	NBN mt	RPMI 1640 + 10 - 15 % FCS
AG09387	Wt	RPMI 1640 + 10 - 15 % FCS
DK0064	ATR mt	RPMI 1640 + 10 - 15 % FCS

Menschliche Melanom-Zelllinie

D03		RPMI 1640 + 10 % FCS
------------	--	----------------------

Menschliche Zervixkarzinom-Zelllinien

HeLa MR		DMEM + 10 % FCS
HeLa S3		DMEM + 10 % FCS

Zusätzlich wurde für die Kultivierung der Zelllinien den entsprechenden Medien die Antibiotika Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml) zugefügt.

Folgende Zelllinien wurden von Prof. Digweed (Berlin) zur Verfügung gestellt: LB1+LXIN, LB1+NBS1, 95P466, 94P247 und 94P126

Folgende Zelllinien wurden von Dr. O'Driscoll (Brighton) zur Verfügung gestellt: AG09387 und DK0064

2.2. Medien und Zellkulturkomponenten

10 x Trypsin-EDTA (0,5 %, 0,2 % in D-PBS)	PAA, Pasching, Österreich
100 x Penicillin/Streptomycin (10 U/µl, 10 µg/µl)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.3. Bakterienstämme

Escherichia coli (*E. coli*) RR1

2.4. Vektoren

pSuper basic	Oligoengine, Seattle, Washington
pSV2-MGMT	(Kaina et al., 1991)
pSV2-neo	(Southern and Berg, 1982)

2.5. shRNA-Oligonukleotide gegen NBN

Sense

GATCCCCGGCGTGTCAGTTGATGAAATTCAAGAGATTTTCATCAACTGACACGCCTTTTTA

Antisense

AGCTTAAAAAGGCGTGTCAGTTGATGAAATCTCTTGAATTTCATCAACTGACACGCCGGG

Beide DNA-Oligonukleotide wurden von Oligoengine (Seattle, Washington) bezogen.

2.6. DNA-Oligonukleotide für den BER-Aktivitätstest

ABP

5'-ATAAGCTTGATCGGCCGGCCGCGGTATAT-3'

2GScomp

5'-TCGGTAGCCAATAAGCGTGGTCGGACGGACTCGGTAGAT-3'

2GSU

5'-ATCTACCGAGTCCGTCCGAUCACGCTTATTGGCTACCGA-3'

Die drei DNA-Oligonukleotide wurden von Genterprise Genomics (Mainz, Deutschland) bezogen.

2.7. Primärantikörper

10H (Anti-PAR)	Mouse mAb	(Kawamitsu et al., 1984), von Prof. Bürkle (Konstanz) zur Verfügung gestellt
Anti-AMP-Kinase	Mouse mAb	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts
Anti-pAMP-Kinase (Thr172)	Rabbit mAb	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts
Anti-Caspase-7 (Spaltpr., sp198)	Rabbit pAb	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts
Anti-CHK2	Rabbit pAb	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts
Anti-pCHK2 (T68)	Rabbit mAb	Epitomics, Burlingame, Kalifornien
Anti-ERK2	Rabbit pAb	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-MGMT	Rabbit pAb	eigene Herstellung von Prof. Kaina

2. Materialien

Anti-MGMT	Mouse mAb	Millipore, Billerica, Massachusetts
Anti-MLH1	Rabbit pAb	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-MSH2	Mouse mAb	Oncogene Science Biomarker Group, Cambridge, Massachusetts
Anti-MSH6	Mouse mAb	BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, New Jersey
Anti-NBN	Rabbit pAb	Novus Biologicals, Cambridge, Großbritannien
Anti-p53	Mouse mAb	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-PARP1	Mouse mAb	BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, New Jersey
Anti-PMS2	Mouse mAb	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

2.8. Sekundärantikörper

Peroxidase-konjugiert

Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, Pennsylvania
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, Pennsylvania

Infrarot-Farbstoff-konjugiert

IRDye 800CW Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
IRDye 800CW Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland

IRDye 680 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
IRDye 680 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland

Fluorophor-konjugiert

Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
---	-----------------------------------

2.9. Chemikalien

1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-Oktan (DABCO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2-(4-[2-Hydroxyethyl]-1-Piperazinyl) -Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol Blau Natriumsalz	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Coomassie Brillant-Blau G250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Entwicklungs- und Fixier-Lösung	Kodak, Rochester, New York
Ethidiumbromid-Lösung (1 %, 10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure- Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NAD	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2. Materialien

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nonylphenylpolyethylen-Glykol (NP-40)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rotiphorese Gel 40 (19:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiszint eco plus	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris [Hydroxymethyl]-Aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylen Cyanol FF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.10. Inhibitoren und Aktivatoren

3,4-Dihydro-5-[4-(1-Piperidiny)- Butoxy]-1(2H)-Isoquinolinon (DPQ)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aprotinin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chymostatin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Leupeptin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Metformin (1,1-Dimethylbiguanid-Hydrochlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NU7026	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
O ⁶ -Benzylguanin (O ⁶ -BG)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pepstatin	Merck, Darmstadt, Deutschland

2. Materialien

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Sigma-Aldrich, Taufkirchen,
Deutschland

2.11. Enzyme und entsprechende Reaktionspuffer

10 x Restriktionspuffer (rot)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
10 x T4 Polynukleotid-Kinase Reaktionspuffer	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
BGLII (10.000 U/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EcoRI (10.000 U/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HINDIII (18.000 U/ml)	GE Healthcare, München, Deutschland
T4 DNA-Ligase (2 x 10 ⁶ U/ml), 10 x Reaktionspuffer	New England Bio Labs, Frankfurt am Main, Deutschland
T4 Polynukleotid-Kinase (10.000 U/ml)	New England Bio Labs, Frankfurt am Main, Deutschland
Phosphokreatin-Kinase	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Uracil-DNA-Glykolsylase (1000 U/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

2.12. Biologische Substanzen

100 bp DNA-Leiter	New England Bio Labs, Frankfurt am Main, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ATP	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ATP, [³² P] – 3000 Ci/mmol	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland

2. Materialien

Agar (Pulver)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Desoxynukleotid-Mix (dNTP)	New England Bio Labs, Frankfurt am Main, Deutschland
G418	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kalbsthymus-DNA (³ H-markiert)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller, Pulver)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Low melting point (LMP)-Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Magermilch (Pulver)	Frema Reform, Granovita, Reformhaus, Mainz, Deutschland
PeqGOLD Protein-Marker II	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Phosphokreatin-Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rinderserumalbumin, Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.13. Gentoxische Substanzen

[³ H]-N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff ([³ H]-MNU)	GE Healthcare, München, Deutschland
ETO	Apotheke Uniklinik Mainz, Deutschland
HdCDT	Dr. Teresa Frisan, Karolinska Institut Stockholm, Schweden
MMS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MNNG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TMZ	Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey
TPT	Apotheke Universitätsmedizin Mainz, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 % (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.14. Kits und Assays

Cell Titer-Glo Lumineszent Zell Viabilitätsassay	Promega, Mannheim, Deutschland
ECL-Detektions-Kit	GE Healthcare, München, Deutschland
Effectene Transfektions-Reagenz	Qiagen, Hilden, Deutschland
FITC-Annexin V	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Plasmid Midi-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 (Water soluble tetrazolium 1)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

2.15. Puffer und Lösungen

Agarose-Gel-Lösung (Herstellung shRNA-Vektor)	2 % Agarose 90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM EDTA 0,7 µg/ml Ethidiumbromid
Annexin V-Bindepuffer (Annexin V/PI-Doppelfärbung)	10 mM HEPES 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂ 0,1 % BSA pH 7,4
Antifade-Medium (Immunfluoreszenz)	48,75 % Glycerin 48,75 % PBS 2,5 % DABCO pH 8,6

2. Materialien

BER-Puffer (BER-Aktivitätstest)	40 mM HEPES 5 mM MgCl ₂ 0,1 mM EDTA 0,5 mM DTT pH 7,8
Blocklösung (Immunfluoreszenz)	5 % Magermilch 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 mM KH ₂ PO ₄ 0,1 % Tween-20 pH 7,4
Blocklösung (Western-Blot-Verfahren)	5 % Magermilch 20 mM Tris 137 mM NaCl 0,1 % Tween-20 pH 7,6
Bradford-Lösung (Proteinkonzentrationsbestimmung)	8,5 % Phosphorsäure 4,75 % Ethanol 0,01 % Coomassie Brilliant- Blau G250 Lösung filtern
Einfriermedium (Zellkultur)	90 % FCS 10 % DMSO
Elektrophorese-Puffer (alk. Comet-Assay)	300 mM NaOH 1 mM EDTA pH > 13
Elektrophorese-Puffer (Western-Blot-Verfahren)	50 mM Tris 384 mM Glycin 0,1 % SDS

2. Materialien

Formamid-Ladepuffer (BER-Aktivitätstest)	97 % Formamid 10 mM EDTA 0,025 % Bromphenol-Blau 0,025 % Xylen Cyanol FF
Fusionspuffer (Herstellung shRNA-Vektor)	100 mM NaCl 50 mM HEPES pH 7,4
LB-Agar-Lösung (Herstellung shRNA-Vektor)	25 g/l LB-Medium (Pulver) 15 g/l Agar 100 µg/ml Ampicillin- Natriumsalz
Mix A (BER-Aktivitätstest)	80 mM HEPES 10 mM MgCl ₂ 0,2 mM EDTA 1 mM DTT 4 mM ATP 40 µM dNTP 500 µM NAD 50 mM Phosphokreatin 100 ng/µl Phosphokreatin- Kinase 40 ng/µl ABP DNA- Oligonukleotid 60 nM DNA-Oligonukleotid pH 7,8
Neutralisationspuffer (alk. Comet-Assay)	0.4 M Tris pH 7.5
PBS-Twen-20 (PBST) (Immunfluoreszenz)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 mM KH ₂ PO ₄ 0,1 % Tween-20 pH 7,4

2. Materialien

Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (verschiedene Anwendungen)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Polyacrylamid-Sequenziergel (BER-Aktivitätstest)	50 % Rotiphorese Gel 40 7 M Harnstoff 90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM EDTA 0,035 % APS 0,0175 % TEMED
Ponceau S-Lösung (Western-Blot-Verfahren)	0,1 % Ponceau S 5 % CH ₂ COOH
Protein-Ladepuffer (Western-Blot-Verfahren)	50 mM Tris/HCl 2 % SDS 10 % Glycerin 0,02 % Bromphenol-Blau 1 % β-Mercaptoethanol
Protein-Transferpuffer (Western-Blot-Verfahren)	50 mM Tris 384 mM Glycin 20 % Methanol
Puffer I (Proteinextraktherstellung BER-Aktivitätstest)	10 mM Tris 200 mM KCl 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Chymostatin 1 µg/ml Pepstatin 1 µg/ml Aprotinin 1 mM DTT 1 µM PMSF pH 7,8

2. Materialien

Puffer II (Proteinextraktherstellung BER-Aktivitätstest)	10 mM Tris 600 mM KCl 2 mM EDTA 40 % Glycerol 0,2 % NP-40 pH 7,8
Reaktionspuffer (MGMT-Aktivitätstest)	70 mM HEPES/KOH 1 mM DTT 5 mM EDTA pH 7,8
Reaktionslösung (WST-1-Assay)	10 % WST-1-Reagenz 90 % Zellkulturmedium
RWDB-Puffer (BER-Aktivitätstest)	25 mM HEPES 10 mM KCl 12 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 1 mM DTT 17 % Glycerol
SDS-Sammelgel-Lösung (Western-Blot-Verfahren)	0,76 ml Rotiphorese Gel 40 0,76 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8 4,4 ml dH ₂ O 60 µl 10 % SDS 60 µl 10 % APS 6 µl TEMED
SDS-Trenngel-Lösung (5 %/7,5 %/10 %/12,5 %) (Western-Blot-Verfahren)	1,5 ml/2,3 ml/3 ml/3,6 ml Rotiphorese Gel 40 3 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 7,2 ml/6,5 ml/5,7 ml/5,1 ml dH ₂ O 120 µl 10 % SDS 60 µl 10 % APS 6 µl TEMED

2. Materialien

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) (verschiedene Anwendungen)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM EDTA
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) (verschiedene Anwendungen)	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8
Tris-gepufferter Salzlösung-Tween-20 (TBST) (Western-Blot-Verfahren)	20 mM Tris 137 mM NaCl 0,1 % Tween-20 pH 7,6
Zellysepuffer (alk. Comet-Assay)	2.5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris/NaOH 1 % Na-Laurylsarcosinat 1 % Triton X100 10 % DMSO pH 10
Zellysepuffer (Proteinextraktherstellung MGMT-Aktivitätstest)	20 mM Tris/HCl 1 mM EDTA 1 mM β -Mercaptoethanol 5 % Glycerin 100 mM PMSF pH 8,5
Zellysepuffer (Proteinextraktherstellung Western-Blot-Verfahren)	20 mM Tris/HCl 1 mM EDTA 1 mM β -Mercaptoethanol 5 % Glycerin 10 mM DTT 500 μ M PMSF 1 μ M Na_3VO_4 pH 8,5

2.16. Software

Ascent Software v2.6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Cell A	Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Deutschland
CellQuest Pro	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
EndNote v9.0.0	Thomson Reuters, New York City, New York
Gene Snap v6.0.5	Syngene, Cambridge, Großbritannien
GraphPad Prism v3.0.2	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien
ImageQuant v5.2	Molecular Dynamics, Sunnyvale, Kalifornien
Komet v4.0.2	Kinetic Imaging, Liverpool, Großbritannien
Mikro Win 2000 v4.41	Mikrotek Laborsysteme, Overath, Deutschland
MS Office v2003	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Multi-Analyst v1.0.1	Bio-Rad, München, Deutschland
Odyssey v3.0	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
Photoshop v7.0	Adobe Systems, München, Deutschland
Scanner Control v4	Molecular Dynamics, Sunnyvale, Kalifornien
WinMDI v2.9	J. Trotter, http://facs.scripps.edu/software.html

2.17. Verbrauchsmaterialien

15 ml-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
50 ml-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
6-Lochplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2. Materialien

24-Lochplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96-Lochplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96-Lochplatten (opak)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Chemielumineszenz-Filme (18 cm x 24 cm)	GE Healthcare, München, Deutschland
Chromatographie-Säulen (Micro Bio-Spin 6/30)	Bio-Rad, München, Deutschland
Deckgläser (20 mm x 20 mm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser (50 mm x 24 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Dialysierschläuche (MWCO 8-10 kDa)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalpipetten (5 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Einmalpipetten (10 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
FACS-Analysenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Injektionsspritzen (5 ml)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Kombispitzen (5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Nitrozellulose-Transfer-Membran	Whatman, Dassel, Deutschland
Objektträger (76 mm x 26 mm)	Diagonal, Münster, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, Illinois
Pasteurpipetten (Glas)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen (weiß)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (gelb)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (blau)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzenfilter (Porengröße 0,45 µm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2. Materialien

Transferpapier (1 mm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen (35 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen (60 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen (100 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2.18. Geräte

[³² P]-Detektionsschirm		Molecular Dynamics, Sunnyvale, Kalifornien
[³² P]-Dokumentationsanlage Typ Storm B40		Molecular Dynamics, Sunnyvale, Kalifornien
[¹³⁷ Cs]-Quelle	Typ Gammacell 2000	Molsgaard Medical, Heorsholm, Dänemark
Analysenwaagen	Typ TE4101	Sartorius, Göttingen, Deutschland
	Typ A200S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Binokulare	Typ Wilovert A	Hund, Wetzlar, Deutschland
	Typ Telaval 31	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Brutschrank	Typ Hera Cell 150	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer	Typ FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Einfrierbox	Typ Cryo 1°C	
	Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts

2. Materialien

Entwicklungskassette		Appligene, Heidelberg, Deutschland
Flüssigszintillationszähler	Typ Tri-Carb 2100TR	Canberra Packard Central Europe, Schwadorf, Austria
Geldokumentationsanlage	Typ Ingenius	Syngene, Cambridge, Großbritannien
Gelelektrophorese-Kammer	Typ 41-2025	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
	Typ Wide Mini-Sub Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Typ Forma 905	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Heizblock	Typ Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizkammer für Schüttelinkubator	Typ Certomat H	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Infrarot-Abbildungsanlage	Typ Odyssey	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
Kombipipette	Typ Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Luminometer	Typ Centro LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Mikroskope	Typ Microphot-FXA	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
	Typ Axiovert 35	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrozentrifuge	Typ DW41	Qualitron, Korea
N ₂ -Zelltank	Typ Locator 6+	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
pH-Meter	Typ pH525	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	Typ Multiscan EX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
	Typ Sunrise RC TS/TW	Tecan, Crailsheim, Deutschland

2. Materialien

Pipetten	Typ Pipetman (P20, P100, P200, P1000)	Gilson, Middleton, Wisconsin
Pipetten	Typ Labmate (10, 5000)	Abimed, Langenfeld, Deutschland
Pipettierhilfe	Typ Pipetboy acu	IBS, Fernwald, Deutschland
Proteintransferkammer	Typ Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Schüttelinkubator	Typ Certomat R	B. Braun, Melsungen Deutschland
SDS-PAGE-System	Typ Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Sequenziergel-System	Typ Sequi-Gen GT	Bio-Rad, München, Deutschland
Spannungsgeräte	Typ Power Pac 200	Bio-Rad, München, Deutschland
	Typ Power Pac 300	Bio-Rad, München, Deutschland
	Typ 200/2.0 Power Supply	Bio-Rad, München, Deutschland
	Typ 3000Xi	Bio-Rad, München, Deutschland
Spektrophotometer	Typ Nanodrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Sterilbank	Typ Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Überkopfschüttler	Typ Eigenbau	Werkstatt, Universitätsmedizin Mainz, Deutschland
Ultraschallgerät	Typ Sonifier Cell Disruptor B15	Branson Ultraschall, Dietzenbach, Deutschland
Ultrazenrtifuge	Typ Himac CS 120GX	Hitachi Koki, Tokyo, Japan
UVC-Quelle	Typ NSE 11-270	Philips, Hamburg, Deutschland
Vakuumpumpe	Typ N022 AN.18	KNF Neuberger, Freiburg Deutschland

2. Materialien

Vortexer	Typ Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Gera, Deutschland
Wasserbäder	Typ 3044	Köttermann, Uetze Hänigsen, Deutschland
	Typ 1002	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wippschüttler	Typ Certomat TC2	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Zählkammer	Typ Neubauer	Marienfeld, Lauda- Königshofen, Deutschland
Zellschaber		Deutsch & Neumann, Berlin, Deutschland
Zentrifugen	Typ Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Typ Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
	Typ Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
	Typ Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
	Typ Sorvall RC-5	Du Pont, Neu Isenburg, Deutschland

3. Methoden

3.1. Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien wurde in entsprechendem Nährmedium in Plastikzellkulturflaschen bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 7 % CO₂ durchgeführt. Der Typ des Mediums sowie verwendete Zusätze wie FCS und Antibiotika sind in Kapitel 2.1. angegeben.

Die Zelllinien wurden 2 x wöchentlich passagiert. Dafür wurden die adhärenzwachsenden Zellen, sobald das Wachstum der Zellen annähernd eine Konfluenz erreicht hatte, das alte Medium verworfen, die Zellkulturflasche mit PBS gespült und mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden einzeln und mit frischem, angewärmtem Medium neu ausgesät, wobei 80 – 90 % der Zellen verworfen wurden. Zur Passage der Zellen, welche in Suspension wachsen, wurde die Zellsuspension nach Inkubation der gewünschten Zeitspanne homogenisiert und die Zelldichte mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Danach wurde die Zellsuspension durch Zugabe von frischem, angewärmtem Medium auf eine Zelldichte von $3,5 \times 10^5$ Zellen pro ml verdünnt.

Zur Herstellung des Stickstoff-Vorrats wurden exponentiell wachsende Zellen geerntet, in PBS aufgenommen und 5 min bei 1000 g abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in Einfriermedium aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und in der dafür vorgesehenen Einfrierbox bei -80°C weggefroren. Nachdem sich die Temperatur langsam angeglichen hat, wurden die Zellen am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen der Zellen aus dem Stickstoff-Vorrat wurden die Kryoröhrchen dem Stickstoff-Tank entnommen und möglichst schnell im Wasserbad aufgetaut. Danach wurde die gesamte Zellsuspension in Medium verdünnt und 5 min bei 1000 g abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in frischem, angewärmtem Medium erneut ausgesät.

3.2. Behandlung der Zellen mit Zytostatika

Zur Beantwortung der in Kapitel 1.4. erwähnten Fragestellungen wurden die Zellkulturen mit verschiedenen Zytostatika behandelt oder UVC bzw. IR ausgesetzt.

Die Zytostatika-Behandlung der Zellen erfolgte durch direkte Zugabe des spezifischen Volumens der Stammlösung zum Zellkulturmedium oder, zur besseren Handhabung bei geringen Zytostatika-Konzentrationen, durch Zugabe einer Vorverdünnung der Stammlösung in Medium. Aufgrund der geringen Stabilitäten und der damit verbundenen kurzen Halbwertszeiten wurde bei der Behandlung mit MNNG, TMZ, ETO, TPT und HdCDT eine Dauerbehandlung durchgeführt und auf einen Mediumwechsel verzichtet. Im Fall von MMS wurde die Behandlungsdauer auf 1 Std. begrenzt und nach entsprechender Inkubation das Medium nach einmaligem Waschen mit PBS durch frisches, angewärmtes Medium ersetzt. Um das DNA-Reparaturprotein MGMT zu inaktivieren, wurde, wenn nicht anders beschrieben, bei der Behandlung mit den Alkylanzien (MNNG, TMZ und MMS) zusätzlich 1 Std. vor der Zytostatika-Applikation der MGMT-Inhibitor O⁶-BG (Dolan et al., 1990) in einer Konzentration von 10 µM dem Medium zugefügt.

Die Bestrahlung der Zellkulturen mit IR erfolgte an der [¹³⁷Cs]-Strahlungsquelle des Institutsgebäudes. Die Bestrahlung mit UVC wurde unter der UV-Quelle durchgeführt. Da Plastik und das Zellkulturmedium UVC-Strahlung abschirmen, wurden die Zellkulturschalen vor der Bestrahlung geöffnet und das Medium für den Zeitraum der Bestrahlung entfernt.

3.3. Herstellung des shRNA-Vektors gegen Nibrin

Die von Oligoengine (Seattle, Washington) bezogenen Sense und Antisense DNA-Oligonukleotide wurden jeweils in sterilem, Nuklease-freiem H₂O gelöst und auf eine Konzentration von 3 mg/ml eingestellt. Danach wurde die Fusionsreaktion (Annealing), bei welcher die beiden einzelsträngigen DNA-Oligonukleotide aneinander binden, angesetzt. Es wurde jeweils 1 µg beider DNA-Oligonukleotide in 50 µl Fusionspuffer verdünnt und der Reaktionsansatz nacheinander 4 min bei 90°C und 10 min bei 70°C inkubiert. Es folgte ein Herunterkühlen auf 4°C. Parallel dazu erfolgte die Linearisierung

3. Methoden

des pSuper basic-Vektors. Hierzu wurden 20 µg Vektor in Restriktionspuffer (rot) verdünnt und 72 U HINDIII Restriktionsenzym zugefügt und 2 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 40 U BGLII Restriktionsenzym hinzugefügt. Es folgte eine erneute Inkubation von 2 Std. bei 37°C. Nach Abschluss der Linearisierung wurden beide Restriktionsenzyme durch eine Inkubation des Ansatzes von 20 min bei 80°C inaktiviert. Darauf folgend wurde die Klonierung des doppelsträngigen DNA-Oligonukleotids in den linearisierten pSuper basic-Vektor durchgeführt. Dazu wurden 80 ng DNA-Oligonukleotid, 0,5 µg pSuper basic-Vektor und 2000 U T4 DNA-Ligase in T4 DNA-Ligase-Puffer verdünnt und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Um die Effizienz der Bakterientransformation zu steigern, wurde nach der Klonierung ein zusätzlicher BGL2-Verdau durchgeführt, welcher religierten Vektor, in welchen das DNA-Oligonukleotid nicht kloniert wurde, wieder linearisiert. Es wurden 10 U BGLII dem Klonierungsansatz zugefügt und 30 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend erfolgte die Transformation des ligierten Vektors in kompetente *E. coli*-Bakterien Stamm RR1 durch Verdünnen von etwa 250 ng Vektor-DNA in 100 µl Bakterienlösung (*E. coli* RR1 in 50 mM CaCl₂/10 % Glycerin) und nachfolgender Inkubation von 30 min auf Eis. Danach wurde die Suspension für 90 sec bei 42°C inkubiert und anschließend mit 300 µl vorgewärmten LB-Medium weiter verdünnt. Es erfolgte eine weitere Inkubation von 1 Std. bei 37°C und nachfolgend eine Zentrifugation für 2 min bei 4000 Umdrehungen pro Minute. Danach wurden 300 µl des Überstandes verworfen, die transformierten Bakterien in den verbleibenden 100 µl resuspendiert und abschließend auf LB-Agar-Platten, die mit 100 µg/ml Ampicillin supplementiert wurden, ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Nachdem Ampicillin-resistente Kolonien auf den Platten gewachsen waren, wurden einige wenige dieser Kolonien gepickt, in jeweils 3 ml LB-Medium, das mit 100 µg/ml Ampicillin supplementiert wurde, resuspendiert und zur Amplifikation für 8 Std. bei 37°C unter konstantem Schütteln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jeweils 60 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium mit jeweils 60 – 120 µl der gewachsenen Bakteriensuspensionen angeimpft und über Nacht unter gleichen Bedingungen inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Bakterienkulturen geerntet und jeweils komplett in die Plasmid-Präparation eingesetzt, welche mit dem Plasmid Midi Kit laut Protokoll durchgeführt wurde. Abschließend wurde die isolierte Plasmid-DNA jeder

Kultur in 40 µl TE-Puffer resuspendiert und nach Messen der DNA-Konzentration am Spektrophotometer auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt.

Zum Testen, ob das DNA-Oligonukleotid in den linearisierten Vektor kloniert wurde, wurde ein Teil der isolierten Plasmide erneut einem Restriktionsverdau unterzogen und mittels Gelelektrophorese untersucht. 1 µg Plasmid-DNA wurde daher in Restriktionspuffer (rot) verdünnt und 18 U HINDIII sowie 10 U EcoRI Restriktionsenzym zugesetzt. Nach Ablauf der Inkubation über Nacht bei 37°C erfolgte die Untersuchung des Restriktionsmusters durch Auftrennung des Verdau in einem 2 %-igen Ethidiumbromid-haltigen Agarose-Gel in TBE-Puffer bei 90 V, wobei die Geltaschen mit 0,5 µg DNA beladen wurden. Die Analyse des Gels wurde an der Geldokumentationsanlage mit der Gene Snap v6.0.5 Software durchgeführt.

Zur abschließenden Überprüfung der fertigen Vektoren wurde jeweils die Region um das klonierte DNA-Fragment sequenziert. Hierzu wurden Proben der Plasmide mit Nuklease-freiem H₂O auf eine Endkonzentration von 0,25 µg/µl verdünnt und die Sequenzierung bei Genterprise Genomics (Mainz, Deutschland) als Single Read in Auftrag gegeben.

3.4. Stabile Transfektion von Melanomzellen und Fibroblasten

Menschliche Melanomzellen (D03) und Fibroblasten (GM637, NBS-1LBI und ATs4) wurden mit verschiedenen Vektoren stabil transfiziert. In den Melanomzellen sollte ein Knockdown von NBN mittels RNAi erreicht werden. Dazu wurde der pSuper basic Vektor, der eine cDNA für die shRNA (short-hairpin RNA) gegen NBN trägt, verwendet. In den Fibroblasten wurde eine ektopische Expression von MGMT angestrebt, da die verwendeten Zelllinien das Protein endogen zum Teil nicht exprimierten. Für diese Transfektion wurde der bereits beschriebene pSV2-MGMT Vektor verwendet (Kaina et al., 1991). Um eine Selektionsmöglichkeit zu erhalten, erfolgte in beiden Fällen eine Co-Transfektion mit dem pSV2-neo Vektor, welcher ein Neomycin (neo)-Resistenzgen besitzt (Southern and Berg, 1982).

Die Transfektion wurde mit dem Effectene Transfektions-Reagenz laut Protokoll des Herstellers durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 6 cm-

Schalen ausgesät, wobei die Zelldichte so gewählt wurde, dass die Konfluenz der Zellkultur zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 40 – 80 % betrug, was in der Regel 2×10^5 Zellen pro Schale entsprach. Es wurde pro Transfektions-Ansatz 0,9 µg des pSuper basic oder des pSV2-MGMT Vektors sowie 0,1 µg pSV2-neo für die Selektion in DNA-Kondensationspuffer (Puffer EC) aus dem Kit auf ein Volumen von 150 µl verdünnt und anschließend 8 µl Enhancer-Reagenz (ebenfalls aus dem Kit) zugefügt. Nach einer Inkubation von 5 min erfolgte die Zugabe von 25 µl Effectene-Reagenz sowie eine Inkubation von 10 min zur Formation der Transfektionskomplexe. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Lösung 1 ml Zellkulturmedium zugefügt und der Ansatz auf die Zellen, welche vorher einem Mediumwechsel unterzogen wurden, aufgetropft. Nach einer Inkubation der Zellen von 18 – 20 Std. im Brutschrank wurde das Medium gewechselt. Es folgte eine erneute Inkubation von 24 Std. Danach wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet. Nach einer weiteren Inkubation von 24 Std. wurde dem Zellkulturmedium das neo-Analogon G418 in einer Konzentration von 1 mg/ml zugefügt. Nach Auswachsen G418-resistenter Kolonien wurden diese untereinander isoliert und in 24-Lochplatten neu ausgesät. Abschließend wurden die Zellen der Klone expandiert, so dass für den Stickstoff-Vorrat und für die Herstellung von Proteinextrakten zur Analyse des NBN-Knockdowns bzw. der ektopischen MGMT-Expression genügend Zellen zur Verfügung standen.

3.5. Wachstumskurven

Zur Erstellung von Wachstumskurven der Zelllinien wurden jeweils 5×10^4 Zellen (adhärent-wachsende Zellen) bzw. 2×10^5 Zellen (Suspensionszellen) pro 6 cm-Schale ausgesät, im Intervall von 24 Std. geerntet und die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Im Fall der adhärent-wachsenden Zellen ist zu beachten, dass die erste Zellzahlbestimmung 24 Std. nach Aussaat den Beginn der Wachstumskurve ($t = 0$ Std.) widerspiegelt, da sonst die Anwachseffizienz der Zellen die Wachstumskurve verfälschen würde. Anhand der Wachstumskurve wurde zusätzlich die Generationszeit mit der GraphPad Prism v3.0.2 Software berechnet.

3.6. WST-1-Assay

Der WST-1-Assay ist ein gängiger Toxizitätstest, der eine Bestimmung der Zellviabilität nach Behandlung mit Toxinen ermöglicht. Dabei wird das im Assay eingesetzte Tetrazoliumsalz durch zelluläre Enzyme der Atmungskette gespalten, wobei Formazan als Endprodukt entsteht und einen Farbumschlag bewirkt, der Photonen mit einer Wellenlänge von 440 nm maximal absorbiert. Durch photometrische Messung dieses Farbumschlags mit einem Photometer kann auf die Anzahl der lebenden Zellen mit intakter Atmungskette im Reaktionsansatz geschlossen und somit die Toxizität der zu untersuchenden Substanz bestimmt werden.

Die Durchführung des Assays erfolgte im Fall der adhären-wachsenden Zellen gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die Zellen wurden in eine 96-Lochplatte ausplattiert (5000 Zellen pro Loch) und am folgenden Tag mit den entsprechenden Zytostatika behandelt. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch 100 µl Reaktionslösung ersetzt. Danach erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37°C bis ein kräftiger Farbumschlag in den Ansätzen mit den unbehandelten Kontrollzellen sichtbar wurde. Dies dauerte in der Regel 1 – 2 Std.

Zur Bestimmung der Toxizität in den lymphoblastoiden Zelllinien wurde die Durchführung des Protokolls modifiziert, da die Zelllinien dieses Zelltyps in Suspension wachsen. Die Zellen wurden in einer 6 cm-Kulturschale mit einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro ml ausgesät und mit den Zytostatika behandelt. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Zelldichte in den unbehandelten Kontrollzellen erneut bestimmt und 5×10^4 Zellen in ein Loch einer 96-Lochplatte überführt. Im Fall der Ansätze, welche einer Zytostatika-Behandlung ausgesetzt waren, wurde das gleiche Volumen wie bei den Kontrollzellen für die Reaktion transferiert. Je nach Toxizität wurden somit entsprechend weniger Zellen der behandelten Ansätze in die Reaktion eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden anschließend auf ein Volumen von 90 µl mit Zellkulturmedium verdünnt und mit 10 µl WST-1-Reagenz aufgefüllt, so dass ein Gesamtvolumen von jeweils 100 µl vorlag. Danach wurde die 96-Lochplatte ebenfalls 1 – 2 Std. bei 37°C inkubiert bis in den Reaktionsansätzen der unbehandelten Zellen ein kräftiger Farbumschlag sichtbar wurde.

Abschließend erfolgte die Messung der Extinktion am Photometer bei einer Wellenlänge von 440 nm und einer Referenzwellenlänge als Kontrolle von 600 nm, wobei die Absorption in den Ansätzen der unbehandelten Kontrollzellen zwischen 0,7 und 1 liegen sollte. Die Hintergrundextinktion wurde durch Messen einer Nullkontrolle ohne Zellen bestimmt und ausgeschlossen. Für jede Zytostatika-Konzentration wurden Vierfachwerte gemessen und der Mittelwert bestimmt. Zur Berechnung der Toxizität wurde die Extinktion, die proportional zur Zellviabilität ist, in den unbehandelten Kontrollzellen als 100 % definiert und die Viabilität der Zytostatika-behandelten Zellen entsprechend in Bezug dazu dargestellt.

3.7. Annexin V/PI-Doppelfärbung und Analyse am FACS

Diese Methode, welche erstmal 1995 beschrieben wurde, erlaubt die Unterscheidung von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen in einer Population und ist daher für Untersuchungen, über welche Signalwege die betreffenden Zellen sterben, gut geeignet (Vermes et al., 1995).

Als frühe Ereignisse während der Apoptose treten Veränderungen in der Plasmamembran auf. Ein solches Ereignis ist die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran nach außen zur Zelloberfläche (Martin et al., 1995). Diese Membranveränderung spielt im weiteren Verlauf der Apoptose an der Erkennung der entstehenden Zellfragmente durch Phagozyten eine wesentliche Rolle und verleiht apoptotischen Zellen einen so genannten „Eat-Me-Label“. Annexin V ist ein eukaryotisches Protein, welches Ca^{2+} -abhängig an Phosphatidylserin bindet (Andree et al., 1990). Da Annexin V nicht membrangängig ist, wird es sowohl von vitalen als auch von apoptotischen Zellen ausgeschlossen. Mit dem Durchflusszytometer wird daher unter Verwendung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertem Annexin V-Protein, das von Photonen mit einer Wellenlänge von 495 nm maximal angeregt wird und daraufhin Photonen emittiert, eine Unterscheidung von vitalen und apoptotischen Zellen möglich, da nur in apoptotischen Zellen Phosphatidylserin für Annexin V zugänglich ist.

Die oben beschriebene Translokation von Phosphatidylserin tritt jedoch auch während der Nekrose auf. Im Gegensatz zur Apoptose kommt es hier jedoch bereits im sehr

frühen Stadium zu einem Zusammenbruch der Plasmamembrankontinuität. Beides hat zur Folge, dass nekrotische Zellen am Durchflusszytometer ebenfalls Annexin V-positiv erscheinen. Eine Differenzierung von apoptotischen Zellen wird jedoch unter zusätzlicher Verwendung von PI, das in Nukleinsäuren interkaliert und von apoptotischen nicht jedoch von nekrotischen Zellen ausgeschlossen wird, möglich.

Nach Ablauf der spezifischen Inkubationszeit nach Zytostatika-Behandlung wurden die zu untersuchenden Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung geerntet und 5 min bei 1000 g und 4°C abzentrifugiert, wobei der Überstand der Zellkultur der geernteten Zellsuspension zugefügt wurde, da sterbende Zellen die Adhäsion zur Petrischale verlieren. Danach wurde der Überstand verworfen, die Zellen 1 x in PBS gewaschen, erneut unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert und in 50 µl Annexin V-Bindepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 2,5 µl FITC-markiertem Annexin V erfolgte eine Inkubation von 15 – 20 min auf Eis. Danach wurde der Zellsuspension erneut 430 µl Annexin V-Bindepuffer zugefügt und die Zellen zusätzlich mit 10 µl PI-Lösung (50 mg/ml) angefärbt. Bis zur Messung erfolgte die Lagerung der fertigen Proben auf Eis.

Die Messung der Proben wurde am Durchflusszytometer durchgeführt. Pro Probe wurden 1×10^4 Zellen analysiert und mit der Software CellQuest Pro aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte mit der Software WinMDI v2.9.

3.8. Herstellung von Proteinextrakten

Für die Western-Blot-Analyse und den MGMT-Aktivitätstest

Zur Herstellung von Proteinextrakten für die Western-Blot-Analyse und den MGMT-Aktivitätstest wurden die zu verwendeten Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung geerntet und zentrifugiert (5 min, 4°C, 1000 g). Die Zellen wurden daraufhin 1 x mit kalter PBS gespült, erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und in 150 – 300 µl Zellysepuffer, je nach Zellmasse (Zellpellet), resuspendiert. Danach wurde die Lyse der Zellen durch Ultraschallbehandlung durchgeführt, wobei 3×10 Impulse (Ausgangsregler: 4, Auslastungsgrad: 40 %) angewendet wurden. Abschließend wurden die verbleibenden Zellfragmente 10 min bei maximaler Geschwindigkeit und

4°C abzentrifugiert. Der Überstand, in welchem die Proteine gelöst sind, wurde dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Benutzung bei -20°C gelagert.

Um Phosphorylierungen an Proteinen mit dem Western-Blot-Verfahren nachzuweisen, wurde neben dem oben beschriebenen Protokoll eine zweite Methode verwendet, da sonst bei der Herstellung des Proteinextrakts die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass die zu untersuchenden Phosphorylierungen enzymatisch abgebaut werden. Dieses Protokoll wurde jedoch nur bei den adhärent-wachsenden Zellen angewendet, da es sich nicht für Zellen eignet, welche in Suspension wachsen. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde die Zellkulturschale mit PBS gespült, wobei das PBS sehr sorgfältig abgesaugt wurde, da in der Schale verbleibende Flüssigkeit sonst die Konzentration des Protein-Ladepuffers verdünnen würde. Danach wurde 200 – 400 µl Protein-Ladepuffer, der auf 95°C vorgeheizt wurde, direkt auf die Zellkultur aufgetropft und durch Schwenken der Schale verteilt. Durch weiteres Schwenken wurden die Zellen direkt auf der Zellkulturplatte lysiert, wobei aufgrund der freigesetzten Nukleinsäuren eine viskose Masse entstand. Diese wurde anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 2 x 10 Impulse (Ausgangsregler: 4, Auslastungsgrad: 40 %) am Ultraschallgerät ausgesetzt, um die Nukleinsäuren zu degradieren. Zum Denaturieren der Proteine wurden die Proteinextrakte abschließend für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -20°C.

Für den BER-Aktivitätstest

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit einem Zellscharber geerntet. Hierfür wurden die Zellen in der Zellkulturschale zuerst mit PBS gespült und erneut mit 5 ml eiskalter PBS überschichtet. Mit dem Zellscharber wurden die Zellen durch vorsichtiges Streichen gelöst, in ein 15 ml-Röhrchen überführt und darauf folgend mittels Zentrifugation (5 min, 1000 g, 4°C) geerntet. Die Zellen wurden dann mit eiskalter PBS gewaschen und anschließend bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Zellsediment wurde daraufhin mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und für mindestens 1 Std. bei -80°C gelagert.

Zur Lyse der Zellen wurden diese nach dem Auftauen zuerst in Puffer I resuspendiert, wobei das Volumen dem Volumen der Zellmasse entsprach. Anschließend erfolgte eine Verdünnung der Probe mit dem doppelten Volumen von Puffer II. Nach gründlichem Mischen wurden die Ansätze für 2 Std. auf dem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Um verbleibende Zellfragmente und Nukleinsäuren vom Proteinextrakt zu

trennen, erfolgte danach eine Zentrifugation der Ansätze in der Ultrazentrifuge (4×10^4 Umdrehungen pro Minute, 20 min, 4°C), Der Überstand, welcher die Proteine beinhaltet, wurde gesammelt und über Nacht mit Dialyse-Schläuchen (8-10 kDa) in RWDB-Puffer bei 4°C unter konstantem Rühren dialysiert. Bei der Dialyse entstandene Präzipitate wurden durch erneutes Zentrifugieren (maximale Geschwindigkeit, 10 min, 4°C) der Proteinextrakte eliminiert. Da die Enzymaktivität bei wiederholtem Auftauen und Einfrieren abnimmt, wurden die fertigen Proteinextrakte aliquotiert und danach mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80°C.

3.9. Bestimmung der Proteinkonzentration durch den Bradford-Test

Da bei den durchgeführten Tests (Western-Blot-Analyse, BER-Aktivitätstest, MGMT-Aktivitätstest) jeweils eine spezifische Proteinmenge eingesetzt wurde, wurde die Konzentration der Proteinextrakte vor der ersten Verwendung mit dem so genannten Bradford-Test bestimmt (Bradford, 1976).

