

# **Alkylantien induzierte Zytotoxizität, DNA-schadensinduzierte Reparaturkapazität und Apoptoseinduktion von Immunzellen**

D i s s e r t a t i o n  
Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

vorgelegt von  
Manuela Briegert  
geb. in Eisenhüttenstadt

Mainz, 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Zellen des Immunsystems – Haematopoese.....	1
1.2	Generierung von Dendritischen Zellen und ihre Funktion.....	3
1.3	Verwendung von Dendritischen Zellen in der Immuntherapie und Kombination mit Chemotherapie .....	6
1.4	DNA-Reparaturmechanismen.....	7
1.4.1	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) .....	8
1.4.2	Basenexzisionsreparatur (BER).....	10
1.5	Apoptose.....	13
1.6	Fragestellung .....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1	Chemikalien .....	17
2.2	Geräte .....	18
2.3	„Kits“ .....	19
2.4	Verbrauchsmaterialien .....	20
2.5	Humane Antikörper .....	20
2.6	Synthetische Oligonukleotide .....	21
2.7	Zellkulturmedien .....	22
2.8	Zytokine .....	23
2.9	Adhärente Zelllinien .....	23
2.10	Puffer .....	24
2.11	Zellkulturarbeiten .....	25
2.11.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	25
2.11.2	Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut .....	25
2.11.3	Anreicherung von Monozyten aus PBMCs .....	26
2.11.4	Generierung von Dendritischen Zellen aus humanen Monozyten .....	26
2.11.5	Generierung von Makrophagen aus humanen Monozyten.....	27
2.11.6	Isolierung von CD34 <sup>+</sup> Stammzellen aus Nabelschnurblut .....	27
2.11.7	Generierung von Langerhanszellen aus CD34 <sup>+</sup> Stammzellen.....	28
2.12	Phänotypcharakterisierung .....	29
2.13	Zytotoxizitätsuntersuchungen .....	29
2.13.1	Koloniebildungstest.....	29
2.13.2	Bestimmung metabolischer Zellaktivität.....	30

2.13.3	Vitalitätsermittlung durch Trypan-Blau Detektion.....	30
2.13.4	Bestimmung der Apoptosefrequenz durch Sub-G1-Messung .....	30
2.14	Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mittels Einzelzellgel-elektrophorese (SCGE; „Comet-Assay“).....	31
2.14.1	Neutrale Einzelzellgelelektrophorese.....	31
2.14.2	Alkalische Einzelzellgelelektrophorese .....	31
2.15	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	32
2.15.1	Konzentrationsbestimmungen .....	32
2.15.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	32
2.15.3	Untersuchung der Genexpression .....	33
2.15.3.1	RNA-Isolation .....	33
2.15.3.2	Reverse Transkription .....	33
2.15.3.3	Semiquantitative RT-PCR .....	34
2.15.3.4	Quantitative RT-PCR .....	34
2.15.4	Methylierungsspezifische PCR (MSP).....	34
2.15.4.1	Isolierung genomischer DNA .....	35
2.15.4.2	Bisulfit Modifikation .....	35
2.15.4.3	PCR.....	36
2.16	Untersuchung der Proteinexpression .....	36
2.16.1	Präparation von Gesamtzellproteinen.....	36
2.16.2	Präparation von Zellkernproteinen.....	37
2.16.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach <i>Bradford</i> .....	37
2.16.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach <i>Lowry</i> .....	37
2.16.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	38
2.16.6	Western-Blot .....	38
2.17	Gelretardationsexperiment (EMSA).....	39
2.17.1	Präparation von Kernextrakten für EMSA.....	39
2.17.2	Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden.....	39
2.17.3	EMSA-Assay.....	40
2.18	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Aktivitätstest.....	40
2.19	Apurine Endonuklease 1 (APE1)-Aktivitätstest.....	41
2.19.1	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden für den APE1-Aktivitätstest.....	41
2.19.2	Erzeugung und Stabilisierung einer apurinen (AP) Stelle.....	41
2.19.3	APE1-Aktivitätstest .....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
3.1	Generierung von Monozyten-abgeleiteten DC aus PBMC mittels Zytokine .....	43
3.2	Phänotypcharakterisierung von Monozyten, unausgereiften und ausgereiften DC .....	44

3.3	Ermittlung der MGMT Aktivität in Monozyten, <i>in vitro</i> generierten iDC und mDC, sowie in Lymphozyten .....	45
3.4	Protein- und Genexpression von MGMT in Monozyten und DC.....	46
3.5	Untersuchung der MGMT Promotormethylierung in Monozyten, iDC, mDC, Lymphozyten und CD34 <sup>+</sup> Stammzellen .....	47
3.6	Regulation der <i>mgmt</i> Genexpression durch den Transkriptionsfaktor AP-1.....	48
3.7	Auswirkungen der Zytokine GM-CSF und IL-4, sowie der Monozytenanreicherung per MACS auf die MGMT Proteinexpression.....	48
3.8	Protein- und Genexpression weiterer DNA-Reparaturproteine.....	49
3.9	Sensitivität von Monozyten und iDC gegenüber Alkylantien .....	52
3.10	Sensitivität von Monozyten und iDC gegenüber DNA interkalierenden Verbindungen (‘Cross-linker’) und oxidativem Stress .....	53
3.11	Einfluss von MGMT auf die Sensitivität der Monozyten und iDC nach Alkylantienbehandlung.....	54
3.12	Alkylantien-induzierte Apoptose in Monozyten und iDC, sowie der Vergleich zu Lymphozyten .....	55
3.13	SSBs Reparatur in Monozyten und iDC nach Alkylantienbehandlung .....	57
3.14	Expression an der Basenexzisionsreparatur (BER) beteiligter Proteine.....	58
3.15	Genexpression der BER .....	60
3.16	APE-1 Aktivität in Monozyten und iDC .....	61
3.17	XRCC1 und Lig III $\alpha$ Proteinexpression in Zytokin-behandelten Monozyten, sowie der Vergleich unbehandelter Monozyten mit PBLC .....	62
3.18	Sensitivität und Apoptose von XRCC1 pro- und defizienten CHO Zellen nach MMS Behandlung.....	63
3.19	Untersuchung von zellulären DNA-schadensinduzierten apoptotischen Signaltransduktionswegen nach MNNG-Behandlung in Monozyten und iDC .....	64
3.19.1	Caspasen-Aktivierung nach MNNG-Behandlung in Monozyten und iDC .....	64
3.19.2	Proteinexpression von Bcl-2 und Bax, sowie Genexpression von <i>fasR</i> und <i>fasL</i> nach MNNG-Behandlung.....	65
3.20	Sensitivität von Monozyten, iDC und PBLC gegenüber Methylphenidat.....	66
3.21	Generierung von Langerhans-Zellen (LHC) aus expandierten CD34 <sup>+</sup> Stammzellen aus Nabelschnurblut.....	67
3.22	Phänotypisierung von CD34 <sup>+</sup> Stammzellen aus Nabelschnurblut angereichert durch MACS .....	69
3.23	BER Genexpression in expandierten CD34 <sup>+</sup> Stammzellen versus iLHC.....	70
3.24	Sensitivität expandierter CD34 <sup>+</sup> Stammzellen aus Nabelschnurblut versus nichtproliferierender iDC aus PBMC gegenüber MNNG, Fotemustin und Cisplatin	71