Es wurde je nach zu erwartender Proteinkonzentration 1 – 3 µl Proteinextrakt in ein Loch der 96-Lochplatte pipettiert und mit 200 µl Bradford-Lösung überschichtet. Nach einer Inkubation von ca. 5 – 10 min wurde die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt. Als Referenz wurde zusätzlich eine Eichreihe angelegt, wobei jeweils 1 – 5 µl BSA-Lösung (1 µg/µl) in ein Loch der 96-Lochplatte pipettiert wurde, so dass die absolute Proteinmenge pro Loch 1 – 5 µg betrug. Anhand der Absorptionswerte der Eichreihe wurde mit der Ascent Software v2.6 eine Regressionsgerade ermittelt und die daraus resultierende Steigungsfunktion bestimmt. Anhand der Steigungsfunktion wurde die Gesamtmenge an Protein in den einzelnen Reaktionsansätzen ermittelt und die Konzentration im Proteinextrakt berechnet. Um Pipettierfehler zu minimieren, wurden für die Bestimmung der Proteinkonzentration 4-fach Werte (Doppelwerte für die Eichreihe) angelegt und der Mittelwert berechnet.

3.10. Western-Blot-Verfahren

Das hier verwendete Western-Blot-Verfahren basiert auf einer Methode, welche erstmals Ende der 1970er Jahre beschrieben wurde (Renart et al., 1979). Sie ermöglicht die Detektion und Quantifizierung spezifischer Proteine aus einem Proteinextrakt. Dabei werden Proteine, nachdem sie in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt wurden, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern, welche selektiv an die zu untersuchenden Proteine binden, inkubiert. Die gebundenen Primärantikörper werden anschließend mit einem sekundärem Antikörper, der entweder mit Meerrettichperoxidase oder mit einem Infrarot-Farbstoff gekoppelt ist, detektiert und die Proteine entsprechend sichtbar gemacht.

Als erster Schritt wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine durchgeführt. Dafür wurden die SDS-Polyacrylamid-Gele jeweils frisch gegossen. Die flüssige Lösung für das Trenngel wurde, nachdem die Polymerisations-Reaktion durch Zugabe von 60 µl 10 % APS und 6 µM TEMED induziert wurde, in die vorher aufgebaute Gel-Apparatur gegossen und zum Glätten der Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach Beendigung der Polymerisation wurde das Isopropanol abgeschüttet und das Trenngel mit flüssiger Sammelgel-Lösung, deren Polymerisation auf die gleiche Weise wie im Fall des Trenngels verlief, überschichtet. Unmittelbar danach wurde der entsprechende Kamm zur Bildung der Ladetaschen eingesetzt. Danach wurde das fertige Gel in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt oder bis zur Verwendung im Kühlschrank, in feuchte Tücher und Zellophanfolie eingeschlagen, gelagert. Nach dem Einsetzen des Gels in die Elektrophorese-Kammer wurde diese mit Elektrophorese-Puffer gefüllt, so dass die Ladetaschen des Gels vollständig überschichtet waren.

Danach folgte die Beladung der Geltaschen mit den Proteinextrakten. Hier ist zu beachten, dass die Proteinextrakte, welche für die Detektion von Proteinphosphorylierungen hergestellt wurden, direkt aufgetragen wurden, da die Proteine schon in Protein-Ladepuffer gelöst waren. Außerdem musste in diesem Fall aufgrund des Ladepuffers auf eine Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Methode verzichtet werden. Daher wurden 10–15 µl Proteinextrakt pro Tasche aufgetragen. Später wurde dann eine Konzentrationsangleichung vorgenommen,

indem die Signalintensität der Ladekontrolle (normalerweise ERK2 [Extracellular signal-regulated kinase 2]) quantifiziert wurde und anschließend die Extrakte entsprechend verdünnt wurden. Die Proteinextrakte, welche in Zellysepuffer gelöst waren, wurden nach der Konzentrationsbestimmung in Ladepuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren. In die einzelnen Ladetaschen wurden dann jeweils 20 – 30 µg Proteinextrakt in Ladepuffer eingebracht. Nach Abschluss der Beladung der Geltaschen wurde das elektrische Feld angelegt. Die Elektrophorese wurde in Elektrophorese-Puffer bei 100 – 130 V durchgeführt und abgestoppt sobald die blaue Lauffront, bedingt durch den Ladepuffer, bis zur unteren Gelkante vorgedrungen war.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese erfolgte der Proteintransfer. Dazu wurde das Gel der Elektrophorese-Einheit entnommen und auf einer mit Transferpuffer getränkten Nitrozellulose-Transfer-Membran platziert. Beide Seiten wurden mit angefeuchtetem Transferpapier und Schwammplatten umschlossen, in einem Gelhalter fixiert und in die Transferkammer, welche mit Transferpuffer gefüllt war, geschoben. Dabei war aufgrund der negativen Ladung der Proteine und des daraus resultierenden Wanderungsverhaltens im elektrischen Feld auf die Orientierung des Gels und der Transfer-Membran zu achten, wobei das Gel zur Kathode und die Transfer-Membran zur Anode gerichtet wurden. Nach Anlegen der Spannung erfolgte der Transfer über Nacht bei einer Stromstärke von 100 mA.

Im Anschluss an den Proteintransfer wurde die Transfer-Membran dem Transfersystem entnommen und mit TBST gespült, um restlichen Transferpuffer zu entfernen. Danach erfolgte ein Anfärben der Proteine auf der Transfer-Membran durch kurze Inkubation der Membran in Ponceau S-Lösung und ein anschließendes Spülen mit TBST. Die Banden des Protein-Markers wurden dann mit Bleistift auf der Transfer-Membran angezeichnet. Um unspezifische Antikörperbindungen an der Transfer-Membran zu verhindern, wurde diese danach für 1 Std. mit Blocklösung inkubiert und anschließend erneut mit TBST gespült. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Hierfür wurden die Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 bis 1:3000 in Blocklösung verdünnt. Danach folgten 3 x 10 min Waschen mit TBST und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der ebenfalls in Blocklösung verdünnt wurde (1:2000 für Peroxidase-konjugierte Antikörper, 1:10000 für Infrarot-Farbstoff-konjugierte Antikörper). Die Inkubationszeit betrug

1 – 2 Std. bei RT. Abschließend wurde die Transfer-Membran erneut 3 x 10 min mit TBST gewaschen.

Die Detektion der Antikörper erfolgte entweder, wie oben bereits erwähnt, mittels Chemielumineszenz, wenn Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundäntikörper verwendet wurden, oder mit der Odyssey-Infrarot-Abbildungsanlage, bei Verwendung von Infrarot-Farbstoff-gekoppelten Antikörpern. Im ersten Fall wurde die Transfer-Membran mit ECL-Lösung überschichtet und 5 min bei RT inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Transfer-Membran in Zellophan-Folie eingeschlagen, in einer Entwicklungskassette platziert und in der Dunkelkammer einem bisher unbelichteten Chemielumineszenz-Film exponiert, wobei die Expositionsdauer von mehreren Sekunden bis einigen Minuten entsprechend der Signalstärke der jeweiligen Antikörper variierte. Zum Visualisieren der Proteinbanden wurde der Chemielumineszenz-Film nach Ablauf der Belichtungsdauer in 20 % Entwickler-Lösung inkubiert und anschließend mit Leitungswasser gespült. Danach erfolgte eine Fixierung des Chemielumineszenz-Films in 20 % Fixier-Lösung und ein erneutes Spülen mit Leitungswasser. Um die Ergebnisse zu digitalisieren, wurde der Film nach dem Trocknen am PC eingescannt. Gegebenenfalls wurde die Proteinbanden-Intensität mit der Multi-Analyst v1.0.1 Software quantifiziert.

Falls Infrarot-Farbstoff-gekoppelte Sekundäntikörper verwendet wurden, wurde die Transfer-Membran nach dem letzten Waschen getrocknet, mit der Infrarot-Abbildungsanlage gescannt und mit der Odyssey v3.0 Software analysiert. In beiden Fällen erfolgte die Bildbearbeitung mit Photoshop v7.

3.11. BER-Aktivitätstest

Mit dem BER-Aktivitätstest ist es möglich die einzelnen Teilschritte des BER-Signalwegs zu untersuchen (Dianov, 2003). Hierbei wird ein doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid, das eine apurine Stelle enthält und radioaktiv markiert ist, mit einem Proteinextrakt inkubiert. Dabei kommt es durch die aktiven BER-Proteine zur Reparatur der DNA-Läsion. Nach einer spezifischen Inkubationszeit wird die Reaktion abgestoppt und die DNA-Fragmente in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und analysiert. Da das DNA-Oligonukleotid während des Reparaturprozesses erst

3. Methoden

geschnitten und nach Behebung der Läsion wieder religiert wird, ist es möglich anhand des Wanderungsverhaltens der DNA-Fragmente die wesentlichen Schritte der BER zu untersuchen und anhand dessen auf die BER-Reparatur-Kapazität in den entsprechenden Proteinextrakten der Zellen zu schließen.

Um das DNA-Oligonukleotid in die BER-Reaktion einsetzen zu können, wurde dieses zu Beginn hergestellt. Dabei erfolgte zuerst die radioaktive Markierung des 5'-Endes eines einzelsträngigen DNA-Fragments mit 39 Nukleotiden, das an der Position 20 ein Uracil-Rest trug (2GSU). Dazu wurde 120 pmol des DNA-Fragments, 2 µl [³²P]-markiertes ATP, 10 U T4 Polynukleotid-Kinase in Polynukleotid-Kinase-Reaktionspuffer in einem Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 40 µl eingesetzt, für 90 min bei 37°C inkubiert und auf ein Volumen von 100 µl mit TE-Puffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA mit äquilibrierten Chromatographie-Säulen (Micro Bio-Spin 6) durch Zentrifugation für 4 min bei 1000 g und eine weitere Verdünnung der gelösten DNA mit dH₂O auf ein Volumen von 200 µl.

Darauf folgend wurde die Fusionsreaktion angesetzt. Hierfür wurden 100 µl des radioaktiv-markierten DNA-Oligonukleotids mit 120 pmol eines komplementären DNA-Fragments (2GSComp) supplementiert, 20 µl 1 M NaCl zugegeben und der Ansatz auf ein Endvolumen von 200 µl mit TE-Puffer verdünnt. Es folgte ein Erhitzen auf 90°C für 5 min und ein langsames Abkühlen der Reaktion auf RT in einem Wasserbad. Nach der Fusion der beiden einzelsträngigen DNA-Moleküle wurde in dem doppelsträngigen DNA-Oligonukleotid durch enzymatisches Entfernen des Uracil-Restes eine apurine Stelle generiert. 30 µl der Duplex-DNA wurde 4 U Uracil-DNA-Glykolsylase zugesetzt und in BER-Puffer in einem Volumen von 60 µl für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde das DNA-Oligonukleotid mit äquilibrierten Chromatographie-Säulen (Micro Bio-Spin 30) durch erneute Zentrifugation für 4 min bei 1000 g aufgereinigt und bis zur Verwendung des fertigen DNA-Oligonukleotids in der Reparatur-Reaktion bei -20°C gelagert.

Für die Durchführung der Zeit-abhängigen Reparatur-Reaktion wurden die zuvor hergestellten Proteinextrakte mit RWDB-Puffer auf eine Konzentration von 0,4 µg/µl verdünnt. Anschließend wurden jeweils 30 µl dieser Verdünnung mit 30 µl frisch hergestelltem Mix A, der unter anderem das radioaktiv-markierte DNA-Oligonukleotid enthält, gemischt und bei 37°C inkubiert. Nach der gewünschten Reaktionszeit wurden

jeweils 10 µl der Reaktion entnommen und in 10 µl Formamid-Ladepuffer verdünnt. Es folgte ein Erhitzen auf 90°C für 15 min. Nach Abkühlen der Proben wurden diese in ein Polyacrylamid-Sequenziergel, das in der entsprechenden Kammer installiert wurde, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 4 Std. bei 10 Watt in TBE-Puffer.

Zum Detektieren der radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurde das Gel nach der Auftrennung dem [³²P]-Detektionsschirm über Nacht exponiert. Abschließend wurde das Gel an der [³²P]-Dokumentationsanlage mit der Scanner Control v4 Software eingescannt und mit der ImageQuant v5.2 Software analysiert. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte mit der Multi-Analyst v1.0.1 Software.

3.12. MGMT-Aktivitätstest

Das Prinzip des Aktivitätstests beruht auf der Übertragung einer radioaktiv-markierten Methylgruppe von der O⁶-Position eines Guanosins aus einem Nukleinsäure-Fragment auf das MGMT-Protein im zu untersuchenden Proteinextrakt (Myrnes et al., 1984). Die bei dieser Reaktion übertragene Radioaktivität kann mit einem Flüssigszintillationszähler detektiert und quantifiziert werden, wobei die gemessene Menge an Radioaktivität im Proteinextrakt proportional zur MGMT-Aktivität ist.

Die im Test verwendete DNA stammte aus einem Kalbsthymus und wurde vor dem eigentlichen Aktivitätstest durch Verwendung von [³H]-MNU radioaktiv markiert. Die Methylierungseffizienz der O⁶-Position des Guanosins liegt dabei in der Regel bei 90 %. Danach erfolgte eine Aufreinigung der DNA durch 3-malige Fällung mit Ethanol und abschließend ein Lösen der DNA in TE-Puffer. Die gebrauchsfertige, radioaktiv-markierte DNA wurde von Prof. Kaina bereitgestellt.

Zur Aktivitätsmessung wurden 200 µg Proteinextrakt und 10 µl [³H]-markierte DNA (ca. 80000 cpm) in einem Reaktionsvolumen von 200 µl in Reaktionspuffer für 90 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 400 µl 13 % Trichloressigsäure (TCA) und von 100 µg BSA. Durch das Aufkochen der Probe für 30 min bei 95°C wurde die DNA hydrolysiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis abgekühlt, wobei die Proteine gefällt wurden. Durch eine Zentrifugation (maximale Geschwindigkeit, 10 min, 4°C) wurden die Proteine sedimentiert, anschließend 3 x mit 400 µl 5 % TCA

gewaschen und zum Abschluss in 200 µl 0,1 N NaOH hydrolysiert. Die gebundene Radioaktivität wurde nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit im Flüssigszintillationszähler bestimmt und abschließend die MGMT-Aktivität, die in fmol/mg Gesamtprotein angegeben wurde, berechnet.

3.13. Alkalischer Comet-Assay

Der Comet-Assay (oder auch Einzelzellgelelektrophorese) wurde erstmals 1984 als sensitive Methode zur Quantifizierung von DSBs in einzelnen Zellen beschrieben (Ostling and Johanson, 1984). Das Prinzip des Comet-Assays beruht auf dem Wanderungsverhalten von Nukleinsäuren in Agarose im elektrischen Feld aufgrund deren negativen Ladung. Dabei wird ausgenutzt, dass der Grad der Fragmentierung genomischer DNA mit der Mobilitätsgeschwindigkeit korreliert, wobei eine stärkere Fragmentierung eine schnellere Wanderungs-Geschwindigkeit erlaubt. So formt die DNA von Zellkernen je nach Anzahl der DSBs mehr oder weniger ausgeprägte „Kometen“, nachdem Zellen in Agarose eingebettet, lysiert und einem elektrischen Feld ausgesetzt wurden. Der hier verwendete, alkalische Comet-Assay ist eine speziell modifizierte Variante, die es aufgrund einer zusätzlichen Denaturierung der DNA ermöglicht neben DSBs auch ESBs zu detektieren (Singh et al., 1988).

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung geerntet und 5 min bei 1000 g und 4°C abzentrifugiert, anschließend gezählt und auf eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt. 10 µl der Suspension wurden danach in 120 µl 0,5 % LMP-Agarose/PBS verdünnt. Diese Suspension wurde auf einen Agarose-beschichteten (1,5 % Agarose in PBS) Objektträger aufgetropft und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach dem Aushärten der Agarose wurde das Deckglas seitlich abgezogen und die Zellen für 60 min bei 4°C in Zelllysepuffer lysiert. Die Präparate wurden dann in einer Gelelektrophorese-Kammer platziert, mit Elektrophorese-Puffer überschichtet und 20 min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte die Elektrophorese bei 25 V und 300 mA für 20 min. Um die Neutralisation durchzuführen, wurden die Präparate aus der Elektrophorese-Kammer genommen und 3 x 5 min in Neutralisationspuffer inkubiert. Abschließend erfolgten ein Spülen mit dH₂O und eine Inkubation für 5 min in absolutem Ethanol. Nach dem Trocknen der Präparate wurde die DNA mit PI-Lösung (50 µg/ml) angefärbt.

Die Quantifizierung der „Kometen“ erfolgte am Mikroskop mit der Software Komet v4.0. Dabei wurde das so genannte „Tail Moment“ (TM) anhand folgender Formel bestimmt:

$$TM = (Mb - Ma) \times \left(\frac{Fb}{Fc} \right)$$

Mb = Flächenmedian der Fluoreszenzverteilung des Kometen

Ma = Flächenmedian der Fluoreszenzverteilung des Nukleus

Fb = Mittlere Fluoreszenzintensität des Kometen

Fc = Mittlere Fluoreszenzintensität der gesamten DNA (Nukleus und Komet)

3.14. Immunfluoreszenz-Färbungen

Um eine Aktivierung von PARP1 nachzuweisen, wurde der 10H-Antikörper, der Poly-ADP-Ribosen (PAR) mit 20 oder mehr ADP-Ribose-Resten detektiert, verwendet (Kawamitsu et al., 1984). Da PAR die enzymatischen Endprodukte von PARP1 sind, ist es möglich bei deren Nachweis auf eine vorausgegangene PARP1 Aktivierung zu schließen. Das verwendete Protokoll (Burkle et al., 1993) wurde leicht modifiziert.

Zu Beginn wurden Deckgläser, die für die Immunfluoreszenz-Färbung verwendet wurden, zuerst für 20 min in 100 % Diethylether inkubiert und danach nacheinander mit absolutem und 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 20 min in 1 M HCl und ein erneutes Waschen mit dH₂O. Bis zur Verwendung wurden die gebrauchsfertigen Deckgläser in 70 % Ethanol gelagert.

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit den entsprechenden Zytostatika behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen 1 x mit PBS gespült und anschließend in 75 % Methanol/25 % Essigsäure fixiert. Die Inkubationszeit betrug 5 min bei RT. Die Zellen wurden 2 x 5 min in PBS gewaschen und anschließend mit dem Primärantikörper (10H) in einer Konzentration von 5 µg/ml in Blocklösung bei 37°C für 30 – 60 min inkubiert. Danach wurden die Zellen 1 x mit PBS gespült und 4 x 5 min gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG [H+L]; 1:500 in Blocklösung) und ein erneutes Waschen der Zellen mit PBS unter gleichen

Bedingungen (1 x spülen, 4 x 5 min waschen). Abschließend wurden die Zellen auf den Deckgläsern in 15 µl Antifade-Medium auf Objektträgern fixiert und mit Nagellack abgedichtet. Um die Nuklei der Zellen anzufärben, wurde das Antifade-Medium zusätzlich mit 1 µg/ml DAPI versetzt. Die Analyse der Immunfluoreszenz erfolgte am Mikroskop unter Verwendung der Cell A Software.

3.15. ATP-Test

Ähnlich wie der WST-1-Assay, der unter Kapitel 3.6 diskutiert wurde, ist der ATP-Test, bei dem der ATP-Gehalt einer Zellkultur gemessen wird, ein allgemein akzeptierter Toxizitätstest, da die Viabilität einer Zelle mit deren intrazellulären ATP-Menge korreliert. Der hier verwendete Test basiert auf der Oxidation von Luciferin zu Oxiluciferin, wobei die Reaktion durch die Luciferase katalysiert wird und O₂ sowie ATP als Substrate benötigt. Neben der Bildung von Adenosin-5'-Monophosphat (AMP) werden bei diesem exothermen Prozess Photonen emittiert. Aufgrund der Stöchiometrie ist die Menge an zur Verfügung stehendem ATP mit der Menge an synthetisiertem Oxiluciferin und daher auch mit der Anzahl emittierter Photonen proportional. Da im Reaktionsreagenz des Tests alle für die Reaktion wichtigen Komponenten außer ATP im Überschuss vorhanden sind, ist bei der Anwendung im Test das ATP, welches durch die Zellkultur bereitgestellt wird, der reaktionslimitierende Faktor. Daher kann durch Quantifizieren der Photonenemission am Luminometer auf die ATP-Menge in der zu untersuchenden Zellkultur und somit auch auf deren Viabilität geschlossen werden.

Die Durchführung des ATP-Tests erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen in einer lichtdichten 96-Lochplatte in 100 µl Zellkulturmedium ausgesät (1000 Zellen pro Loch) und am folgenden Tag mit dem Zytostatikum behandelt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde die 96-Lochplatte 30 min bei RT äquilibriert. Anschließend wurde 100 µl gebrauchsfertiges Test-Reagenz zugefügt und die 96-Lochplatte 2 min auf dem Schüttler inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Zur Etablierung der Lumineszenz erfolgte eine weitere Inkubation von 10 min bei RT.

Abschließend wurde die Messung der Lumineszenz am Luminometer unter Verwendung der Software Mikro Win 2000 v4.41 durchgeführt. Die Hintergrundlumineszenz wurde durch Messen einer Nullkontrolle ohne Zellen bestimmt und ausgeschlossen. Für jede Zytostatika-Konzentration wurden Vierfachwerte gemessen und der Mittelwert bestimmt. Die Lumineszenz der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 100 % definiert. Der ATP-Gehalt der Zytostatika-behandelten Zellen wurde entsprechend als Anteil des ATP-Gehalts der Kontrollzellen dargestellt.

Da in der vorliegenden Arbeit mit diesem Test nicht die Toxizität der jeweiligen Zytostatika bestimmt wurde, sondern eine mögliche ATP-Depletion nach MNNG-Behandlung in dem Anteil lebender Zellen analysiert werden sollte, wurden die Ergebnisse dementsprechend mit drei verschiedenen Ansätzen korrigiert. Um die Toxizität auszuschließen, wurde daher einerseits der ATP-Gehalt durch die Viabilität der Zellen, die im WST-1-Assay gemessen wurde, oder durch die lebende Zellpopulation der Annexin V/PI-Doppelfärbung dividiert. Andererseits wurde der Proteingehalt der Zellkulturen nach MNNG-Behandlung durch Quantifizieren der ERK2-Expression in Western-Blot-Untersuchungen bestimmt und der ATP-Gehalt in Bezug zur Proteinmenge in der Zellkultur dargestellt.

3.16. Statistiken

In allen quantitativen Analysen wurden jeweils mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Anschließend wurden die Daten mit der Software GraphPad Prism v3.0.2 verarbeitet. Dabei wurden die entsprechenden Mittelwerte gebildet und in die graphischen Darstellungen aufgetragen. Zur Angabe der Fehlerwerte wurde der so genannte Standard- oder Stichprobenfehler herangezogen. Dieser ergibt sich aus der Quadratwurzel der Varianz und wird wie folgt berechnet:

$$\sigma(x) = \sqrt{\sum_i (x_i - E(X))^2 f_x(x_i)}$$

Um zu prüfen, ob die beobachteten Unterschiede zwischen den Zelllinien statistisch signifikant sind, wurden P-Werte mit dem ungepaarten T-Test berechnet und wie folgt angegeben: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen an menschlichen Fibroblasten

Methylierende Agenzien induzieren Basenschäden an der DNA. Diese Läsionen werden während der Replikation zu DSBs translatiert. Da NBN und ATM wichtige Funktionen während der Reparatur von DSBs haben, ist es denkbar, dass Zellen, die in einem dieser Proteine mutiert sind, sensitiver gegenüber methylierenden Agenzien reagieren als Zellen, die diese Beeinträchtigung nicht aufweisen.

Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurden in den folgenden Untersuchungen drei menschliche Fibroblasten-Zelllinien verwendet, welche SV40-transformiert und somit p53-inaktiv waren. Eine der drei Zelllinien (NBS-1LBI) trägt eine hypomorphe Mutation im NBN-Gen (Kraakman-van der Zwet et al., 1999). Diese Mutation führt zur Bildung eines verkürzten Proteins, welches nur eingeschränkt funktionsfähig ist. Eine weitere Zelllinie (Ats4) weist eine Mutation im ATM-Gen auf. Beide Zelllinien wurden durch die Transformation von Primärzellen, die aus NBS- bzw. AT-Patienten isoliert wurden, etabliert. Die dritte Zelllinie (GM637) besitzt in beiden Genen keine Mutation und wird im Folgenden als Wildtyp bezeichnet.

4.1.1. Allgemeine Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

Zu Beginn der Studie wurden in den drei Fibroblasten-Zelllinien verschiedene Parameter analysiert, welche einen Einfluss auf die Alkylanzien-vermittelte Toxizität ausüben. So wurde zuerst der NBN-Status der Wildtyp-Zelllinie und der NBN-defizienten Zelllinie mit einer Western-Blot-Untersuchung verifiziert. Während im Wildtyp eine starke NBN-Expression detektiert wurde, war keine Proteinexpression in der NBN-mutierten Zelllinie nachzuweisen, obwohl in diesen Zellen trotz der Mutation ein verkürztes NBN-Protein gebildet wird (Abb. 6A). Durch die geringere Größe des Proteins ist zu erwarten, dass die spezifische Proteinbande im Polyacrylamid-Gel in Richtung der kleineren Proteine verschoben ist. Jedoch wurde auch in diesem Bereich keine Expression beobachtet, da der verwendete Antikörper gegen NBN das verkürzte Protein nicht detektiert.

4. Ergebnisse

Da, wie in der Einführung beschrieben, die durch Alkylanzien-induzierte Toxizität Replikations-abhängig erfolgt, wurde in den verwendeten Fibroblasten-Zelllinien jeweils die Wachstumsgeschwindigkeit untersucht und die Generationszeiten berechnet. Das Wachstum des Wildtyps und der NBN-mutierten Zelllinie verlief sehr ähnlich. Die ATM-defiziente Zelllinie hingegen wies mit 17,5 Std. eine kürzere Generationszeit auf (Abb. 6B).

Um auszuschließen, dass mögliche Unterschiede in der Sensitivität der Zellen auf eine Beeinträchtigung der MMR-Kapazität zurückzuführen waren, wurde zusätzlich die Expression der Proteine, welche die beiden wichtigen Reparaturkomplexe MutS α (bestehend aus MSH2 und MSH6) und MutL α (bestehend aus MLH1 und PMS2) bilden, mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression dieser Proteine festgestellt werden (Abb. 6C).

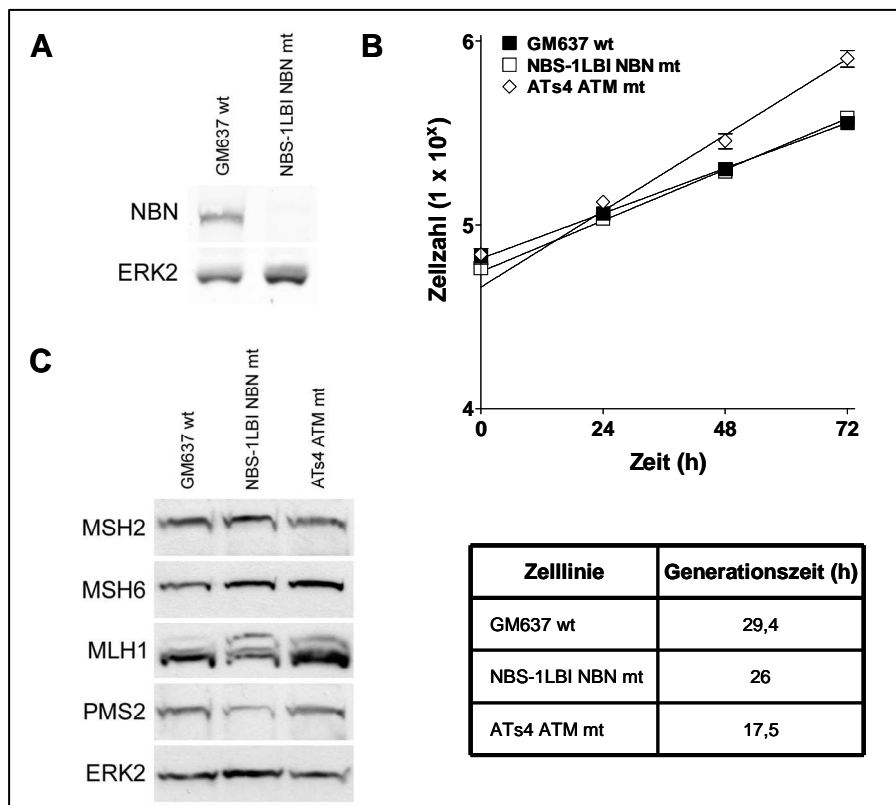


Abb. 6 Allgemeine Charakterisierung der menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4. A) Bestimmung der NBN-Expression in GM637- und NBS-1LBI-Zellen mittels Western-Blot-Analyse. Zur Kontrolle der Beladung wurde die ERK2-Expression bestimmt. B) Wachstumskurven und Berechnung der daraus resultierenden Generationszeiten. C) Untersuchung der Proteinexpression von MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2 mittels Western-Blot-Untersuchungen. Zur Kontrolle der Beladung wurde die ERK2-Expression bestimmt.

4.1.2. Untersuchung der zellulären Sensitivität nach Behandlung mit MNNG und TMZ

Um die Sensitivität der Zelllinien gegenüber MNNG und TMZ zu bestimmen, wurde 72 Std. nach Behandlung der Zellen mit beiden Gentoxinen ein WST-1-Assay mit verschiedenen Dosen durchgeführt, wobei zu beachten ist, dass das DNA-Reparaturenzym MGMT durch die Vorbehandlung mit dem MGMT-Inhibitor O⁶-BG (Dolan et al., 1990) inaktiviert wurde. Wie in Abb. 7 gezeigt wird, reagierte sowohl die NBN- als auch die ATM-mutierte Zelllinie im gesamten untersuchten Dosisbereich sensibler als der Wildtyp gegenüber MNNG (Abb. 7A) und TMZ (Abb. 7B).

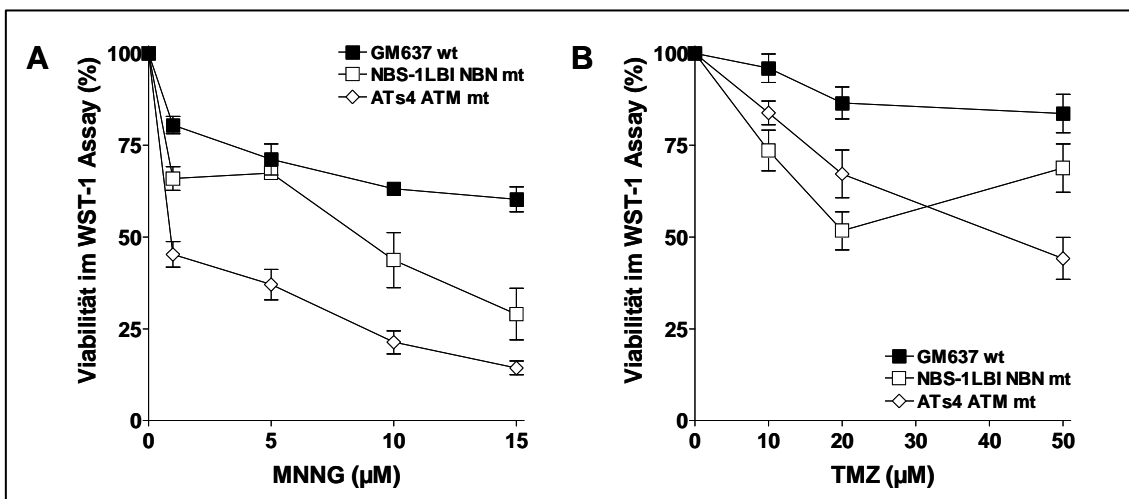


Abb. 7 Analyse der Viabilität der menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 mit dem WST-1-Assay. Die Messung erfolgte 72 Std. nach Behandlung mit den alkylierenden Agenzien MNNG (A) und TMZ (B) in verschiedenen Konzentrationen.

Dies wurde mit der Analyse Annexin V/PI-doppelgefärbter Zellen durch Durchflusszytometrie bestätigt. Auch hier waren die NBN- und ATM-mutierte Zelllinien nach MGMT-Inaktivierung hypersensitiv gegenüber MNNG (Abb. 8A) und TMZ (Abb. 8C), wenn 72 Std. nach Behandlung der induzierte Zelltod durch Summation der apoptotischen und nekrotischen Fraktion analysiert wurde. Bei der ATM-defizienten

4. Ergebnisse

Zelllinie war die erhöhte Sensitivität nach TMZ-Behandlung jedoch nur für die höchste verwendete Dosis (50 μM) festzustellen.

Weiterhin wurde die Zelltod-Induktion (Summe aus Apoptose und Nekrose) nach Behandlung mit 10 μM MNNG und 50 μM TMZ im zeitlichen Verlauf analysiert, wobei auch in diesen Experimenten das MGMT-Enzym durch die Zugabe von $\text{O}^6\text{-BG}$ inhibiert wurde. Nach Behandlung mit beiden Gentoxinen waren die NBN- und die ATM-mutierten Zelllinien über die gesamte untersuchte Zeitspanne signifikant sensitiver als der Wildtyp (Abb. 8B und 8D). Die Sensitivität stieg nach MNNG-Behandlung in der ATM-defizienten Zelllinie während des Zeitverlaufs an, während sie in der NBN-mutierten Zelllinie jedoch zwischen 72 und 120 Std. nach Behandlung auf dem gleichen Niveau blieb. Nach TMZ-Behandlung stieg sowohl die Sensitivität der NBN- als auch der ATM-mutierten Zelllinie mit der Zeit an. Detaillierte Darstellungen der Toxizität 96 und 120 Std. nach MNNG-Behandlung (Abb. 34) sowie 96 Std. nach TMZ-Behandlung (Abb. 35) sind im Anhang enthalten.

4. Ergebnisse

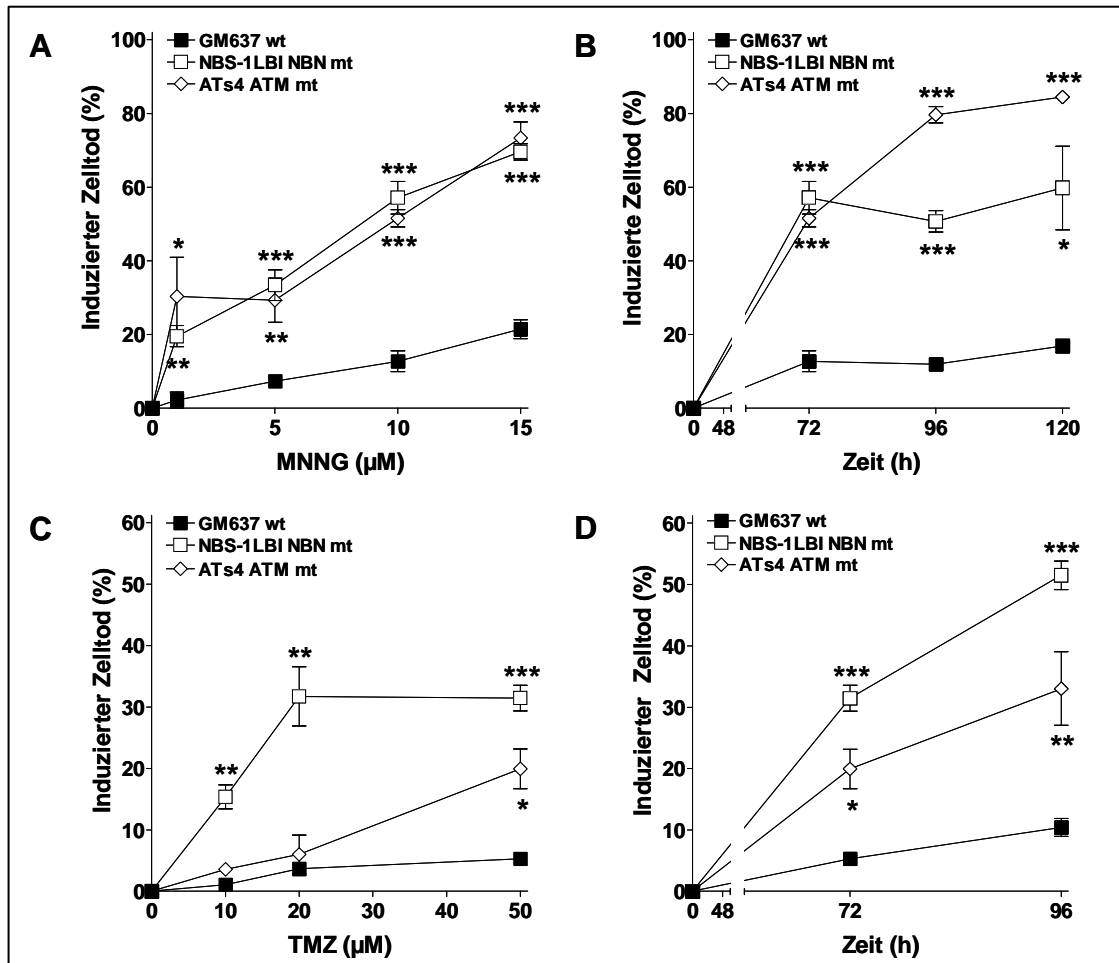


Abb. 8 Analyse der Zelltod-Induktion mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4. Die Bestimmung des Zelltods erfolgte durch Summation der Apoptose- und Nekrose-Fraktion. Die P-Werte beziehen sich jeweils auf die Kontrollzelllinie GM637: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$ A) 72 Std. nach Behandlung mit MNNG in verschiedenen Konzentrationen. B) Zeitabhängigkeit nach Behandlung mit 10 µM MNNG. C) 72 Std. nach Behandlung mit TMZ in verschiedenen Konzentrationen. D) Zeitabhängigkeit nach Behandlung mit 50 µM TMZ.

Zusätzlich wurden zwei transgene Zelllinien in die Studie eingeschlossen, welche durch Transfektion der NBN-mutierten Zelllinie entweder mit einem NBN-Expressionsvektor (LBI-NBS-1) oder mit einem Leervektor (LBI-LXIN) etabliert wurden. Somit wurde eine ektopische NBN-Expression in der NBN-defizienten Zelllinie erzielt. Zuerst wurde die NBN-Expression in der komplementierten Zelllinie und in der entsprechenden mit dem Leervektor transfizierten Kontrolle überprüft. In der Western-Blot-Untersuchung konnte die NBN-Expression in der komplementierten Zelllinie nachgewiesen werden, während in der Kontrolle kein NBN-Protein detektiert wurde (Abb. 9A). In der anschließenden Toxizitätsanalyse, die in Abb. 9B dargestellt wird,

4. Ergebnisse

zeigte sich 72 Std. nach Behandlung der Zellen mit TMZ und O⁶-BG eine erhöhte Resistenz der NBN-komplementierten Zelllinie über den gesamten untersuchten Dosisbereich verglichen zur Kontrolle, welche mit dem Leervektor transfiziert wurde. Hierbei war die erhöhte Resistenz der NBN-komplementierten Zelllinie jedoch nur nach Behandlung mit 10 bzw. 15 µM TMZ signifikant.

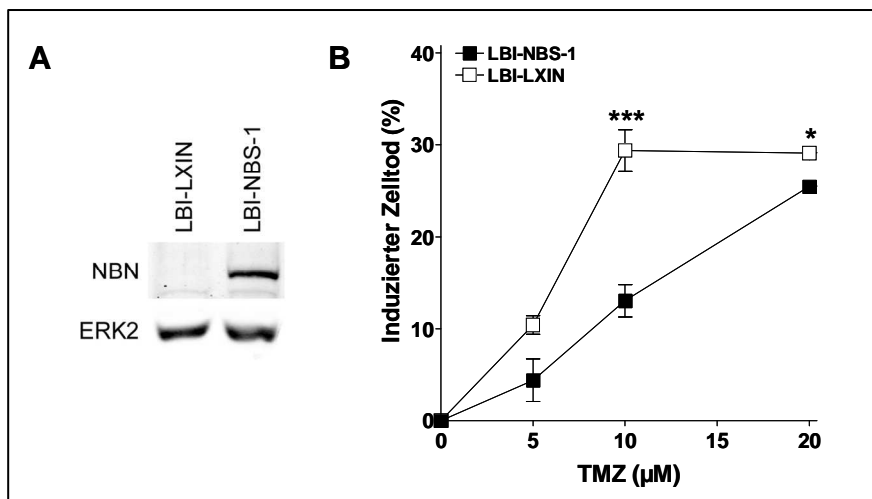


Abb. 9 Einfluss der NBN-Komplementation auf die TMZ-induzierte Toxizität in den NBS-1LBI-Zellen. Verwendet wurden NBS-1LBI-Zellen, welche mit einem Kontroll- bzw. einem NBN-Expressionsvektor stabil transfiziert wurden. A) Bestimmung der NBN-Expression mittels Western-Blot-Analyse. Zur Kontrolle der Beladung wurde die ERK2-Expression bestimmt. B) Analyse der Zelltod-Induktion mit der Annexin V/PI-Methode 72 Std. nach Behandlung mit TMZ in verschiedenen Konzentrationen. Die Bestimmung des Zelltods erfolgte durch Summation der Apoptose- und Nekrose-Fraktion. *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$

Da mit der Annexin V/PI-Doppelfärbung eine Diskriminierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen möglich ist (Vermees et al., 1995), wurden beide Fraktionen im Wildtyp und in den NBN- und ATM-defizienten Zelllinien zusätzlich getrennt voneinander analysiert. 72 Std. nach MNNG-Behandlung wurde in den NBN- und ATM-mutierten Zelllinien eine signifikant verstärkte Induktion sowohl von Apoptose (Abb. 10A) als auch von Nekrose (Abb. 10B) gegenüber dem Wildtyp beobachtet. Bei hohen Dosen (15 µM) dominierte der nekrotische Zelltod in den beiden mutierten Zelllinien, während in der Wildtyp-Zelllinie die Apoptose dominant war.

4. Ergebnisse

Im zeitlichen Verlauf stieg die Apoptose nach Behandlung mit 10 μM MNNG in den NBN- und ATM-defizienten Zelllinien im Gegensatz zum Wildtyp mit der Zeit weiter an (Abb. 10C), wohingegen die Induktion der Nekrose während des untersuchten Zeitraums in der NBN-mutierten Zelllinie und im Wildtyp nahezu konstant blieb und in der ATM-defizienten Zelllinie mit der Zeit abfiel (Abb. 10D). Während des gesamten untersuchten Zeitraums war die Apoptose- und Nekrose-Induktion in der NBN- und ATM-defizienten Zelllinie verglichen zur Wildtyp-Zelllinie verstärkt. Jedoch war die Erhöhung der Nekrose-Rate in der ATM-mutierten Zelllinie nach 120 Std. nicht signifikant.

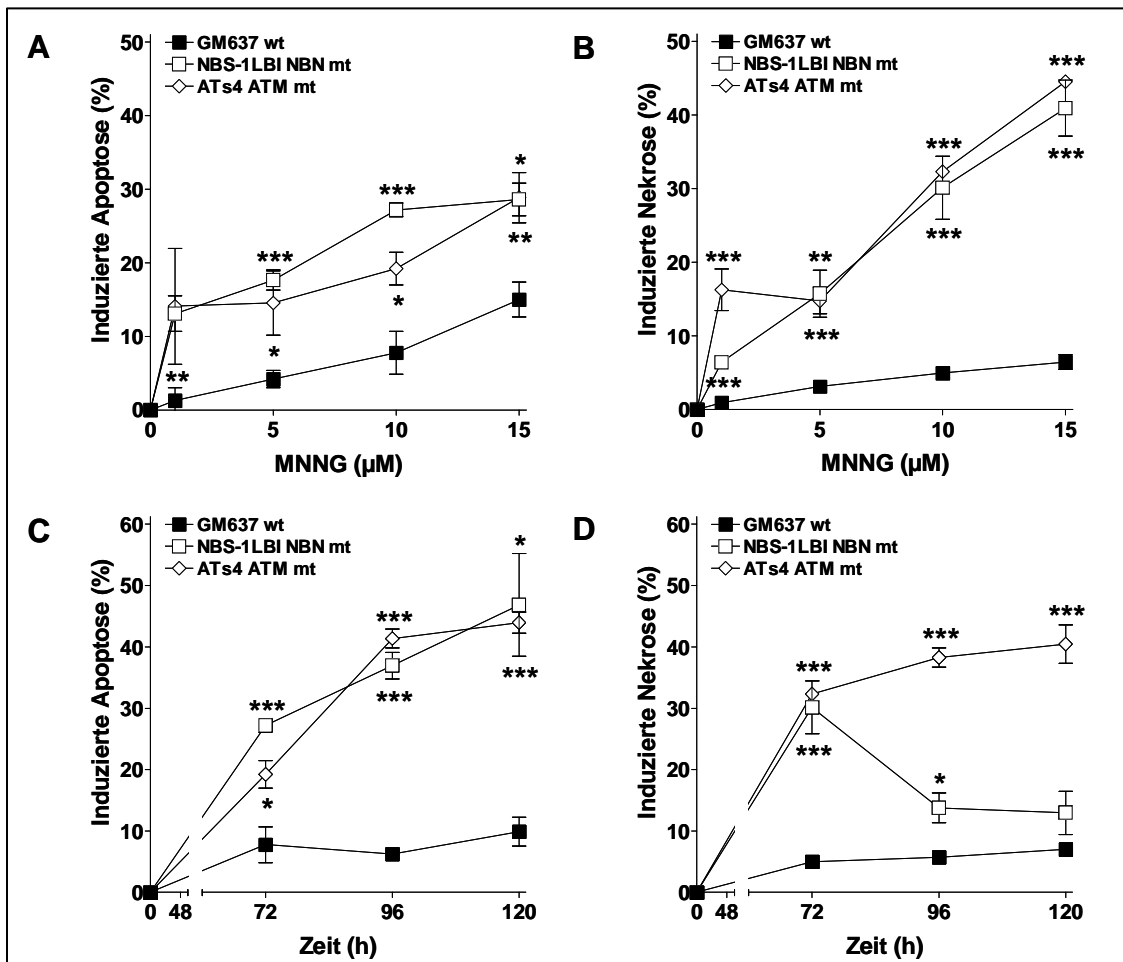


Abb. 10 Analyse der Apoptose- und Nekrose-Induktion mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 nach MNNG-Behandlung. Die P-Werte beziehen sich jeweils auf die Kontrollzelllinie GM637: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$ A) Induzierte Apoptose 72 Std. nach Behandlung mit MNNG in verschiedenen Konzentrationen. B) Induzierte Nekrose 72 Std. nach Behandlung mit MNNG in verschiedenen Konzentrationen. C) Induzierte Apoptose in Abhängigkeit der Zeit nach Behandlung mit 10 μM MNNG. D) Induzierte Nekrose in Abhängigkeit der Zeit nach Behandlung mit 10 μM MNNG.

4. Ergebnisse

Auch nach TMZ-Behandlung wies die NBN-mutierte Zelllinie verglichen mit dem Wildtyp nach 72 Std. eine verstärkte Apoptose- (Abb. 11A) und Nekrose-Rate auf (Abb. 11B). Die ATM-defiziente Zelllinie hingegen zeigte lediglich bei hohen Dosen (50 μ M) eine signifikant gesteigerte Nekrose-Induktion. Die Apoptose-Induktion blieb über den gesamten untersuchten Dosisbereich auf demselben niedrigen Niveau wie in der Wildtyp-Zelllinie.

Im zeitlichen Verlauf nach Behandlung der Zellen mit 50 μ M TMZ stieg die Apoptose-Rate in der NBN-defizienten Zelllinie weiter an und blieb im Wildtyp sowie in der ATM-mutierten Zelllinie auch zu späteren Zeitpunkten (96 Std.) auf einem sehr niedrigen Niveau (Abb. 11C). Die Induktion der Nekrose stieg mit der Zeit nach der Behandlung in beiden mutierten Zelllinien weiter an und war zu allen untersuchten Zeitpunkten in der Wildtyp-Zelllinie sehr niedrig (Abb. 11D).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass NBN- und ATM-mutierte Fibroblasten hypersensitiv gegenüber den alkylierenden Agenzien MNNG und TMZ reagieren, wobei sowohl die Induktion der Apoptose als auch die Induktion der Nekrose stark erhöht ist.

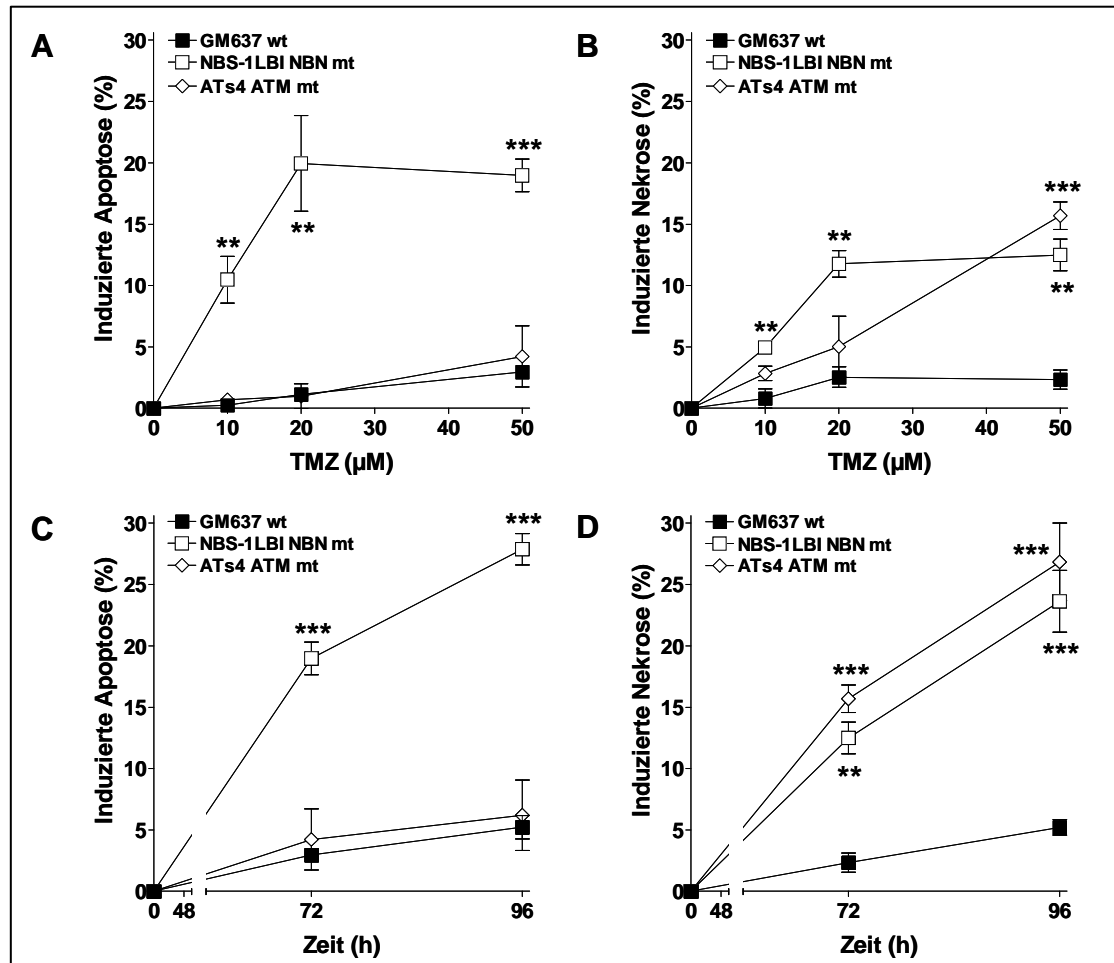


Abb. 11 Analyse der Apoptose- und Nekrose-Induktion mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 nach TMZ-Behandlung. Die P-Werte beziehen sich jeweils auf die Kontrollzelllinie GM637: **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$ A) Induzierte Apoptose 72 Std. nach Behandlung mit TMZ in verschiedenen Konzentrationen. B) Induzierte Nekrose 72 Std. nach Behandlung mit TMZ in verschiedenen Konzentrationen. C) Induzierte Apoptose in Abhängigkeit der Zeit nach Behandlung mit 50 µM TMZ. D) Induzierte Nekrose in Abhängigkeit der Zeit nach Behandlung mit 50 µM TMZ.

4.1.3. Analyse apoptotischer Marker nach Behandlung mit MNNG: Aktivierung der Caspase-7 und Spaltung von PARP1

Zur weiteren Verifikation des apoptotischen Zelltods wurden zwei verschiedene apoptotische Marker nach Behandlung der Zellen mit 10 µM MNNG und Vorbehandlung mit O⁶-BG im Zeitverlauf mit Western-Blot-Analysen untersucht. Dabei wurde in Proteinextrakten der NBN- und ATM-mutierten Zelllinien eine Spaltung bzw. Aktivierung der Caspase-7 beobachtet (Abb. 12A). Gleiches galt für die Caspase-

4. Ergebnisse

abhängige Spaltung von PARP1. Das 24 kDa-große Spaltprodukt von PARP1 wurde in beiden mutierten Zelllinien nach Behandlung mit MNNG detektiert (Abb. 12B). Beide Proteinfragmente, das der Caspase-7 und von PARP1, wurden in der Wildtyp-Zelllinie nicht nachgewiesen. Somit ist die stark erhöhte Apoptose-Rate nach MNNG-Behandlung in den NBN- und ATM-mutierten Zellen durch eine verstärkte Spaltung der Caspase-7 und von PARP1 gekennzeichnet.

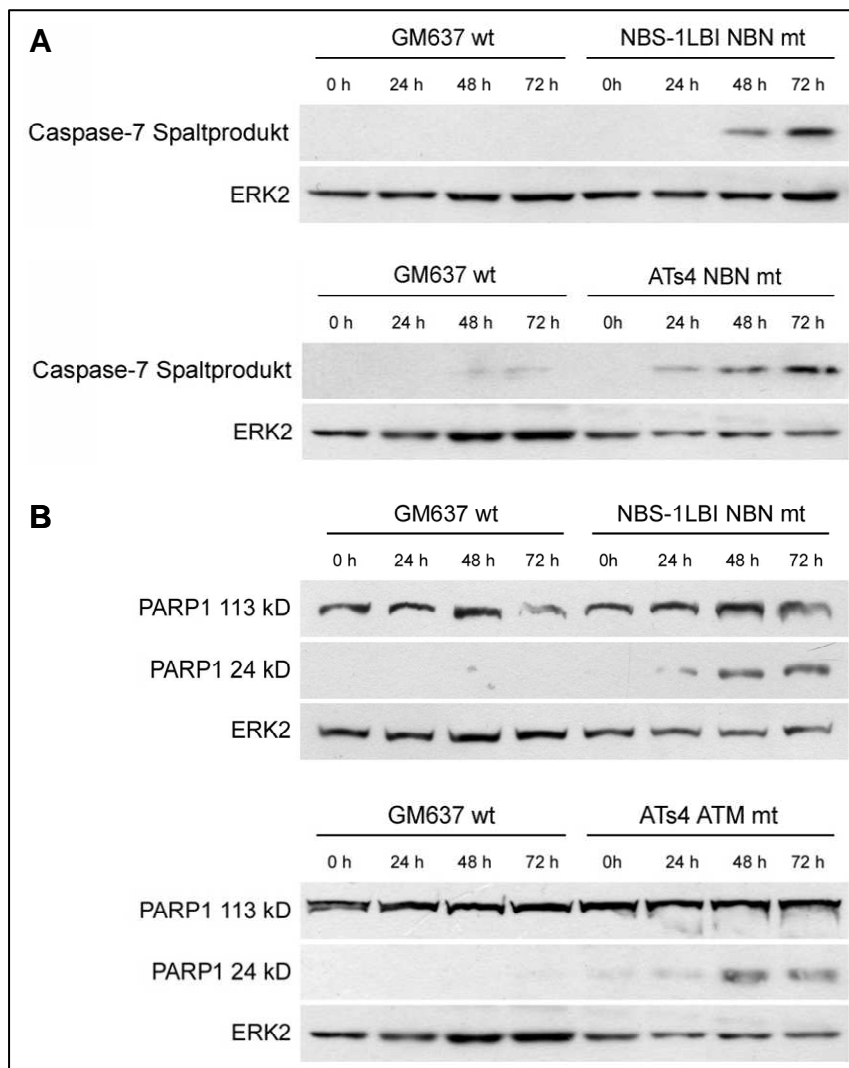


Abb. 12 Untersuchung apoptotischer Marker in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit 10 μ M MNNG mittels Western-Blot-Analysen. Zur Kontrolle der Beladung wurde die ERK2-Expression bestimmt. A) Zeitabhängige Spaltung (Aktivierung) von Caspase-7. B) Zeitabhängige Spaltung von PARP1.

4.1.4. Untersuchung des Einflusses von MGMT auf die Sensitivität der Zellen nach Behandlung mit MNNG

Weiterhin wurde der Einfluss des DNA-Reparaturenzyms MGMT, das Alkylierungen an der O⁶-Position des Guanins entfernt, auf die induzierte Toxizität nach Behandlung der Zellen mit MNNG untersucht. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurde zunächst die MGMT-Expression der Zelllinien in einer Western-Blot-Analyse bestimmt. Lediglich in der ATM-mutierten Zelllinie zeigte sich die Expression des MGMT-Proteins (Abb. 13A). Der Wildtyp und die NBN-defiziente Zelllinie exprimierten das MGMT-Protein nicht. Bestätigt wurde dieser Befund durch Messung der MGMT-Aktivität mit einem *in-vitro*-Aktivitätstest. Hier konnte lediglich in der ATM-Mutante mit 470,5 fmol/mg Protein eine starke Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 13B).

Aus diesem Grund wurden die beiden MGMT-negativen Zelllinien (Wildtyp und NBN-Mutante) und auch die ATM-Mutante mit einem MGMT-Expressionsplasmid transfiziert. Nach Co-Transfektion mit einem Selektorplasmid, welches ein neo-Resistenzgen trug, wurden G418-resistente Klone isoliert und die MGMT-Expression untersucht. Im Wildtyp und in der ATM-mutierten Zelllinie konnten positive Klone identifiziert werden, was bedeutet, dass einige Klone der Wildtyp-Zelllinie eine Expression des MGMT-Proteins aufwiesen und die MGMT-Expression in einigen Klonen der ATM-mutierten Zelllinie gesteigert war. Im Gegensatz dazu waren alle Klone der NBN-defizienten Zelllinie MGMT-negativ. Für die weiteren Untersuchungen wurde jeweils ein positiver Klon des Wildtyps (GM637 MGMT 7) und der ATM-mutierten Zelllinie (Ats4 MGMT 10) verwendet und erneut die MGMT-Expression in einer Western-Blot-Untersuchung dargestellt (Abb. 13A).

In beiden MGMT-positiven Klonen wurde anschließend die Toxizität nach Behandlung der Zellen mit 10 µM MNNG mit der Annexin V/PI-Methode bestimmt, wobei in diesem Fall keine O⁶-BG Vorbehandlung durchgeführt wurde. Die Toxizität wurde dann mit den Ursprungszelllinien, welche mit MNNG und O⁶-BG behandelt wurden, verglichen. Sowohl der Klon des Wildtyps (GM637 MGMT 7) als auch der Klon der ATM-mutierten Zelllinie (Ats4 MGMT 10) zeigten nur eine marginale Induktion von Apoptose und Nekrose (Abb. 13C – 13E). Die Zellen waren folglich äußerst resistent gegenüber MNNG, wenn sie das MGMT-Protein exprimierten und kein Inhibitor verabreicht wurde.

4. Ergebnisse

Daraus kann geschlossen werden, dass der DNA-Schaden O⁶-MeG für die verstärkte Zytotoxizität von NBN- und ATM-mutierten Zellen verantwortlich ist.

4. Ergebnisse

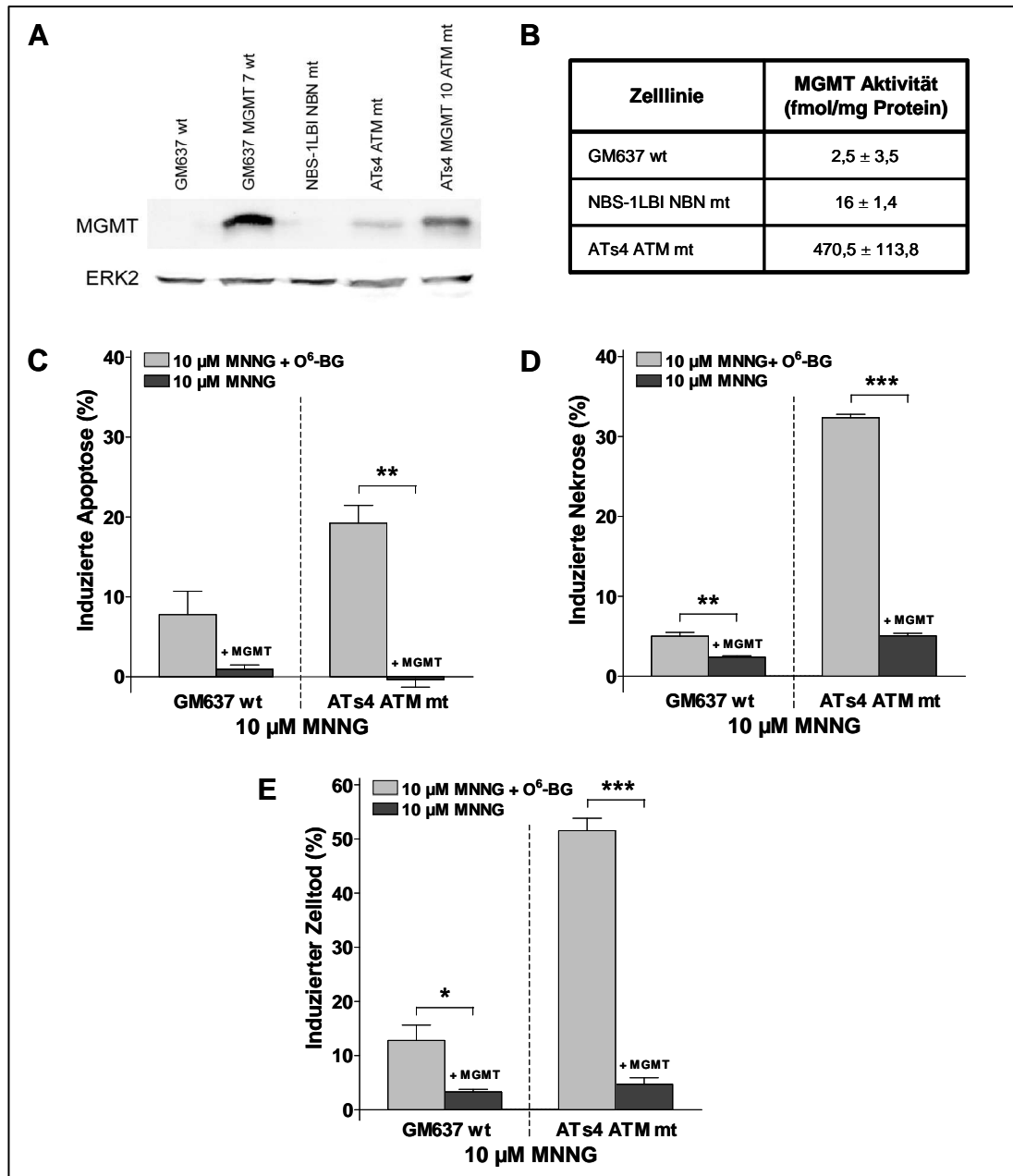


Abb. 13 Einfluss von MGMT auf die MNNG-induzierte Toxizität in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4. Für diese Untersuchung wurden die Zelllinien mit einem MGMT-Expressionsplasmid stabil transfiziert. A) Bestimmung der MGMT-Expression in den nicht-transfizierten Zellen und in den mit MGMT transfizierten Klonen der Wildtyp- (GM637 MGMT 7) und der ATM-defizienten Zelllinie (Ats4 MGMT 10) durch Western-Blot-Untersuchungen. In den NBS-1LBI-Zellen war die Transfektion nicht erfolgreich. Zur Kontrolle der Beladung wurde die ERK2-Expression bestimmt. B) Analyse der MGMT-Aktivität in den nicht-transfizierten Zellen mittels MGMT-Aktivitätstest. C) – E) Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den nicht-transfizierten Zelllinien GM637 und ATs4 und den mit MGMT stabil transfizierten Klonen (GM637 MGMT 7 und Ats4 MGMT 10) 72 Std. nach Behandlung mit 10 µM MNNG in Ab- bzw. Anwesenheit des MGMT-Inhibitors O⁶-BG. Die Bestimmung des Zelltods erfolgte durch Summation der Apoptose- und Nekrose-Fraktion. Da die NBS-1LBI-Zellen keine MGMT-Expression aufweisen und die Transfektion nicht erfolgreich war, wurde die Zelllinie in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$

4.1.5. Untersuchung der BER-Kapazität

Da in einer kürzlich publizierten Studie postuliert wurde, dass NBN-mutierte Zellen einen Defekt in der BER aufweisen (Sagan et al., 2009), wurde die BER-Kapazität in den verwendeten Zelllinien untersucht. In dem durchgeführten *in-vitro*-Aktivitätstest, mit welchem es möglich ist, die einzelnen Teilschritte der BER zu analysieren, wurde in der NBN- und auch in der ATM-defizienten Zelllinie keine verminderte BER-Aktivität im Vergleich mit der Wildtyp-Zelllinie festgestellt. Wie in Abb. 14A in einem repräsentativen Gelbild zu sehen ist, wurde das verwendete DNA-Oligonukleotid, das eine apurine Stelle trug, in allen drei Zelllinien effektiv durch die APE geschnitten und anschließend nach der Basen-Reparatur wieder ligiert. Durch Untersuchung der Reaktionskinetik wurde festgestellt, dass keine Unterschiede in der Akkumulation des Reparatur-Endprodukts im Wildtyp und in der NBN-mutierten Zelllinie vorlagen (Abb. 14B). In der ATM-defizienten Zelllinie dagegen verlief die Bildung des religierten DNA-Oligonukleotids etwas schneller. Dies äußerte sich durch eine signifikante Erhöhung der Akkumulation des Reparatur-Endprodukts in der ATM-Mutante im Vergleich zur Kontrollzelllinie nach einer Reaktionszeit von 60 min.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Verwendung des alkalischen Comet-Assays, bei dem die Bildung und das Verschwinden von ESBs, welche während der BER als Reparaturintermediate auftreten, analysiert wurden. Nach einer einstündigen Behandlung von exponentiell wachsenden Zellen mit 15 μ M MNNG stieg das TM (definiert als Produkt der „Kometenlänge“ und des Anteils der gesamten DNA im „Kometen“), das als Maß für ESBs herangezogen wird, in der Wildtyp- sowie in der NBN-mutierten Zelllinie in gleichem Maße und in der ATM-defizienten Zelllinie etwas schwächer an. Nach Auswaschen des Agens, das heißt in der Nachbehandlungs-Periode, fiel das TM in allen drei Zelllinien mit vergleichbarer Kinetik wieder ab, was ein Maß für die Reparatur der Alkylierungsschäden in der DNA darstellt (Abb. 14C).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in den NBN- und ATM-mutierten Fibroblasten-Zelllinien keine Verminderung der BER festgestellt werden konnte. Damit widersprechen diese Daten der oben erwähnten Studie (Sagan et al., 2009), in der ein Einfluss von NBN auf die BER postuliert wurde.

4. Ergebnisse

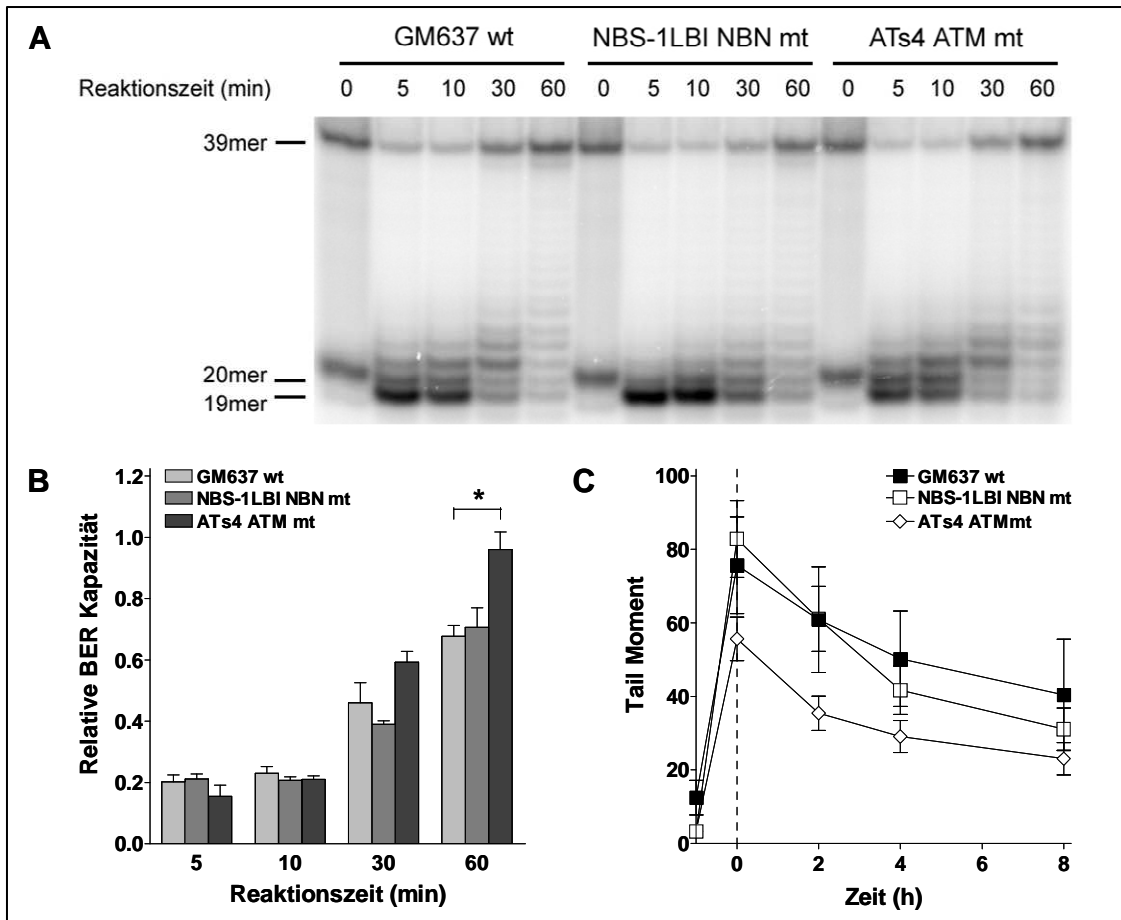


Abb. 14 Analyse der BER-Kapazität der menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4. A) Repräsentatives Gelbild eines BER-Aktivitätstests. Untersucht wurde die BER in Proteinextrakten unbehandelter Zellen in Abhängigkeit der Zeit. B) Quantifizierung der relativen BER-Kapazität. Die Darstellung der Kapazität erfolgte als Fraktion des wiederhergestellten DNA-Oligonukleotids (39-Mer) zum gegebenen Reaktionszeitpunkt verglichen zur Kontrolle (Reaktionszeit: 0 min) als Mittelwerte von drei unabhängigen Reparaturreaktionen. *, $P < 0,05$ C) Untersuchung der DNA-Einzelstrang-Formation und -Reparatur in der Nachbehandlungs-Periode nach einstündiger Behandlung mit $15 \mu\text{M}$ MNNG durch den alkalischen Comet-Assay.

4.1.6. Untersuchung des Einflusses der NHEJ auf die Reparatur der MNNG-induzierten DNA-Läsionen

Um zu untersuchen, ob die NHEJ für die Reparatur der Alkylanzien-induzierten DNA-Schäden von Bedeutung ist, wurde die induzierte Toxizität nach Behandlung der Zellen mit $10 \mu\text{M}$ MNNG bei gleichzeitiger MGMT-Inaktivierung untersucht. Zu diesen Experimenten wurde das DNA-Reparaturenzym DNA-PK_{CS} durch die Zugabe von

10 μ M NU7026 (Hollick et al., 2003) inhibiert, wobei die Zugabe des Inhibitors 1 Std. vor der MNNG-Behandlung erfolgte.

Wie aus Abb. 15 ersichtlich ist, wurde 72 Std. nach Behandlung mit MNNG die induzierte Toxizität im Wildtyp und in der ATM-defizienten Zelllinie durch Inhibition der DNA-PK nicht beeinflusst. In der NBN-defizienten Zelllinie dagegen stieg die Induktion der Apoptose (Abb. 15A) und der Nekrose (Abb. 15B) stark an. Somit war auch der induzierte Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) in der NBN-mutierten Zelllinie stark erhöht, wenn die DNA-PK_{CS} inhibiert wurde (Abb. 15C). Die Daten zeigen, dass die NHEJ in den Wildtyp- und in den ATM-defizienten Zellen während der Reparatur der DNA-Schäden, die durch MNNG induziert werden, keine wichtige Rolle spielt. In den NBN-mutierten Zellen hingegen beeinflusst die NHEJ die Reparatur dieser DNA-Schäden signifikant.

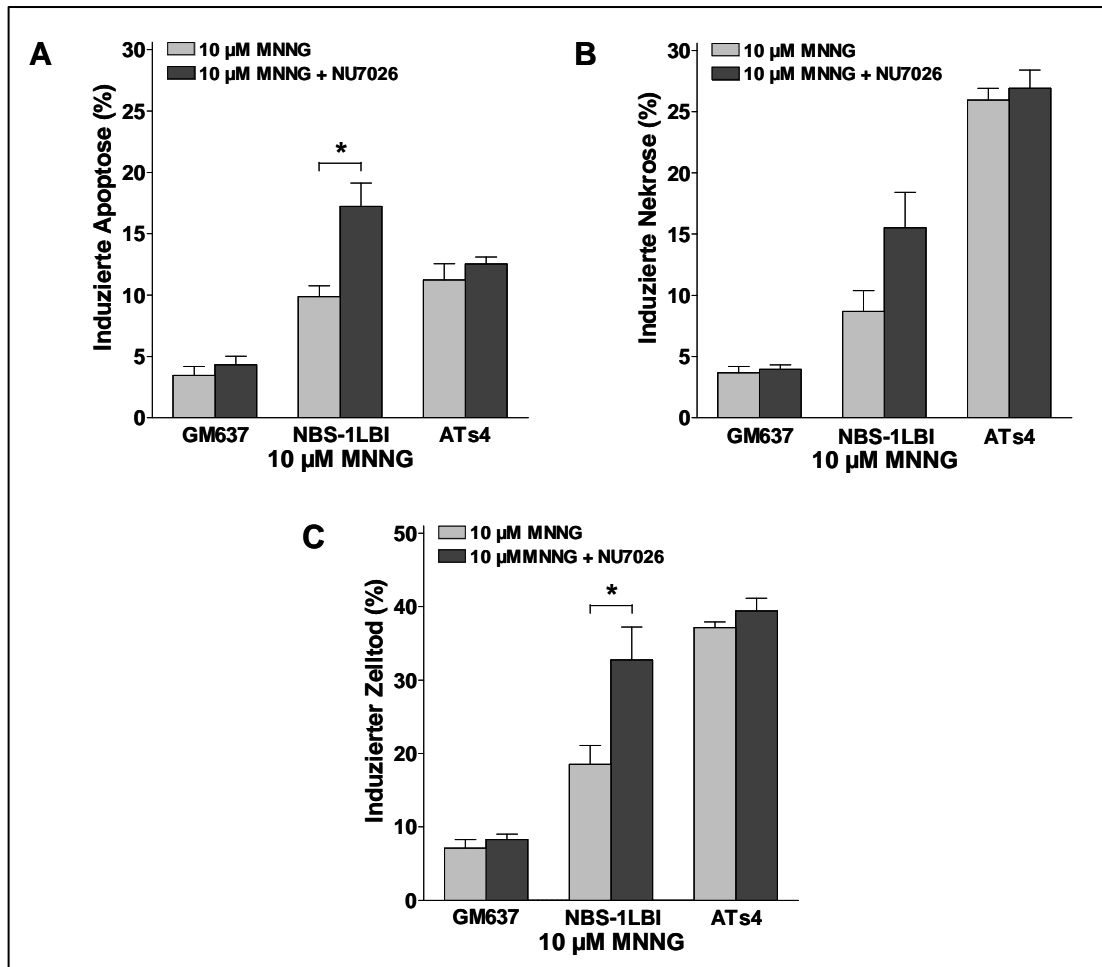


Abb. 15 Einfluss von NU7026 auf die MNNG-induzierte Toxizität in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4. Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode 72 Std. nach Behandlung mit 10 μ M MNNG in Ab- bzw. Anwesenheit des DNA-PK_{CS}-Inhibitors NU7026 (10 μ M 1 Std. vor der MNNG-Behandlung). *, $P < 0,05$
 A) Induzierte Apoptose. B) Induzierte Nekrose. C) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose).

4.1.7. Untersuchung der Nekrose-Induktion nach Behandlung der Zellen mit MNNG

In den nachfolgend dargestellten Experimenten wurde die Ursache für die hohe Frequenz der Induktion der Nekrose in den NBN- und ATM-defizienten Zelllinien untersucht. Wie in der Einleitung in Kapitel 1.3.1 diskutiert wurde, könnte diese durch eine Hyperaktivierung von PARP1 und einer damit verbundenen ATP-Depletion verursacht werden (Festjens et al., 2006). Deshalb wurde die Aktivierung von PARP1

4. Ergebnisse

nach Behandlung der Wildtyp-Zelllinie sowie der NBN- und ATM-mutierten Zelllinien mit 10 μ M MNNG und O⁶-BG mittels Immunfluoreszenz untersucht. Dabei wurde das enzymatische Endprodukt von PARP1, PAR, mit dem 10H-Antikörper (Kawamitsu et al., 1984) nachgewiesen und anhand dessen auf die PARP1-Aktivität geschlossen. Im Wildtyp und in beiden mutierten Zelllinien konnte zu keinen untersuchten Zeitpunkten PAR nachgewiesen werden, während die Nuklei der Zellen, welche als Positivkontrolle für 10 min mit H₂O₂ behandelt wurden, stark positiv für die PAR-Färbung waren (Abb. 16A).

Zusätzlich wurde der ATP-Gehalt der Zellen nach gleicher Behandlung mit 10 μ M MNNG (in Anwesenheit von O⁶-BG) mit einem ATP-Test untersucht. Während in der Wildtyp-Zelllinie die ATP-Menge 72 Std. nach Behandlung verglichen zur unbehandelten Kontrolle nur geringfügig absank, wurde in den NBN- und ATM-mutierten Zelllinien dagegen eine massive ATP-Depletion nachgewiesen (Abb. 16B).

Ein wichtiger zellulärer Energiesensor für ATP ist die AMP-Kinase (Hardie et al., 2003). Sie wird durch Phosphorylierung aktiviert, wenn das Verhältnis von ATP zu AMP in der Zelle absinkt, und stimuliert anschließend die ATP-Produktion. Die Phosphorylierung der AMP-Kinase wurde in Western-Blot-Untersuchungen in Proteinextrakten der verwendeten Zelllinien analysiert. Wie aus Abb. 16C hervorgeht, erfolgte im Wildtyp 48 und 72 Std. nach Behandlung der Zellen mit 10 μ M MNNG eine starke Phosphorylierung der AMP-Kinase. Diese Phosphorylierung fehlte in der NBN-defizienten Zelllinie komplett und war in der ATM-Mutante nur sehr schwach nachzuweisen. Zu beachten ist, dass auch in diesem Experiment das MGMT-Enzym durch O⁶-BG inaktiviert wurde.

Die Daten weisen somit darauf hin, dass die Depletion des ATP-Gehalts und daher sehr wahrscheinlich auch die hohe Nekrose-Rate in den NBN- und ATM-mutierten Zellen durch das Ausbleiben der AMP-Kinase-Aktivierung bedingt ist.

4. Ergebnisse

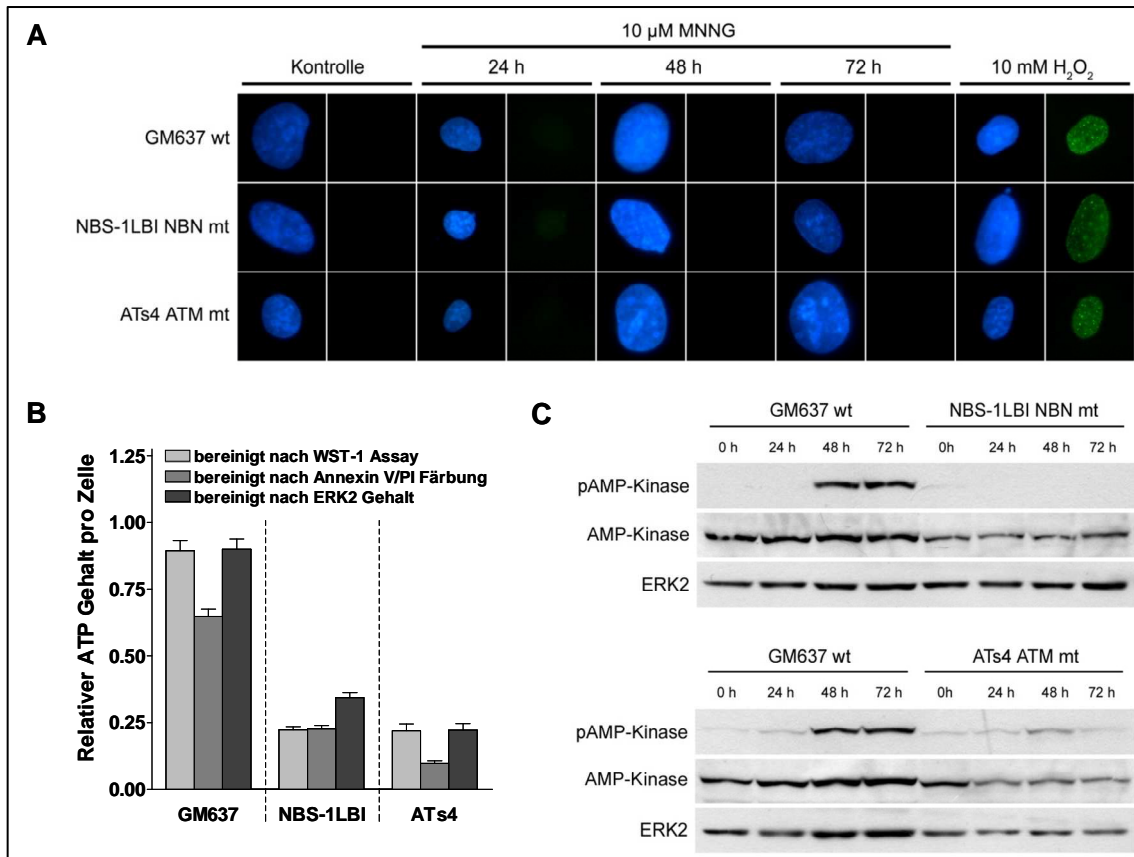


Abb. 16 Untersuchung der Nekrose-Induktion nach 10 μ M MNNG-Behandlung in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4. A) Analyse der PARP1-Aktivierung mittels Immunfluoreszenz-Färbung von PAR mit dem 10H-Antikörper. B) Bestimmung des relativen ATP-Gehalts 72 Std. nach MNNG-Behandlung mit dem ATP-Test. Zum Normalisieren des ATP-Gehalts auf die lebende Population wurden die Daten aus dem WST-1-Assay oder der Annexin V/PI-Methode sowie der ERK2-Proteingehalt verwendet. C) Untersuchung der AMP-Kinase-Phosphorylierung (pAMP-Kinase) nach 10 μ M MNNG-Behandlung mittels Western-Blot-Analyse. Zur Kontrolle der Beladung wurde die ERK2-Expression bestimmt.