3.25	BER-Reparaturkapazität nach MNNG-Behandlung, sowie XRCC1 und Lig III $\alpha$ Proteinexpression in CD34 <sup>+</sup> Stammzellen aus der Leukopherese eines Patienten .	72
3.26	DNA-Reparatur und Apoptoseuntersuchung in expandierten versus nichtexpandierten T-Lymphozyten nach Alkylantienbehandlung.....	73
3.27	Generierung von Makrophagen aus Monozyten und deren Proteinexpression von XRCC1 und Lig III $\alpha$ .....	74
3.28	Untersuchung der Apoptose in Makrophagen nach Temozolomid und MNNG Behandlung.....	75
3.29	Auswirkung von Topoisomeraseinhibitoren in Abhängigkeit von p53.....	76
3.29.1	Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Etoposid und Einfluss von Pifithrin auf die SSB Bildung in p53 wt und knockout Mausfibroblasten.....	76
3.29.2	Sensitivität, Apoptose/Nekroseuntersuchungen und SSBs Bildung von Topotecan bei wt und p53 defizienten Mausfibroblasten.....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>79</b>
4.1	Expression von DNA-Reparaturproteinen in Monozyten und deren <i>in vitro</i> generierten DC .....	79
4.1.1	MGMT Expression und Regulation in Monozyten und den daraus abgeleiteten DC.....	79
4.1.2	Expression weiterer DNA-Reparaturproteine in Monozyten und DCs .....	81
4.2	Sensitivität und Apoptoseinduktion von Monozyten, DC, PBLC und CD34 <sup>+</sup> Stammzellen und Makrophagen nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien .....	82
4.3	BER-Reparaturkapazität und -Proteinexpression in Monozyten, DC, PBLC und CD34 <sup>+</sup> Stammzellen.....	85
4.4	Alkylantien induzierte DSBs und Apoptose in proliferierenden versus nichtproliferierenden Lymphozyten .....	86
4.5	Wirkung von Topoisomeraseinhibitoren in Abhängigkeit von p53 .....	87
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>104</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	104
7.2	Tabellenverzeichnis .....	108
7.3	Publikationen .....	109
7.4	Tagungsbeiträge.....	110

## Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AP-Stelle	apurine/apyrimidine Stelle
ATP	Adenosin-5`-Triphosphat
Bax	„Bcl-2 associated protein X“
Bcl-2	„B cell lymphoma 2“ / „B cell leukemia 2“
BER	Basenexzisionsreparatur
Bez.	Bezeichnung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAD	caspase activated DNase
Caspase	Cystein-abhängige, Aspartat-spezifische Caspasen
CBMCs	cord blood mononuclear cells
CD	cluster of differentiation
Ci	Curie
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
DC	Dendritic cells, Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSBs	Doppelstrangbrüche
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Elektrophoretic Mobility Shift Assay
ERK2	extracellular signal receptor regulated kinase 2
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f	femto
FACS	fluorescence activated cell sorter
FasR/CD95R	Fas/CD95-Rezeptor

FBS	fetal bovine serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde oder human
HCl	Salzsäure
HR	homologe Rekombination
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iDC	unreife (immature) DC
J	Joule
k	kilo
KCl	Kaliumchlorid
KBp	Kilobasenpaar(e)
KDa	Kilodalton
l	Liter
Lig	Ligase
LMP-Agarose	<i>low melting point</i> Agarose (Agarose mit niederem Schmelzpunkt)
m	milli
M	molar
mA	Miliamper
MACS	magneting cell sorter
mDC	reife (mature) DC
MHC	“major histocompatibility complex”
ml	Mililiter
MeOH	Methanol
min	Minute
μl	Mikroliter
m	methyliert
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MMR	Mismatch Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
n	nano

n	nested
NaC	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaOH	Natronlauge
NER	Nukleotisexzisionsreparatur
NHJ	non homologous end joining
NP-40	Nonidet P-40
NTPs	Nukleosidtriphosphate
O <sup>6</sup> -MeG	O <sup>6</sup> -Methylguanin
OTM	olive tail moment
PAA	Polyacrylamid (38%) / Bispolyacrylamid (2%)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribosyl)-Polymerase
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCNA	proliferatin cell nuclear antigen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PGE	Prostaglandin E
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	T4-Polynukleotid-Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	real-time PCR
s	Sekunde
SCE	Schwesterchromatidenaustausch
SCGE	Einzelzellgelelektrophorese
SDS	Natrium(Sodium)dodecylsulfat
SSBs	Einzelstrangbrüche
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor

## Abkürzungen

---

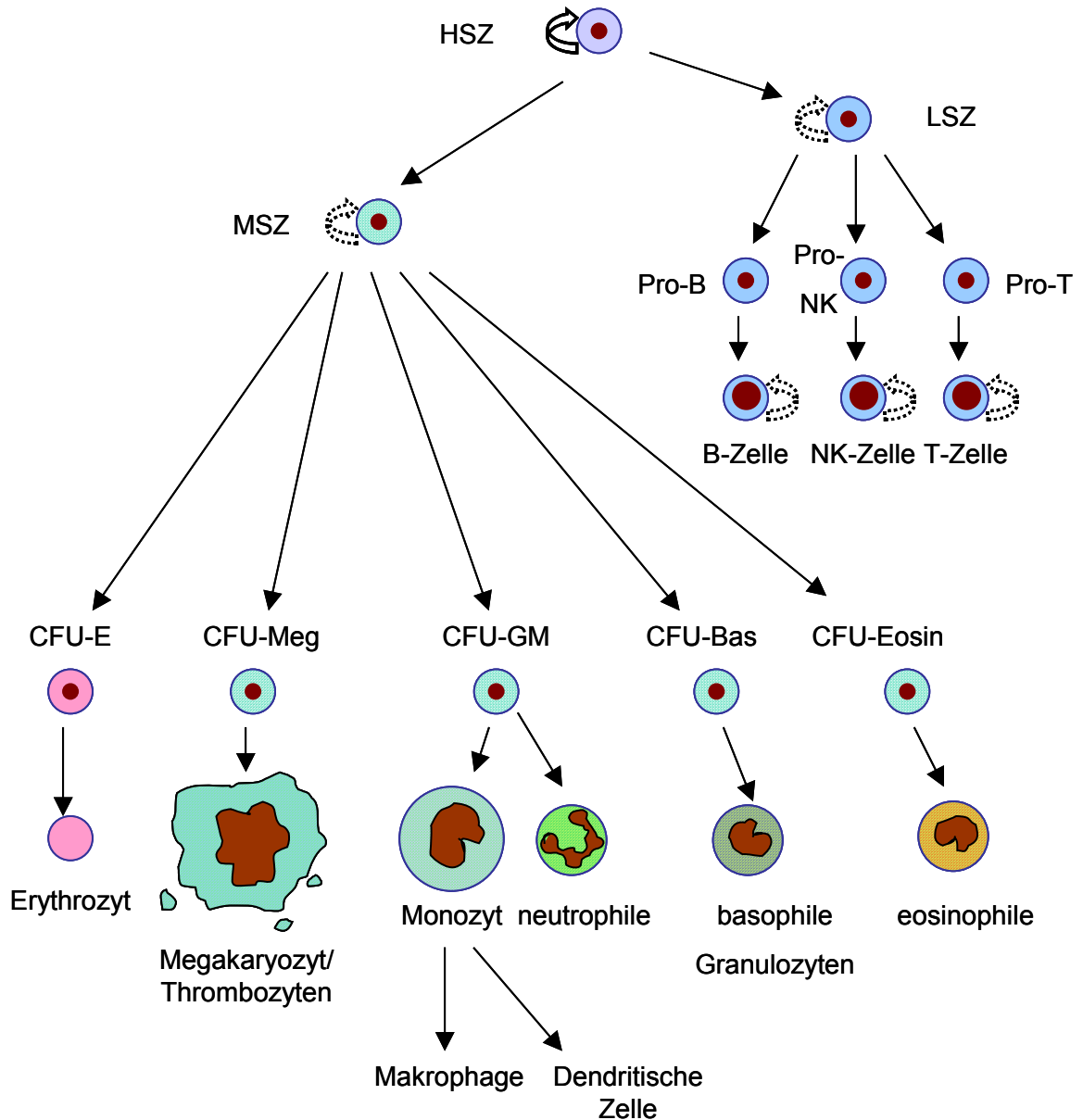
Treg	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris - (hydroxymethyl)-aminoethan
um	unmethyliert
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
UV-A	Ultraviolette Strahlung der Wellenlänge 320-400 nm
UV-B	Ultraviolette Strahlung der Wellenlänge 290-320 nm
UV-C	Ultraviolette Strahlung der Wellenlänge 200-290 nm
V	Volt
Vol	Volumen
wt	Wildtyp
XP	Xeroderma pigmentosum
XRCC1	X-ray repair cross complementing protein 1
üN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 Zellen des Immunsystems – Haematopoese

Die Zellen des Immunsystems haben die Aufgabe, Krankheitserreger zu erkennen und zu eliminieren. Immunzellen zirkulieren im Blut und in Lymphgefäßen und kommen ebenso im Gewebe vor. Sie weisen eine kurze Lebensdauer auf und müssen stets aus einer pluripotenten Stammzelle neu gebildet werden. Die sogenannte Hämatopoese bezeichnet die Bildung und Reifung der Bestandteile des Blutes und des Immunsystems (siehe dazu Abb. 1.1). Eine pluripotente, hämatopoetische Stammzelle (HSZ) besitzt die Fähigkeit, sich selbst zu amplifizieren oder sich in eine Progenitorzelle der lymphoiden oder myeloiden Reihe zu differenzieren. Diese Prozesse werden durch Wachstumsfaktoren und Zytokinen reguliert (DiJulio, 1991). Bei der Lymphopoese geht aus einer hämatopoetischen Stammzelle eine lymphoide Stammzelle (LSZ) hervor, welche sich weiter zu Pro-Vorläuferzellen differenziert, aus der dann weiter T-, B- oder NK-Zellen generiert werden können. Diese Zellen erfüllen ihre Aufgabe in der Immunabwehr. Während die Lymphopoese bei den T-Zellen im Thymus und bei den B-Zellen im Lymphknoten oder in der Milz stattfindet, erfolgt die Myelopoese ausschliesslich im Knochenmark. Hierbei entstehen aus der myeloiden Vorläuferzelle (MSZ) weitere Vorläuferzellen, welche sich zu Zellkolonien zusammenlagern und daher als ‚colony-forming units‘ CFU bezeichnet werden. Durch Zytokin-gerichtete Differenzierung und Reifung der CFU-Progenitorzellen entstehen Erythrozyten, Megakaryozyten und deren abgeleiteten Thrombozyten, Granulozyten oder Monozyten. Erythrozyten stellen den häufigsten Zelltyp im Blut dar, dessen Aufgabe in der Sauerstoffversorgung und dem Abtransport von Kohlendioxid liegt. Megakaryozyten sind große Zellen mit einem polyploiden Kern. Aus zytoplasmatischen Abschnürungen der Megakaryozyten entstehen kernlose Thrombozyten, welche bei der Blutgerinnung eine Rolle spielen. Die Granulozyten enthalten viele Lysosomen und sekretorische Vesikel und lassen sich in drei Klassen einteilen. Neutrophile gehören zu den am häufigsten vorkommenden Granulozytentyp, dessen Funktion in der Phagozytose von Mikroben infizierten Zellen liegt. Eosinophile enthalten in der Granula basische Proteine und lassen sich durch Eosin rot anfärben. Diese Zellen sind an der zellulären Immunabwehr und Parasitenabwehr beteiligt und spielen bei Asthma und Allergien eine Rolle. Basophile stellen den geringsten vorkommenden Granulozytentyp im Blut dar und enthalten in der Granula Histamine und Heparin, vermitteln Entzündungs- und allergische Reaktionen und sind bei der Abwehr von Parasiten beteiligt. Monozyten zirkulieren im Blut und sind Vorläufer von Makrophagen und