Um den Einfluss der AMP-Kinase auf die Nekrose-Induktion in den Fibroblasten-Zelllinien zu untersuchen, wurde die Apoptose- und Nekrose-Induktion nach Behandlung der Zelllinien mit MNNG in Anwesenheit des AMP-Kinase-Aktivators Metformin (Zhou et al., 2001) analysiert. Wie mittels Western-Blot-Analyse gezeigt werden konnte, wurde die AMP-Kinase im Wildtyp und in der ATM-mutierten Zelllinie 24 Std. nach Behandlung mit 5 mM Metformin schwach phosphoryliert (Abb. 17A).

Der Wildtyp und die ATM-mutierte Zelllinie wurden dann in Anwesenheit von O⁶-BG mit 10 μ M MNNG und Metformin co-behandelt und nach 72 Std. mit der Annexin V/PI-

4. Ergebnisse

Doppelfärbung untersucht. Die Metformin-Behandlung erfolgte dabei alle 24 Std. in einer Konzentration von 5 mM beginnend zum Zeitpunkt der MNNG-Behandlung. Im Wildtyp wurden die Gesamtoxizität und die Induktion von Apoptose und Nekrose durch die Anwesenheit von Metformin nicht beeinflusst (Abb. 17B). In der ATM-mutierten Zelllinie hingegen fiel die Induktion der Nekrose nach Co-Behandlung der Zellen mit MNNG und Metformin verglichen zur MNNG-Einzelbehandlung signifikant ab, während die Induktion der Apoptose in gleichem Maße anstieg (Abb. 17C). Der induzierte Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) war auch hier nicht verändert.

Somit war in der ATM-mutierten Zelllinie durch die Zugabe von Metformin eine Modulation der Apoptose- und Nekrose-Rate möglich, wobei die Sensitivität der Zellen nicht beeinflusst wurde. Dies verdeutlicht die Rolle der AMP-Kinase in der Regulation der Apoptose- und Nekrose-Induktion. Außerdem deuten die Daten daraufhin, dass die Aktivierung AMP-Kinase die Sensitivität der Zellen nicht beeinflusst.

Weiterhin konnte auch in der NBN-defizienten Zelllinie die Metformin-induzierte Phosphorylierung der AMP-Kinase beobachtet werden (Abb. 36A im Anhang). In dieser Zelllinie wurde jedoch anders als in der ATM-mutierten Zelllinie keine Veränderungen in der Apoptose- und Nekrose-Induktion nach MNNG-Behandlung nachgewiesen (Abb. 36B im Anhang).

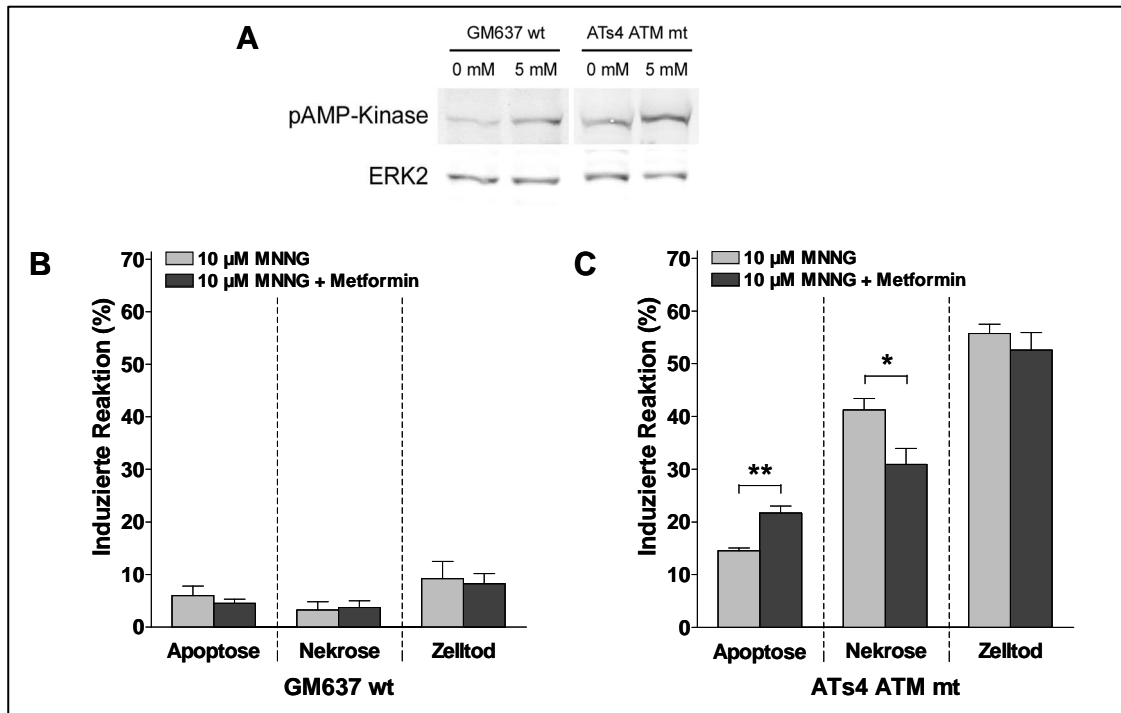


Abb. 17 Einfluss der AMP-Kinase-Phosphorylierung auf die MNNG-induzierte Toxizität in den GM637- und ATs4-Zellen. A) Untersuchung der AMP-Kinase-Phosphorylierung (pAMP-Kinase) 24 Std. nach Behandlung mit 5 mM Metformin mittels Western-Blot-Untersuchung. Zur Kontrolle der Beladung wurde die ERK2-Expression bestimmt. B) und C) Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode 72 Std. nach 10 µM MNNG-Behandlung in Ab- bzw. Anwesenheit des AMP-Kinase-Aktivators Metformin (5 mM alle 24 Std. beginnend ab der MNNG-Behandlung). Die Bestimmung des Zelltods erfolgte durch Summation der Apoptose- und Nekrose-Fraktion. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$

4.1.8. Untersuchung der zellulären Sensitivität sowie der Apoptose- und Nekrose-Induktion nach Behandlung mit verschiedenen gentoxischen Agenzien

Da alkylierende Agenzien, wie MNNG und TMZ, in verschiedenen Zellsystemen durch die O⁶-MeG-Läsion vorwiegend Apoptose induzieren (Naumann et al., 2009; Ochs and Kaina, 2000; Roos et al., 2004; Roos et al., 2007), war die hohe Frequenz der Nekrose-Induktion in den NBN- und ATM-mutierten Zelllinien sehr unerwartet. Daher wurde der Einfluss der NBN- und ATM-Mutationen auf die Apoptose- und Nekrose-Induktion nach Behandlung der Zellen mit einer Reihe von verschiedenen Gentoxinen (MNNG, TMZ, MMS, ETO, TPT, IR, UVC, HdCDT) untersucht.

4. Ergebnisse

Hierzu wurden die Fibroblasten-Zelllinien mit den entsprechenden Gentoxinen behandelt und 72 Std. später die apoptotische bzw. nekrotische Zellfraktion und der induzierte Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) bestimmt, wobei bei Behandlung der Zellen mit den methylierenden Agenzien MNNG, TMZ und MMS wie bei den vorigen Analysen zusätzlich eine O⁶-BG-Applikation erfolgte. Verglichen zum Wildtyp reagierten die NBN- und ATM-mutierten Zelllinien hypersensitiv gegenüber allen verwendeten Gentoxinen (Abb. 18A).

Weiterhin wurde der prozentuale Anteil der Apoptose und der Nekrose am Zelltod analysiert. In der Wildtyp-Zelllinie dominierte abhängig vom Gentoxin entweder die Induktion der Apoptose oder der Nekrose oder es lag eine ausgeglichene Verteilung vor (Abb. 18B). So wurde nach Behandlung der Zellen mit MNNG, MMS oder IR signifikant mehr Apoptose als Nekrose induziert. Nach Bestrahlung der Zellen mit UVC dominierte dagegen die Induktion der Nekrose. Im Fall der TPT- und der ETO-Behandlung waren die Verhältnisse mit 48:52 und 44:56 ausgeglichen, so dass nach Behandlung mit diesen beiden Gentoxinen kein signifikant dominanter Signalweg beobachtet wurde. Auf eine Analyse der TMZ- und HdCDT-induzierten Apoptose- und Nekrose-Fractionen wurde verzichtet, da die induzierte Toxizität bei diesen Agenzien im Wildtyp sehr gering war.

In der NBN-mutierten Zelllinie war lediglich nach MNNG-Behandlung der nekrotische Zelltod dominant (Abb. 18C). Die Induktion der Apoptose dominierte dagegen signifikant nach Behandlung mit TMZ und nach Bestrahlen der Zellen mit IR. Nach MMS-, TPT-, ETO- und HdCDT-Behandlung sowie nach UVC-Exposition zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Apoptose-Induktion gegenüber der Nekrose-Induktion. Die Verhältnisse von Apoptose zu Nekrose waren 52:48 (MMS), 54:46 (UVC, TPT, ETO) und 53:47 (HdCDT).

In der ATM-mutierten Zelllinie dominierte nach allen verwendeten Behandlungsarten die Induktion der Nekrose (Abb. 18D). Lediglich nach MMS-Behandlung waren die beobachteten Unterschiede nicht signifikant. Somit machen diese Ergebnisse deutlich, dass die ATM-mutierte Zelllinie nicht nur nach MNNG-Behandlung, sondern auch nach Behandlung mit anderen Gentoxinen mit einer hohen Nekrose-Frequenz reagiert.

Eine detaillierte Darstellung der Toxizität 72 Std. nach Behandlung mit den verschiedenen Gentoxinen ist im Anhang enthalten (Abb. 37 – 39).

4. Ergebnisse

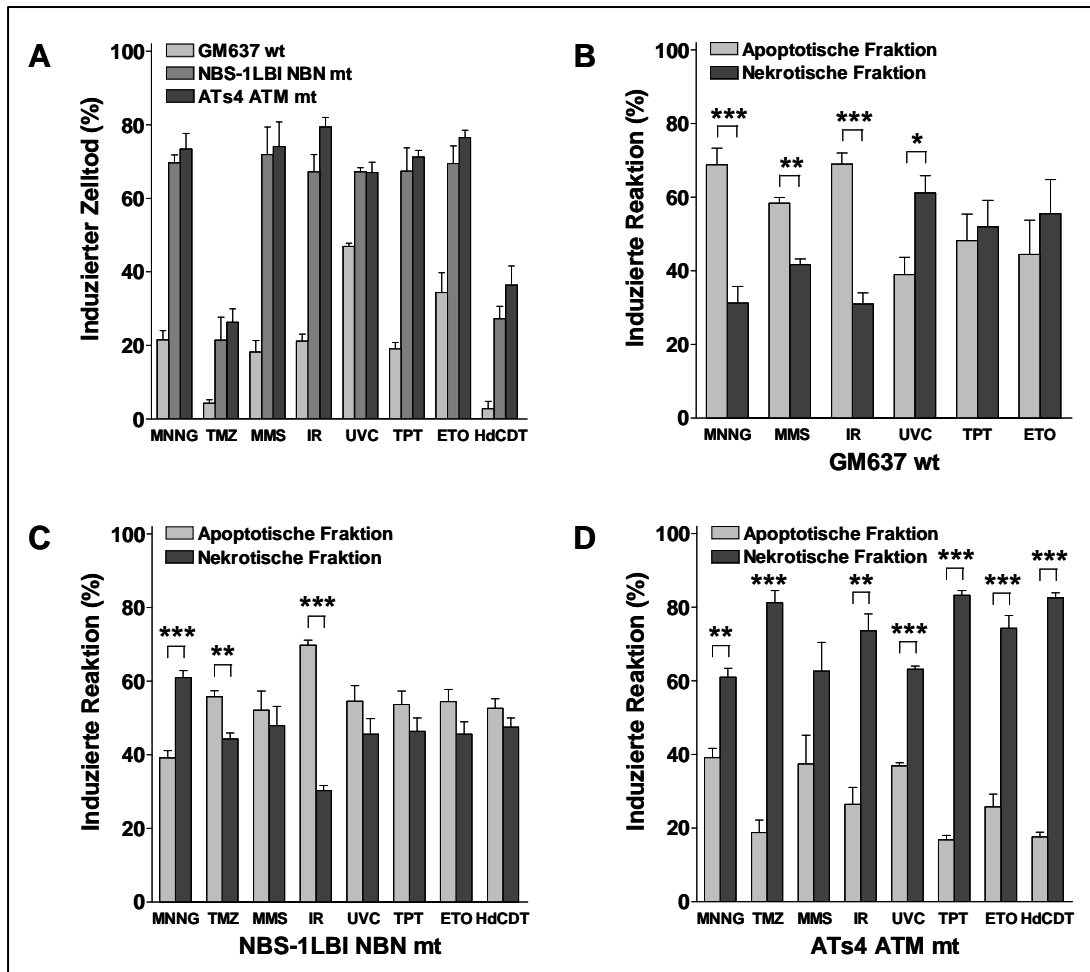


Abb. 18 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 72 Std. nach Behandlung mit verschiedenen Genotoxinen (MNNG: 15 μ M; TMZ: 100 μ M; MMS: 1 mM; IR: 12 Gy; UVC: 25 J; TPT: 10 ng/ml; ETO: 1 μ g/ml; HdCDT: 1 ng/ml); *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$ A) Induzierter Zelltod. (Summe aus Apoptose und Nekrose) B) – D) Apoptotische bzw. nekrotische Fraktion als Anteil am induzierten Zelltod. Aufgrund der niedrigen Toxizität in den GM637-Zellen nach TMZ- und HdCDT-Behandlung wurde auf eine Berechnung der Fraktionen verzichtet. Es wird deutlich, dass die ATM-defiziente Zelllinie ATs4 unabhängig vom verwendeten Genotoxin primär durch den nekrotischen Zelltod stirbt.

4.2. Untersuchungen an menschlichen, lymphoblastoiden Zellen

Um die Daten, welche mit den Fibroblasten-Zelllinien gewonnen wurden, zu bekräftigen, wurden als weiteres Untersuchungssystem drei menschliche, lymphoblastoide Zelllinien verwendet. Zwei Zelllinien (94P247 und 94P126) tragen eine

Mutation im NBN-Gen, welche zu der Expression eines verkürzten und damit teilweise funktionslosen NBN-Proteins führen. Beide Zelllinien wurden ähnlich der NBN-defizienten Fibroblasten-Zelllinie aus Patienten mit dem NBS isoliert. Die dritte Zelllinie (95P466) zeigt keine Mutation im NBN-Gen und wird daher im Folgenden als Wildtyp definiert. Alle drei Zelllinien wurden durch EBV-Transformation immortalisiert.

4.2.1. Allgemeine Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

Wie in den Fibroblasten wurden ebenfalls in den lymphoblastoiden Zellen verschiedene Parameter untersucht, welche die Methylierung-induzierte Toxizität beeinflussen. Zunächst wurde die NBN-Expression in Western-Blot-Untersuchungen bestätigt. In Proteinextrakten des Wildtyps war eine NBN-Expression zu beobachten (Abb. 19A). Im Gegensatz dazu konnte in den NBN-mutierten Zelllinien kein NBN-Protein detektiert werden, da der verwendete Antikörper das verkürzte NBN-Protein, welches von den NBN-mutierten Zelllinien gebildet wird, nicht erkennt.

Weiterhin wurden Wachstumskurven der drei Zelllinien erstellt und anschließend die Generationszeit berechnet. Die Wildtyp-Zelllinie zeigte eine Generationszeit von 38,6 Std. (Abb. 19B). Eine der beiden NBN-mutierten Zelllinien (94P247) wuchs im Vergleich dazu etwas schneller, die andere Zelllinie (94P126) dagegen langsamer. Auch hier wurde erneut die Expression der wichtigen MMR-Proteine des MutS α - (bestehend aus MSH2 und MSH6) und des MutL α -Komplexes (bestehend aus MLH1 und PMS2) mittels Western-Blot-Analysen bestimmt. Die Expression der untersuchten Proteine zeigte im Wildtyp und in einer der beiden NBN-defizienten Zelllinien (94P247) keine signifikanten Unterschiede (Abb. 19C). Die Protein-Expression in der zweiten NBN-mutierten Zelllinie (94P126) unterschied sich jedoch zum Teil deutlich von der Expression der anderen beiden Zelllinien. So wurde vor allem MSH6, aber auch MSH2 und PMS2, auf niedrigerem Niveau exprimiert.

Da das p53-Protein ebenfalls eine Determinante für die Sensitivität von Zellen nach Behandlung mit methylierenden Agenzien darstellt, wurde abschließend der p53-Status der drei verwendeten Zelllinien untersucht. Wie in Abb. 19D zu sehen ist, zeigte die Western-Blot-Untersuchung in Proteinextrakten aller drei Zelllinien eine Akkumulation

4. Ergebnisse

des p53-Proteins 5,5 Std. nach Bestrahlung der Zellen mit γ -Strahlung, so dass davon auszugehen ist, dass die Zelllinien in Bezug auf p53 nicht mutiert waren.

In den folgenden Untersuchungen wurde, wenn nicht anders erwähnt, ausschließlich jene NBN-defiziente Zelllinie (94P247) verwendet, welche nur geringe Abweichungen in der Generationszeit und keine signifikanten Unterschiede in der Expression der MMR-Proteine aufwies.

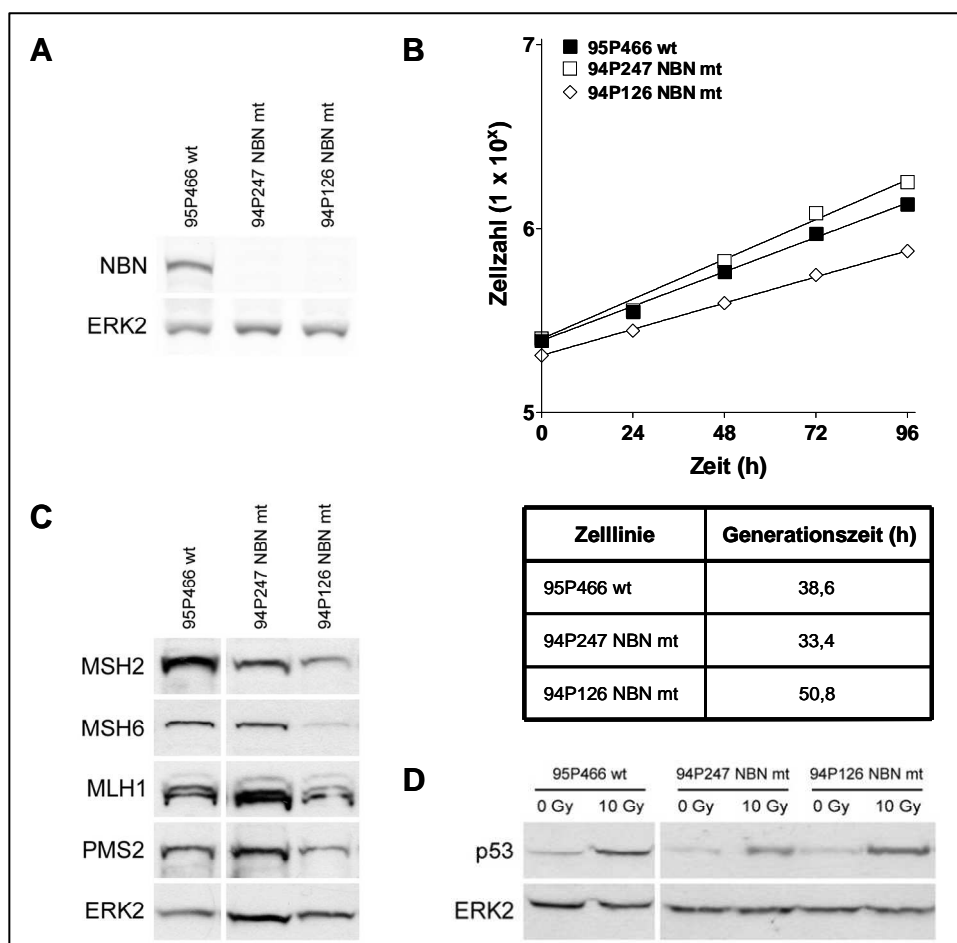


Abb. 19 Allgemeine Charakterisierung der lymphoblastoiden Zelllinien 95P466, 94P247 und 94P126. A) Analyse der NBN-Expression mittels Western-Blot-Untersuchung. B) Wachstumskurven und Berechnung der daraus resultierenden Generationszeiten. C) Untersuchung der Proteinexpression von MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2 mittels Western-Blot-Analyse. D) Bestimmung des p53-Status mittels Western-Blot-Analyse 5,5 Std. nach Bestrahlung mit IR. Zur Kontrolle der Beladung in den Western-Blot-Untersuchungen in A), C) und D) wurde die ERK2-Expression bestimmt.

4.2.2. Untersuchung der Sensitivität der Zellen nach Behandlung mit MNNG und TMZ

Zu Beginn wurde erneut die zelluläre Sensitivität nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Dosen MNNG und TMZ mit Hilfe des WST-1-Assays bestimmt. 72 Std. nach Behandlung reagierte die NBN-defiziente Zelllinie sensitiver als die Wildtyp-Zelllinie gegenüber MNNG (Abb. 20A) und TMZ (Abb. 20B). Voraussetzung zum Erzielen toxischer Effekte war, dass MGMT durch die Zugabe von O⁶-BG inhibiert wurde.

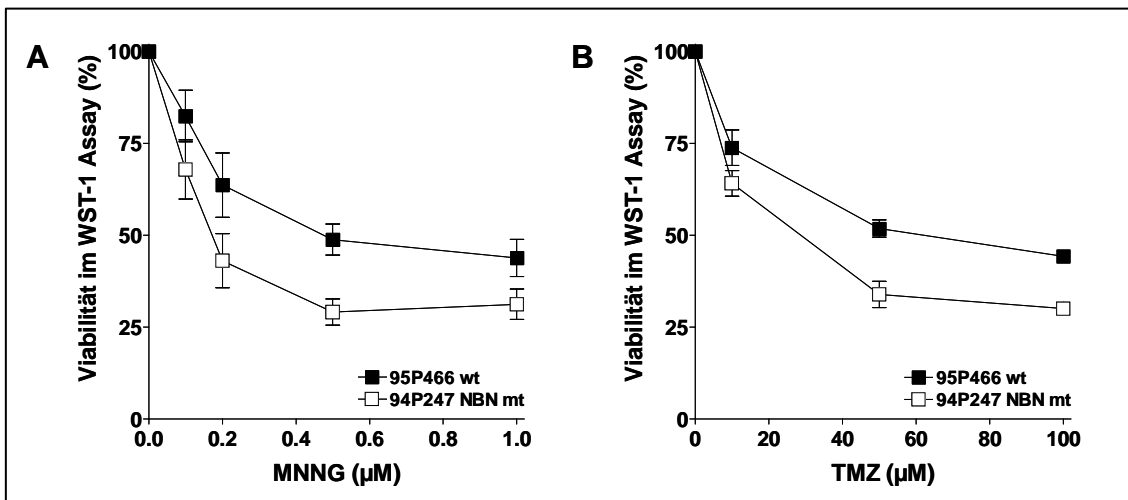


Abb. 20 Analyse der Viabilität der lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247 mit dem WST-1-Assay. Die Messung erfolgte 72 Std. nach Behandlung mit den alkylierenden Agenzien MNNG (A) und TMZ (B) in verschiedenen Konzentrationen.

Um diese Befunde zu verifizieren, wurde die Induktion des Zelltods (Summe aus Apoptose und Nekrose) in beiden Zelllinien mit der Annexin V/PI-Methode analysiert. Hier war die NBN-Mutante 72 Std. nach Behandlung mit MNNG (Abb. 21A) und TMZ (Abb. 21B) über den gesamten untersuchten Dosisbereich signifikant sensitiver als der Wildtyp, wenn MGMT inhibiert wurde. Zusätzlich wurde die Sensitivität beider Zelllinien im zeitlichen Verlauf nach Behandlung mit 0,5 µM MNNG (in Anwesenheit von O⁶-BG) betrachtet, wobei zu beobachten war, dass die Toxizität zu frühen Zeitpunkten sehr

4. Ergebnisse

gering war und dann mit der Zeit anstieg. Außerdem wurden die Unterschiede in der Sensitivität zwischen den Zelllinien erst 72 Std. nach Behandlung signifikant (Abb. 21C). Eine detaillierte Darstellung der Toxizität 24 und 48 Std. nach MNNG-Behandlung ist im Anhang enthalten (Abb. 40).

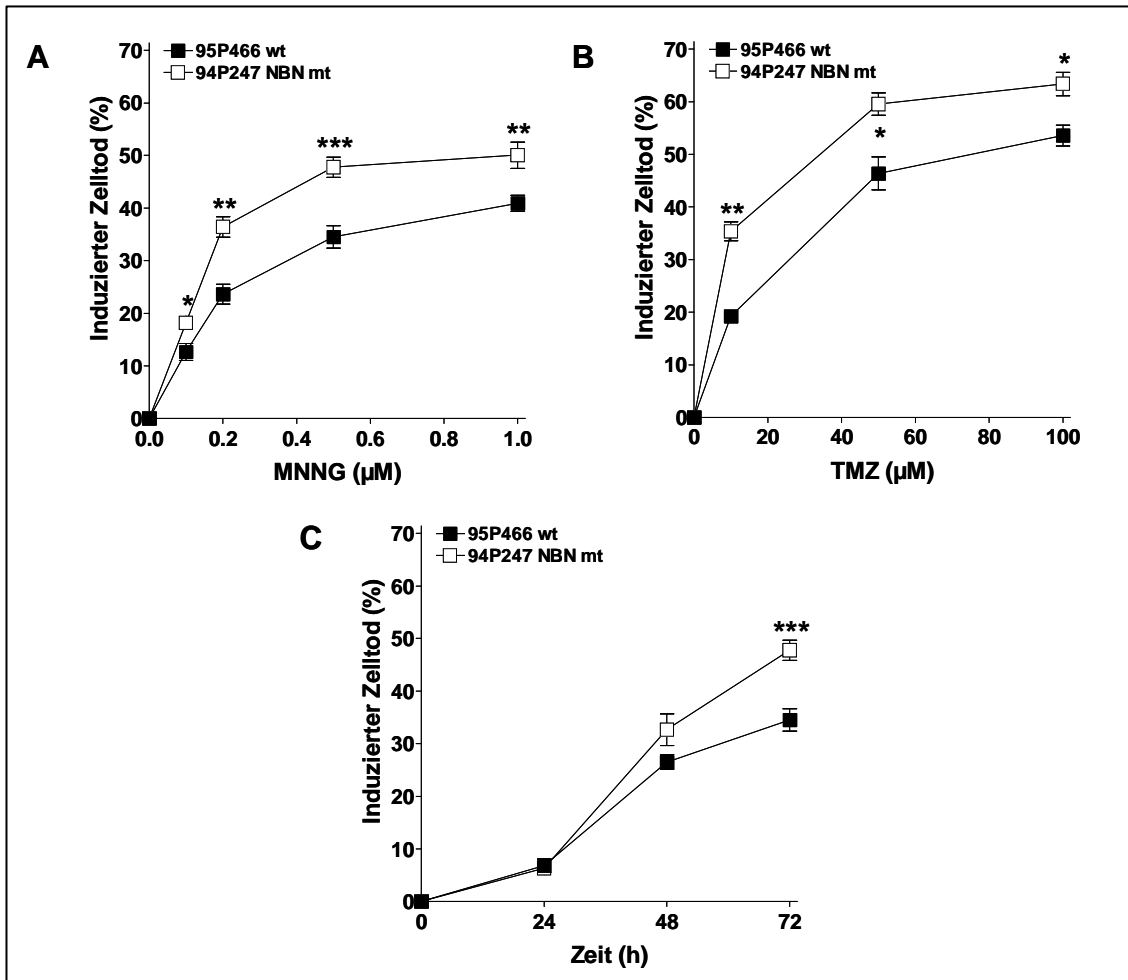


Abb. 21 Analyse der Zelltod-Induktion mit der Annexin V/PI-Methode in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247. Die Bestimmung des Zelltods erfolgte durch Summation der Apoptose- und Nekrose-Fraktion. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$ A) 72 Std. nach Behandlung mit MNNG in verschiedenen Konzentrationen. B) 72 Std. nach Behandlung mit TMZ in verschiedenen Konzentrationen. C) Zeitabhängigkeit nach Behandlung mit 0,5 µM MNNG.

Weiterhin wurde die Induktion der Apoptose und Nekrose getrennt voneinander untersucht. 72 Std. nach Behandlung der Zellen mit MNNG wurde nach hohen Dosen

4. Ergebnisse

(1 μM) im Wildtyp eine signifikant verstärkte Induktion der Apoptose verglichen zur NBN-mutierten Zelllinie beobachtet (Abb. 22A). Die Induktion der Nekrose erwies sich in der Wildtyp-Zelllinie als sehr gering und war in der NBN-defizienten Zelllinie über den gesamten untersuchten Dosisbereich dramatisch erhöht (Abb. 22B).

Im zeitlichen Verlauf nach 0,5 μM MNNG-Behandlung wurde in beiden Zelllinien zu frühen Zeitpunkten nur wenig Apoptose induziert (Abb. 22C). Die Induktion stieg in beiden Zelllinien mit der Zeit an, wobei zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen beiden Zelllinien zu beobachten waren. Auch die Induktion der Nekrose war zum frühen Zeitpunkt nach MNNG-Behandlung in beiden Zelllinien sehr niedrig und stieg in der NBN-Mutante mit der Zeit stark an, während im Wildtyp nur eine leichte Induktion nach 48 Std. beobachtet wurde, die nach 72 Std. nicht weiter anstieg (Abb. 22D).

4. Ergebnisse

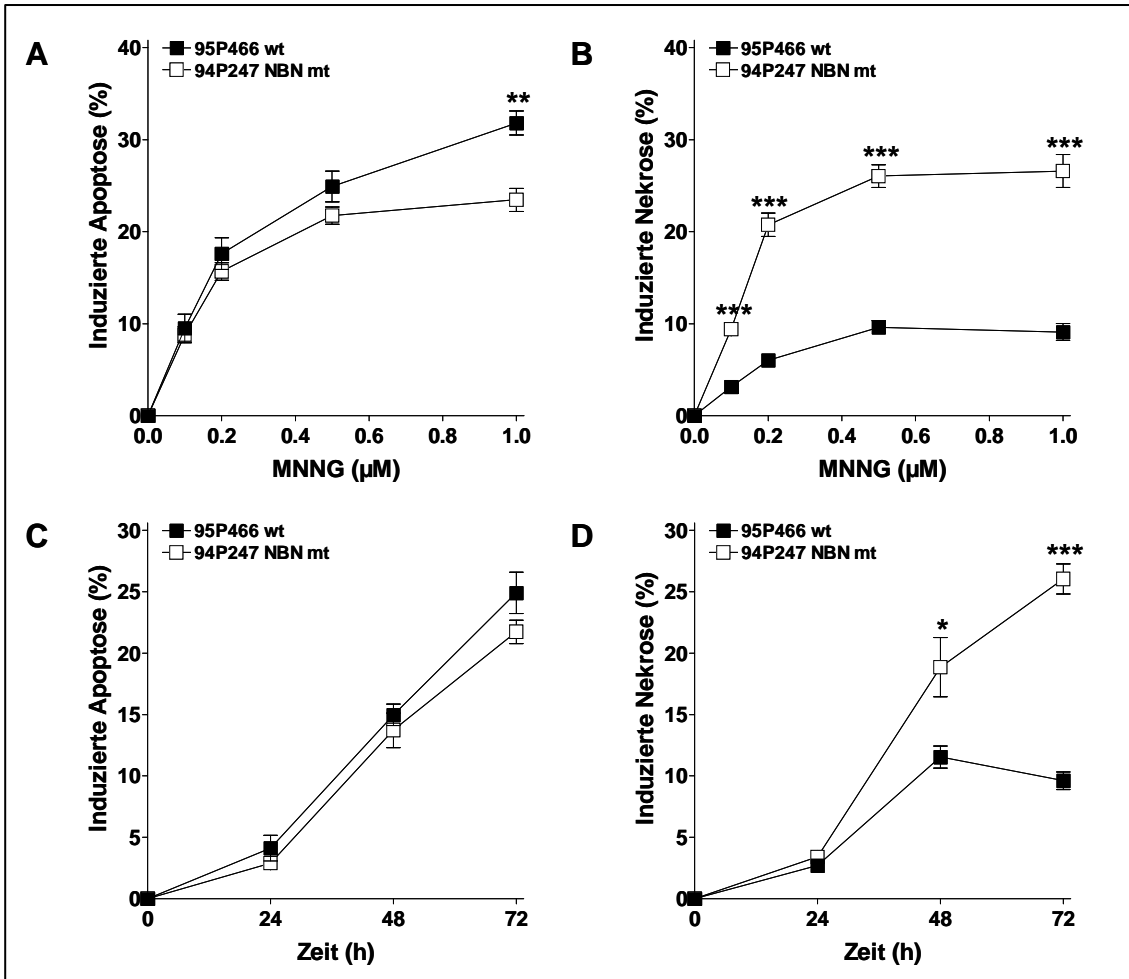


Abb. 22 Analyse der Apoptose- und Nekrose-Induktion mit der Annexin V/PI-Methode in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247 nach MNNG-Behandlung. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$ A) Induzierte Apoptose 72 Std. nach Behandlung mit MNNG in verschiedenen Konzentrationen. B) Induzierte Nekrose 72 Std. nach Behandlung mit MNNG in verschiedenen Konzentrationen. C) Induzierte Apoptose in Abhängigkeit der Zeit nach Behandlung mit $0,5 \mu\text{M}$ MNNG. D) Induzierte Nekrose in Abhängigkeit der Zeit nach Behandlung mit $0,5 \mu\text{M}$ MNNG.

Auch nach Behandlung der Zellen mit hohen Dosen TMZ konnte nach 72 Std. in der Wildtyp-Zelllinie verglichen zur NBN-Mutante erneut eine leicht verstärkte Induktion der Apoptose nachgewiesen werden (Abb. 23A). Diese war jedoch nicht signifikant. Die Induktion der Nekrose war auch nach TMZ-Behandlung im Wildtyp sehr gering und signifikant verstärkt in der NBN-defizienten Zelllinie (Abb. 23B).

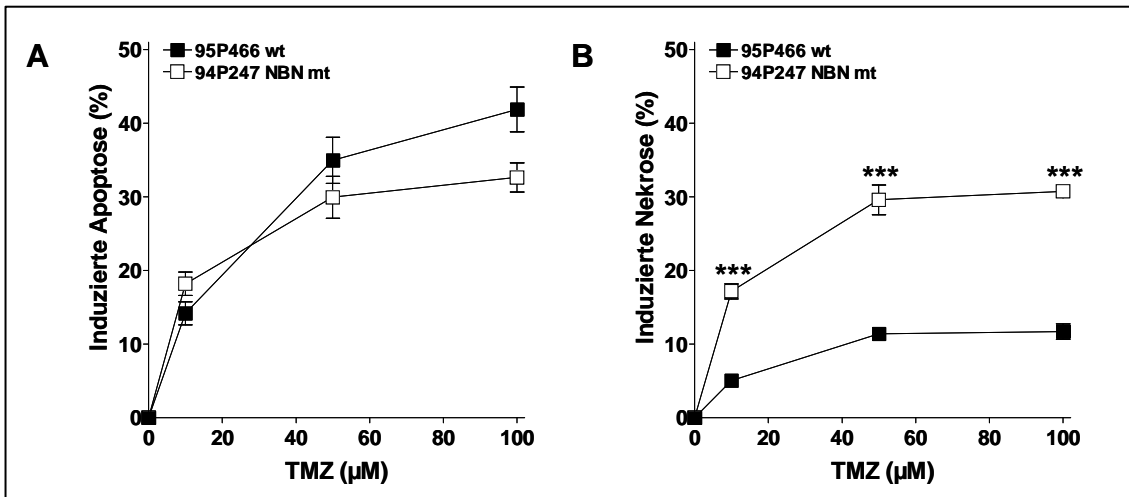


Abb. 23 Analyse der Apoptose- und Nekrose-Induktion mit der Annexin V/PI-Methode in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247 72 Std. nach Behandlung mit TMZ in verschiedenen Konzentrationen. ***, $P < 0,001$ A) Induzierte Apoptose. B) Induzierte Nekrose.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die NBN-mutierte lymphoblastoide Zelllinie ähnlich wie die NBN-mutierte Fibroblasten-Zelllinie eine erhöhte Sensitivität gegenüber MNNG und TMZ zeigt. Während auch in diesem Zellsystem die Induktion der Nekrose in der NBN-Mutante im Vergleich zum Wildtyp dramatisch erhöht ist, zeigt sich im Gegensatz dazu die Apoptose-Induktion in der NBN-defizienten lymphoblastoiden Zelllinie leicht reduziert.

4.2.3. Analyse apoptotischer Marker nach Behandlung mit MNNG: Aktivierung der Caspase-7 und Spaltung von PARP1

Wie in den Fibroblasten, wurde auch in den lymphoblastoiden Zellen zur weiteren Analyse des apoptotischen Zelltods die Spaltung bzw. Aktivierung der Caspase-7 sowie die Spaltung von PARP1 in Proteinextrakten untersucht. Nach Behandlung der Zellen mit 0,5 µM MNNG und gleichzeitiger O⁶-BG-Behandlung wurde in Western-Blot-Analysen in beiden Zelllinien Spaltprodukte beider Proteine nachgewiesen, wobei die Spaltung von Caspase-7 (Abb. 24A) und PARP1 (Abb. 24B) im Wildtyp leicht stärker war als in der NBN-defizienten Zelllinie. Dies zeigt erneut eine verstärkte Apoptose-Induktion in der Wildtyp-Zelllinie im Vergleich zur NBN-Mutante.

4. Ergebnisse

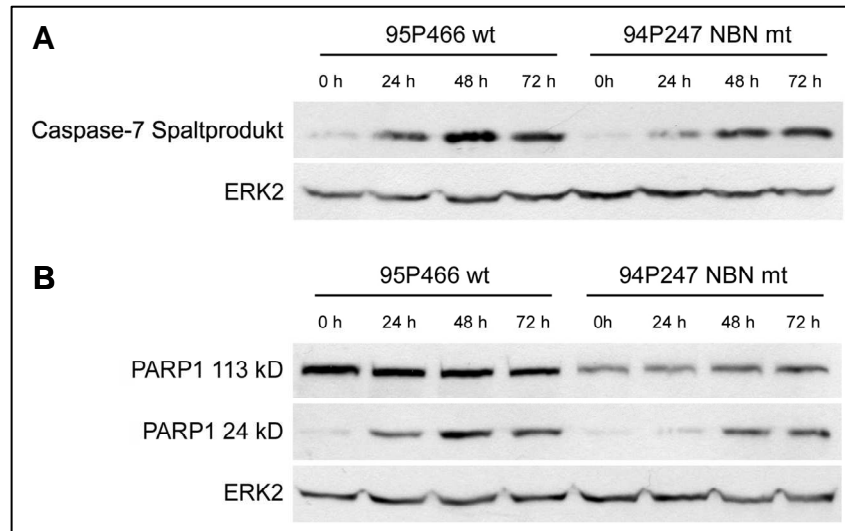


Abb. 24 Untersuchung apoptotischer Marker in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit 0,5 μ M MNNG mittels Western-Blot-Untersuchungen. Zur Kontrolle der Beladung wurde die ERK2-Expression bestimmt. A) Zeitabhängige Spaltung (Aktivierung) von Caspase-7. B) Zeitabhängige Spaltung von PARP1.

4.2.4. Untersuchung des Einflusses von MGMT auf die Sensitivität der Zellen nach Behandlung mit MNNG

Weiterhin wurde der Einfluss von MGMT auf die MNNG-induzierte Toxizität in den lymphoblastoiden Zelllinien analysiert. Zunächst wurden die MGMT-Expression und die entsprechende Protein-Aktivität im Wildtyp und in der NBN-mutierten Zelllinie bestimmt. Während im Wildtyp eine starke Expression des MGMT-Proteins beobachtet wurde, war in der NBN-mutierten Zelllinie keine MGMT-Expression zu detektieren (Abb. 25A). Analog zur Proteinexpression zeigte sich im Aktivitätstest MGMT-Aktivität in der Wildtyp-Zelllinie, jedoch nicht in der NBN-mutierten Zelllinie (Abb. 25B). Da die in den Toxizitätsstudien verwendete NBN-defiziente Zelllinie (95P466) kein MGMT-Protein exprimiert, wurde zur Untersuchung des Einflusses von MGMT auf die MNNG-induzierte Toxizität eine zweite NBN-mutierte Zelllinie (94P126) verwendet, welche das MGMT-Protein exprimiert (Abb. 25A) und mit 588,5 fmol/mg Protein auch eine hohe MGMT-Aktivität aufwies (Abb. 25B).

4. Ergebnisse

Wie mit der Annexin V/PI-Doppelfärbung gezeigt wurde, war diese Zelllinie trotz MGMT-Inhibition durch O⁶-BG sehr resistent gegenüber der Behandlung mit MNNG (Abb. 41 im Anhang), so dass im folgenden Experiment die Dosis für diese Zelllinie auf 5 µM MNNG erhöht wurde, um eine Toxizität beobachten zu können. Der Wildtyp hingegen wurde nur mit 0,5 µM MNNG behandelt. 72 Std. nach dieser Behandlung war in beiden Zelllinien mit der Annexin V/PI-Methode fast keine Induktion von Apoptose (Abb. 25C) und Nekrose (Abb. 25D) zu beobachten, wenn die Zellen nicht mit O⁶-BG vorbehandelt wurden.