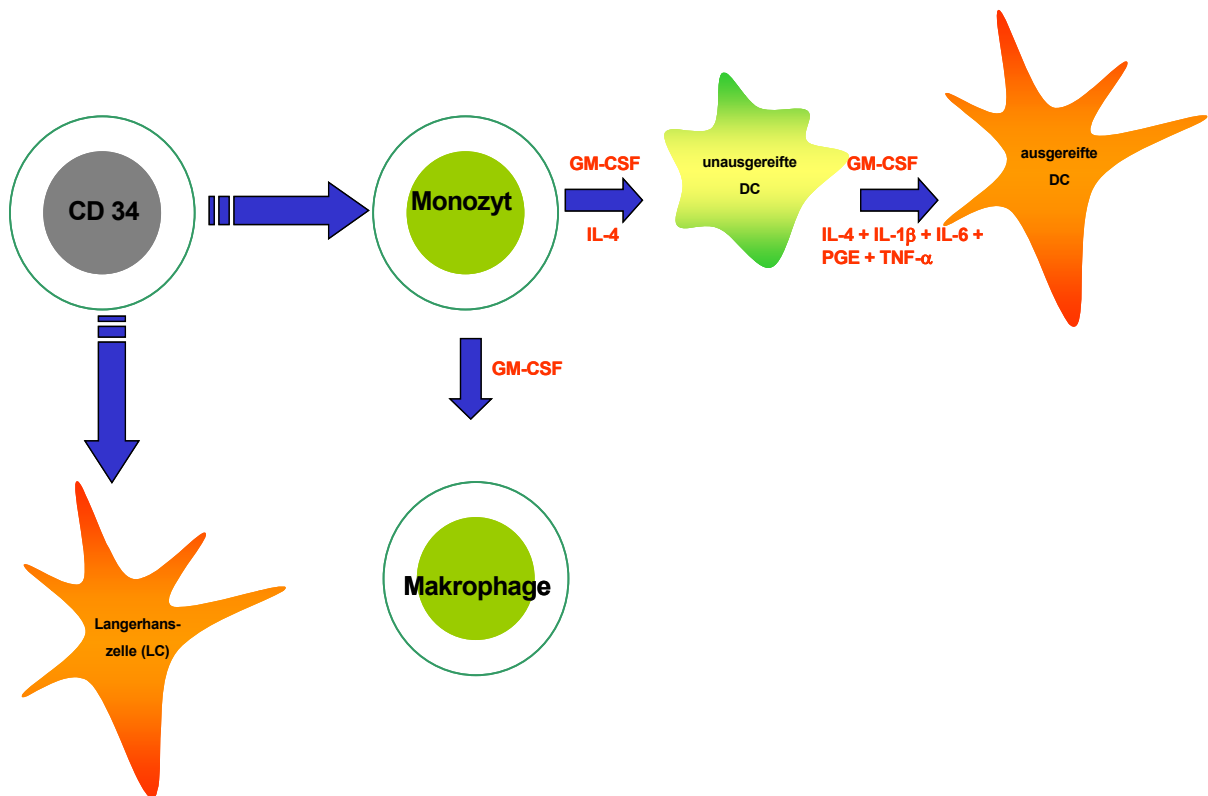
DC. Makrophagen sind Fresszellen und dienen der Beseitigung von Mikroorganismen und apoptotischen Zellen durch Phagozytose. Durch die Aufnahme und Prozessierung des Antigens an die Zelloberfläche können sekundär weitere Zellen des Immunsystems, wie T- und B-Zellen im Lymphknoten oder in der Milz aktiviert werden. DC sind antigenpräsentierende Zellen, deren Funktion in der Aktivierung weiterer reaktiver Immunzellen liegt, welches näher in nächsten Abschnitt beschrieben wird.



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Hämatopoese.** Aus einer hämatopoetischen Stammzelle (HSZ) können lymphoide (LSZ) oder myeloide (MSZ) Stammzellen hervorgehen, aus denen wiederum weitere Vorläuferzellen (CFU, colony forming unit) entstehen, In der myeloiden Zellentwicklung können aus der entsprechenden Progenitorzelle Erythrozyten, Megakaryozyten, Thrombozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Monozyten und neutrophile, basophile, eosinophile Granulozyten hervorgehen. In der lymphoiden Zellentwicklung können sich B-, NK- und T- Zellen bilden, die wie die HSZ, MSZ und LSZ die Fähigkeit zur Zellteilung besitzen.

## 1.2 Generierung von Dendritischen Zellen und ihre Funktion

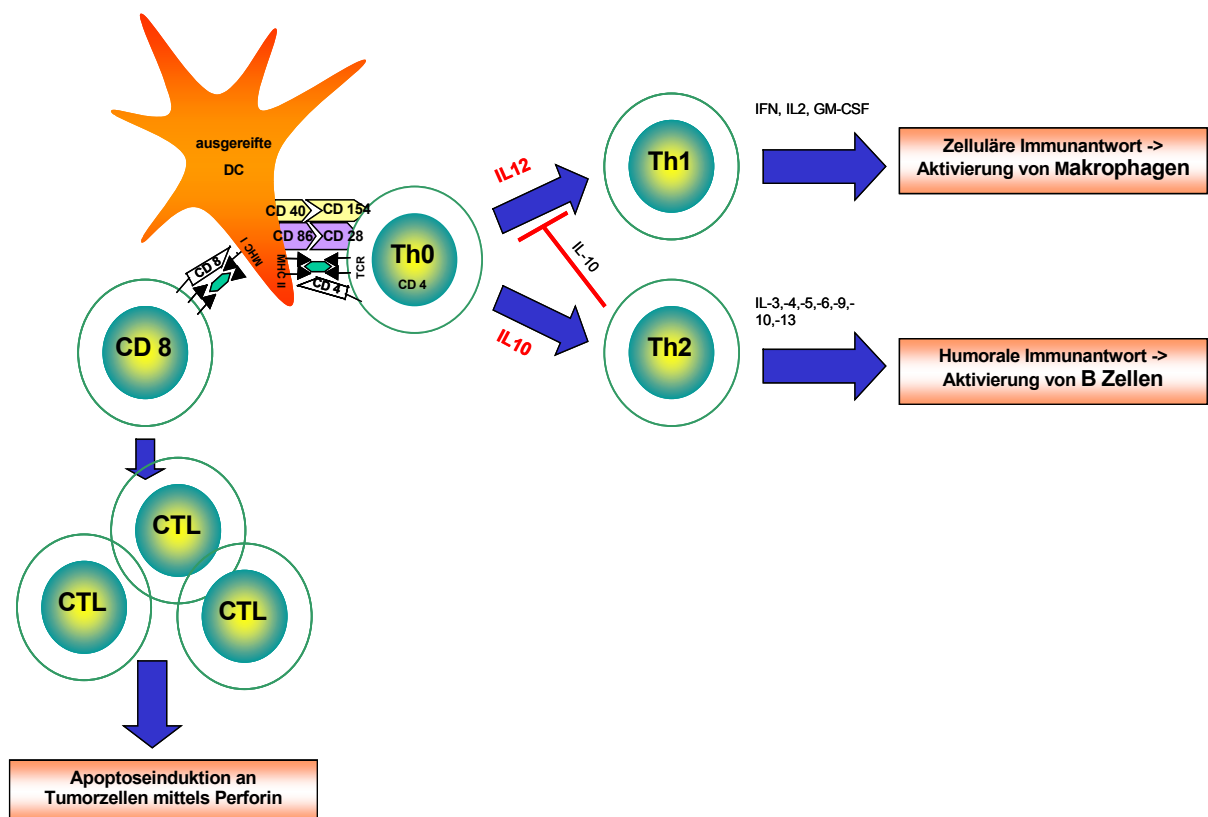
Dendritische Zellen (DC) stellen Wächterzellen des Immunsystems dar, welche gezielt Immunantworten initiieren oder modulieren können (Banchereau and Steinman, 1998). Im Jahre 1868 entdeckte Paul Langerhans in der Haut Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern, welche nach ihm benannt wurden. Erst 1973 wurden Dendritische Zellen von Steinman und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben und nach dem charakteristischen Erscheinungsbild mit astförmigen Ausläufern (griech.: dendros = Baum) benannt (Steinman and Cohn, 1973). Die Funktion der Dendritischen Zellen wurde erst Jahre später aufgeklärt (Steinman and Witmer, 1978). Heute unterscheidet man verschiedene Typen von DC, welche alle aus einer pluripotenten CD34 Stammzelle hervorgehen, aber unterschiedliche Differenzierungswege aufweisen (Shortman and Naik, 2007). Die plasmatoide Dendritische Zelle geht aus dem lymphoiden Entwicklungsweg hervor und weist keine Dendriten auf, hat eine lange Lebensdauer und stellt eine zirkulierende Zelle dar, welche nach Aktivierung Interferon- $\alpha$  bildet (Liu et al., 2005; O'Keeffe et al., 2002). Interstitielle DC gehen aus der myeloiden Zellreihe aus einem nicht-inflammatorischen Monozyt hervor (Yrlid et al., 2006). Sie kommen im Interstitium der meisten Organe wie Herz, Leber, Niere, Pankreas, Darm, Haut, Urogenitaltrakt und Schilddrüse vor (Hart and Fabre, 1981). Langerhans Zellen (Fahrbach et al., 2007) liegen in der Haut und der Mukosa vor und zeichnen sich durch eine hohe Expression von Langerin, ein Oberflächenprotein, in der Birbeck-Granula aus (Shortman and Naik, 2007). Die Lebensdauer einer LC in der Maushaut beträgt mehr als 3 Wochen (Kamath et al., 2002). LC gehen *in vivo* aus der myeloiden Reihe hervor und können *in vitro* aus CD34<sup>+</sup> Stammzellen aus dem Nabelschnurblut generiert werden. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Monozyten-abgeleitete DC verwendet. Somit sind diese DC myeloiden Ursprung und kommen im peripheren Gewebe vor. Die *in vitro* Generierung von DC aus Monozyten ist in der Abbildung 1.2 dargestellt und wird im folgenden Text genauer erklärt. Dendritische Zellen werden aus Monozyten aus dem peripheren Blut zunächst zu unreifen DC mittels der Zytokine GM-CSF und IL-4 generiert (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Während GM-CSF die Expression von Oberflächenmarkern stimuliert, inhibiert IL-4 die Expression von CD14, welches zur Suppression der Makrophagendifferenzierung führt (Jansen et al., 1989). Zur Ausreifung werden noch zusätzlich proinflammatorische Zytokine benötigt, wie IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE und TNF- $\alpha$  (Jonuleit et al., 1997). Mit der Ausreifung der Monozyten-abgeleiteten DC werden auch die Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 hochreguliert, welche zur Phänotypisierung per FACS verwendet werden (Aiba, 1998). Zur Generierung von Makrophagen werden Monozyten mit GM-CSF behandelt, was zu einer vermehrten Adhärenz von Makrophagen führt. Ebenso ist die Generierung von LC aus Stammzellen des Nabelschnurblutes möglich.



**Abb. 1.2: *In vitro* DC Generierung.** Aus CD34<sup>+</sup> Stammzellen gehen Monozyten hervor, welche entweder in unreife DC mittels GM-CSF und IL-4 oder in Makrophagen durch GM-CSF differenzieren können. Ausreifung der DC erfolgt durch IL-1β, IL-6, PGE und TNF-α. Langerhans-Zellen können direkt aus CD34<sup>+</sup> Stammzellen generiert werden.

Dendritische Zellen liegen als unreife Zellen im peripheren Gewebe vor, weisen eine geringe Ausbildung von Dendriten auf und besitzen die Aufgabe, Antigene aufzunehmen. Diese Aufnahme erfolgt mittels Makropinozytose, Endozytose oder Phagozytose (Xiang et al., 2006). Antigene werden intrazellulär prozessiert, an MHC-Moleküle gebunden und an die Zelloberfläche transportiert. Somit werden antigenische Determinanten für T-Zellen erkennbar gemacht. Durch Antigenaufnahme und inflammatorischen Zytokine werden die Reifung und die Migration unreifer DC vom peripheren Gewebe zum Lymphknoten induziert. Reife DC weisen keine Migration auf, zeigen eine verstärkte Ausbildung von Dendriten und stimulieren T-Zellen zur Proliferation, wie in Abb. 1.3 schematisch dargestellt ist. Die Interaktion einer DC mit T-Zellen wird durch die Bindung des T-Zellrezeptors an den MHC-Antigen-Komplex II stabilisiert und stellt das erste Signal für die T-Zellaktivierung dar. Ein weiteres kostimulatorisches Signal ist erforderlich, um die T-Zellproliferation zu ermöglichen. Dieses Signal wird durch die Interaktion von CD86 auf DC mit CD28 auf T-Zellen übermittelt. Eine

DC Zelle kann mit bis zu 3000 T-Zellen interagieren und diese Interaktion kann zwischen 15 Stunden bis zu 2 Tagen anhalten (Moser, 2004). Der MHC II –Antigen-Komplex interagiert mit einer naiven CD4 T-Zelle, einer T-Helferzelle, welche sich durch Einfluss von Zytokinen zu  $T_{h1}$  oder  $T_{h2}$  differenzieren kann.  $T_{h1}$  Zellen induzieren weiter über Zytokine Makrophagen und  $T_{h2}$  Zellen aktivieren B-Zellen. Der MHC I-Antigen-Komplex reagiert mit naiven CD8 Zellen, die zur Proliferation stimuliert werden und sich zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren, welche die Apoptose der Tumorzelle oder mikrobiell befallene Zellen induzieren. Die T-Zellaktivierung im Lymphknoten ist zeitlich begrenzt, da reife DC eine Lebensdauer von 3-4 Tagen auf weisen. Reife DC aktivieren ihren eigenen Tod durch Apoptose über Hochregulation der Expression eines pro-apoptischen Proteins der Bcl-2 Familie, Bim (Hou and Van Parijs, 2004), und der Herabregulation der Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 (Moser, 2004).

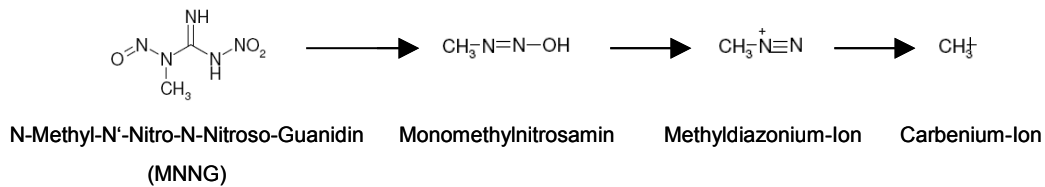


**Abb. 1.3: Funktion von DCs im Immunsystem.** Ausgereifte, antigenbeladene DCs können über MHC II CD4 T-Helferzellen oder über MHC I CD8 T-Zellen aktivieren. Dabei können CD4 T-Zellen zu  $T_{h1}$  oder  $T_{h2}$  differenzieren welche wiederum die zelluläre oder humorale Immunantwort einleiten. CD8 T-Zellen reifen zu reaktiven zytotoxischen T-Zellen, welche gezielt die Apoptose der Zielzelle oder Tumorzelle induzieren.