Auch der induzierte Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) war sehr gering; die Zellen waren äußerst resistent gegenüber der MNNG-Behandlung (Abb. 25E). Wurden die Zellen mit O⁶-BG vorbehandelt, so zeigte sich in der NBN-defizienten Zelllinie eine Induktion sowohl von Apoptose als auch von Nekrose, wobei der induzierte Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) jedoch insgesamt etwas geringer war als die Toxizität in der Wildtyp-Zelllinie. Zusammenfassend zeigen diese Daten auf, dass die O⁶-MeG-Läsion für die Induktion des Zelltods sowohl in den Wildtyp- als auch in den NBN-defizienten Zellen verantwortlich ist.

4. Ergebnisse

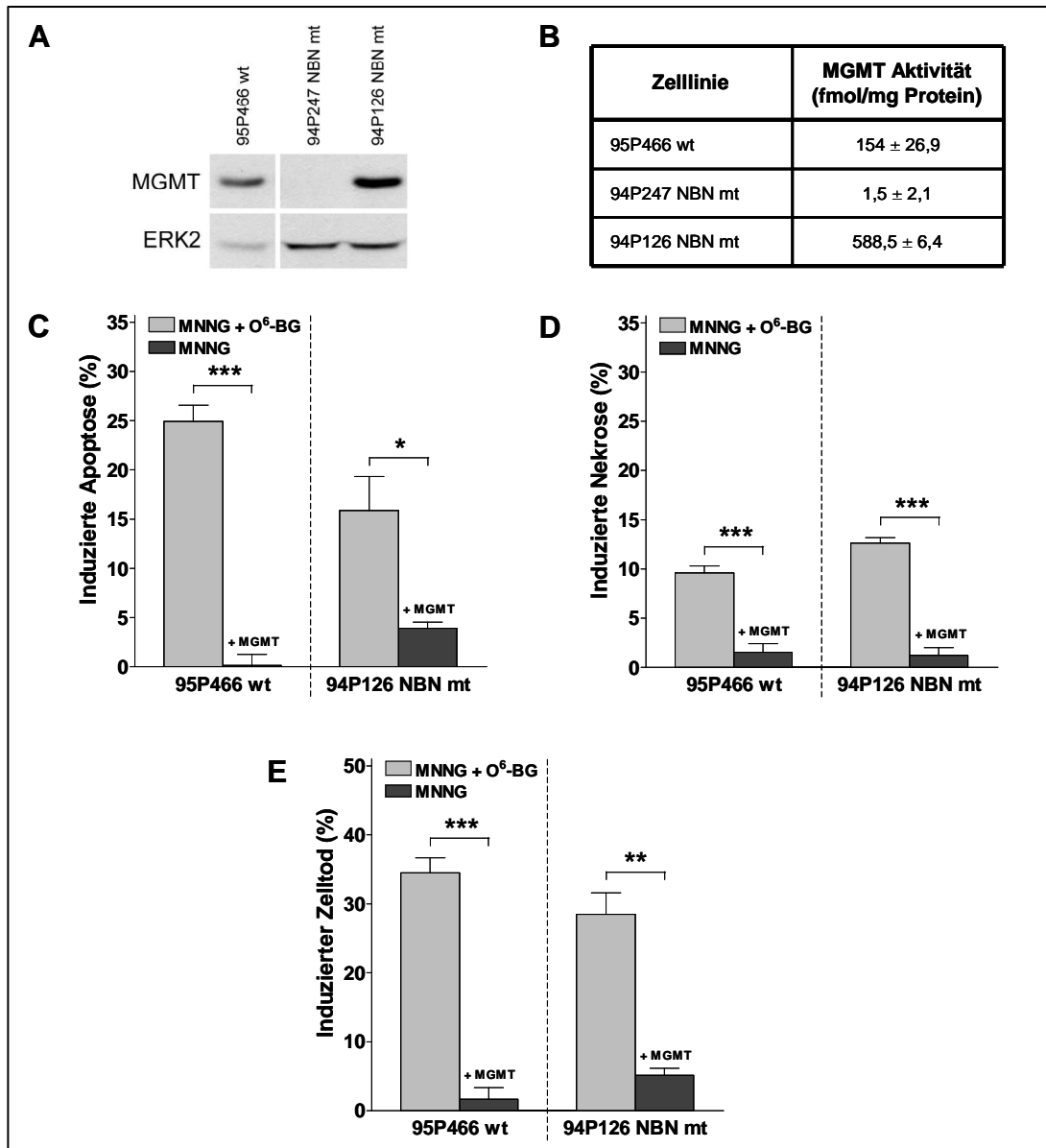


Abb. 25 Einfluss von MGMT auf die MNNG-induzierte Toxizität in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466, 94P247 und 94P126. A) Bestimmung der MGMT-Expression mittels Western-Blot-Analyse. Zur Kontrolle der Beladung wurde die ERK2-Expression bestimmt. B) Analyse der MGMT-Aktivität mittels MGMT-Aktivitätstest. C) – E) Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den 95P466- und 94P126-Zellen 72 Std. nach MNNG-Behandlung (95P466: 0,5 μ M; 94P126: 5 μ M) in Ab- bzw. Anwesenheit des MGMT-Inhibitors O⁶-BG. Die Bestimmung des Zelltods erfolgte durch Summation der Apoptose- und Nekrose-Fraktion. Da die 94P247-Zellen keine MGMT-Expression aufweisen, wurde die Zelllinie in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$

4.2.5. Bestimmung des Einflusses von DPQ auf die Nekrose-Induktion nach Behandlung der Zellen mit MNNG

Da auch in der lymphoblastoiden NBN-Mutante eine unerwartet hohe Nekrose-Induktion nach Behandlung der Zellen mit MNNG und TMZ beobachtet wurde, wurde auch in diesem Zellsystem überprüft, ob die Nekrose-Induktion durch eine Hyperaktivierung von PARP1 bedingt wurde. Dazu wurde die Aktivität von PARP1 inhibiert, indem die Zellen zum Zeitpunkt der MNNG-Behandlung mit 2 μM und zusätzlich nach 24 Std mit 1 μM DPQ (Suto et al., 1991) behandelt wurden. Die MNNG-induzierte Toxizität wurde mit der Annexin V/PI-Doppelfärbung untersucht.

In Abb. 26 wird gezeigt, dass 72 Std. nach Behandlung mit 0,5 μM MNNG (in Anwesenheit von $\text{O}^6\text{-BG}$) weder die Apoptose- (Abb. 26A) noch die Nekrose-Induktion (Abb. 26B) im Wildtyp und in der verwendeten NBN-defizienten Zelllinie durch die PARP1-Inhibition signifikant beeinflusst wurde. Folglich war auch die Induktion des Zelltods (Summe aus Apoptose und Nekrose) durch die Inhibition von PARP1 nicht verändert (Abb. 26C). Wir schlussfolgern daraus, dass die hohe Nekrose-Rate nach Behandlung mit den methylierenden Agenzien MNNG und TMZ in der NBN-defizienten Zelllinie nicht durch eine Hyperaktivierung von PARP1 verursacht wird.

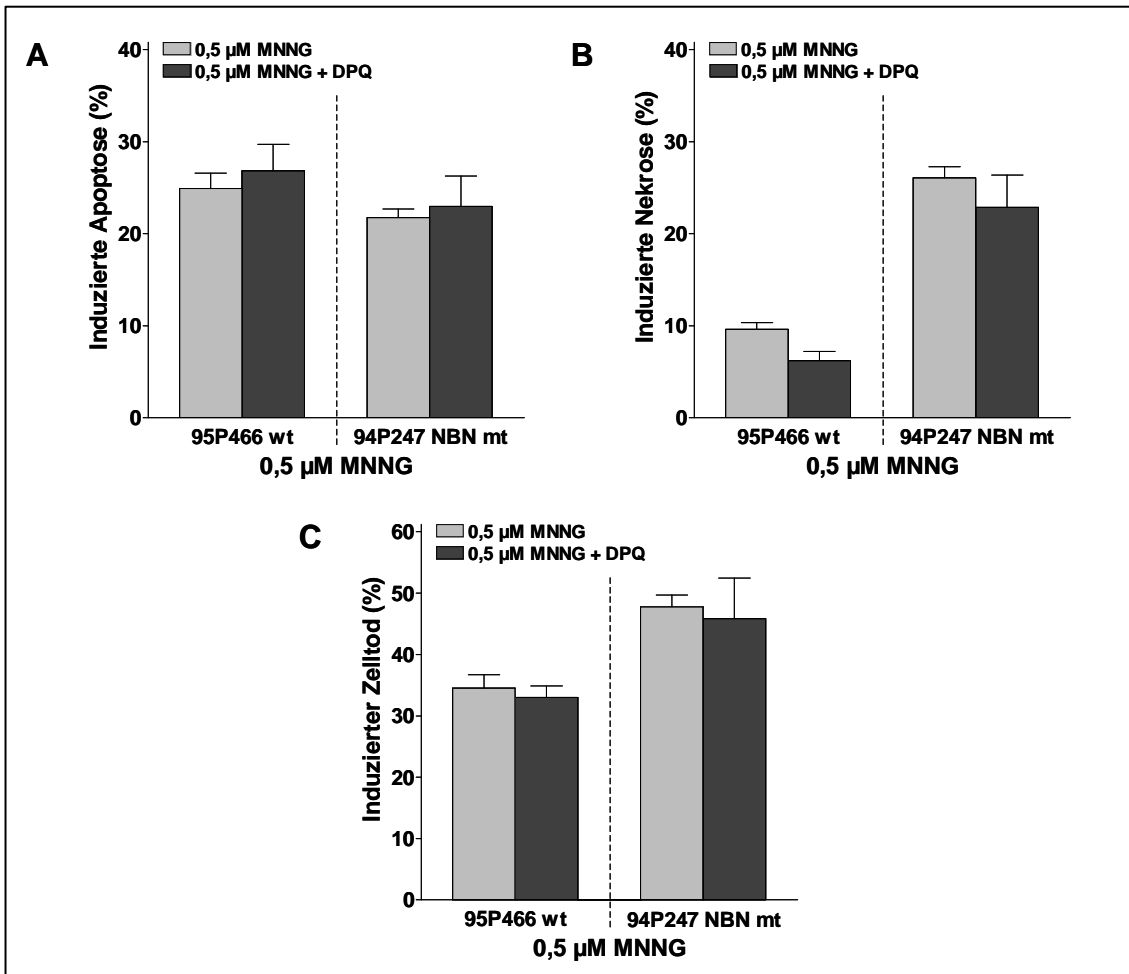


Abb. 26 Einfluss von DPQ auf die MNNG-induzierte Toxizität in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247. Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode 72 Std. nach Behandlung mit 0,5 μM MNNG in Ab- bzw. Anwesenheit des PARP1-Inhibitors DPQ (2 μM zum Zeitpunkt der MNNG-Behandlung und 1 μM 24 Std. danach). A) Induzierte Apoptose. B) Induzierte Nekrose. C) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose).

4.3. Untersuchungen an menschlichen Melanom-Zelllinien

Maligne Melanome werden nach Metastasierung in der Klinik mit TMZ oder DTIC, einem weiteren methylierenden Agens, behandelt (Bhatia et al., 2009). Dies wirft die Frage auf, ob auch Melanom-Zellen, welche in der NBN-Expression beeinträchtigt sind, ähnlich wie die Fibroblasten- oder die lymphoblastoiden Zellen, die eine Mutation im NBN-Gen tragen, eine erhöhte Sensitivität gegenüber TMZ zeigen. Ist dies der Fall, ist davon auszugehen, dass die NBN-Expression in den Tumorzellen den Erfolg der Chemotherapie beeinflusst. Somit würde sich NBN als zelluläres Angriffsziel anbieten,

um die Therapie-Effizienz zu verbessern. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in einer menschlichen Melanom-Zelllinie (D03) ein NBN-Knockdown durchgeführt. Mittels stabiler Transfektion eines shRNA-tragenden Vektors gegen NBN wurde in diesen Zellen die NBN-Expression herunterreguliert. Nach der Etablierung verschiedener Klone, welche einen stabilen Knockdown zeigten, wurden drei Klone (D03 siNBN 1, D03 siNBN 13, D03 siNBN 19) für die Studie verwendet und näher charakterisiert.

4.3.1. Allgemeine Charakterisierung der verwendeten Zelllinie und Analyse des NBN-Knockdowns

Zuerst wurde die NBN-Expression in der nicht-transfizierten Zelllinie und den drei Klonen mittels Western-Blot-Analyse untersucht und das relative Expressionsniveau in Bezug zur nicht-transfizierten Kontrolle bestimmt. Alle drei Klone zeigten eine Verminderung der NBN-Expression, wobei das Ausmaß unterschiedlich stark war (Abb. 27A). Einer der Klone zeigte einen sehr geringen NBN-Knockdown (D03 siNBN 1), ein zweiter Klon eine mittlere Expression (D03 siNBN 19) und der dritte Klon mit einer residualen NBN-Expression von 22,7 % einen starken NBN-Knockdown (D03 siNBN 13).

Nachfolgend wurde das Zellwachstum, das die TMZ-induzierte Toxizität beeinflusst, untersucht und die entsprechenden Generationszeiten berechnet. Dabei wurde eine Abhängigkeit des Zellwachstums von der NBN-Expression beobachtet. So zeigte die nicht-transfizierte Zelllinie mit 23,3 Std. die kürzeste Generationszeit, während das Wachstum der drei transfizierten Klone mit abnehmender NBN-Expression langsamer wurde (Abb. 27B und 27C). Bei Betrachtung der Generationszeit als Funktion der relativen NBN-Expression zeigte sich eine sehr starke Korrelation beider Parameter (Abb. 27D).

4. Ergebnisse

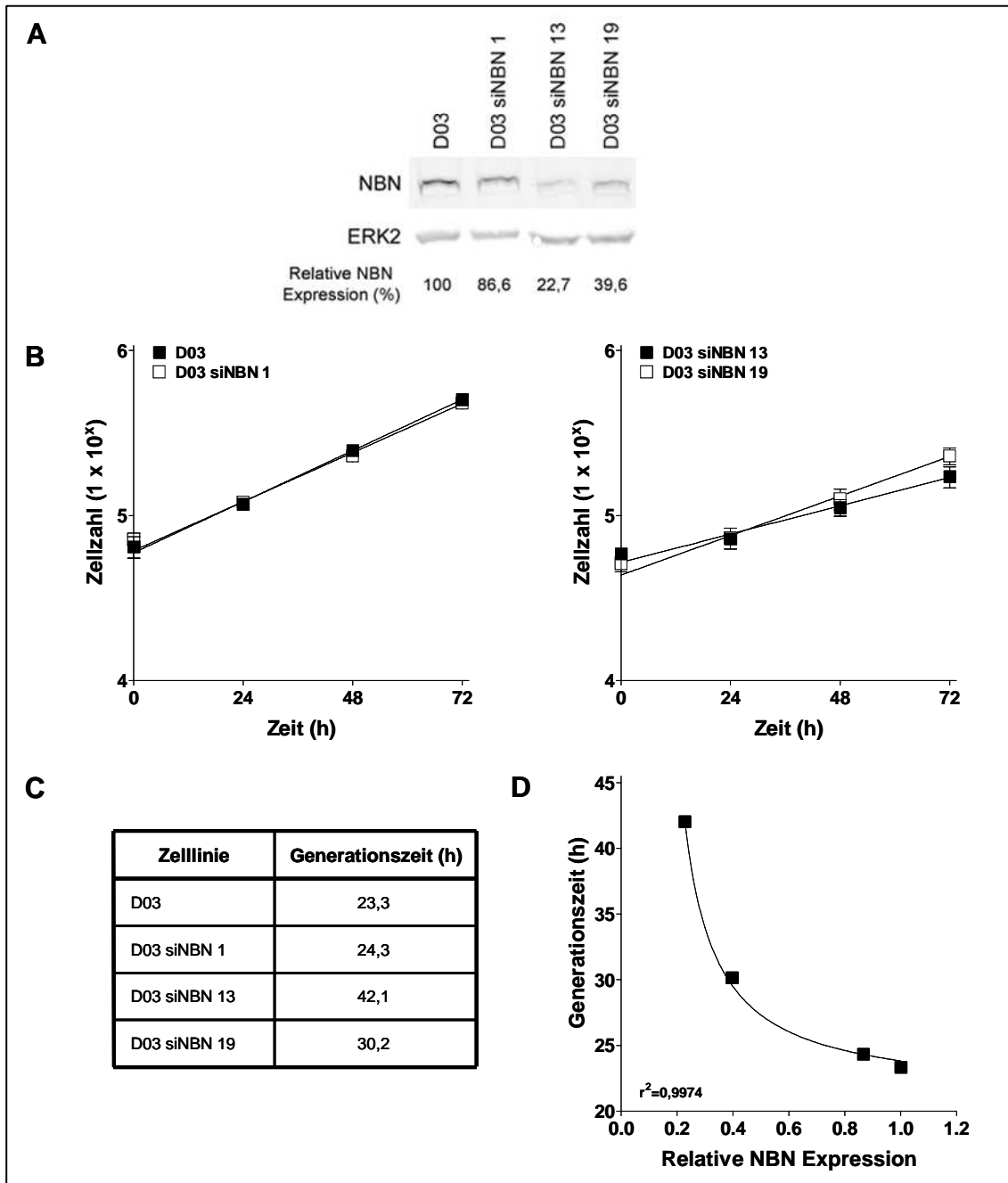


Abb. 27 Allgemeine Charakterisierung der Melanom-Zelllinie D03 nach stabilem NBN-Knockdown. Untersucht wurde die nicht-transfizierte Zelllinie und drei Klone (D03 siNBN 1, D03 siNBN 13 und D03 siNBN 19) mit NBN-Knockdown. A) Bestimmung der NBN-Expression mittels Western-Blot-Analyse und Quantifizierung der residualen NBN-Expression. Zur Kontrolle der Beladung und für die Berechnung der relativen NBN-Expression wurde die ERK2-Expression bestimmt. B) Wachstumskurven. C) Berechnung der aus den Wachstumskurven resultierenden Generationszeiten. D) Analyse der Generationszeit als Funktion der relativen NBN-Expression.

4.3.2. Untersuchung der zellulären Sensitivität nach Behandlung mit TMZ

Darauf folgend wurde die zelluläre Sensitivität gegenüber TMZ mit der Annexin V/PI-Methode untersucht, wobei auch diese Zellen mit O⁶-BG vorbehandelt wurden, obwohl sie kein MGMT-Protein exprimierten (Abb. 42 im Anhang). Die O⁶-BG-Applikation wurde durchgeführt, um sicherzugehen, dass kein aktives MGMT-Protein in den Zellen während der Behandlung vorlag, da der MGMT-Status der Zellen während der Durchführung dieser Experimente nicht bekannt war. Da der Klon (D03 siNBN 19), welcher eine mittlere NBN-Expression zeigte, schon basal eine sehr hohe Rate an toten Zellen aufwies (Abb. 43 im Anhang), wurde dieser Klon von der folgenden Analyse ausgeschlossen.

Gemessen 144 Std. nach Behandlung mit 50 µM TMZ erwies sich die nicht-transfizierte Zelllinie als sehr resistent (Abb. 28A). Lediglich in der Induktion der Apoptose war ein geringer Anstieg nach Behandlung mit TMZ zu beobachten (Abb. 28B). Die Induktion der Nekrose verzeichnete sogar einen leichten Abfall, der jedoch nicht signifikant war (Abb. 28C). Während in dem Klon (D03 siNBN 1), der einen schwachen NBN-Knockdown zeigte, nur ein leichter Anstieg in der Induktion der Apoptose und der Nekrose zu beobachten war, zeigte der Klon (D03 siNBN 13) mit starkem NBN-Knockdown verglichen zur unbehandelten Zelllinie eine sehr hohe Induktion von Apoptose bzw. Nekrose und folglich auch des Zelltods (Summe aus Apoptose und Nekrose). Dabei war zu beachten, dass die Induktion der Apoptose in diesem Klon (D03 siNBN 13) gegenüber der Nekrose-Induktion leicht dominierte.

Wie in Abb. 28D gezeigt wird, wurde abschließend die induzierte Toxizität als Funktion der relativen NBN-Expression analysiert. Bei dieser Untersuchung konnte ein funktionaler Zusammenhang zwischen beiden Parametern beobachtet werden. Dieser äußerte sich als inverse Korrelation, wobei die durch TMZ-induzierte Toxizität mit dem Ansteigen der relativen NBN-Expression abnahm. Zusammenfassend belegen die Daten, dass auch menschliche Melanom-Zellen, die durch einen siRNA-Knockdown in der NBN-Expression beeinträchtigt sind, eine erhöhte Sensitivität gegenüber methylierende Agenzien wie TMZ aufweisen.

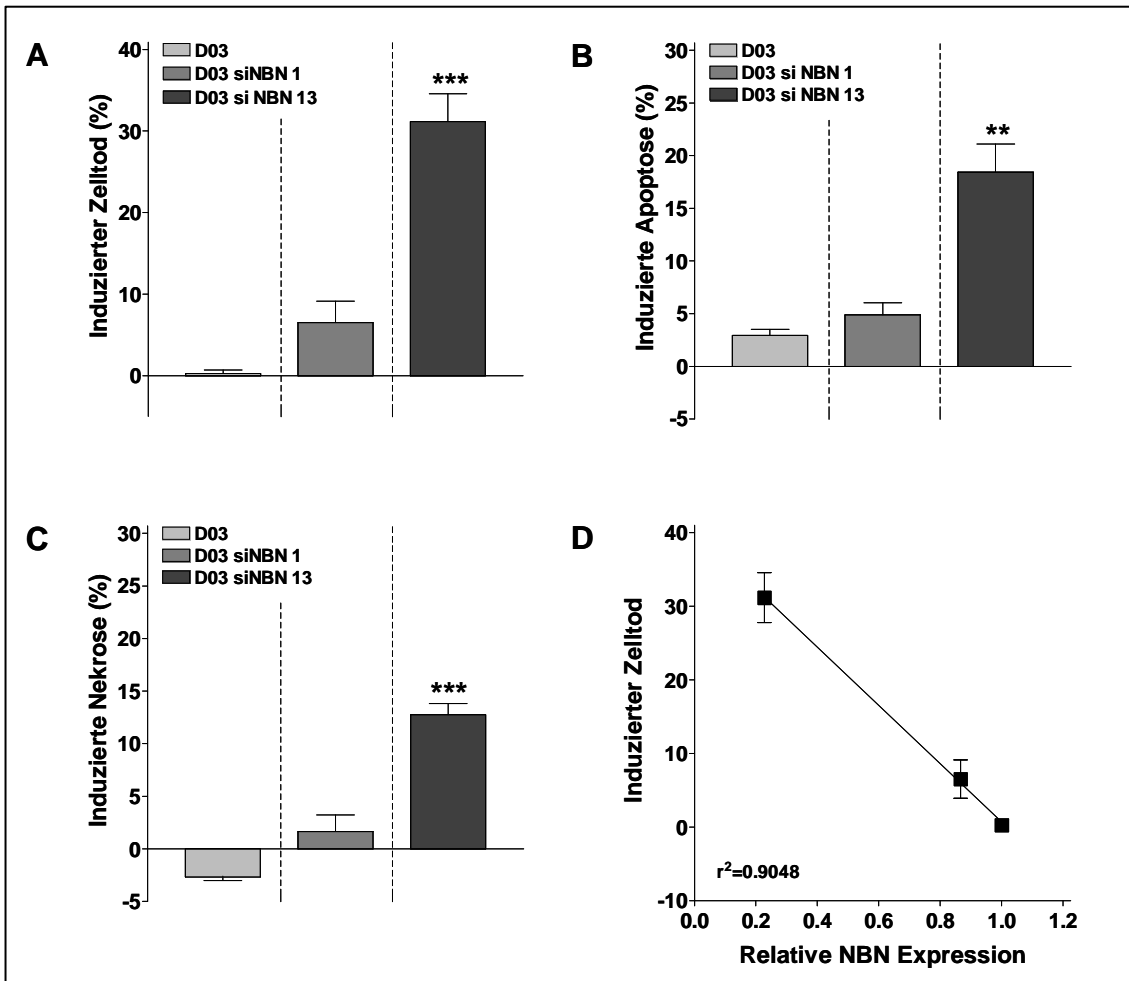


Abb. 28 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in der Melanom-Zelllinie D03 nach stabilem NBN-Knockdown 72 Std. nach Behandlung mit 50 μ M TMZ. Untersucht wurde die nicht-transfizierte Zelllinie und zwei Klone (D03 siNBN 1 und D03 siNBN 13) mit NBN-Knockdown. Die P-Werte beziehen sich jeweils auf die nicht-transfizierte Kontrollzelllinie D03: **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$ A) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose). B) Induzierte Apoptose. C) Induzierte Nekrose. D) Analyse des induzierten Zelltods als Funktion der relativen NBN-Expression. Hierbei konnte eine inverse Korrelation beider Parameter beobachtet werden.

4.4. Untersuchungen an ATR-defizienten lymphoblastoiden Zellen

Methylierungen an der DNA, wie sie zum Beispiel durch TMZ induziert werden, werden während der Replikation in DSBs überführt. Neben NBN und ATM besitzt auch ATR wichtige Funktionen während der Reparatur von DSBs (siehe Kapitel 1.2.4.). Daher ist eine berechtigte Frage, ob neben den NBN- und ATM-defizienten Zellen auch ATR-

defiziente Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber diesen methylierenden Agenzien aufweisen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden zwei menschliche lymphoblastoide Zelllinien verwendet, welche EBV-transformiert wurden. Eine dieser Zelllinien (DK0064) wurde aus einem Patienten mit dem Seckel-Syndrom isoliert. Sie trägt eine Mutation im ATR-Gen. Diese hypomorphe Mutation führt zur Bildung von verschiedenen Splice-Varianten der mRNA und bewirkt eine starke Reduktion der Expression des Wildtyp-Proteins. Die zweite Zelllinie (GM09387) trägt keine Mutation im ATR-Gen und exprimiert daher das Protein auf normalem Niveau. Sie wird im folgenden Teil als Wildtyp bezeichnet.

4.4.1. Charakterisierung des Wachstums der verwendeten Zelllinien

Da die Methylierungs-induzierte Toxizität abhängig von der Replikation der Zellen ist, wurden auch hier zunächst Wachstumskurven erstellt und anschließend die daraus resultierenden Generationszeiten berechnet. Das Wachstum beider Zelllinien war sehr ähnlich. Die Generationszeit des Wildtyps war mit 24,6 Std. jedoch etwas kürzer als die Generationszeit der ATR-mutierten Zelllinie (27 Std.) (Abb. 29).

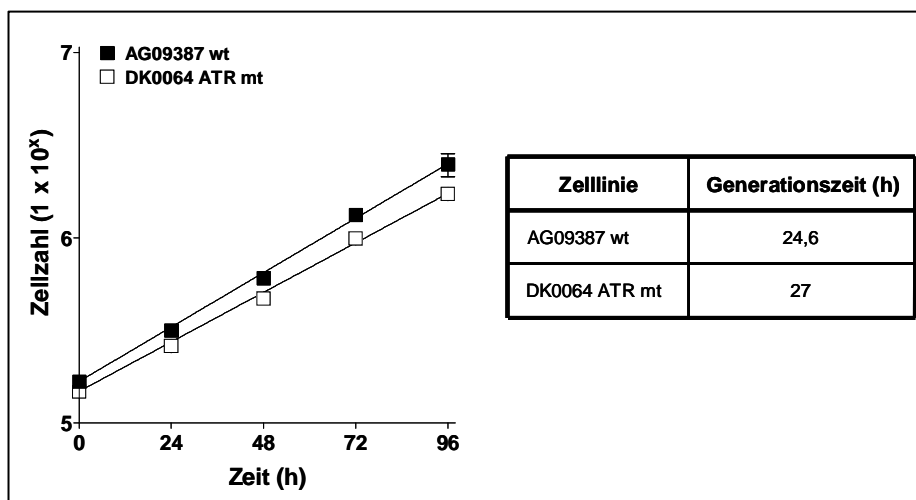


Abb. 29 Untersuchung des Zellwachstums in den lymphoblastoiden Zelllinien AG09387 und DK0064. Wachstumskurven und Berechnung der daraus resultierenden Generationszeiten.

4.4.2. Untersuchung der Sensitivität der Zellen nach Behandlung mit TMZ

Nach der Untersuchung des Wachstums wurde die Sensitivität der Zellen gegenüber TMZ (in Anwesenheit von O⁶-BG) mit der Annexin V/PI-Methode bestimmt. 72 Std. nach Behandlung der Zellen zeigte die ATR-mutierte Zelllinie über den kompletten untersuchten Dosisbereich eine signifikant verstärkte Induktion der Apoptose (Abb. 30A). Die Induktion der Nekrose zeigte sich ebenfalls leicht erhöht, wobei nur bei einer Konzentration von 20 µM ein signifikanter Unterschied beobachtet wurde (Abb. 30B). Die Induktion des Zelltods (Summe aus Apoptose und Nekrose) war dementsprechend in der ATR-Mutante ebenfalls erhöht (Abb. 30C). Hier waren die Unterschiede bei einer Dosis von 20 µM und 100 µM signifikant. Somit zeigen auch ATR-defiziente Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber TMZ.

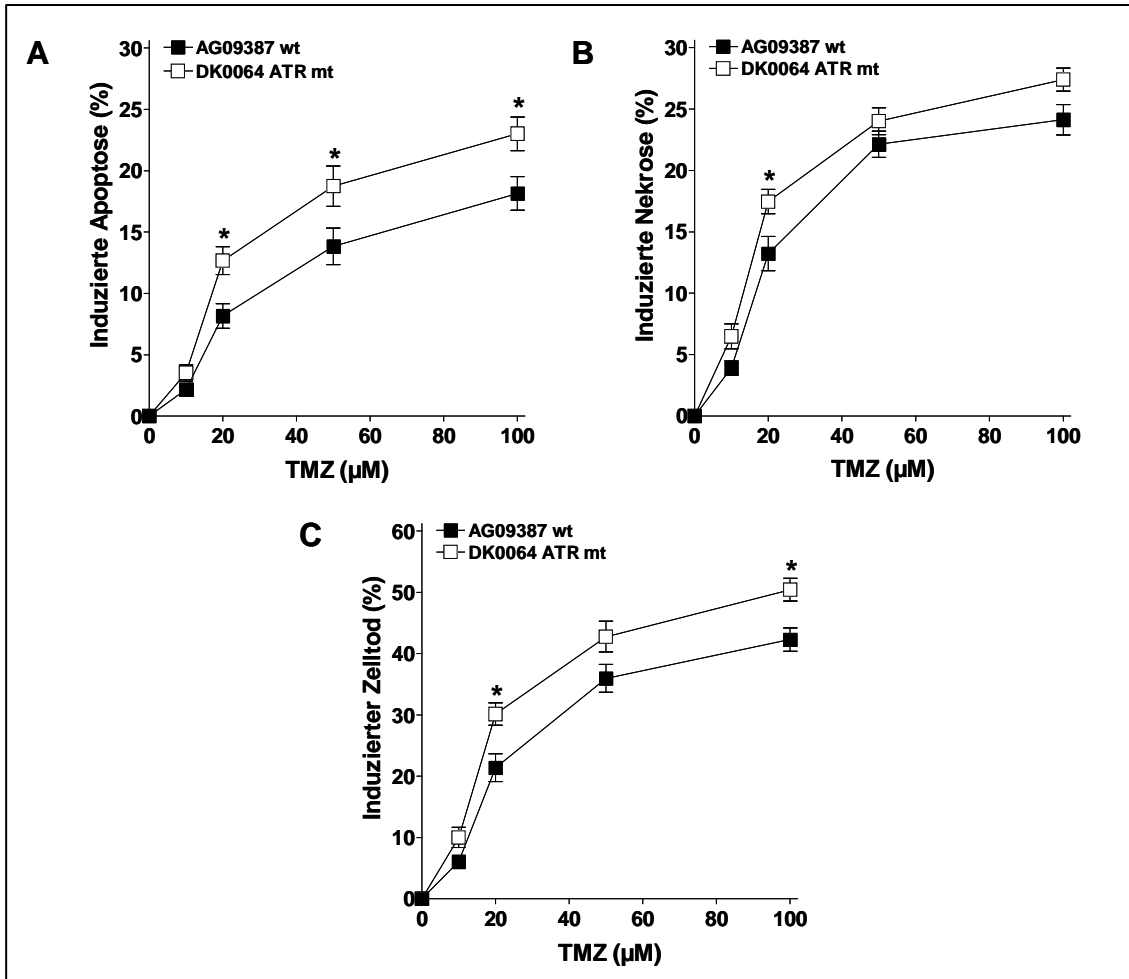


Abb. 30 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den lymphoblastoiden Zelllinien AG09387 und DK0064 72 Std. nach Behandlung mit TMZ in verschiedenen Konzentrationen. *, $P < 0,05$ A) Induzierte Apoptose. B) Induzierte Nekrose. C) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose).

4.4.3. Untersuchung des Einflusses von MGMT auf die Sensitivität der Zellen nach Behandlung mit TMZ

Weiterhin wurde der Einfluss von MGMT auf die TMZ-induzierte Toxizität analysiert. Zunächst wurde das MGMT-Protein untersucht. In Western-Blot-Analysen zeigten beide Zelllinien eine Expression des MGMT-Proteins (Abb. 31A). Im Gegensatz dazu war die Enzym-Aktivität, die mit dem Aktivitätstest gemessen wurde, im Wildtyp niedrig (Abb. 31B). Die ATR-Mutante zeigte hingegen eine starke MGMT-Aktivität.

4. Ergebnisse

Anschließend wurde 72 Std. nach Behandlung der Zellen mit 50 μM TMZ die Induktion der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode analysiert, wobei die Zellen nicht mit $\text{O}^6\text{-BG}$ vorbehandelt wurden. Im Wildtyp zeigte sich unter diesen Bedingungen eine starke Reduktion der Apoptose (Abb. 31C) sowie der Nekrose (Abb. 31D) und folglich auch des Zelltods (Summe aus Apoptose und Nekrose) (Abb. 31E) verglichen zur Toxizität, die TMZ in Kombination mit der $\text{O}^6\text{-BG}$ -Vorbehandlung induzierte. Jedoch war trotz der vorliegenden MGMT-Enzymaktivität in dieser Zelllinie eine signifikante Toxizität festzustellen. Die ATR-mutierte Zelllinie hingegen war sehr resistent gegenüber der TMZ-Behandlung, wenn die Zellen nicht mit $\text{O}^6\text{-BG}$ vorbehandelt wurden. Dies zeigt, dass die $\text{O}^6\text{-MeG}$ -Läsion wie in den NBN- und ATM-defizienten Zellen auch für die erhöhte Sensitivität der ATR-mutierten Zellen verantwortlich ist.

4. Ergebnisse

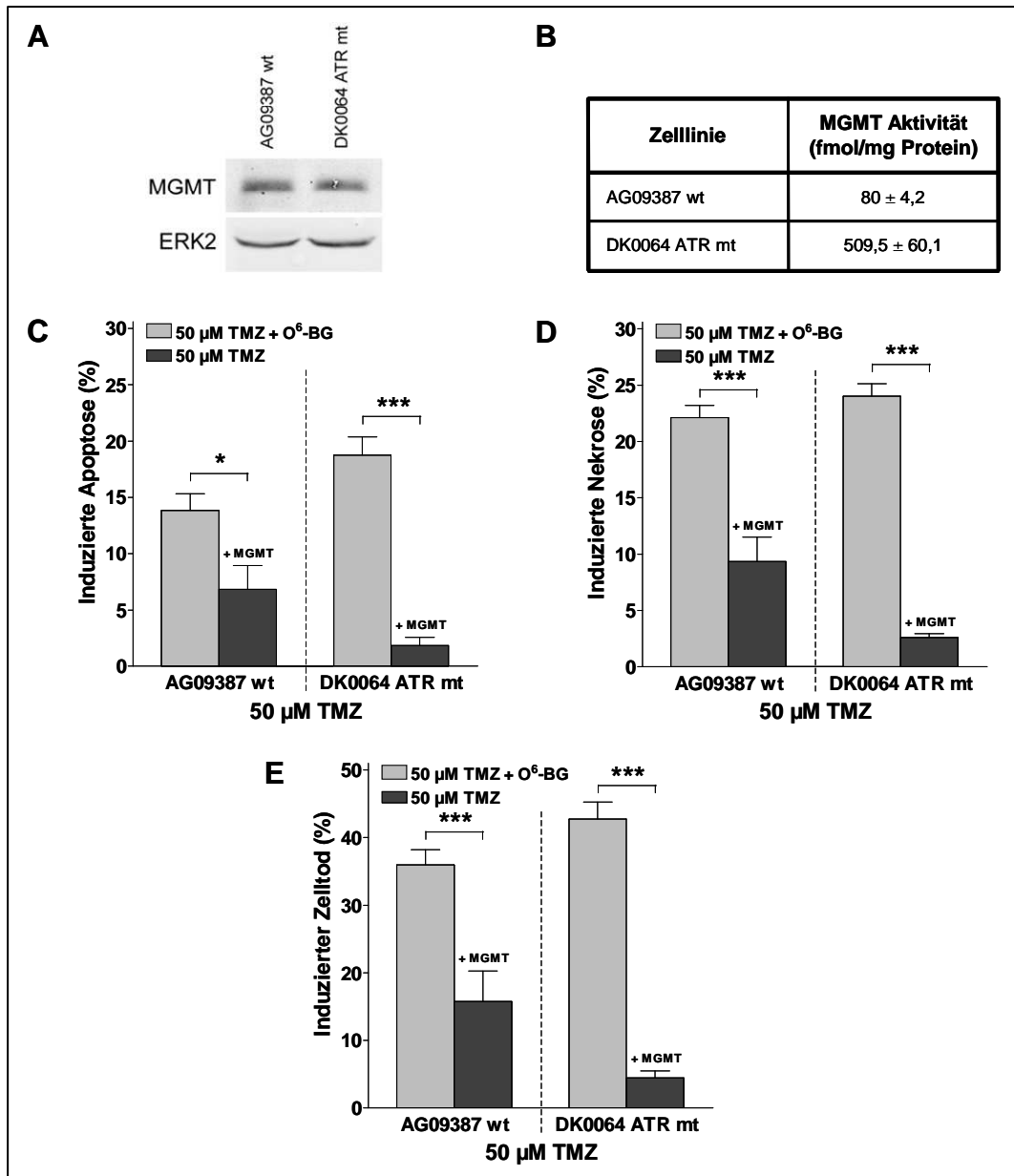


Abb. 31 Einfluss von MGMT auf die MNNG-induzierte Toxizität in den lymphblastoiden Zelllinien AG09387 und DK0064. A) Bestimmung der MGMT-Expression durch Western-Blot-Untersuchung. Zur Kontrolle der Beladung wurde die ERK2-Expression bestimmt. B) Analyse der MGMT-Aktivität mittels MGMT-Aktivitätstest. C) – E) Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode 72 Std. nach Behandlung mit 50 µM TMZ in Ab- bzw. Anwesenheit des MGMT-Inhibitors O⁶-BG. Die Bestimmung des Zelltods erfolgte durch Summation der Apoptose- und Nekrose-Fraktion. *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$

5. Diskussion

5.1. Analyse der erhöhten Sensitivität der NBN-, ATM- und ATR-mutierten Zellen

NBN, ATM und ATR besitzen wichtige Funktionen während der Reparatur von DSBs (siehe Kapitel 1.2.4.) und sind somit wichtige Faktoren, die zur genomischen Stabilität beitragen. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss dieser drei Proteine auf die Alkylanzien-induzierte Toxizität analysiert. Für diese Untersuchungen wurden verschiedene menschliche Zellsysteme, die entweder in einem dieser Gene mutiert sind oder in welchen ein Knockdown mittels RNAi erzielt wurde, verwendet und die Zellen mit den alkylierenden Agenzien MNNG und TMZ behandelt. Zu diesen Zellsystemen zählten menschliche Fibroblasten und lymphoblastoide Zellen, welche hypomorphe NBN-Mutationen in beiden Allelen tragen. Diese Mutationen führen zu der Expression eines verkürzten NBN-Proteins, das teilweise funktionslos ist, jedoch Restfunktionen aufweist.

In Toxizitätsanalysen waren die NBN-mutierten Zelllinien im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Zelllinien hypersensitiv gegenüber MNNG und TMZ. Hierbei ist zu beachten, dass in diesen Experimenten zuvor MGMT mittels O⁶-BG inaktiviert wurde. Die erhöhte Sensitivität der NBN-mutierten Zellen konnte in menschlichen Melanom-Zellen, die einen stabilen NBN-Knockdown zeigten, bestätigt werden, wobei eine Korrelation zwischen residualer NBN-Expression und induzierter Toxizität gefunden wurde. Ähnlich wie im Fall der NBN-mutierten Zelllinien waren auch ATR-mutierte lymphoblastoide Zellen, die ebenfalls hypomorphe Mutationen tragen, und ATM-defiziente Fibroblasten sensitiver gegenüber den Alkylanzien, verglichen zu den entsprechenden Kontrollen. Durch Analysen des Zellwachstums sowie der Hauptproteine der MMR konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Unterschiede in der Sensitivität auf eine Beeinträchtigung der MMR beruhen.

Somit konnte gezeigt werden, dass homozygote Mutationen in einem dieser drei Gene in verschiedenen Zellsystemen zu einer Hypersensitivität gegenüber methylierenden Agenzien führt. Die Daten dieser Studie offenbaren damit NBN, ATM und ATR als neue Faktoren der zellulären Resistenz gegenüber S_N1-alkylierenden Agenzien, unter anderem dem methylierenden Chemotherapeutikum TMZ.

Die Daten führten zu der Frage, welche DNA-Läsion für die erhöhte Sensitivität der mutierten Zelllinien verantwortlich ist. Daher wurde der Einfluss von MGMT auf die Induktion der Toxizität untersucht. Da keine der verwendeten NBN-mutierten Zelllinien und auch nicht die Melanom-Zellen, in welchen der NBN-Knockdown etabliert wurde, das MGMT-Protein exprimierten, wurde versucht die NBN-mutierte Fibroblasten-Zelllinie mit einem MGMT-Expressionsvektor stabil zu transfizieren, um eine ektopische Expression von MGMT zu erzielen. Das war jedoch nicht möglich. Nach der Selektion der G418-resistenten Kolonien, konnten zwar einzelne Klone isoliert und expandiert werden. Bei der Analyse der MGMT-Expression erwiesen sich jedoch alle Klone als MGMT-negativ. Dies erklären wir durch eine verminderte Kapazität der HR in den NBN-defekten Zellen.

Daher wurde zusätzliche eine NBN-defiziente aber MGMT-profiziente lymphoblastoide Zelllinie verwendet und mit der lymphoblastoiden Wildtyp-Zelllinie, die ebenfalls MGMT exprimiert, verglichen. Diese Zelllinie wies jedoch keine erhöhte Sensitivität auf; sie war sogar resistenter gegenüber MNNG als die Wildtyp-Zelllinie. Der Grund hierfür war sehr wahrscheinlich eine verminderte Protein-Expression von MSH2, MSH6 und PMS2, welche für die MMR essentiell sind (siehe Kapitel 1.2.2.), sowie eine deutlich längere Generationszeit. Nach Behandlung beider Zellen mit MNNG in Anwesenheit von MGMT, das heißt wenn keine O⁶-BG-Vorbehandlung stattfand, waren beide Zelllinien fast komplett resistent.

Das gleiche Ergebnis war in den ATM-mutierten Zellen zu beobachten. Nach erfolgreicher Transfektion der ATM-defizienten und der Wildtyp-Fibroblasten mit einem MGMT-Expressionsvektor zeigten sich beide Zelllinien fast komplett resistent gegenüber einer Behandlung mit MNNG, wenn MGMT zuvor nicht inhibiert wurde. Anders als im Fall der verwendeten NBN- und ATM-mutierten Zelllinien exprimierten sowohl die ATR-mutierte Zelllinie als auch der entsprechende Wildtyp das MGMT-Protein. In Anwesenheit von MGMT war die ATR-mutierte Zelllinie sehr resistent gegenüber der TMZ-Behandlung. Auch im Wildtyp zeigte sich eine Reduktion der TMZ-induzierten Toxizität, wenn MGMT exprimiert wurde. Jedoch wurde weiterhin eine signifikante Induktion von Zelltod beobachtet. Dies ist sehr wahrscheinlich mit einer relativ niedrigen MGMT-Aktivität (80 fmol/mg Protein) zu begründen. Nachfolgend sind die Daten in Tab. 1 im Überblick zusammengefasst.

5. Diskussion

Zellsystem	Wildtyp			Mutante		
	MGMT-Aktivität (fmol/mg)	Induzierter Zelltod (%)		MGMT-Aktivität (fmol/mg)	Induzierter Zelltod (%)	
		+ O ⁶ -BG	- O ⁶ -BG		+ O ⁶ -BG	- O ⁶ -BG
NBN-mutierte lymphoblastoide Zellen	154 ± 26,9	34,5 ± 7,2	1,7 ± 3	588,5 ± 6,4	28,5 ± 5,4	5,1 ± 1,8
ATM-mutierte Fibroblasten	Nicht bestimmt	12,8 ± 6,4	3,3 ± 1	Nicht bestimmt	51,6 ± 4	4,7 ± 2,1
ATR-mutierte lymphoblastoide Zellen	80 ± 4,2	35,9 ± 6,9	15,8 ± 9	509,5 ± 60,1	42,7 ± 7,5	4,5 ± 2,1

Tab. 1 Übersicht zum Einfluss von MGMT auf den induzierten Zelltod in den NBN-, ATM- und ATR-mutierten Zelllinien. Die MGMT-Aktivität wurde mit dem MGMT-Aktivitätstest bestimmt. Die Messung des induzierten Zelltods erfolgte mit der Annexin V/PI-Methode 72 Std. nach Behandlung. Die Daten folgender Zelllinien sind dargestellt: 95P466 wt, 94P126 NBN mt (NBN-mutierte lymphoblastoide Zellen); GM637 MGMT 7 wt, ATs4 MGMT 10 ATM mt (ATM-mutierte Fibroblasten); AG09387 wt, DK0064 ATR mt (ATR-mutierte lymphoblastoide Zellen). Zur Induktion der Toxizität wurden folgende Konzentrationen verwendet: 0,5 µM MNNG (95P466 wt), 5 µM MNNG (94P126 NBN mt), 10 µM MNNG (GM637 MGMT 7 wt, ATs4 MGMT 10 ATM mt), 50 µM TMZ (AG09387 wt, DK0064 ATR mt).

Wie anhand dieser Untersuchungen gezeigt werden konnte, verleiht das MGMT-Protein den NBN-, ATM- und ATR-mutierten Zellen eine hohe Resistenz gegenüber MNNG und TMZ. Diese Ergebnisse verdeutlichen die kritische Rolle O⁶-MeG-Läsion. Sie ist für die toxische Wirkung der alkylierenden Agenzien gegenüber den verwendeten Zelllinien verantwortlich und vermittelte die erhöhte Sensitivität der NBN-, ATM- und ATR-mutierten Zellen.

Wie der Einfluss von MGMT auf die Zytotoxizität zeigt, spielen die durch MNNG und TMZ induzierten N-Alkylierungen, die durch die BER repariert werden (siehe Kapitel 1.1.2.), nur eine marginale Rolle. Das war so nicht zwingend zu erwarten, da auch N-Alkylierungen toxisch wirken können. Theoretisch ist es denkbar, dass NBN, ATM oder ATR auch in N-Alkylierung-induzierten Signalwegen Funktionen haben. Im Fall von NBN wurde beispielsweise ein Einfluss auf die BER beschrieben (Sagan et al.,

2009). Aus diesem Grund wurde in den Fibroblasten-Zelllinien ebenfalls die BER-Kapazität untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene Strategien gewählt. In einem BER-Aktivitätstest, mit dem es möglich ist die einzelnen Teilschritte der BER zu untersuchen, konnte in den beiden mutierten Zelllinien keine verminderte BER-Aktivität nachgewiesen werden. Dabei zeigte die NBN-mutierte Zelllinie eine dem Wildtyp vergleichbare Reparaturkinetik und die ATM-defiziente Zelllinie sogar eine etwas schnellere Reparatur. Dies wurde durch den alkalischen Comet-Assay, der ESBs, welche als Reparaturintermediate während der BER entstehen, detektiert, bestätigt. Nach einer MNNG-Pulsbehandlung von 60 min war auch in diesem Ansatz die Kinetik der ESB-Reparatur in den ATM-defizienten Zellen etwas schneller als im Wildtyp und in den NBN-defizienten Zellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in NBN- und ATM-mutierten Zellen kein Defekt in der BER vorliegt. Dies steht im Einklang mit den oben diskutierten Daten zum Einfluss von MGMT auf die Alkylanzien-induzierte Toxizität, die zeigen, dass N-Alkylierungen keine nennenswerte Toxizität in den mutierten Zellen induzieren, und widerspricht der erwähnten Studie (Sagan et al., 2009). In dieser wird postuliert, dass eine Beeinträchtigung im NBN-Protein, entweder durch das Vorhandensein von Mutationen oder durch einen Knockdown mittels RNAi, zu einer reduzierten BER-Kapazität und daher zu einer erhöhten Sensibilität der Zellen gegenüber MMS und H₂O₂ führt. Die Ursache hierfür soll in einer reduzierten Aktivierung von PARP1, das die BER stimuliert, liegen.

Die widersprüchlichen Ergebnisse zwischen dieser Studie und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist sehr schwierig zu erklären. In beiden Arbeiten wird ein sehr ähnlicher BER-Aktivitätstest verwendet. Über die Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse in diesen Experimenten kann nur spekuliert werden. Möglicherweise könnte es auf die verschiedenen verwendeten Zellsysteme zurückzuführen sein. Weiterhin wurde in der Arbeit von Sagan und Co-Autoren eine reduzierte Aktivierung von PARP1 nachgewiesen. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Übereinstimmend sind jedoch die Daten bezüglich der Sensitivität gegenüber MMS. Hier zeigen die Daten beider Arbeiten, dass NBN-defiziente Zellen oder Zellen mit einem NBN-Knockdown sensitiver gegenüber MMS sind als entsprechende Wildtyp-Zellen. Die erhöhte Sensitivität wird in der Arbeit von Sagan und Co-Autoren durch den Defekt in der BER erklärt. Möglicherweise könnte sie aber auch auf eine verringerte

Reparatur von DSBs, welche indirekt durch die Alkylierungen der Basen induziert werden, zurückzuführen sein.

Die erhöhte Sensitivität der NBN-, ATM- und ATR-mutierten Zelllinien gegenüber S_N1 -alkylierenden Agenzien ist, wie oben diskutiert wurde, auf O^6 -MeG-Läsionen zurückzuführen. Diese induzieren als sekundären DNA-Schäden DSBs (siehe Kapitel 1.1.2.). Die Proteine NBN, ATM und ATR haben essentielle Funktionen während des frühen Prozessierens der DSBs, das vor allem zur Initiation der HR führt. Aber auch Einflüsse auf spätere Teilschritte der DSB-Reparatur sind beschrieben worden. So wurde beispielsweise eine Rolle von NBN in der HR vorgeschlagen (Tsuchi et al., 2002). Daher ist es nahe liegend zu vermuten, dass die erhöhte Sensitivität der mutierten Zelllinien auf eine verringerte DSB-Reparatur zurückzuführen ist, wobei speziell die HR beeinträchtigt sein sollte (Abb. 32). Diese Hypothese wird durch eine Studie unterstützt, in der gezeigt wurde, dass die Alkylanzien-induzierten DSBs vorwiegend durch HR repariert werden (Roos et al., 2009).

Um die Frage zu klären, ob die NHEJ an Bedeutung gewinnt, wenn NBN oder ATM mutiert sind, wurde ein DNA-PK_{CS}-Inhibitor zur Vorbehandlung verwendet. Da die DNA-PK für die NHEJ unerlässlich ist (siehe Kapitel 1.2.4.3.), ist es mit dem verwendeten Inhibitor möglich, diesen Signalweg zu hemmen. Im Wildtyp und in der ATM-mutierten Zelllinie führte die DNA-PK_{CS}-Inhibition nicht zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber der MNNG-Behandlung. Im Gegensatz dazu wurde eine starke Sensibilisierung der NBN-Mutante gegenüber MNNG durch die Zugabe des Inhibitors beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass in den verwendeten Wildtyp- und ATM-defizienten Fibroblasten die NHEJ keine Rolle in der Protektion gegenüber MNNG spielt. Im Fall der NBN-defizienten Zellen ist das anders. Hier scheint die NHEJ eine große Bedeutung zu haben.

Diese Daten bestätigen das in Kapitel 1.2.4.4. beschriebene Modell (siehe auch Abb. 3), in dem der MRN-Komplex und der KU70/KU80-Komplex um die Bindung an den DSB konkurrieren, wobei abhängig von dem an den DSB-bindenden Proteinkomplex der entsprechende Reparatur-Mechanismus bevorzugt wird. Demnach würde das Fehlen des MRN-Komplexes im Nukleus zu einer verstärkten Induktion der NHEJ führen, so dass in NBN-mutierten Zellen durch O^6 -MeG-induzierte DSBs ebenfalls durch die NHEJ repariert werden.

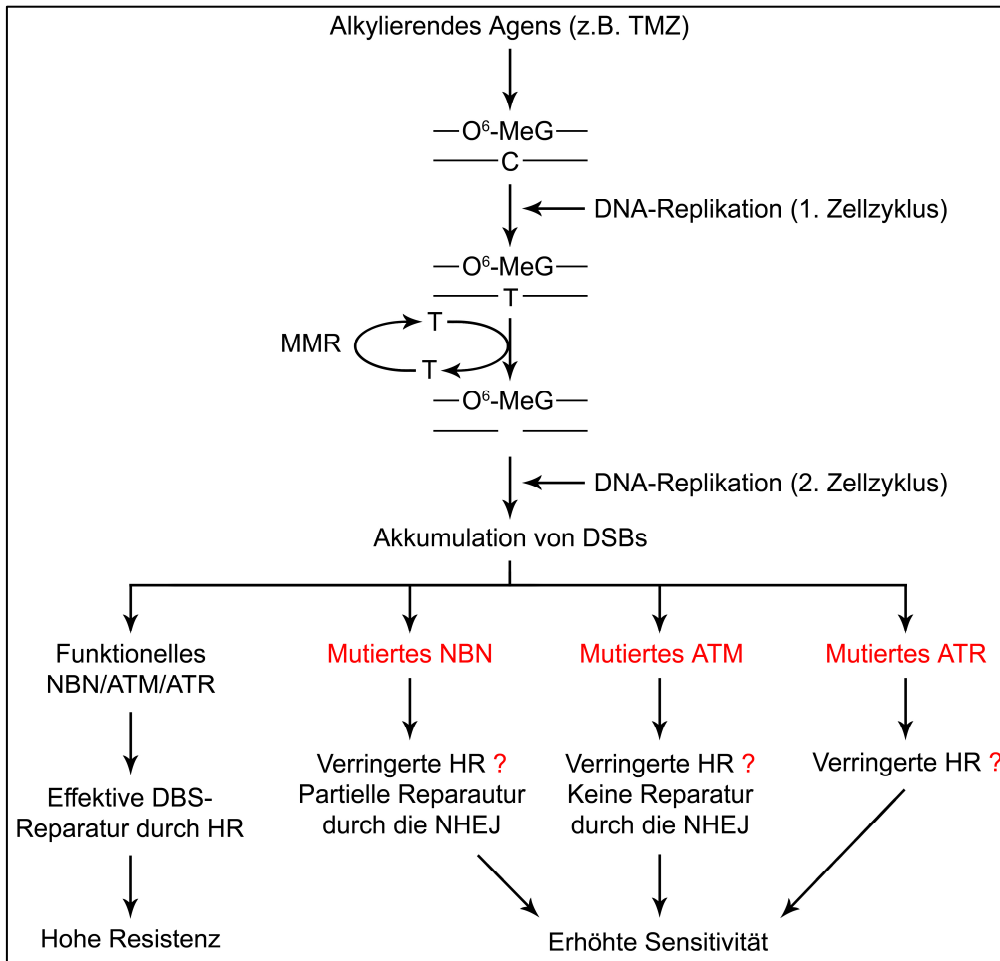


Abb. 32 Model zur O⁶-MeG-induzierten Toxizität mit Berücksichtigung von NBN, ATM und ATR. Vereinfachte Darstellung der vorgeschlagenen Signalwege. Ob die Mutationen von NBN, ATM und ATR zu einer verringerten HR führen, ist bislang nicht geklärt. Aufgrund der Funktionen der drei Proteine ist dies jedoch sehr wahrscheinlich. Der Einfluss der NHEJ auf die Methylnanzen-induzierte Toxizität wurde in den ATR-defizienten Zellen nicht untersucht.

5.2. Klinische Bedeutung der erhöhten Sensitivität der NBN-, ATM- und ATR-mutierten Zellen in der Tumorthherapie

TMZ wird in Verbindung mit IR für die Therapie von Glioblastomen eingesetzt. Diese tragen in hoher Frequenz spontane Mutationen im NBN-Gen (Watanabe et al., 2009). Sie betreffen entweder ein oder beide Allele und korrelieren mit zusätzlichen Mutationen im p53-Gen. Aufgrund der Daten der vorliegenden Arbeit ist es nahe liegend anzunehmen, dass homozygote NBN-Mutationen in Glioblastomen die auf TMZ-basierende Tumorthherapie stark beeinflussen. Hierbei sollten jene Tumore, die in

den Tumorzellen entsprechende Mutationen aufweisen, während der Therapie eine erhöhte Sensitivität zeigen. Daher sollte der NBN-Status der Tumorzellen als prognostischer Marker herangezogen werden können.

Auch maligne Melanome werden nach Metastasierung mit methylierenden Agenzien behandelt, wobei im europäischen Raum DTIC Verwendung findet. In den Vereinigten Staaten wird zur Melanom-Therapie aber mittlerweile ebenfalls TMZ eingesetzt, das DTIC dort verdrängte. In einem Teil der Patienten (2 von 80 Fällen, entspricht 2,5 %), die am malignen Melanom erkrankten, wurden heterozygote Keimbahn-Mutationen im NBN-Gen nachgewiesen (Debniak et al., 2003). Analysen der Tumor-Proben dieser Patienten zeigte in beiden Fällen einen Verlust der Heterozygotie im Tumor, wobei jeweils das Wildtyp-Allel betroffen war, so dass kein funktionelles NBN-Protein exprimiert wurde. Wie in Glioblastomen sollte der NBN-Status der Tumorzellen auch in Melanomen die Sensitivität der Tumorzellen beeinflussen und daher als prognostischer Marker dienen können. Jedoch sind Melanome sehr resistent und daher meist schlecht therapierbar. Dies ist in Einklang mit dem geringen Anteil an Tumoren, welche NBN-Mutationen aufweisen. Möglicherweise zeigen aber diese Tumore ein erhöhtes Ansprechen auf die auf Alkylanzien-basierende Therapie.

Weiterhin zeigen Zellen des Aderhautmelanoms, das dem malignen Melanom verwandt ist, aber nicht mit TMZ behandelt wird, eine variable Expression des NBN-Proteins und eine Korrelation zwischen dem Expressionsniveau und dem mittleren Überleben der Patienten (Ehlers and Harbour, 2005). In der vorliegenden Studie wurde in malignen Melanom-Zellen mittels RNAi ein stabiler Knockdown des NBN-Proteins erzielt. In anschließenden Toxizitätsmessungen zeigte sich eine klar erkennbare Korrelation zwischen der residualen NBN-Expression und der Sensitivität gegenüber TMZ, so dass anzunehmen ist, dass auch die Stärke der NBN-Expression in malignen Melanom-Zellen einen Einfluss auf deren Sensitivität gegenüber der Chemotherapie mit TMZ hat. Ob und in welchem Maß sich die Expression von NBN in malignen Melanom-Zellen als variabel erweist, muss durch detaillierte Studien untersucht werden.

Bei Untersuchungen einer Glioblastom-Zelllinie, die hypersensitiv gegenüber IR reagiert und keine DNA-PK_{CS} exprimiert, wurde zusätzlich eine spontan aufgetretene hemizygoten ATM-Mutation nachgewiesen (Tsuchida et al., 2002). Diese führt neben dem Wildtyp-Transkript zur Bildung von veränderten Transkripten, so dass die Menge

des Wildtyp-Proteins sehr niedrig ist. Analog dazu wurde auch in einer Melanom-Zelllinie eine somatische, homozygote Mutation im ATM-Gen beschrieben, welche ebenfalls mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber IR einhergeht (Ramsay et al., 1998). Beide Befunde führen zu der Annahme, dass Glioblastome und maligne Melanome neben somatischen Mutationen im NBN-Gen auch spontane Mutationen im ATM-Gen tragen. Außerdem wurde gezeigt, dass die ATM-Expression in primären Glioblastom-Zellen variiert und mit deren Sensitivität gegenüber IR korreliert (Tribius et al., 2001). In Melanom-Zellen hingegen wurde mehrfach eine sehr starke ATM-Expression detektiert (Ivanov et al., 2009; Moschos et al., 2009), so dass ATM als Biomarker für Melanome vorgeschlagen wurde (Roesch et al., 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten an, dass auch der ATM-Status der Glioblastom- und Melanom-Zellen den Erfolg der Chemotherapie beeinflusst. Während hierbei ATM-Mutationen in den Tumorzellen eine erhöhte Sensitivität verursachen sollten, könnte eine hohe Expression des Wildtyp-Proteins zur TMZ-Resistenz führen und damit eine ungünstige Prognose erlauben.

Die Hypothese, welche NBN und ATM als prognostische Marker für den Therapieerfolg während der Behandlung von Glioblastomen und malignen Melanomen vorschlägt, könnte möglicherweise auch auf ATR ausgeweitet werden. Jedoch liegen anders als im Fall von NBN und ATM zu ATR bislang keine Daten bezüglich eventueller Mutationen in beiden Tumor-Arten vor. Auch sind zum jetzigen Zeitpunkt keine Studien bekannt, welche eine variable ATR-Expression in den Zellen dieser Tumore beschreiben. Außerdem identifizieren die Daten NBN, ATM und auch ATR als neue therapeutische Angriffsziele in Glioblastomen und malignen Melanomen, deren selektive Inhibition die Effizienz der Chemotherapie sehr wahrscheinlich verbessern könnte.

Wie in Kapitel 4.1.8. beschrieben, wurde zusätzlich eine Reihe von weiteren Gentoxinen in den mutierten Fibroblasten untersucht. Hier wiesen die NBN- und ATM-mutierten Zelllinien eine erhöhte Sensitivität gegenüber IR, UVC, ETO, TPT, MMS und HdCDT auf. Durch diese Daten könnte die aufgestellte These, die NBN und ATM als therapeutische Angriffsziele in Glioblastomen und malignen Melanomen vorschlägt, auf eine Vielzahl von Tumoren, welche mit den verwendeten Zytostatika behandelt werden, ausgeweitet werden.

Weiterhin lässt die erhöhte Sensitivität der NBN- und ATM-defizienten Zellen nach Behandlung mit den verschiedenen Gentoxinen vermuten, dass der Status des NBN- und ATM-Proteins die Resistenz von Tumorzellen gegenüber einer Vielzahl von Zytostatika beeinflusst. In diesem Fall könnten NBN und ATM auch als prognostische Marker für eine Vielzahl von Tumoren herangezogen werden. Das Auftreten von spontanen Mutationen von NBN und ATM in diversen Tumoren unterstreicht diese Bedeutung.

Beispielsweise wurden somatische NBN-Mutationen in Medulloblastomen detektiert (Huang et al., 2008). In Patienten mit Brustkrebs (Gorski et al., 2003) und Ovarialkarzinomen (Plisiecka-Halasa et al., 2002) sind heterozygote Keimbahn-Mutationen im NBN-Gen beschrieben. Diese gehen in den Brustkrebs-Patienten in allen Fällen und in den Patienten mit Ovarialkarzinomen in einem Fall mit dem Verlust der Heterozygotie im Tumor und einem damit verbundenen Fehlen des Wildtyp-Proteins einher. Auch in Zellen von akuten lymphatischen Leukämien wurden spontane, heterozygote Mutationen im NBN-Gen nachgewiesen (Varon et al., 2001). Hier wird ein möglicher dominant-negativer Effekt des mutierten Proteins diskutiert.

Bezüglich des ATM-Gens wurden somatische Mutationen, die beide Allele betreffen, in hoher Frequenz in B- bzw. T-Zell-Leukämien gefunden (Schaffner et al., 1999; Vorechovsky et al., 1997). Weiterhin wurde in Mantelzelllymphomen, die unter anderem in der Sekundärtherapie mit ETO und IR behandelt werden (Ghielmini and Zucca, 2009), in einem großem Teil der Tumore die Deletion des ATM-Gens in einem Allel beschrieben (Schaffner et al., 2000). In all diesen Fällen trug das zweite Allel eine spontane, in der Keimbahn nicht vorkommende, Punktmutation, was den kompletten Verlust des Wildtyp-Proteins in den Tumorzellen zur Folge hatte.

Der Einfluss von ATR auf die Sensitivität gegenüber den genannten Gentoxinen wurde aus Zeitgründen nicht untersucht, da die Zelllinien erst gegen Ende der Studie zur Verfügung standen. Für den Fall, dass sich ATR-mutierte Zellen in Bezug auf die Sensitivität gegenüber diversen Zytostatika ähnlich wie NBN- und ATM-defiziente Zellen verhalten, könnte ATR ebenfalls als therapeutisches Angriffsziel in der Tumorthherapie herangezogen werden. Da auch somatische ATR-Mutationen in verschiedenen Tumoren beschrieben wurden, ist die Frage berechtigt, ob ATR als prognostischer Marker angesehen werden kann. Zum Beispiel wurden in Endometriumkarzinomen (Vassileva et al., 2002) oder in Magentumoren (Menoyo et

al., 2001) Mutationen gefunden, die jedoch nur ein Allel betrafen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die verwendeten lymphoblastoiden Zellen, die aus einem Patienten mit Seckel-Syndrom isoliert wurden, wie schon erwähnt eine hypomorphe ATR-Mutation tragen, welche eine verbleibende Expression des Wildtyp-Proteins zulässt. Daher ist die genetische Situation in diesen Zellen der Situation in Tumoren, die eine heterozygote Mutation tragen, sehr ähnlich.

5.3. Analyse der hohen Nekrose-Rate in den NBN- und ATM-defizienten Zellen

Mit der Annexin V/PI-Methode wurde gezeigt, dass in menschlichen Fibroblasten und lymphoblastoiden Zellen, welche Mutationen im NBN- bzw. im ATM-Gen tragen, die Hypersensitivität gegenüber MNNG und TMZ durch eine sehr hohe Nekrose-Frequenz bedingt ist. Bei Verwendung der Alkylanzien in hohen Dosen dominierte sogar in der Mehrzahl der durchgeführten Analysen der nekrotische Zelltod gegenüber der Apoptose. Auch in malignen Melanom-Zellen wurde nach Behandlung mit TMZ eine signifikante Induktion von Nekrose verzeichnet, wenn die NBN-Expression durch einen stabilen Knockdown vermindert wurde. Jedoch war in diesem Fall die Apoptose der dominante Zelltod-Mechanismus. MNNG und TMZ induzieren über die O⁶-MeG-Läsion in verschiedenen Zellsystemen vorwiegend Apoptose. Dies wurde zum Beispiel für maligne Melanom-Zellen (Naumann et al., 2009), menschliche Lymphozyten (Roos et al., 2004), Glioblastom-Zellen (Roos et al., 2007) und auch für Hamster-Zellen (Ochs and Kaina, 2000) gezeigt. Im Gegensatz dazu wurde bislang noch keine Induktion von Nekrose durch die O⁶-MeG-Läsion beschrieben. Daher waren die erhaltenen Befunde dieser Arbeit sehr überraschend und wurden im Detail untersucht.

Die Induktion von Nekrose wird oft in Verbindung gebracht mit der Hyperaktivierung von PARP1, die durch massiven DNA-Schaden oder durch eine Beeinträchtigung des BER-Systems induziert werden kann (siehe Kapitel 1.3.1.). In diesem Fall verläuft deren Induktion über eine NAD- und ATP-Depletion. Wie oben bereits diskutiert wurde, ist die gesamte Toxizität und damit auch die Induktion der Nekrose in den NBN- und ATM-defizienten Zellen fast ausschließlich auf die O⁶-MeG-Läsion zurückzuführen, da MGMT die Zellen vor der Induktion der Toxizität schützt. Daher ist die Frage berechtigt, ob die O⁶-MeG-Läsion in den NBN- und ATM-mutierten Zellen eine PARP1-

Hyperaktivierung verursacht. Aus diesem Grund wurde die Bildung von PAR, anhand derer auf eine Aktivierung von PARP1 geschlossen werden kann, in den Fibroblasten untersucht. Während im Wildtyp und in den NBN- und ATM-defizienten Zelllinien nach Behandlung mit H₂O₂ eine starke Bildung von PAR im Nukleus detektiert wurde, konnte nach MNNG-Behandlung zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine PAR-Formation beobachtet werden. Daher ist davon auszugehen, dass nach Behandlung mit MNNG in den Fibroblasten-Zelllinien keine Hyperaktivierung von PARP1 stattfindet und somit die hohe Nekrose-Rate in den mutierten Zelllinien PARP1-unabhängig induziert wird.

Dies wurde in den NBN-defizienten lymphblastoiden Zellen verifiziert. Da die lymphblastoiden Zellen in Suspension wachsen und daher die Immunfluoreszenz-Färbung nur schwierig durchzuführen ist, wurde hier jedoch eine andere Strategie verwendet, wobei durch Verwendung von DPQ parallel zur MNNG-Behandlung eine Inhibition von PARP1 durchgeführt wurde. Trotz Inhibition von PARP1 zeigte die NBN-defiziente Zelllinie keine Verminderung der hohen Nekrose-Induktion nach MNNG-Behandlung. Daher kann auch in diesem Fall geschlossen werden kann, dass die Nekrose-Induktion PARP1-unabhängig stattfindet.

Da das Absinken des ATP-Gehalts ein klassisches Charakteristikum während der Nekrose-Induktion darstellt (siehe Kapitel 1.3.1.), wurde der relative ATP-Gehalt in den Fibroblasten-Zelllinien nach MNNG-Behandlung analysiert. Hier konnte ein starkes Absinken der ATP-Menge nach MNNG-Behandlung in den NBN- und ATM-defizienten Zelllinien nachgewiesen werden. In der Wildtyp-Zelllinie zeigte sich hingegen nur ein geringer Abfall des ATP-Gehalts. Es ist daher nahe liegend zu schlussfolgern, dass die Nekrose-Induktion in den defizienten Fibroblasten-Zelllinien durch eine PARP1-unabhängige ATP-Depletion verursacht wird.

Eine wichtige Fragestellung, welche sich aus den oben diskutierten Befunden ergibt, ist die Frage nach der Ursache für die beobachtete ATP-Depletion. Aus diesem Grund wurde die Phosphorylierung der AMP-Kinase in menschlichen Fibroblasten mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die AMP-Kinase ist ein wichtiger zellulärer Energiesensor (Hardie et al., 2003). Sie wird durch Phosphorylierung aktiviert, wenn das Verhältnis von zellulärem ATP zu AMP absinkt und stimuliert dann ATP-produzierende katabolische Prozesse in der Zelle, so dass vermehrt ATP bereitgestellt wird. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die AMP-Kinase nach Aktivierung proapoptotisch wirkt. So verstärkt sie zum Beispiel in Glioblastom-Zellen apoptotische

Signale nach TMZ-Behandlung, unter anderem durch die Inhibition des mTOR (Mammalian target of rapamycin)-Signalweges (Zhang et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde nach MNNG-Behandlung in den Wildtyp-Fibroblasten eine starke Phosphorylierung der AMP-Kinase beobachtet. Diese war in der NBN-defizienten Zelllinie überhaupt nicht und in der ATM-mutierten Zelllinie nur sehr schwach zu beobachten. Daher kann vermutet werden, dass die Depletion der ATP-Menge und die damit verbundene Nekrose-Induktion in den beiden mutierten Zelllinien durch das Ausbleiben einer effektiven AMP-Kinase-Aktivierung bedingt wird (Abb. 33). Hierbei ist zu beachten, dass die inaktive AMP-Kinase nicht direkt für die ATP-Depletion verantwortlich sein sollte. Es kann vielmehr davon ausgegangen werden, dass die Behandlung mit den Alkylanzien zu einer Verminderung der ATP-Menge führt, die durch die fehlende Aktivierung der AMP-Kinase in den NBN- und ATM-mutierten Zellen nicht ausgeglichen wird.

Verstärkt wird die These zur Nekrose-Induktion durch eine Studie, in der ebenfalls eine Regulation der Nekrose durch die AMP-Kinase postuliert wird (Saber et al., 2008). Hier wurde unter anderem gezeigt, dass die H₂O₂-induzierte Nekrose durch die Zugabe des AMP-Kinase-Aktivators Metformin reduziert werden kann. Dieser experimentelle Ansatz wurde auch in der vorliegenden Studie für den Fall der Fibroblasten gewählt. Dabei war in der Wildtyp-Zelllinie durch die Zugabe von Metformin keine Beeinflussung der MNNG-induzierten Nekrose zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigte die ATM-mutierte Zelllinie nach MNNG-Behandlung und gleichzeitiger Aktivierung der AMP-Kinase durch Metformin eine signifikante Verringerung der Nekrose-Frequenz verglichen zur MNNG-Einzelbehandlung. Gleichzeitig war die Induktion der MNNG-induzierten Apoptose entsprechend erhöht, wenn die Zellen mit Metformin co-behandelt wurden, so dass der induzierte Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) durch die Metformin-Zugabe nicht beeinflusst wurde. Somit war in der ATM-mutierten Fibroblasten-Zelllinie eine Beeinflussung der MNNG-induzierten Nekrose-Rate durch die Modulation der AMP-Kinase möglich.

Diese Daten führen zu der Annahme, dass nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien funktionelles und aktives ATM-Protein in den Fibroblasten-Zellen notwendig ist, um eine effektive AMP-Kinase-Phosphorylierung zu gewährleisten. Diese Hypothese wird nicht nur durch die Daten der ATM-mutierten Zelllinie belegt, sondern auch durch die Ergebnisse, welche mit der NBN-defizienten Zelllinie erzielt wurden.

Hier konnte in einer Western-Blot-Analyse gezeigt werden, dass CHK2 nach 10 μ M MNNG-Behandlung nur sehr schwach phosphoryliert wurde (Abb. 44 im Anhang). Daraus ist zu schließen, dass auch ATM nur marginal aktiviert wurde. Daher ist die Situation in den NBN-defizienten Zellen der Situation in den ATM-mutierten Zellen sehr ähnlich.

Jedoch ist das Zusammenspiel von ATM und der AMP-Kinase, das zu einer ATM-abhängigen Phosphorylierung der AMP-Kinase führt, noch weitestgehend unklar. Eine wichtige Proteinkinase, welche die AMP-Kinase am Thr-172 phosphorylieren kann, ist LKB1 (Liver kinase B1) (Shaw et al., 2004). Bezüglich dieser Kinase sind mehrfach Wechselwirkungen mit ATM beschrieben worden. So induziert beispielsweise IR die Phosphorylierung von LKB1 in Abhängigkeit von ATM (Sapkota et al., 2002). In diesem Zusammenhang wurde im ATM-Protein eine Interaktionsdomäne für DNA-Schaden-induzierte Wechselwirkungen zwischen ATM und entsprechenden Zielproteinen identifiziert (Fernandes et al., 2005). Deren Fehlen führt zum Aufheben von Interaktionen zwischen ATM und LKB1. Beide Studien zeigen, dass es eine Verbindung zwischen ATM und LKB1 gibt. Weiterhin wurde gezeigt, dass ROS ATM-abhängig eine LKB1-vermittelte AMP-Kinase-Phosphorylierung im Zytoplasma induzieren, deren Konsequenz die Hemmung von mTOR und die Induktion von Autophagie sind (Alexander et al., 2010). Daher ist es denkbar, dass auch in den hier beschriebenen Untersuchungen in Fibroblasten-Zelllinien die Phosphorylierung der AMP-Kinase durch LKB1 in Abhängigkeit von ATM erfolgt.

Es gibt jedoch auch Veröffentlichungen, die eine ATM-abhängige AMP-Kinase-Phosphorylierung aufzeigen, welche unabhängig von LKB1 verläuft. Beispielsweise induziert IR die AMP-Kinase. Dies geschieht unabhängig von LKB1, jedoch in Abhängigkeit von ATM (Sanli et al., 2010). Gleiches gilt für die 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-Ribonucleotid (AICAR)- (Sun et al., 2007) bzw. für die IGF1 (Insulin-like growth factor 1)-vermittelte (Suzuki et al., 2004) Phosphorylierung der AMP-Kinase, so dass in beiden Studien ATM als direkte Kinase der AMP-Kinase vorgeschlagen wird. Diese Daten weisen darauf hin, dass auch eine ATM-abhängige, aber LKB1-unabhängige, AMP-Kinase-Phosphorylierung in den untersuchten Fibroblasten-Zelllinien denkbar ist. Der genaue molekulare Mechanismus der ATM-bedingten AMP-Kinase-Aktivierung muss jedoch noch in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden.

Da die Nekrose in den NBN- und ATM-mutierten Zellen durch einen spezifischen Stimulus (der O⁶-MeG-Läsion) induziert wird und da davon ausgegangen werden kann, dass neben der Regulation durch die AMP-Kinase weitere nachfolgende Signalwege zur Exekution der Nekrose führen, kann auch in diesen Fall von der „programmierten Nekrose“ gesprochen werden. Jedoch sind zum jetzigen Zeitpunkt die zugrunde liegenden Signalwege sowie die Frage, ob die hier vorliegende „programmierte Nekrose“ als „Nekroptose“ bezeichnet werden kann, nicht geklärt. Wie in Abb. 33 zusammengefasst ist, kann das Absinken der ATP-Menge verschiedene Signalwege induzieren (siehe auch Abb. 5 in Kap. 1.3.2.). Möglicherweise verursacht der ATP-Mangel einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Dieser kann einen Anstieg der mitochondrialen Ca²⁺-Konzentration und nachfolgend die Permeabilisierung der Mitochondrien (MPT) induzieren. Die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration kann aber auch die Aktivierung von Calpain und damit die Permeabilisierung der Lysosomen (LMP) verursachen. Weiterhin führt die ATP-Depletion auch zu einer Aktivierung von RIP1, welche dann über die Aktivierung der JNK ebenfalls MPT bedingen kann.

Um zu ermitteln, welcher dieser Signalwege an der Ausführung der Nekrose in den NBN- und ATM-mutierten Zelllinien beteiligt ist, müssen geeignete Experimente durchgeführt werden. Eine Strategie für diese Untersuchungen ist zum Beispiel der Einsatz verschiedener Inhibitoren. So kann die MPT durch den Einsatz von Cyclosporin A blockiert werden (Javadov and Karmazyn, 2007). Weiterhin existieren verschiedene Inhibitoren von Calpain, mit denen eine Beeinflussung der LMP möglich sein sollte. Hierzu zählt zum Beispiel der Peptid-Inhibitor Calpastatin (Maki et al., 1989).

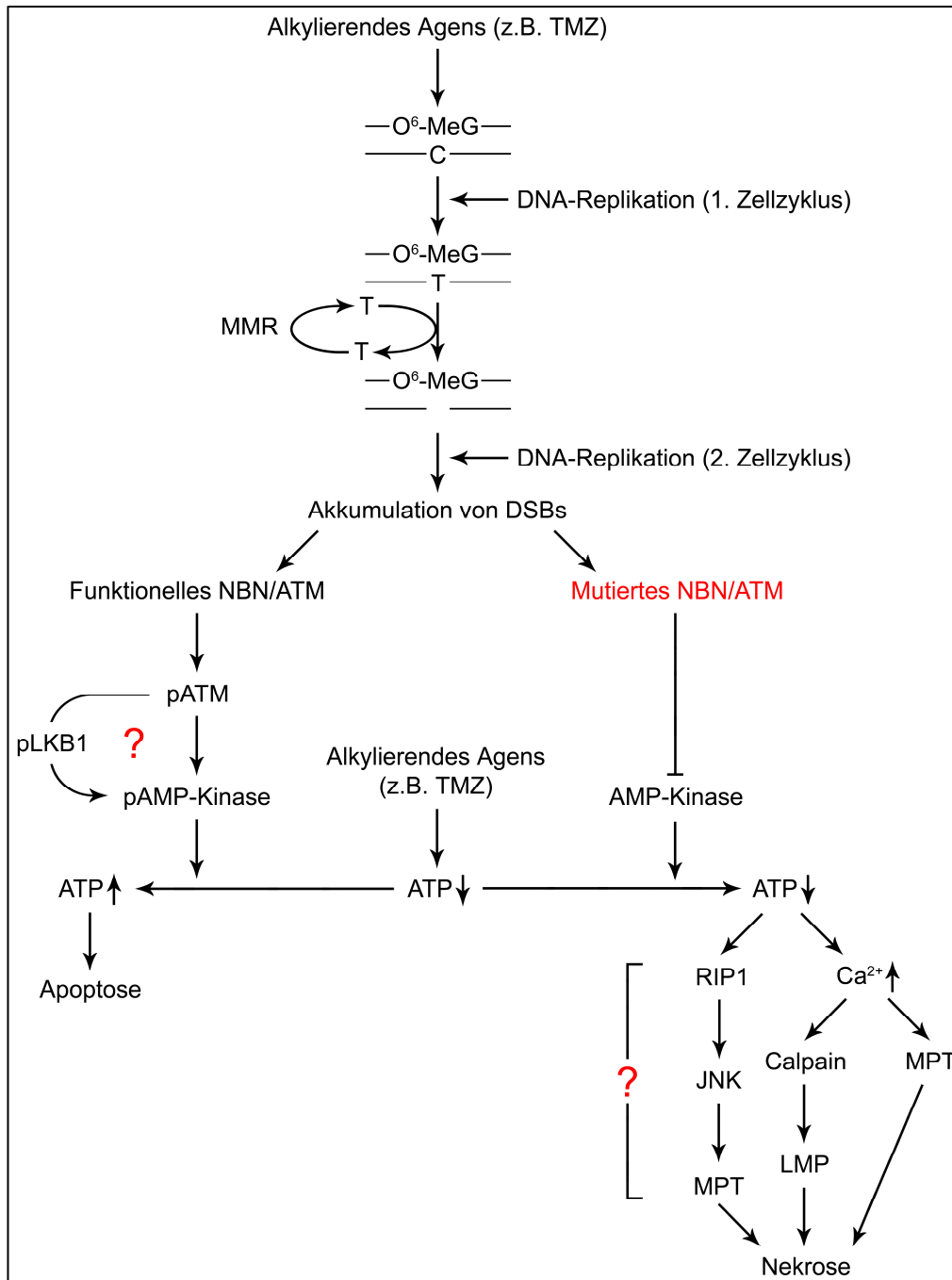


Abb. 33 Model zur O⁶-MeG-induzierten Apoptose- und Nekrose-Regulation. Vereinfachte Darstellung des vorgeschlagenen Signalwegs. Weitestgehend unklar sind die Verbindung zwischen ATM und der AMP-Kinase sowie der Signalweg, über welchen die Nekrose ausgeführt wird.