### 1.3 Verwendung von Dendritischen Zellen in der Immuntherapie und Kombination mit Chemotherapie

Im peripheren Blut des Menschen kommen reife DC mit einer geringen Häufigkeit von unter 0,5% der gesamten Leukozyten vor. Daher wurden Strategien entwickelt, um eine grosse Anzahl von DC *ex vivo* zu generieren, entweder aus Monozyten oder CD34<sup>+</sup> Stammzellen (siehe 1.2). Mittels der Identifikation von tumorassoziierten Antigenen und der Verfügbarkeit an DC, entstand eine neue Tumortherapie, die Immuntherapie. Durch Vakzinierung mit Tumorantigen-beladenen DC können zytotoxische T-Zellen (CTL) *in vivo* aktiviert werden, welche sich gegen die Tumorantigene richten und gezielt Apoptose von Tumorzellen induzieren. In Tiermodellen konnte eine Tumorprotektion und Tumorregression durch tumorantigen-beladene DC Vakzinierung erreicht werden (Celluzzi et al., 1996; Hernando et al., 2003). Die Beladung der DC kann mit verschiedenen Antigenen erfolgen, so z.B. mit Peptiden, Proteinen oder RNA, die spezifische Tumorantigene kodiert (Figdor et al., 2004). Fusionierung der DC mit Tumorzellen kann ebenso zu einer effizienten Induktion von zytotoxischen T-Zellen führen (Gong et al., 2000). Die erste klinische Studie der DC Vakzinierung wurde 1996 in *Nature Medicine* von der Arbeitsgruppe Hsu publiziert, bei der DC-Vakzine gegen B-Zelllymphome eingesetzt wurde (Hsu et al., 1996). Die Verwendung der DC-Vakzine bei der Tumorbehandlung dehnt sich heute auf verschiedene Tumortypen aus, wie z.B. Melanome, Nierenkarzinome, Gliome, Mammakarzinome, Gastrointestinalkarzinome, Prostatakarzinome (Felzmann et al., 2002).

Die Wirksamkeit einer solchen DC-Immuntherapie könnte durch Kombination mit Zytostatika gesteigert werden. Studien am Mausmodell zeigten bei einer Behandlung mit geringer Zytostatikadosis und einer anschliessenden DC-Vakzinierung eine Bekämpfung des Tumors (Ramanathapuram et al., 2005; Shin et al., 2003; Tanaka et al., 2002). Auch im Menschen konnten Tumore durch Chemo-Immuntherapie besser therapiert werden (Holtl et al., 2005; Kashimura et al., 2004; Morisaki et al., 2003). Zu den Zytostatika gehören die alkylierenden Agenzien, welche mit nukleophilen Molekülen der DNA reagieren. Der Mechanismus der Zytotoxizität von methylierenden oder chlorethylierenden Alkylantien erfolgt durch spontane Hydrolyse oder durch Aktivierung über Cytochrom P450 in der Leber. Dabei zerfallen methylierende Alkylantien in Methyldiazonium-Ionen (Niknahad and O'Brien, 1995), welche nach Abspaltung von Stickstoff zu reaktiven Carbenium-Ionen werden, welche die nukleophile DNA alkylieren (siehe Abb. 1.4). An der DNA sind 12 verschiedene DNA-Methylierungsprodukte bekannt, wobei N-Alkylierungen an Purinbasen als auch O<sup>6</sup>-Alkylguanin (0,3-8 % der Gesamtalkylierung) für die Zytotoxizität eine Rolle spielen (Beranek, 1990; Kaina et al., 1993).



**Abb. 1.4:** Bildung eines reaktiven Carbenium-Ions durch das Alkylanz MNNG (nach Friedberg et al., 2006).

Zu den heute in der Chemotherapie von Tumoren verwendeten alkylierenden Zytostatika zählen die methylierenden Agenzien, wie Temozolomid, Dacarbazin (DTIC) und Procarbazin (Natulan), chlorethylierende Nitrosoharnstoffverbindungen, wie BCNU (Carmustin), ACNU (Nimustin), CCNU (Lomustin), HeCNU (Elmustin), Fotemustin und bifunktionelle Crosslink-induzierende Agenzien, wie Cyclophosphamid, Mafosfamid, Ifosfamid, Melphalan, Busulfan, Chlorambucil.

## 1.4 DNA-Reparaturmechanismen

Veränderungen an der DNA können exogen durch Umwelteinflüsse, wie UV- und ionisierende Strahlung, alkylierende Agenzien, wie Nitrosamine in der Nahrung oder endogen durch fehlerhafte zelluläre Prozesse, z.B. bei der Replikation oder DNA-Reparatur, oder durch intrinsische DNA-Alkylierungen durch S-Adenosylmethionin verursacht werden. Diese DNA Läsionen können mittels verschiedener DNA-Reparaturmechanismen eliminiert werden. Erfolgt diese DNA-Reparatur jedoch nicht, oder aber fehlerhaft, so können diese Läsionen zur Entstehung von Gendefekten und weiter zu Tumorentstehung führen. Eine Vielfalt von Reparaturmechanismen ermöglicht es der eukaryotischen Zelle unterschiedliche DNA Läsionen zu prozessieren (Christmann et al., 2003; Yu et al., 1999). Dazu zählen zunächst die Schadensreversion von O<sup>6</sup>-Alkylguanin durch die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), sowie die Exzision von Basenfehlpaarungen der DNA durch die Fehlpaarungsreparatur (Mismatch repair, MMR), die Exzision von grösseren Basenschäden wie Pyrimidindimere durch die Nukleotidexzisionsreparatur (Nucleotide excision repair, NER), die Exzision kleiner DNA Schäden wie alkylierte Basen durch die Basenexzisionsreparatur (Base excision repair, BER), sowie die Prozessierung von DNA-Doppelstrangbrüchen über Homologe Rekombination (HR) oder Nicht-homologes end-joining (NHEJ).

### 1.4.1 O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)

Die Reparatur von karzinogenen und chemotherapeutischen Agenzien wie Nitrosamine oder Nitrosoharnstoffe erzeugtes O<sup>6</sup>-Alkylguanin erfolgt durch eine Ein-Schritt-Reaktion über das Suizid-Enzym O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT, E.C.2.1.1.63). Dabei überträgt MGMT die Alkylgruppe von O<sup>6</sup>-Alkylguanin oder –Alkylthymine auf einen internen Cysteinrest, welches zur Inaktivierung und Degradierung der MGMT führt (Pegg, 2000). In der Abbildung 1.4 ist diese irreversible Reaktion von MGMT gegenüber O<sup>6</sup>-Methylguanin dargestellt. Auch längerkettige Alkylgruppen an der O<sup>6</sup> Position des Guanins kann MGMT reparieren, wobei die Effizienz mit zunehmender Alkylgruppenlänge abnimmt.