Wie in Kapitel 5.2. diskutiert wurde, wurde im Fall der menschlichen Fibroblasten eine Reihe von Gentoxinen eingesetzt und die Sensitivität der entsprechenden Zelllinien bestimmt. In diesem Zusammenhang wurden auch die Apoptose- und die Nekrose-

Raten analysiert. Dabei dominierte im Wildtyp und in der NBN-mutierten Zelllinie abhängig vom verwendeten Agens entweder die Induktion der Apoptose oder der Nekrose. In der ATM-mutierten Zelllinie wurde dagegen unabhängig vom Gentoxin in allen Fällen (mit der Ausnahme von MMS, hier war der Unterschied nicht signifikant) signifikant mehr Nekrose als Apoptose induziert. Somit zeigten beide mutierten Zelllinien nach Behandlung mit den verschiedenen Gentoxinen (TMZ, MMS, IR, UVC, TPT, ETO und HdCDT) im Gegensatz zur Situation nach MNNG-Behandlung, verschiedene Phänotypen. Über welche Mechanismen die hohe Nekrose-Induktion in den ATM-defizienten Zellen im Einzelnen verläuft, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt und müsste im Detail untersucht werden.

5.4. Hat die hohe Nekrose-Rate in den NBN- und ATM-mutierten Zellen in der Tumortherapie eine Bedeutung?

Das primäre Ziel der Chemo-, aber auch der Strahlentherapien, die im Kampf gegen verschiedene Tumore eingesetzt werden, ist die selektive Induktion von Apoptose in den Tumorzellen. In diesem Fall kommt es nur begrenzt zu einer Stimulation des Immunsystems und dementsprechend nicht zum Auftreten von Entzündungsreaktionen (siehe Kapitel 1.3.1.). Im Gegensatz dazu stimulieren nekrotische Zellen das Immunsystem sehr stark (siehe Kapitel 1.3.2.). Somit kann angenommen werden, dass entsprechende Tumorzellen, die Mutationen im NBN- oder ATM-Gen tragen und nach Behandlung mit methylierenden Agenzien vermehrt durch Nekrose sterben, Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe hervorrufen. Aus diesem Grund ist möglicherweise eine Chemo- oder Strahlentherapie mit größeren Nebenwirkungen verbunden, die insbesondere durch auftretende Entzündungen ausgelöst werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in diesem Zusammenhang ist, ob diese Stimulation des Immunsystems, welche durch die Nekrose-Induktion in den Tumorzellen ausgelöst wird, jedoch auch förderlich für die Tumortherapie ist. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass die Wirksamkeit der Chemotherapie nicht ausschließlich von der toxischen Wirkung des Chemotherapeutikums abhängt, sondern ebenfalls durch eine Stimulation des Immunsystems, ausgelöst durch sterbende Tumorzellen, positiv beeinflusst werden kann.

Induzieren sterbende Tumorzellen eine Stimulation des Immunsystems spricht man von einem immunogenen Zelltod. Dieser kann durch verschiedene Zytostatika verursacht werden. Beispielsweise induziert DOX in Darmkrebszellen eine immunogene Form der Apoptose, so dass nach der Transplantation entsprechender Tumore die DOX-induzierte Tumorregression in immunkompetenten Mäusen stärker ist als in immundefizienten Versuchstieren (Casares et al., 2005). Ähnliche Befunde wurden bei Brusttumoren beobachtet, welche nach der Transplantation in Versuchsmäuse mit verschiedenen Chemotherapeutika behandelt wurden (Apetoh et al., 2007). Auch in diesem Fall leistet die Stimulation des Immunsystems einen Beitrag zur Tumorregression. Die Stimulation ist hierbei abhängig von einer Aktivierung des TLR4 (Toll-like receptor 4) durch das HMGB1-Protein. Analog zu den Befunden in den Versuchstieren zeigen Patientinnen mit Brusttumoren eine erhöhte Frequenz an wiederkehrenden Metastasen, wenn sie eine Mutation im TLR4 tragen. Weiterhin korreliert der Erfolg der Therapie von Ovarialkarzinomen durch CDDP-Behandlung mit dem Auftreten von potenten T-Zell-Antworten (Coleman et al., 2005).

Diese Beispiele zeigen, dass die Sensibilisierung des Immunsystems gegen die entsprechenden Tumore durch absterbende Tumorzellen einen positiven Einfluss auf die Therapie besitzt. Daher wird angenommen, dass die Nekrose-Induktion in Tumorzellen ebenfalls die Therapie positiv beeinflusst, da in diesem Fall das Immunsystem stark aktiviert wird (Proskuryakov and Gabai, 2010). Verdeutlicht wird dies zum Beispiel durch die massive Freilassung des HMGB1-Proteins in die Umgebung während der Nekrose (siehe Kapitel 1.3.2.). Wie die oben beschriebene Arbeit zeigt, ist dieses Protein für die Sensibilisierung des Immunsystems gegen den Tumor von großer Bedeutung. Diese Überlegungen führen zu der Konsequenz, dass im Rahmen der auf TMZ-basierenden Chemotherapie die Regression von Tumoren, welche NBN- oder ATM-Mutationen tragen, durch eine verstärkte Immunantwort gesteigert sein sollte. Dies ist neben der erhöhten Sensitivität gegenüber einer Vielzahl von Chemotherapeutika ein weiterer wichtiger Aspekt, der die Prognose der Therapie positiv begünstigen sollte.

Abschließend ist zu sagen, dass in neuen Konzepten der Tumorthherapie die Sensibilisierung des Immunsystems gegen entsprechende Tumore eine wichtige Rolle einnimmt (Ullrich et al., 2008). So wird beispielsweise postuliert, dass zur Verbesserung des Therapieerfolgs das operative Entfernen des Tumors sowie die Strahlen- beziehungsweise Chemotherapie generell von einer Stimulation des

Immunsystems begleitet werden sollte. Weiterhin wird im Zusammenhang mit der Chemotherapie eine Kombination der zytotoxischen Wirkung der Zytostatika mit einer begleitenden Stimulation des Immunsystems durch Immunstimulanzien vorgeschlagen. Durch die immer wichtiger werdende Rolle der Immunantwort während der Tumorthherapie und durch die Entdeckung der verschiedenen Signalwege der „programmierten Nekrose“, verbunden mit der Möglichkeit, diese durch spezifische Stimuli zu induzieren, wird auch die gezielte Induktion der Nekrose während der Chemo- beziehungsweise Strahlentherapie an Bedeutung gewinnen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der DNA-Reparaturenzyme NBN (alias NBS-1), ATM und ATR, die wichtige Funktionen während der Reparatur von DSBs besitzen, auf die Alkylanzien-induzierte Toxizität untersucht. Dabei konnte mit dem WST-1-Assay und der Annexin V/PI-Methode gezeigt werden, dass verschiedene menschliche Fibroblasten und lymphoblastoide Zelllinien, welche eine homozygote Mutation in einem dieser drei Gene aufweisen, eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Mutagen MNNG und dem Chemotherapeutikum TMZ zeigen. In malignen Melanom-Zellen konnte dieser Befund durch einen stabilen NBN-Knockdown bestätigt werden, wobei eine Korrelation zwischen residualer NBN-Expression und induziertem Zelltod beobachtet wurde. Da das DNA-Reparaturenzym MGMT die Zellen vor der Induktion des Zelltods schützt, kann geschlossen werden, dass die Hypersensitivität der mutierten Zelllinien gegenüber MNNG und TMZ in allen untersuchten Beispielen auf die O⁶-MeG-Läsion zurückzuführen ist. Die so genannten N-Alkylierungen spielen dabei eine untergeordnete Rolle.

Wie mit einem BER-Aktivitätstest und dem alkalischen Comet-Assay gezeigt werden konnte, führen Mutationen von NBN oder ATM in menschlichen Fibroblasten nicht zu einer verminderten Kapazität der BER. Somit ist die erhöhte Sensitivität der mutierten Zellen sehr wahrscheinlich auf eine verminderte Reparatur der DSBs zurückzuführen, welche als Sekundärschäden durch die O⁶-MeG-Läsion induziert werden. Damit konnte in dieser Studie NBN, ATM und ATR als neue Faktoren in der Abwehr gegen Alkylanzien-induzierte Toxizität identifiziert werden. Dies ist von großer klinischer Bedeutung, da einerseits die drei Proteine als therapeutisches Angriffsziel Bedeutung gewinnen und andererseits verschiedene Tumore, welche in der Klinik routinemäßig mit alkylierenden Agenzien behandelt werden, Mutationen in diesen Genen tragen. Da zusätzlich gezeigt wurde, dass die NBN- und ATM-defizienten Fibroblasten hypersensitiv gegenüber einer Reihe von Zytostatika reagieren, kann diese These auf eine Vielzahl von Tumoren ausgedehnt werden.

Ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung, dass NBN- und ATM-defiziente Zelllinien nach Behandlung mit methylierenden Agenzien eine sehr hohe Nekrose-Rate aufweisen. MNNG und TMZ induzieren in verschiedenen Zellsystemen über die O⁶-MeG-Läsion überwiegend Apoptose und bislang ist keine

Induktion von Nekrose nach Behandlung mit diesen Gentoxinen beschrieben. Daher wurde die Nekrose-Induktion detailliert untersucht.

Mittels Immunfluoreszenz-Färbungen und durch die Verwendung eines Inhibitors von PARP1 (DPQ) konnte gezeigt werden, dass die hohe Nekrose-Rate in den NBN- bzw. ATM-defizienten Fibroblasten sowie in den NBN-mutierten lymphoblastoiden Zellen unabhängig von einer PARP1-Aktivierung induziert wird. Dennoch wurde im ATP-Test in den NBN- und ATM-mutierten Fibroblasten-Zelllinien im Gegensatz zum Wildtyp eine sehr starke Verminderung der ATP-Menge nach MNNG-Behandlung beobachtet. Diese wird durch das Fehlen einer effektiven Aktivierung der AMP-Kinase in beiden Zelllinien verursacht. Somit kann angenommen werden, dass die hohe Nekrose-Rate in den NBN- und ATM-defizienten Fibroblasten auf eine PARP1-unabhängige ATP-Depletion zurückzuführen ist, welche durch die nicht ausreichende AMP-Kinase-Aktivierung in diesen Zellen bedingt wird. Erhärtet wird diese These durch die Verwendung des AMP-Kinase-Aktivators Metformin, durch den eine Modulation der AMP-Kinase-Aktivität möglich wurde. Er bewirkte, dass die MNNG-induzierte Nekrose-Rate in der ATM-mutierten Zelllinie reduziert werden konnte, während die Induktion der Apoptose verstärkt wurde.

Die erhaltenen Untersuchungsergebnisse konnten NBN und ATM als Faktoren des zellulären Schutzes gerichtet gegen die Induktion der „programmierten Nekrose“ identifizieren. Die Aktivierung von NBN und ATM ist in menschlichen Zellen offenbar nötig, um nach MNNG-Behandlung eine ausreichende Phosphorylierung der AMP-Kinase zu gewährleisten, damit die zelluläre ATP-Menge nach Behandlung mit MNNG stabil bleibt. In diesem Zusammenhang muss jedoch die Verbindung zwischen ATM und der AMP-Kinase im Detail untersucht werden. Neben einer direkten Interaktion beider Proteine kommt hierbei LKB1 eine mögliche Rolle zu. Diese Kinase könnte für die AMP-Kinase-Phosphorylierung verantwortlich sein. Einerseits ist bekannt, dass sie effektiv die AMP-Kinase phosphoryliert, andererseits wurde beschrieben, dass LKB1 durch ATM aktiviert werden kann.

Die Beobachtung, dass NBN- und ATM-defiziente Zellen nach Behandlung mit methylierenden Agenzien vermehrt durch den nekrotischen Zelltod sterben, ist ebenfalls von klinischer Bedeutung. Tragen Tumorzellen von Tumoren, welche mit methylierenden Agenzien behandelt werden, Mutationen in einem dieser Gene, so muss mit einer vermehrten Induktion von Nekrose in den entsprechenden Tumorzellen

und daher mit einer Stimulation des Immunsystems während der Chemotherapie gerechnet werden. Dies wäre einerseits mit erhöhten Nebenwirkungen, die sich insbesondere durch Entzündungsreaktionen äußern, verbunden. Andererseits zeigen verschiedene Arbeiten, dass die Stimulation des Immunsystems durch sterbende Tumorzellen während der Chemotherapie die Tumorregression positiv beeinflussen kann.

Anhang

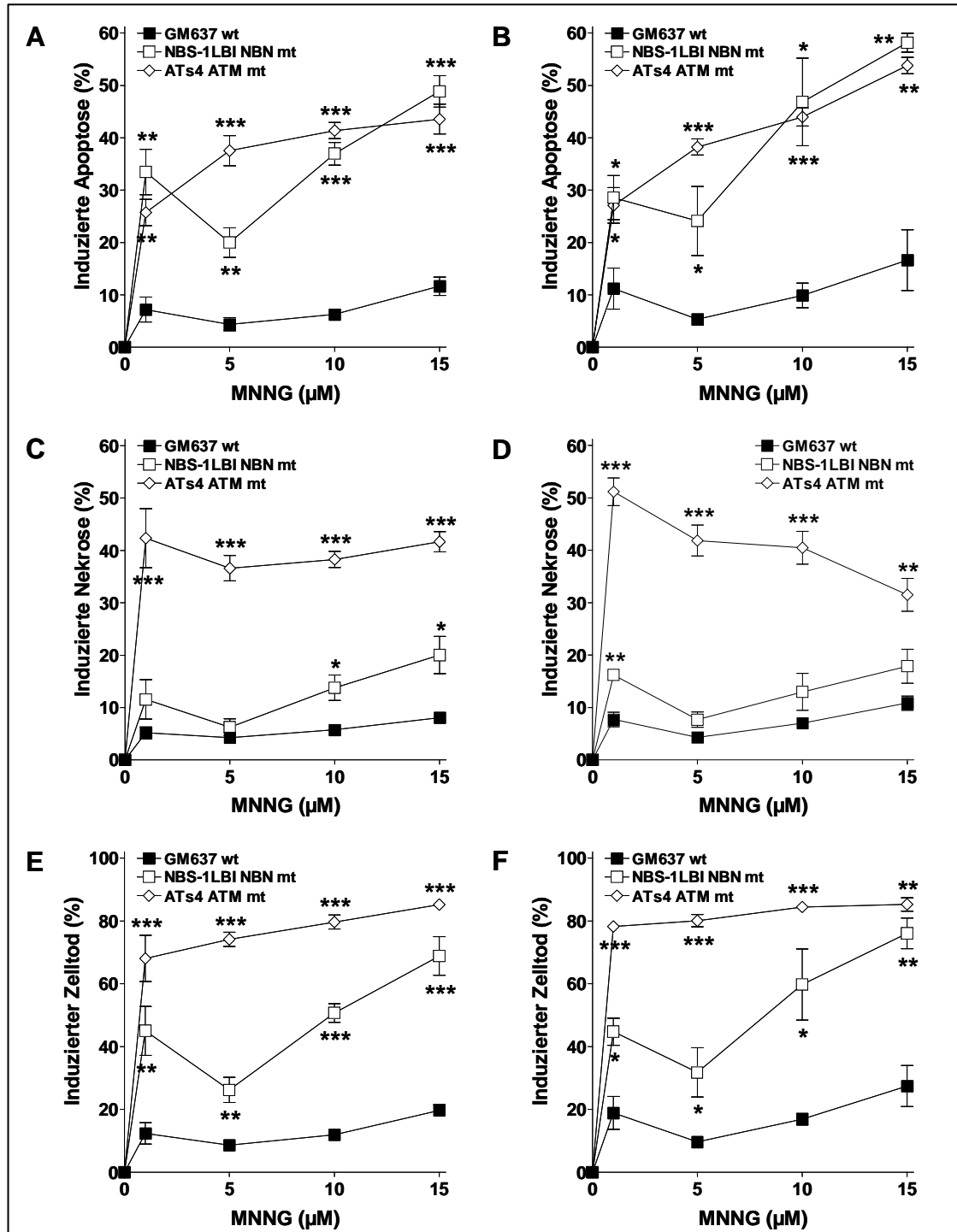


Abb. 34 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 96 und 120 Std. nach Behandlung mit MNNG in verschiedenen Konzentrationen. Die P-Werte beziehen sich jeweils auf die Kontrollzelllinie GM637: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$ A) Induzierte Apoptose 96 Std. nach Behandlung. B) Induzierte Apoptose 120 Std. nach Behandlung. C) Induzierte Nekrose 96 Std. nach Behandlung. D) Induzierte Nekrose 120 Std. nach Behandlung. E) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) 96 Std. nach Behandlung. F) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) 120 Std. nach Behandlung.

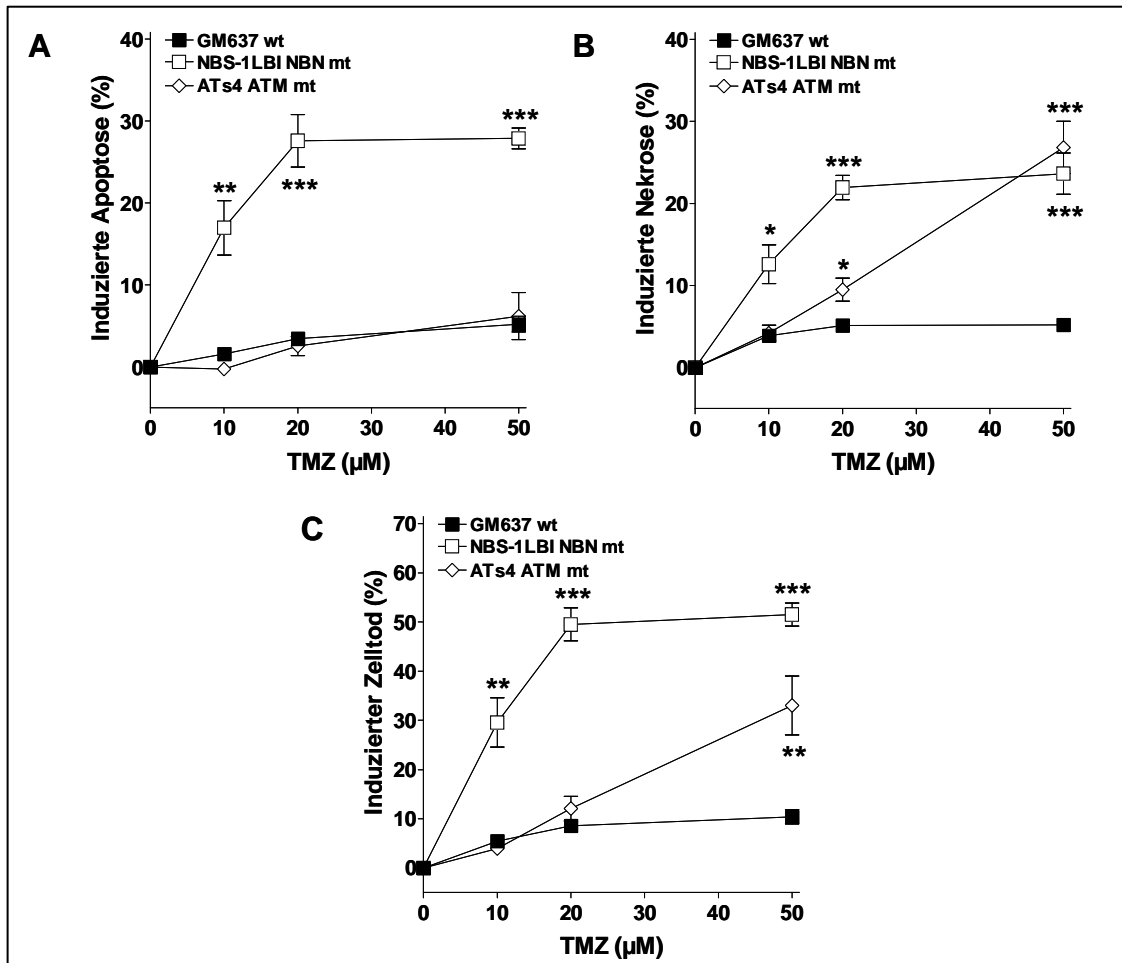


Abb. 35 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 96 Std. nach Behandlung mit TMZ in verschiedenen Konzentrationen. Die P-Werte beziehen sich jeweils auf die Kontrollzelllinie GM637: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$ A) Induzierte Apoptose. B) Induzierte Nekrose. C) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose).

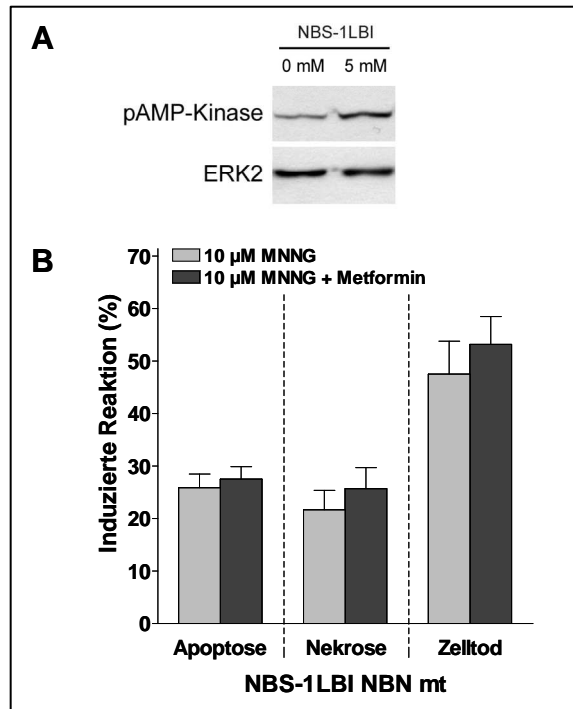


Abb. 36 Einfluss der AMP-Kinase-Phosphorylierung auf die MNNG-induzierte Toxizität in NBS-1LBI-Zellen. A) Untersuchung der AMP-Kinase-Phosphorylierung (pAMP-Kinase) 24 Std. nach Behandlung mit 5 mM Metformin mittels Western-Blot-Untersuchung. Zur Kontrolle der Beladung wurde die ERK2-Expression bestimmt. B) Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode 72 Std. nach 10 µM MNNG-Behandlung in Ab- bzw. Anwesenheit des AMP-Kinase-Aktivators Metformin (5 mM alle 24 Std. beginnend ab der MNNG-Behandlung). Die Bestimmung des Zelltods erfolgte durch Summation der Apoptose- und Nekrose-Fraktion.

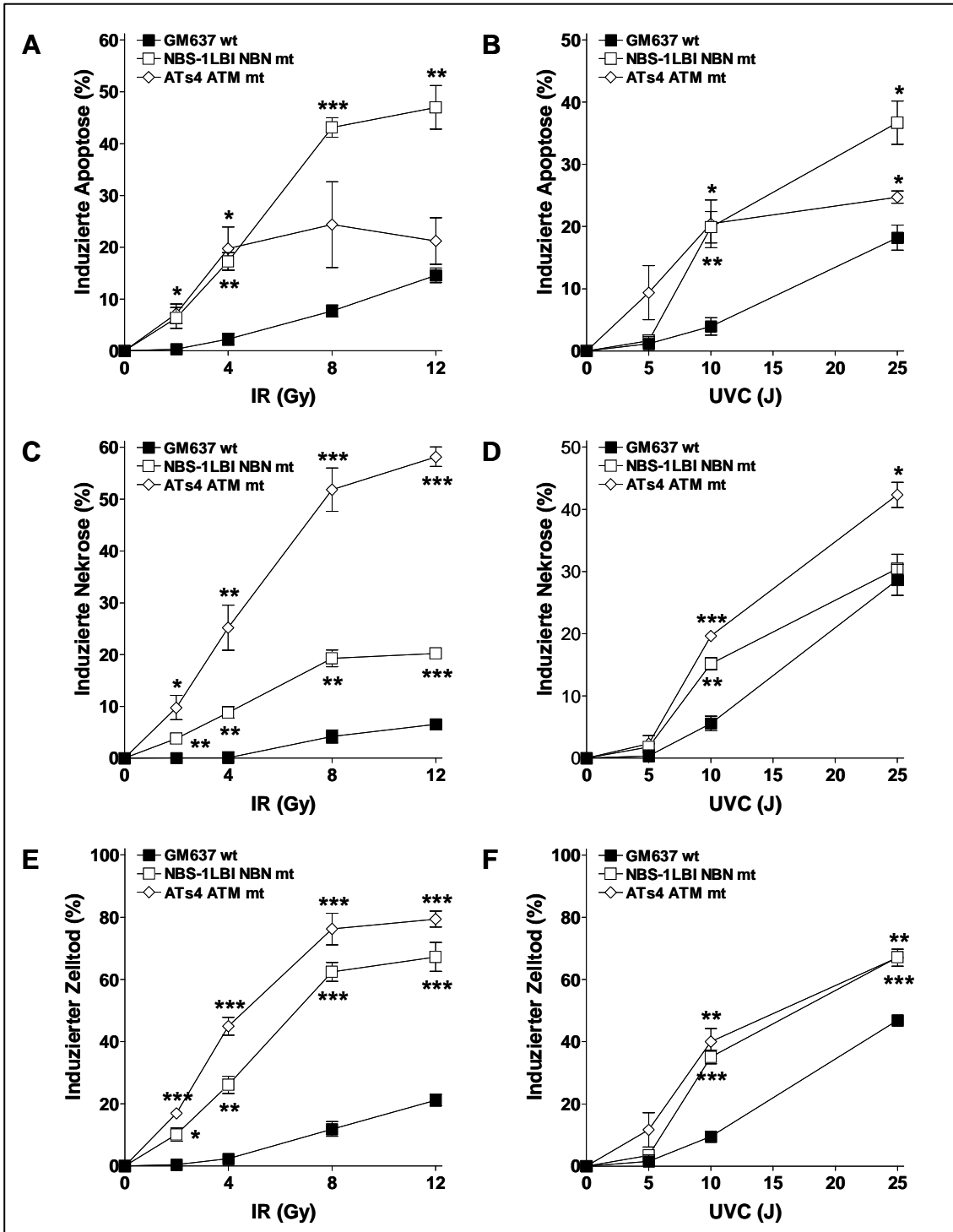


Abb. 37 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 72 Std. nach Exposition zu IR und UVC in verschiedenen Dosen. Die P-Werte beziehen sich jeweils auf die Kontrollzelllinie GM637: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$ A) Induzierte Apoptose nach IR-Exposition. B) Induzierte Apoptose nach UVC-Exposition. C) Induzierte Nekrose nach IR-Exposition. D) Induzierte Nekrose nach UVC-Exposition. E) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) nach IR-Exposition. F) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) nach UVC-Exposition.

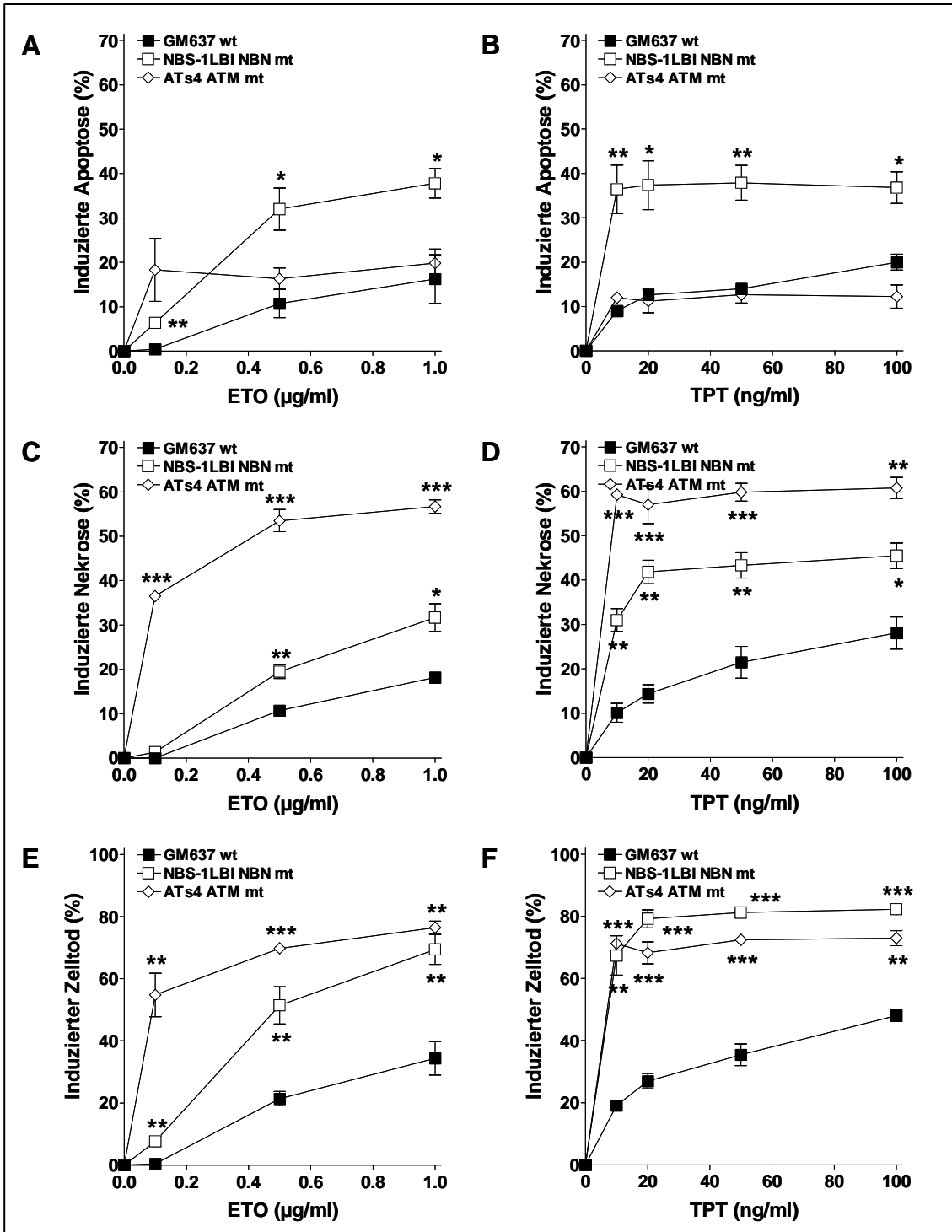


Abb. 38 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 72 Std. nach Behandlung mit ETO und TPT in verschiedenen Konzentrationen. Die P-Werte beziehen sich jeweils auf die Kontrollzelllinie GM637: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$ A) Induzierte Apoptose nach Behandlung mit ETO. B) Induzierte Apoptose nach Behandlung mit TPT. C) Induzierte Nekrose nach Behandlung mit ETO. D) Induzierte Nekrose nach Behandlung mit TPT. E) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) nach Behandlung mit ETO. F) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) nach Behandlung mit TPT.

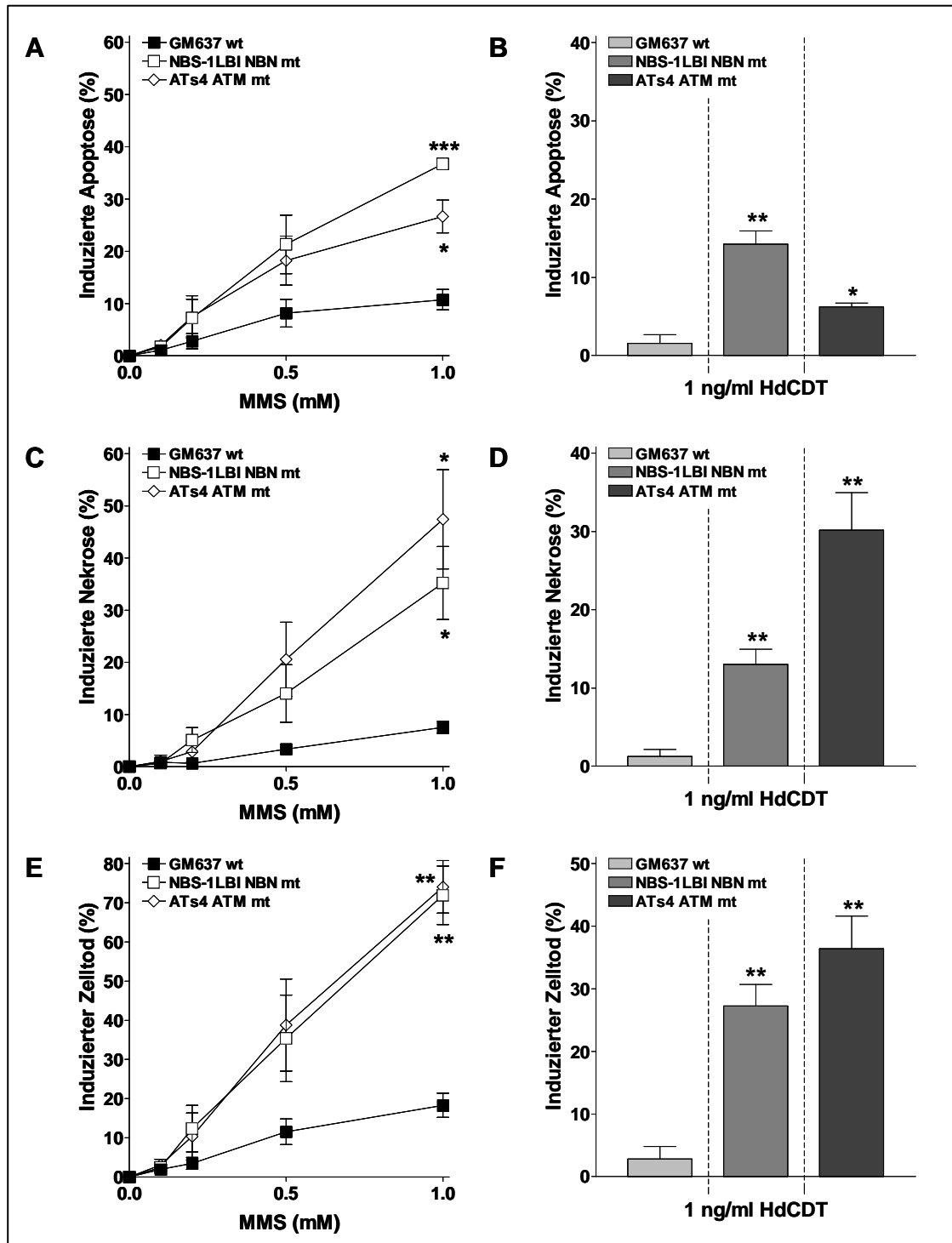


Abb. 39 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 72 Std. nach Behandlung mit MMS in verschiedenen Konzentrationen und mit 1 ng/ml HdCDT. Die P-Werte beziehen sich jeweils auf die Kontrollzelllinie GM637: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$ A) Induzierte Apoptose nach Behandlung mit MMS. B) Induzierte Apoptose nach Behandlung mit HdCDT. C) Induzierte Nekrose nach Behandlung mit MMS. D) Induzierte Nekrose nach Behandlung mit HdCDT. E) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) nach Behandlung mit MMS. F) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) nach Behandlung mit HdCDT.

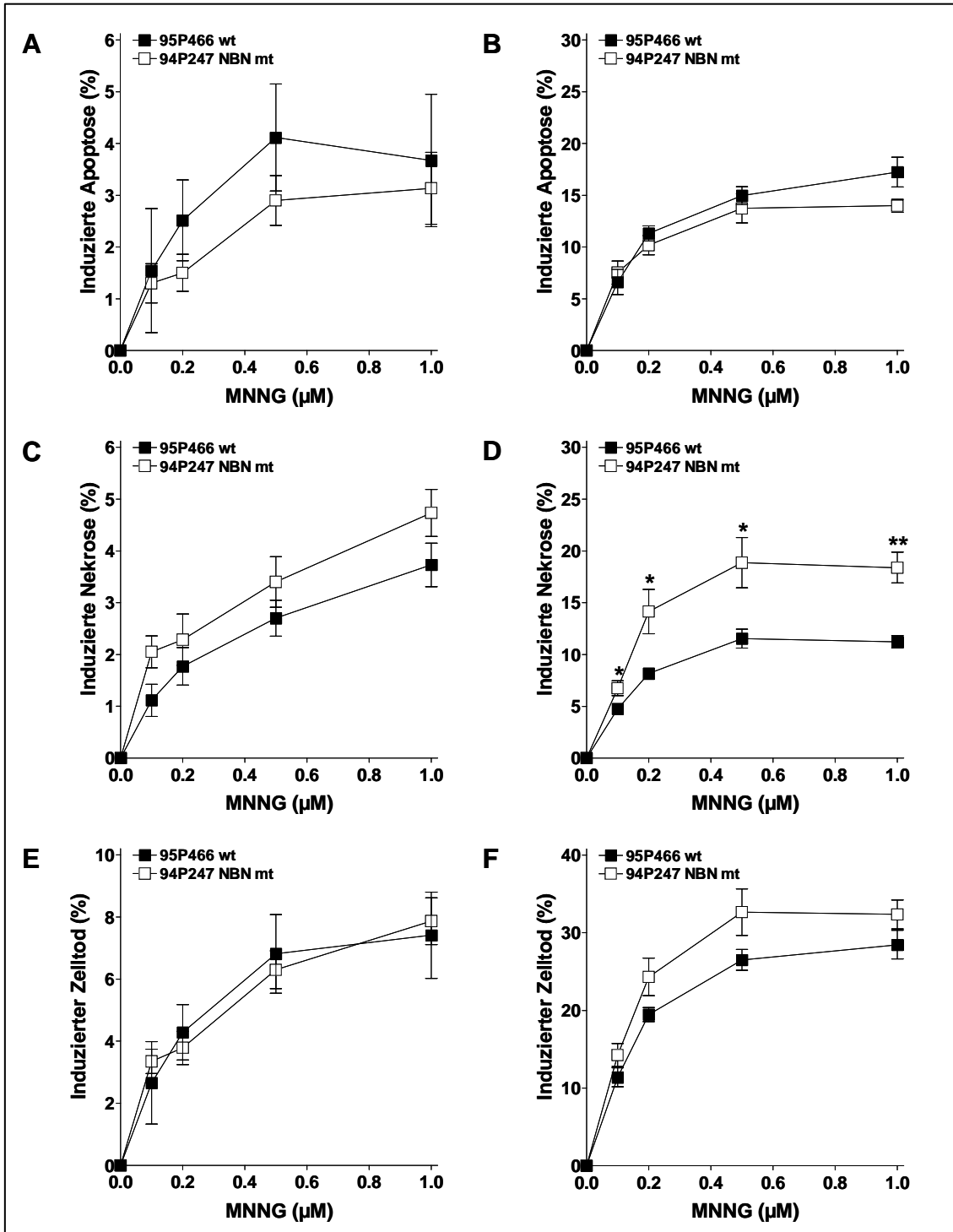


Abb. 40 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P247 24 und 48 Std. nach Behandlung mit MNNG in verschiedenen Konzentrationen. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$ A) Induzierte Apoptose 24 Std. nach Behandlung. B) Induzierte Apoptose 48 Std. nach Behandlung. C) Induzierte Nekrose 24 Std. nach Behandlung. D) Induzierte Nekrose 48 Std. nach Behandlung. E) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) 24 Std. nach Behandlung. F) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose) 48 Std. nach Behandlung.

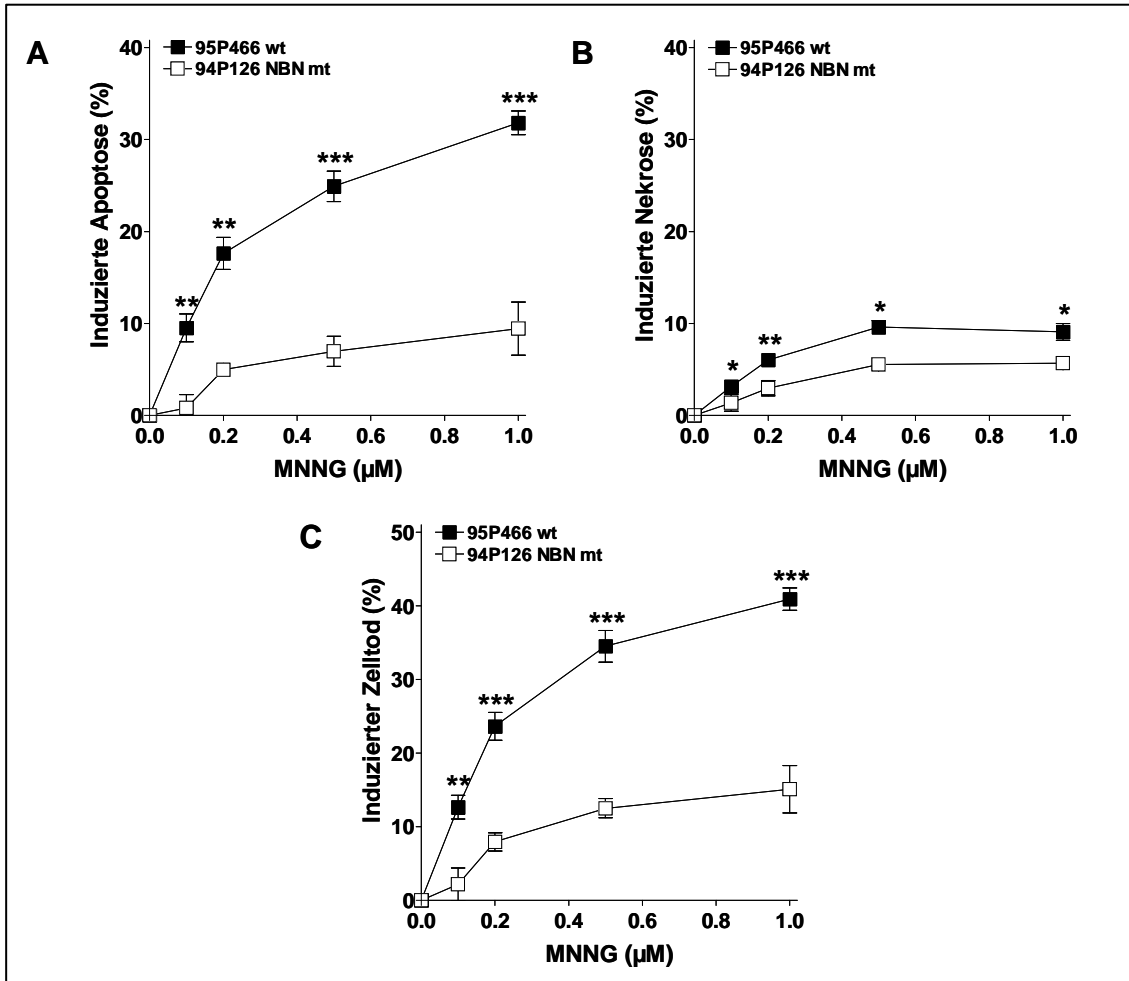


Abb. 41 Analyse der Toxizität mit der Annexin V/PI-Methode in den lymphoblastoiden Zelllinien 95P466 und 94P126 72 Std. nach Behandlung mit MNNG in verschiedenen Konzentrationen. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$ A) Induzierte Apoptose. B) Induzierte Nekrose. C) Induzierter Zelltod (Summe aus Apoptose und Nekrose).