Das humane MGMT-Gen ist auf dem Chromosom 10q26 lokalisiert, besteht aus 5 Exons und kodiert ein Protein bestehend aus 207 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 24 kDa (Margison et al., 2003). Der Promotor flankiert das erste Exon und besteht aus Cytosin-Guanin-reichen Regionen, sogenannten CpG Inseln, die eine entscheidende Rolle bei der Transkriptionsregulation spielen. Ausserdem enthält der Promotor Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie Sp1, AP-1, AP-2 (Harris et al., 1991), und Dexamethason, ein Glukokortikoidhormon, welches durch die Bindung an das „glucocorticoid responsive elements“ zur Induktion der MGMT-Genexpression führt (Biswas et al., 1999; Grombacher et al., 1996). Eine exogene Induktion der MGMT-Expression durch Behandlungen mit Agenzien wurde in verschiedene Spezies beschrieben. So wurde *in vivo* gezeigt, dass  $\gamma$ -Bestrahlung zu einer MGMT Zunahme in der Rattenleber führt (Chan et al., 1992). *In vitro* konnte in Ratten-Hepatoma Zellen gezeigt werden, dass mit MNNG, MMS, UV-C- und  $\gamma$ -Strahlung zu einer Zunahme der MGMT Gen- und Proteinexpression und somit zu einer gesteigerten MGMT Enzymaktivität führt (Fritz et al., 1991; Grombacher and Kaina, 1995; Lefebvre and Laval, 1986). Auch in humanen Hepatomzellen wurde nach einer Behandlung mit Alkylantien oder  $\gamma$ -Strahlen eine Induktion der MGMT Genexpression und Aktivität gezeigt (Lefebvre et al., 1993). In HeLa S3 Zellen wurden durch Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (TPA) und 1,2-Diazylglyzerol (DAG) über die Aktivierung der Proteinkinase C eine 3-5-fache Zunahme der MGMT Expression erreicht (Boldogh et al., 1998). Eine weitere Möglichkeit der MGMT Induktion besteht durch die Bindung eines „MGMT enhancer binding proteins“ (MEBP) am „Enhancer“-Element, welches aus einer Grösse von 59 Bp besteht (Chen et al., 1997).

Die MGMT Expression ist auch von der Methylierung der genomischen DNA abhängig und kann durch zwei verschiedene Mechanismen reguliert werden. Zum Einen besteht die Möglichkeit der Methylierung des Genkörpers, welches zu einer Zunahme der MGMT Expression und Aktivität führt (Christmann et al., 2001) und zum Anderen kann durch Methylierung des Promotors eine Reduktion der MGMT Expression erreicht werden (Qian and Brent, 1997). Die im Promotor lokalisierten CpG-Inseln bestehen aus wiederholenden 5'-

Cytosin-Phosphat-Guanin-3'-Dinukleotiden und liegen im Bereich von -249 bis -103 und von +107 bis +196 (Qian and Brent, 1997). Durch die Methylierung des Cytosins zu 5-Methylcytosin durch Methyltransferasen entstehen Heterochromatinisierungen im Bereich des MGMT Transkriptionsstarts (Watts et al., 1997) und veränderte Chromatinstrukturen (Bhakat and Mitra, 2003). In MGMT defizienten Glioblastomzellen erfolgte durch die Methylierung der CpG-Inseln eine unregelmässige Besetzung von Nukleosomen im Bereich der Transkriptionsfaktorbindestelle, was zu einer „geschlossenen“ Chromatinstruktur führte, welche unzugänglich für Transkriptionsfaktoren und Enzymen wie Polymerasen wurde (Patel et al., 1997).

Eine Abnahme der MGMT Proteinaktivität kann durch Phosphorylierungen erreicht werden. So wurde *in vitro* an humanen Blastomzellen gezeigt, dass Phosphorylierungen an Threonin, Tyrosin und Serin durch Proteinkinase A (PKA), Caseinkinase II und Proteinkinase C (PKC) zu einer Abnahme der Aktivität von 30-65% führt (Srivenugopal et al., 2000). Auch zwei neu isolierte GTP-abhängige Tyrosinkinasen können durch Phosphorylierungen die MGMT Aktivität reduzieren (Mullapudi et al., 2000). Neben der Inaktivierung des Enzyms kann die Phosphorylierung, z.B. am Serin 204, auch vor proteolytische Degradierungen schützen (Lim et al., 2000).

Die Regulation der MGMT Expression und Aktivität kann auch durch p53 erfolgen. So wurde *in vivo* bei Mäusen gezeigt, dass  $\gamma$ -Bestrahlung zu einer Zunahme der Aktivität des Reparaturenzyms in Abhängigkeit mit funktionellem p53 führt (Rafferty et al., 1996). Dieses Phänomen der p53-abhängigen Induktion der Gen- und Proteinexpression von MGMT nach  $\gamma$ -Bestrahlung wurde auch *in vitro* bei Mausfibroblasten und Rattenhepatomzellen beobachtet (Grombacher et al., 1998). Jedoch wurde *in vitro* gezeigt, dass funktionelles p53 die MGMT Promotoraktivität herabreguliert und zu einer verminderten Genexpression führt (Grombacher et al., 1998; Harris et al., 1996). Auch *in vivo* wurde in Tumoren eine Abnahme der MGMT Aktivität mit vorhandenem, funktionellem p53 beobachtet (Hengstler et al., 1999). Somit kann p53 die Expression von MGMT inhibieren oder durch DNA-Schädigung mittels Bestrahlung aktivieren.

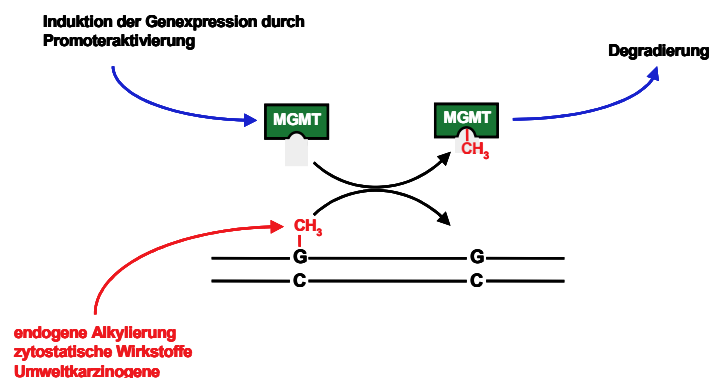


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der MGMT Aktivität an methyliertem Guanin der DNA.