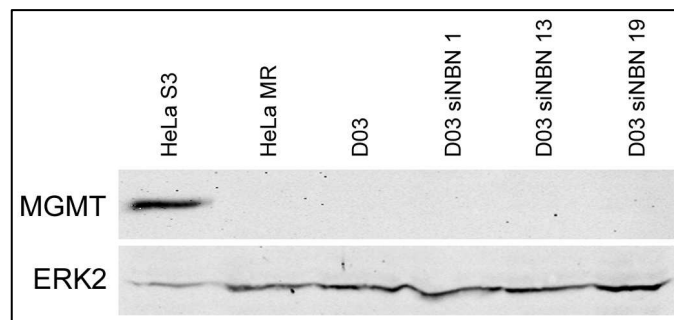


Abb. 42 Bestimmung der MGMT-Expression in der Melanom-Zelllinie D03 nach stabilem NBN-Knockdown mittels Western-Blot-Analyse. Untersucht wurde die nicht-transfizierte Zelllinie und 3 Klone (D03 siBNB 1, D03 siBNB 13 und D03 siBNB 19) mit NBN-Knockdown. Zur Kontrolle der Beladung wurde die ERK2-Expression bestimmt. HeLa S3 diente als Positiv-, HeLa MR als Negativkontrolle.

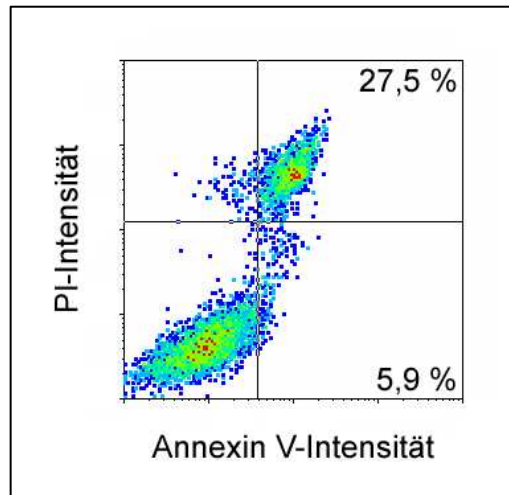


Abb. 43 Bestimmung der basalen Apoptose- und Nekrose-Rate in D03 siNBN 19-Zellen mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung. Abgebildet ist ein Dichte-Diagramm mit einer repräsentativen Verteilung der lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellpopulation von unbehandelten Zellen. Prozentwerte der apoptotischen und nekrotischen Fraktionen sind im Diagramm angegeben.

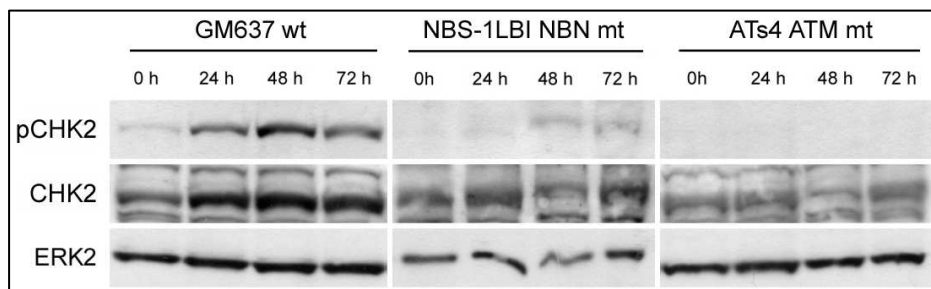


Abb. 44 Untersuchung der CHK2-Phosphorylierung (pCHK2) zu verschiedenen Zeitpunkten nach 10 μ M MNNG-Behandlung in den menschlichen Fibroblasten-Zelllinien GM637, NBS-1LBI und ATs4 mittels Western-Blot-Analyse. Zur Kontrolle der Beladung wurde die ERK2-Expression bestimmt.

Literaturverzeichnis

- Addeo R, De Santi MS, Del Prete S and Caraglia M (2009) Fotemustine and recurrent glioblastoma: possible new opportunities for an old drug. *Cancer Chemother Pharmacol* **64**(5):863-866.
- Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH, Inoki K, Guan KL, Shen J, Person MD, Kusewitt D, Mills GB, Kastan MB and Walker CL (2010) ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(9):4153-4158.
- Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT and Willems GM (1990) Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* **265**(9):4923-4928.
- Andreetta C, Minisini AM, Miscoria M and Puglisi F (2010) First-line chemotherapy with or without biologic agents for metastatic breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **76**(2):99-111.
- Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R and Martinou JC (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* **277**(5324):370-372.
- Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R and Martinou JC (2000) Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* **345 Pt 2**:271-278.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, Andre F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G and Zitvogel L (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* **13**(9):1050-1059.
- Bakkenist CJ and Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**(6922):499-506.
- Balamuth NJ and Womer RB (2010) Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol* **11**(2):184-192.
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y and Ziv Y (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**(5383):1674-1677.
- Barkla DH and Gibson PR (1999) The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology* **31**(3):230-238.
- Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM and Srivastava PK (2000) Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* **12**(11):1539-1546.

- Becker K, Gregel CM and Kaina B (1997) The DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase protects against skin tumor formation induced by antineoplastic chloroethylnitrosourea. *Cancer Res* **57**(16):3335-3338.
- Bei R, Marzocchella L and Turriziani M (2010) The use of temozolomide for the treatment of malignant tumors: clinical evidence and molecular mechanisms of action. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **5**(3):172-187.
- Belanich M, Pastor M, Randall T, Guerra D, Kibitel J, Alas L, Li B, Citron M, Wasserman P, White A, Eyre H, Jaeckle K, Schulman S, Rector D, Prados M, Coons S, Shapiro W and Yarosh D (1996) Retrospective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine. *Cancer Res* **56**(4):783-788.
- Beranek DT (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* **231**(1):11-30.
- Bhatia S, Tykodi SS and Thompson JA (2009) Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)* **23**(6):488-496.
- Bianchi ME and Manfredi A (2004) Chromatin and cell death. *Biochim Biophys Acta* **1677**(1-3):181-186.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Branch P, Aquilina G, Bignami M and Karran P (1993) Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. *Nature* **362**(6421):652-654.
- Branzei D and Foiani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(4):297-308.
- Brouckaert G, Kalai M, Krysko DV, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu M, Haegeman G, D'Herde K and Vandenabeele P (2004) Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell* **15**(3):1089-1100.
- Brown EJ and Baltimore D (2000) ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* **14**(4):397-402.
- Burkle A, Chen G, Kupper JH, Grube K and Zeller WJ (1993) Increased poly(ADP-ribosylation) in intact cells by cisplatin treatment. *Carcinogenesis* **14**(4):559-561.
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A and Chen DJ (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**(45):42462-42467.

- Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P and Shall S (1996) XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res* **24**(22):4387-4394.
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB and Siliciano JD (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **281**(5383):1677-1679.
- Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR, 3rd, Hays L, Morgan WF and Petrini JH (1998) The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* **93**(3):477-486.
- Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, Schmitt E, Hamai A, Hervas-Stubbs S, Obeid M, Coutant F, Metivier D, Pichard E, Aucouturier P, Pierron G, Garrido C, Zitvogel L and Kroemer G (2005) Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* **202**(12):1691-1701.
- Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P and Golstein P (1999) Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* **9**(17):967-970.
- Chen J, Ghorai MK, Kenney G and Stubbe J (2008) Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Res* **36**(11):3781-3790.
- Chen JM, Zhang YP, Wang C, Sun Y, Fujimoto J and Ikenaga M (1992) O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in human tumors. *Carcinogenesis* **13**(9):1503-1507.
- Chi P, San Filippo J, Sehorn MG, Petukhova GV and Sung P (2007) Bipartite stimulatory action of the Hop2-Mnd1 complex on the Rad51 recombinase. *Genes Dev* **21**(14):1747-1757.
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP and Kaina B (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193**(1-2):3-34.
- Cimprich KA and Cortez D (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(8):616-627.
- Citron M, Schoenhaus M, Graver M, Hoffman M, Lewis M, Wasserman P, Niederland M, Kahn L, White A and Yarosh D (1993) O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human normal and malignant lung tissues. *Cancer Invest* **11**(3):258-263.
- Coleman S, Clayton A, Mason MD, Jasani B, Adams M and Tabi Z (2005) Recovery of CD8+ T-cell function during systemic chemotherapy in advanced ovarian cancer. *Cancer Res* **65**(15):7000-7006.

- Costello JF, Futscher BW, Tano K, Graunke DM and Pieper RO (1994) Graded methylation in the promoter and body of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *J Biol Chem* **269**(25):17228-17237.
- Dantzer F, de La Rubia G, Menissier-De Murcia J, Hostomsky Z, de Murcia G and Schreiber V (2000) Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* **39**(25):7559-7569.
- de Jager M, Dronkert ML, Modesti M, Beerens CE, Kanaar R and van Gent DC (2001a) DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res* **29**(6):1317-1325.
- de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R and Wyman C (2001b) Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* **8**(5):1129-1135.
- Debniak T, Gorski B, Cybulski C, Jakubowska A, Kurzawski G, Lener M, Mierzejewski M, Masojc B, Medrek K, Kladny J, Zaluga E, Maleszka R, Chosia M and Lubinski J (2003) Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in patients with malignant melanoma of the skin. *Melanoma Res* **13**(4):365-370.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA and Yuan J (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* **1**(2):112-119.
- Dennis SC, Gevers W and Opie LH (1991) Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to? *J Mol Cell Cardiol* **23**(9):1077-1086.
- Desai-Mehta A, Cerosaletti KM and Concannon P (2001) Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol* **21**(6):2184-2191.
- Dianov GL (2003) Monitoring base excision repair by in vitro assays. *Toxicology* **193**(1-2):35-41.
- Dolan ME, Moschel RC and Pegg AE (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 U S A* **87**(14):5368-5372.
- Duchen MR (2000) Mitochondria and Ca(2+) in cell physiology and pathophysiology. *Cell Calcium* **28**(5-6):339-348.
- Dumenco LL, Allay E, Norton K and Gerson SL (1993) The prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Science* **259**(5092):219-222.
- Dynan WS and Yoo S (1998) Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **26**(7):1551-1559.

- Ehlers JP and Harbour JW (2005) NBS1 expression as a prognostic marker in uveal melanoma. *Clin Cancer Res* **11**(5):1849-1853.
- El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H and Caldecott KW (2003) A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* **31**(19):5526-5533.
- Fernandes N, Sun Y, Chen S, Paul P, Shaw RJ, Cantley LC and Price BD (2005) DNA damage-induced association of ATM with its target proteins requires a protein interaction domain in the N terminus of ATM. *J Biol Chem* **280**(15):15158-15164.
- Festjens N, Vanden Berghe T, Cornelis S and Vandenabeele P (2007) RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ* **14**(3):400-410.
- Festjens N, Vanden Berghe T and Vandenabeele P (2006) Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10):1371-1387.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M and Kolodner R (1994) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* **77**(1):1 p following 166.
- Flechon A, Rivoire M and Droz JP (2008) Management of advanced germ-cell tumors of the testis. *Nat Clin Pract Urol* **5**(5):262-276.
- Frisan T, Cortes-Bratti X, Chaves-Olarte E, Stenerlow B and Thelestam M (2003) The Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell Microbiol* **5**(10):695-707.
- Frosina G, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox LS, Lane DP, Abbondandolo A and Dogliotti E (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* **271**(16):9573-9578.
- Fuentes-Prior P and Salvesen GS (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* **384**(Pt 2):201-232.
- Galluzzi L and Kroemer G (2008) Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* **135**(7):1161-1163.
- Ganti AK, Zhen W and Kessinger A (2007) Limited-stage small-cell lung cancer: therapeutic options. *Oncology (Williston Park)* **21**(3):303-312; discussion 312, 315-308, 323.
- Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, Lavin MF, Gatti RA, Concannon P and Khanna K (2000) ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* **25**(1):115-119.
- Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NG, Lange K and et al. (1988) Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* **336**(6199):577-580.

- Genschel J, Littman SJ, Drummond JT and Modrich P (1998) Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *J Biol Chem* **273**(31):19895-19901.
- Gerson SL, Trey JE, Miller K and Berger NA (1986) Comparison of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis* **7**(5):745-749.
- Ghielmini M and Zucca E (2009) How I treat mantle cell lymphoma. *Blood* **114**(8):1469-1476.
- Gichner T and Veleminsky J (1982) Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homologs. *Mutat Res* **99**(2):129-242.
- Giovannetti A, Pierdominici M, Di Iorio A, Cianci R, Murdaca G, Puppò F, Pandolfi F and Paganelli R (2008) Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. *Curr Pharm Des* **14**(3):253-268.
- Glas M, Happold C, Rieger J, Wiewrodt D, Bahr O, Steinbach JP, Wick W, Kortmann RD, Reifenberger G, Weller M and Herrlinger U (2009) Long-term survival of patients with glioblastoma treated with radiotherapy and lomustine plus temozolomide. *J Clin Oncol* **27**(8):1257-1261.
- Gocheva L (2010) Radiation therapy in Hodgkin's disease - decades of steady progress. *J Buon* **15**(2):226-234.
- Gorski B, Debniak T, Masojc B, Mierzejewski M, Medrek K, Cybulski C, Jakubowska A, Kurzawski G, Chosia M, Scott R and Lubinski J (2003) Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients. *Int J Cancer* **106**(3):379-381.
- Gottlieb TM and Jackson SP (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**(1):131-142.
- Gradia S, Subramanian D, Wilson T, Acharya S, Makhov A, Griffith J and Fishel R (1999) hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. *Mol Cell* **3**(2):255-261.
- Grafstrom RC, Pegg AE, Trump BF and Harris CC (1984) O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in normal human tissues and cells. *Cancer Res* **44**(7):2855-2857.
- Guicciardi ME and Gores GJ (2009) Life and death by death receptors. *Faseb J* **23**(6):1625-1637.
- Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R and Gunter K (2000) Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* **28**(5-6):285-296.
- Guo Z, Kumagai A, Wang SX and Dunphy WG (2000) Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* **14**(21):2745-2756.

- Ha HC and Snyder SH (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24):13978-13982.
- Hacker G (2000) The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* **301**(1):5-17.
- Halestrap AP (2006) Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 2):232-237.
- Hansen RJ, Nagasubramanian R, Delaney SM, Samson LD and Dolan ME (2007) Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in protecting from alkylating agent-induced toxicity and mutations in mice. *Carcinogenesis* **28**(5):1111-1116.
- Hardie DG, Scott JW, Pan DA and Hudson ER (2003) Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* **546**(1):113-120.
- Hecht SS (1999) Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **91**(14):1194-1210.
- Heyer WD, Li X, Rolfsmeier M and Zhang XP (2006) Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res* **34**(15):4115-4125.
- Hollick JJ, Golding BT, Hardcastle IR, Martin N, Richardson C, Rigoreau LJ, Smith GC and Griffin RJ (2003) 2,6-disubstituted pyran-4-one and thiopyran-4-one inhibitors of DNA-Dependent protein kinase (DNA-PK). *Bioorg Med Chem Lett* **13**(18):3083-3086.
- Holliday R (2007) A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet Res* **89**(5-6):285-307.
- Hopfner KP, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen BA, Karcher A, Henderson B, Bodmer JL, McMurray CT, Carney JP, Petrini JH and Tainer JA (2002) The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* **418**(6897):562-566.
- Hopfner KP, Karcher A, Craig L, Woo TT, Carney JP and Tainer JA (2001) Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* **105**(4):473-485.
- Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP and Tainer JA (2000) Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* **101**(7):789-800.
- Huang J, Grotzer MA, Watanabe T, Hower E, Pietsch T, Rutkowski S and Ohgaki H (2008) Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene in medulloblastomas. *Clin Cancer Res* **14**(13):4053-4058.
- Huertas P (2010) DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol* **17**(1):11-16.
- Iijima K, Ohara M, Seki R and Tauchi H (2008) Dancing on damaged chromatin: functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 complex in cellular responses to DNA damage. *J Radiat Res (Tokyo)* **49**(5):451-464.

- Ivanov VN, Zhou H, Partridge MA and Hei TK (2009) Inhibition of ataxia telangiectasia mutated kinase activity enhances TRAIL-mediated apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Res* **69**(8):3510-3519.
- Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* **23**(5):687-696.
- Jagerstad M and Skog K (2005) Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res* **574**(1-2):156-172.
- Jamieson ER and Lippard SJ (1999) Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* **99**(9):2467-2498.
- Javadov S and Karmazyn M (2007) Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* **20**(1-4):1-22.
- Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J and Jackson SP (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* **8**(1):37-45.
- Jeggo P and Lobrich M (2006) Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat Prot Dosimetry* **122**(1-4):124-127.
- Kaina B, Christmann M, Naumann S and Roos WP (2007) MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* **6**(8):1079-1099.
- Kaina B, Fritz G, Mitra S and Coquerelle T (1991) Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* **12**(10):1857-1867.
- Karran P and Bignami M (1994) DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bioessays* **16**(11):833-839.
- Kawamitsu H, Hoshino H, Okada H, Miwa M, Momoi H and Sugimura T (1984) Monoclonal antibodies to poly(adenosine diphosphate ribose) recognize different structures. *Biochemistry* **23**(16):3771-3777.
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**(4):239-257.
- Kim K, Biade S and Matsumoto Y (1998) Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. *J Biol Chem* **273**(15):8842-8848.
- Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S, Nakamura A, Morishima K, Matsuura S, Kobayashi T, Tamai K, Tanimoto K and Komatsu K (2002) NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol* **12**(21):1846-1851.

- Kraakman-van der Zwet M, Overkamp WJ, Friedl AA, Klein B, Verhaegh GW, Jaspers NG, Midro AT, Eckardt-Schupp F, Lohman PH and Zdzienicka MZ (1999) Immortalization and characterization of Nijmegen Breakage syndrome fibroblasts. *Mutat Res* **434**(1):17-27.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B and Melino G (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**(1):3-11.
- Kuruvilla J (2009) Standard therapy of advanced Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:497-506.
- Lamarche BJ, Orazio NI and Weitzman MD (2010) The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett* **584**(17):3682-3695.
- Lavin MF (2008) Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(10):759-769.
- Lawen A (2003) Apoptosis-an introduction. *Bioessays* **25**(9):888-896.
- Lee JH and Paull TT (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**(5721):551-554.
- Lee JW, Yannone SM, Chen DJ and Povirk LF (2003) Requirement for XRCC4 and DNA ligase IV in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in vitro. *Cancer Res* **63**(1):22-24.
- Lees NP, Harrison KL, Hill E, Hall CN, Povey AC and Margison GP (2002) Heterogeneity of O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in colorectal cancer: implications for treatment. *Oncology* **63**(4):393-397.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S and Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* **185**(8):1481-1486.
- Leppard JB, Dong Z, Mackey ZB and Tomkinson AE (2003) Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* **23**(16):5919-5927.
- Li GM and Modrich P (1995) Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(6):1950-1954.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES and Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**(4):479-489.
- Li Y and McClay EF (2002) Systemic chemotherapy for the treatment of metastatic melanoma. *Semin Oncol* **29**(5):413-426.

- Longley MJ, Pierce AJ and Modrich P (1997) DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *J Biol Chem* **272**(16):10917-10921.
- Maki M, Bagci H, Hamaguchi K, Ueda M, Murachi T and Hatanaka M (1989) Inhibition of calpain by a synthetic oligopeptide corresponding to an exon of the human calpastatin gene. *J Biol Chem* **264**(32):18866-18869.
- Margison GP, Povey AC, Kaina B and Santibanez Koref MF (2003) Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* **24**(4):625-635.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM and Green DR (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**(5):1545-1556.
- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J and de Murcia G (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* **18**(6):3563-3571.
- Matsumoto Y and Kim K (1995) Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* **269**(5224):699-702.
- Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K and Elledge SJ (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19):10389-10394.
- Matsuura S, Tauchi H, Nakamura A, Kondo N, Sakamoto S, Endo S, Smeets D, Solder B, Belohradsky BH, Der Kaloustian VM, Oshimura M, Isomura M, Nakamura Y and Komatsu K (1998) Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet* **19**(2):179-181.
- Meek K, Gupta S, Ramsden DA and Lees-Miller SP (2004) The DNA-dependent protein kinase: the director at the end. *Immunol Rev* **200**:132-141.
- Meikrantz W, Bergom MA, Memisoglu A and Samson L (1998) O6-alkylguanine DNA lesions trigger apoptosis. *Carcinogenesis* **19**(2):369-372.
- Menoyo A, Alazzouzi H, Espin E, Armengol M, Yamamoto H and Schwartz S, Jr. (2001) Somatic mutations in the DNA damage-response genes ATR and CHK1 in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. *Cancer Res* **61**(21):7727-7730.
- Modrich P and Lahue R (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* **65**:101-133.
- Moschos SJ, Dodd NR, Jukic DM, Fayewicz SL, Wang X and Becker D (2009) Suppressing the high-level expression and function of ATM in advanced-stage melanomas does not sensitize the cells to ionizing radiation. *Cancer Biol Ther* **8**(19):1815-1825.

- Mouawad R, Sebert M, Michels J, Bloch J, Spano JP and Khayat D (2010) Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *Crit Rev Oncol Hematol* **74**(1):27-39.
- Myrnes B, Norstrand K, Giercksky KE, Sjunneskog C and Krokan H (1984) A simplified assay for O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity and its application to human neoplastic and non-neoplastic tissues. *Carcinogenesis* **5**(8):1061-1064.
- Nakatsuru Y, Matsukuma S, Nemoto N, Sugano H, Sekiguchi M and Ishikawa T (1993) O6-methylguanine-DNA methyltransferase protects against nitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14):6468-6472.
- Naumann SC, Roos WP, Jost E, Belohlavek C, Lennerz V, Schmidt CW, Christmann M and Kaina B (2009) Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br J Cancer* **100**(2):322-333.
- Nicum SJ and O'Brien ME (2007) Topotecan for the treatment of small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* **7**(6):795-801.
- Nikolova T, Ensminger M, Loblrich M and Kaina B (2010) Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate. *DNA Repair (Amst)* **9**(10):1050-1063.
- O'Connor TR and Laval J (1989) Physical association of the 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli* and an activity nicking DNA at apurinic/aprimidinic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(14):5222-5226.
- O'Connor TR and Laval J (1991) Human cDNA expressing a functional DNA glycosylase excising 3-methyladenine and 7-methylguanine. *Biochem Biophys Res Commun* **176**(3):1170-1177.
- O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA and Goodship JA (2003) A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* **33**(4):497-501.
- Ochs K and Kaina B (2000) Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res* **60**(20):5815-5824.
- Ochs K, Lips J, Profittlich S and Kaina B (2002) Deficiency in DNA polymerase beta provokes replication-dependent apoptosis via DNA breakage, Bcl-2 decline and caspase-3/9 activation. *Cancer Res* **62**(5):1524-1530.
- Ostling O and Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **123**(1):291-298.

- Palombo F, Iaccarino I, Nakajima E, Ikejima M, Shimada T and Jiricny J (1996) hMutSbeta, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr Biol* **6**(9):1181-1184.
- Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD and et al. (1994) Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* **263**(5153):1625-1629.
- Pectasides D, Kamposioras K, Papaxoinis G and Pectasides E (2008) Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Cancer Treat Rev* **34**(7):603-613.
- Pegg AE (1990) Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res* **50**(19):6119-6129.
- Pegg AE (2000) Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* **462**(2-3):83-100.
- Penaloza C, Lin L, Lockshin RA and Zakeri Z (2006) Cell death in development: shaping the embryo. *Histochem Cell Biol* **126**(2):149-158.
- Peng LH, Chen XY and Wu TX (2008) Topotecan for ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*(2):CD005589.
- Petermann E, Ziegler M and Oei SL (2003) ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. *DNA Repair (Amst)* **2**(10):1101-1114.
- Pezza RJ, Voloshin ON, Vanevski F and Camerini-Otero RD (2007) Hop2/Mnd1 acts on two critical steps in Dmc1-promoted homologous pairing. *Genes Dev* **21**(14):1758-1766.
- Pfeifer GP (1997) Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem Photobiol* **65**(2):270-283.
- Pierce AJ, Hu P, Han M, Ellis N and Jasin M (2001) Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev* **15**(24):3237-3242.
- Plisiecka-Halasa J, Dansonka-Mieszkowska A, Rembiszewska A, Bidzinski M, Steffen J and Kupryjanczyk J (2002) Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) alterations and its protein (nibrin) expression in human ovarian tumours. *Ann Hum Genet* **66**(Pt 5-6):353-359.
- Preuss I, Eberhagen I, Haas S, Eibl RH, Kaufmann M, von Minckwitz G and Kaina B (1995) O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in breast and brain tumors. *Int J Cancer* **61**(3):321-326.
- Preuss I, Haas S, Eichhorn U, Eberhagen I, Kaufmann M, Beck T, Eibl RH, Dall P, Bauknecht T, Hengstler J, Wittig BM, Dippold W and Kaina B (1996) Activity of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human tumor and corresponding normal tissue. *Cancer Detect Prev* **20**(2):130-136.

- Proskuryakov SY and Gabai VL (2010) Mechanisms of tumor cell necrosis. *Curr Pharm Des* **16**(1):56-68.
- Quiros S, Roos WP and Kaina B (2010) Processing of O6-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. *Cell Cycle* **9**(1):168-178.
- Ramsay J, Birrell G, Baumann K, Boder A, Parsons P and Lavin M (1998) Radiosensitive melanoma cell line with mutation of the gene for ataxia telangiectasia. *Br J Cancer* **77**(1):11-14.
- Renart J, Reiser J and Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(7):3116-3120.
- Riedl SJ and Salvesen GS (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5):405-413.
- Roach HI and Clarke NM (2000) Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br* **82**(4):601-613.
- Robertson AB, Klungland A, Rognes T and Leiros I (2009) DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci* **66**(6):981-993.
- Robson CN and Hickson ID (1991) Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/aprimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res* **19**(20):5519-5523.
- Roesch A, Becker B, Bentink S, Spang R, Vogl A, Hagen I, Landthaler M and Vogt T (2007) Ataxia telangiectasia-mutated gene is a possible biomarker for discrimination of infiltrative deep penetrating nevi and metastatic vertical growth phase melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**(11):2486-2490.
- Roos W, Baumgartner M and Kaina B (2004) Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* **23**(2):359-367.
- Roos WP, Batista LF, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CF and Kaina B (2007) Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* **26**(2):186-197.
- Roos WP and Kaina B (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* **12**(9):440-450.
- Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Naumann SC, Kiedron O, Zdzienicka MZ and Kaina B (2009) Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair (Amst)* **8**(1):72-86.

- Rosenquist TA, Zharkov DO and Grollman AP (1997) Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14):7429-7434.
- Rupnik A, Grenon M and Lowndes N (2008) The MRN complex. *Curr Biol* **18**(11):R455-457.
- Saberi B, Shinohara M, Ybanez MD, Hanawa N, Gaarde WA, Kaplowitz N and Han D (2008) Regulation of H₂O₂-induced necrosis by PKC and AMP-activated kinase signaling in primary cultured hepatocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**(1):C50-63.
- Sagan D, Muller R, Kroger C, Hematulin A, Mortl S and Eckardt-Schupp F (2009) The DNA repair protein NBS1 influences the base excision repair pathway. *Carcinogenesis* **30**(3):408-415.
- San Filippo J, Sung P and Klein H (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77**:229-257.
- Sanli T, Rashid A, Liu C, Harding S, Bristow RG, Cutz JC, Singh G, Wright J and Tsakiridis T (2010) Ionizing radiation activates AMP-activated kinase (AMPK): a target for radiosensitization of human cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **78**(1):221-229.
- Sapkota GP, Deak M, Kieloch A, Morrice N, Goodarzi AA, Smythe C, Shiloh Y, Lees-Miller SP and Alessi DR (2002) Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. *Biochem J* **368**(Pt 2):507-516.
- Sapolsky RM, Trafton J and Tombaugh GC (1996) Excitotoxic neuron death, acidotic endangerment, and the paradox of acidotic protection. *Adv Neurol* **71**:237-244; discussion 244-235.
- Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J and Jackson SP (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**(7169):509-514.
- Saunders JW, Jr. (1966) Death in embryonic systems. *Science* **154**(749):604-612.
- Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS and Shiloh Y (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **268**(5218):1749-1753.
- Scaffidi P, Misteli T and Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**(6894):191-195.
- Scartozzi M, Galizia E, Verdecchia L, Berardi R, Antognoli S, Chiorrini S and Cascinu S (2007) Chemotherapy for advanced gastric cancer: across the years for a standard of care. *Expert Opin Pharmacother* **8**(6):797-808.

- Schaffner C, Idler I, Stilgenbauer S, Dohner H and Lichter P (2000) Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6):2773-2778.
- Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Dohner H and Lichter P (1999) Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **94**(2):748-753.
- Schattenberg JM, Galle PR and Schuchmann M (2006) Apoptosis in liver disease. *Liver Int* **26**(8):904-911.
- Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG and Bonner WM (2002) Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* **158**(4):486-492.
- Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA and Cantley LC (2004) The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10):3329-3335.
- Shi Y, Evans JE and Rock KL (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* **425**(6957):516-521.
- Shiloh Y (1997) Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet* **31**:635-662.
- Shin DS, Pellegrini L, Daniels DS, Yelent B, Craig L, Bates D, Yu DS, Shivji MK, Hitomi C, Arvai AS, Volkmann N, Tsuruta H, Blundell TL, Venkitaraman AR and Tainer JA (2003) Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *Embo J* **22**(17):4566-4576.
- Shiotani B and Zou L (2009) Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Mol Cell* **33**(5):547-558.
- Shrivastav M, De Haro LP and Nickoloff JA (2008) Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* **18**(1):134-147.
- Singhal RK and Wilson SH (1993) Short gap-filling synthesis by DNA polymerase beta is processive. *J Biol Chem* **268**(21):15906-15911.
- Smith GC and Jackson SP (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* **13**(8):916-934.
- Sobol RW, Horton JK, Kuhn R, Gu H, Singhal RK, Prasad R, Rajewsky K and Wilson SH (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature* **379**(6561):183-186.
- Southern PJ and Berg P (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* **1**(4):327-341.
- Specenier PM and Vermorken JB (2009) Current concepts for the management of head and neck cancer: chemotherapy. *Oral Oncol* **45**(4-5):409-415.

- Srivastava DK, Berg BJ, Prasad R, Molina JT, Beard WA, Tomkinson AE and Wilson SH (1998) Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J Biol Chem* **273**(33):21203-21209.
- Srivenugopal KS, Yuan XH, Friedman HS and Ali-Osman F (1996) Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry* **35**(4):1328-1334.
- Steer CB (2009) Chemotherapy for ovarian cancer in the older adult. *Curr Treat Options Oncol* **10**(3-4):159-170.
- Stojic L, Brun R and Jiricny J (2004) Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9):1091-1101.
- Stucki M, Pascucci B, Parlanti E, Fortini P, Wilson SH, Hubscher U and Dogliotti E (1998) Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene* **17**(7):835-843.
- Sulston JE and Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **56**(1):110-156.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG and Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**(1):64-119.
- Sun Y, Connors KE and Yang DQ (2007) AICAR induces phosphorylation of AMPK in an ATM-dependent, LKB1-independent manner. *Mol Cell Biochem* **306**(1-2):239-245.
- Suto MJ, Turner WR, Arundel-Suto CM, Werbel LM and Sebolt-Leopold JS (1991) Dihydroisoquinolinones: the design and synthesis of a new series of potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Anticancer Drug Des* **6**(2):107-117.
- Suzuki A, Kusakai G, Kishimoto A, Shimojo Y, Ogura T, Lavin MF and Esumi H (2004) IGF-1 phosphorylates AMPK-alpha subunit in ATM-dependent and LKB1-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **324**(3):986-992.
- Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, van Gent DC, Shiraishi T, Verkaik NS, vanHeems D, Ito E, Nakamura A, Sonoda E, Takata M, Takeda S, Matsuura S and Komatsu K (2002) Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* **420**(6911):93-98.
- The-Nijmegen-Breakage-Syndrome-Study-Group (2000) Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. *Arch Dis Child* **82**(5):400-406.
- Thelestam M and Frisan T (2004) Cytolethal distending toxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**:111-133.
- Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C and Abraham RT (1999) A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* **13**(2):152-157.

- Tominaga Y, Tsuzuki T, Shiraishi A, Kawate H and Sekiguchi M (1997) Alkylation-induced apoptosis of embryonic stem cells in which the gene for DNA-repair, methyltransferase, had been disrupted by gene targeting. *Carcinogenesis* **18**(5):889-896.
- Tong WP, Kirk MC and Ludlum DB (1982) Formation of the cross-link 1-[N3-deoxycytidyl),2-[N1-deoxyguanosinyl]ethane in DNA treated with N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Cancer Res* **42**(8):3102-3105.
- Toorchen D and Topal MD (1983) Mechanisms of chemical mutagenesis and carcinogenesis: effects on DNA replication of methylation at the O6-guanine position of dGTP. *Carcinogenesis* **4**(12):1591-1597.
- Tribius S, Pidel A and Casper D (2001) ATM protein expression correlates with radioresistance in primary glioblastoma cells in culture. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **50**(2):511-523.
- Truman JW (1984) Cell death in invertebrate nervous systems. *Annu Rev Neurosci* **7**:171-188.
- Tsuchida R, Yamada T, Takagi M, Shimada A, Ishioka C, Katsuki Y, Igarashi T, Chessa L, Delia D, Teraoka H and Mizutani S (2002) Detection of ATM gene mutation in human glioma cell line M059J by a rapid frameshift/stop codon assay in yeast. *Radiat Res* **158**(2):195-201.
- Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, Kroemer G and Zitvogel L (2008) Tumor stress, cell death and the ensuing immune response. *Cell Death Differ* **15**(1):21-28.
- Umar A and Kunkel TA (1996) DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur J Biochem* **238**(2):297-307.
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T and Kroemer G (2010) Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(10):700-714.
- Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N and Vandenabeele P (2008) Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med* **8**(3):207-220.
- Varon R, Reis A, Henze G, von Einsiedel HG, Sperling K and Seeger K (2001) Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res* **61**(9):3570-3572.
- Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanova E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P and Reis A (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* **93**(3):467-476.
- Vassileva V, Millar A, Briollais L, Chapman W and Bapat B (2002) Genes involved in DNA repair are mutational targets in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* **62**(14):4095-4099.

- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**(1):39-51.
- Vidal AE, Boiteux S, Hickson ID and Radicella JP (2001) XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *Embo J* **20**(22):6530-6539.
- Vorechovsky I, Luo L, Dyer MJ, Catovsky D, Amlot PL, Yaxley JC, Foroni L, Hammarstrom L, Webster AD and Yuille MA (1997) Clustering of missense mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukaemia. *Nat Genet* **17**(1):96-99.
- Watanabe T, Nobusawa S, Lu S, Huang J, Mittelbronn M and Ohgaki H (2009) Mutational inactivation of the nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in glioblastomas is associated with multiple TP53 mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**(2):210-215.
- Wei YF, Robins P, Carter K, Caldecott K, Pappin DJ, Yu GL, Wang RP, Shell BK, Nash RA, Schar P and et al. (1995) Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination. *Mol Cell Biol* **15**(6):3206-3216.
- Wilson DM, 3rd and Barsky D (2001) The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res* **485**(4):283-307.
- Woodhouse BC and Dianov GL (2008) Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. *DNA Repair (Amst)* **7**(7):1077-1086.
- Wu X, Li J, Li X, Hsieh CL, Burgers PM and Lieber MR (1996) Processing of branched DNA intermediates by a complex of human FEN-1 and PCNA. *Nucleic Acids Res* **24**(11):2036-2043.
- Wyatt MD and Pittman DL (2006) Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol* **19**(12):1580-1594.
- Wyllie AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**(5756):555-556.
- Xie A, Kwok A and Scully R (2009) Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat Struct Mol Biol* **16**(8):814-818.
- Xu-Welliver M and Pegg AE (2002) Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* **23**(5):823-830.
- Yafi FA, North S and Kassouf W (2011) First- and second-line therapy for metastatic urothelial carcinoma of the bladder. *Curr Oncol* **18**(1):e25-34.

- Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka T and Kominami E (1998) Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. *Eur J Neurosci* **10**(5):1723-1733.
- Yannone SM, Khan IS, Zhou RZ, Zhou T, Valerie K and Povirk LF (2008) Coordinate 5' and 3' endonucleolytic trimming of terminally blocked blunt DNA double-strand break ends by Artemis nuclease and DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Res* **36**(10):3354-3365.
- Yoshioka K, Yoshioka Y and Hsieh P (2006) ATR kinase activation mediated by MutSalpha and MutLalpha in response to cytotoxic O6-methylguanine adducts. *Mol Cell* **22**(4):501-510.
- You Z and Bailis JM (2010) DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends Cell Biol* **20**(7):402-409.
- You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T and Russell P (2005) ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* **25**(13):5363-5379.
- Youle RJ and Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1):47-59.
- Yu X and Baer R (2000) Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor. *J Biol Chem* **275**(24):18541-18549.
- Zhang WB, Wang Z, Shu F, Jin YH, Liu HY, Wang QJ and Yang Y (2010) Activation of AMP-activated protein kinase by temozolomide contributes to apoptosis in glioblastoma cells via p53 activation and mTORC1 inhibition. *J Biol Chem* **285**(52):40461-40471.
- Zhang Y, Hefferin ML, Chen L, Shim EY, Tseng HM, Kwon Y, Sung P, Lee SE and Tomkinson AE (2007) Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* **14**(7):639-646.
- Zhao H and Piwnicka-Worms H (2001) ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* **21**(13):4129-4139.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ and Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* **108**(8):1167-1174.
- Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ and Thompson CB (2004) Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev* **18**(11):1272-1282.

Liste der Publikationen

Eich M, Roos WP, Dianov GL, Digweed M and Kaina B (2010), **Nijmegen breakage syndrome protein (NBN) causes resistance to methylating anticancer drugs such as temozolomide.** *Molecular Pharmacology*, 78, 943-51.

Eich M, Roos WP, Fritz G and Kaina B, **ATM deficiency causes cell death execution by necrosis.** In Vorbereitung

Publizierte Abstracts

Eich M, Roos WP and Kaina B (2008), **Lack of functional NBS-1 leads to an increased induction of necrosis in human fibroblasts and lymphoblastoid cells after treatment with alkylating agents.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 377, 392

Eich M, Roos WP, Digweed M and Kaina B (2009), **Role of Nijmegen breakage syndrome protein (NBN) in DNA signaling and cytotoxicity.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 379, 380

Eich M, Roos WP, Fritz G and Kaina B (2010), **ATM deficiency leads to hypersensitivity and cell death execution via necrosis following genotoxic insult.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 381, 336

Kongressteilnahmen

Passive Teilnahmen

2. Internationale Konferenz zu MGMT & alkylierende Zytostatika-Resistenz, Juni 2007, Mainz, Deutschland

10. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS), Oktober 2007, Mainz, Deutschland

Symposium der DFG-Forschergruppe 527 "Suszeptibilitätsfaktoren der Tumorgenese", Mai 2010, Mainz, Deutschland

Teilnahmen mit Posterpräsentationen

49. Frühjahrstagung der DGPT, März 2008, Mainz, Deutschland

Titel: Lack of functional NBS-1 leads to an increased induction of necrosis in human fibroblasts and lymphoblastoid cells after treatment with alkylating agents

Internationaler ICAS/ApopTrain Trainingskurs, Fortschritte in der Zelltodforschung – Von fundamentalen Prinzipien zu neuen therapeutischen Konzepten, Juli 2008, Günzburg, Deutschland

Titel: NBS-1 defective human cells are hypersensitive to methylating agents due to defective recognition of DNA double-strand breaks arising during the processing of O⁶-methylguanine and this hypersensitivity is executed via necrosis

2. Deutsch-Französisches DNA-Reparatur-Treffen – DNA-Schädigung und -Reparatur in Alterung und degenerative Krankheiten, September 2009, Konstanz, Deutschland

Titel: NBN deficiency leads to an increased cell sensitivity following MNNG treatment without affecting base excision repair

51. Frühjahrstagung der DGPT, März 2010, Mainz, Deutschland

Titel: ATM deficiency leads to hypersensitivity and necrotic cell death following genotoxic insult

11. Tagung der DGDR, September 2010, Jena, Deutschland

Titel: Influence of Nijmegen breakage syndrome protein (NBN) on cell death induction and necrosis regulation caused by methylating agents

25. GUM-Tagung, Lebensmittel: Genotoxische Inhaltsstoffe, Metabolismus & Biomarker, Oktober 2010, Potsdam, Deutschland

Titel: Influence of NBN and ATM on cellular protection against alkylating agent induced toxicity

Teilnahmen mit Vorträgen

10. Tagung der DGDR, September 2008, Berlin, Deutschland

Titel: NBS-1 defective human cells are hypersensitive to methylating agents due to defective recognition of DNA double-strand breaks

50. Frühjahrstagung der DGPT, März 2009, Mainz, Deutschland

Titel: Role of Nijmegen breakage syndrome protein (NBN) in DNA signaling and cytotoxicity