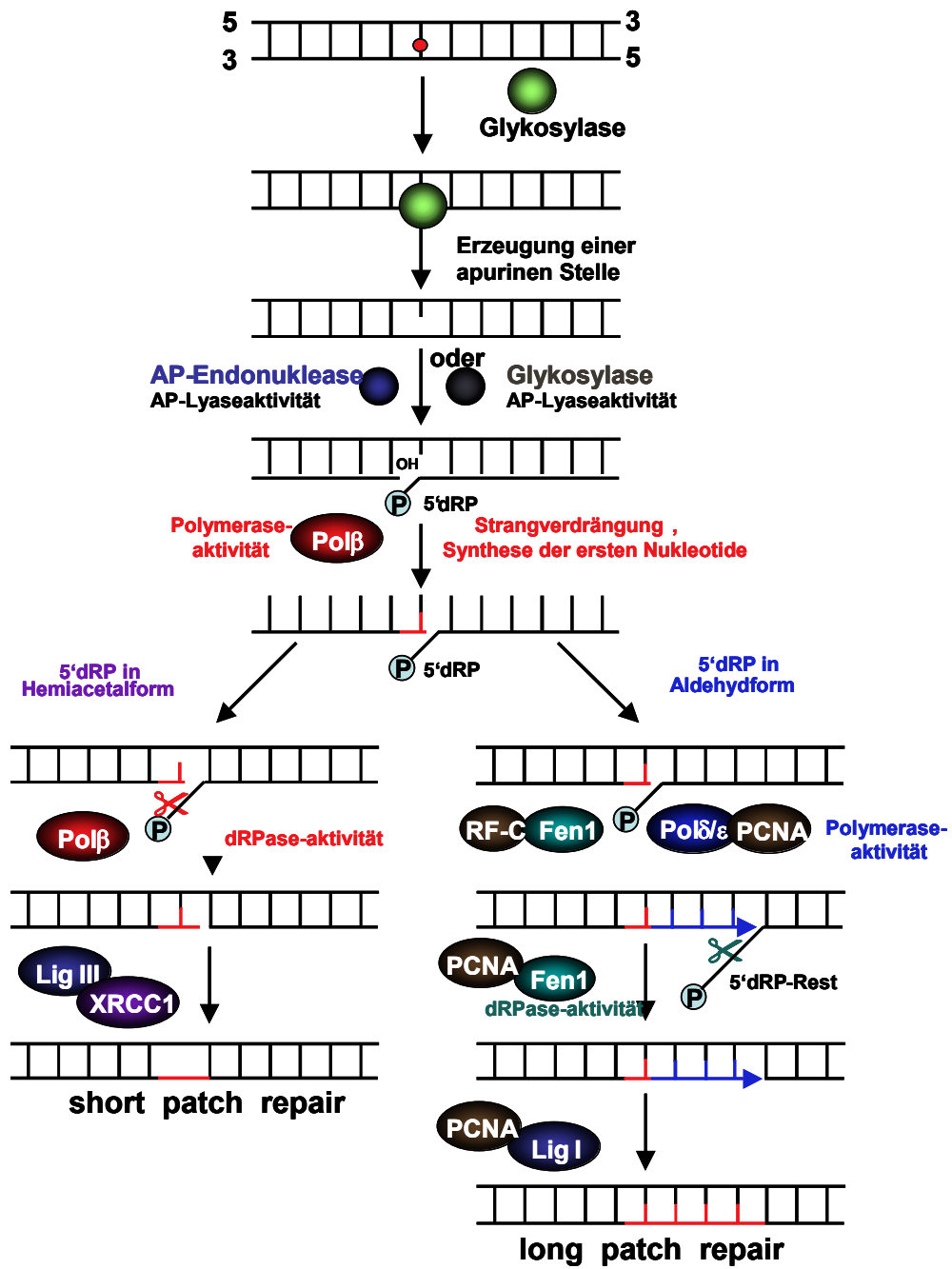
### 1.4.2 Basenexzisionsreparatur (BER)

Die Aufgabe der BER ist es, DNA-Schäden wie N-Alkylierungen an Purinbasen, z. B.: 7-Methylguanin, 3-Methyladenin, 3-Methylguanin, oxidative Läsionen wie 7,8 Dihydro-8-Oxoguanin (8-OxoG) oder Thyminglykol, desaminierte Basen wie z. B. das über Desaminierung aus Cytosin entstandene Uracil in der DNA oder apurine/apyrimidine (AP)-Stellen, zu erkennen und zu reparieren. Diese Reparatur unterteilt sich in zwei Mechanismen: der ‚short-patch‘ BER und der ‚long-patch‘ BER. Bei der ‚short-patch‘ BER kommt es zur Exzision und zum Einbau eines Nukleotides und stellt die häufigste Form der BER dar, wohingegen es bei der ‚long-patch‘ BER zur Reparatur mehrerer Nukleotiden (10-12 Bp) kommt. Der Mechanismus der BER ist in der Abb. 1.5 dargestellt und wird nun im folgenden Text erklärt. Zunächst erfolgt durch Glykosylasen die Erkennung und Entfernung der geschädigten Base über eine hydrolytische Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen der Base und der Desoxyribose, was zur Bildung einer apurinen/apyrimidinen Stelle (AP-Stelle) führt. Es sind bis zu 12 verschiedene Glykosylasen bekannt, welche sich durch unterschiedliche Substratspezifitäten unterscheiden (Christmann et al., 2003). Neben den monofunktionalen Glykosylasen existieren auch bifunktionale Glykosylasen, welche neben der Entfernung der geschädigten Base auch den Einschnitt in der DNA durchführen. Als Beispiel hierzu wäre die 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase 1 (OGG1;) (Ide and Kotera, 2004) zu nennen, die durch oxidativen Stress geschädigte Base 8-Oxoguanin (8-OxoG) entfernt und durch ihre AP-Lyaseaktivität die DNA an der AP-Stelle einschneidet. Monofunktionale Glykosylasen entfernen nur die geschädigte Base. Ein Beispiel hierzu ist die *N*-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG1) (Demple and Harrison, 1994), welche N-alkylierte Basen entfernt. Durch die AP-Endonuklease (APE, HAP1, BAP1, APEX, REF1) erfolgt der hydrolytische Einschnitt am 5' Ende der basenfreien Desoxyribose (AP-Stelle), was zur Bildung von 5'-Desoxyribose-5-Phosphat (dRP) und 3'-OH Rest führt. Bei der ‚short-patch‘ BER kommt es zum Verdrängen des dRP-Restes und zum Einbau eines neuen Nukleotides durch DNA Polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) (Sobol et al., 1996). Es erfolgt nun die Entfernung des dRP-Rests durch die Lyaseaktivität der Pol  $\beta$  (Sobol et al., 2000) und die Ligation durch ein DNA Ligase III – XRCC1 Komplex (Tomkinson et al., 2001). Bei der ‚long-patch‘ BER erfolgt nach dem Einbau eines Nukleotides durch Pol  $\beta$  weitere Reaktionen. Nach der Dissoziation der Pol  $\beta$  von der DNA erfolgt die Strangverdrängung und der Einbau weiterer Nukleotide durch Polymerase  $\epsilon$  oder  $\delta$  zusammen mit PCNA und dem Replikationsfaktor C (RF-C) (Stucki et al., 1998). Durch PCNA stimuliertes FEN1 Protein entfernt über seine Endonuklease-Aktivität die verdrängten Oligonukleotide des 5'-Desoxynukleotid-5-Phosphatsendes, welches man auch als 5'-dRPflap bezeichnet (Dianova

et al., 2001; Klungland and Lindahl, 1997). Die Ligation erfolgt zum Schluss durch Ligase I, welche mit PCNA interagiert (Tomkinson et al., 2001).

Welcher Weg der BER (‘short’ oder ‘long-patch’) bei der Prozessierung der AP-Stelle verwendet wird, ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben der unterschiedlichen chemischen Struktur der AP-Stelle spielen auch Läsionsspezifitäten oder Protein-Protein Interaktionen eine Rolle, die den Verlauf der Reparatur beeinflussen (Fortini and Dogliotti, 2007). AP-Stellen liegen entweder als ringförmige  $\alpha,\beta$  Hemiazetat oder als offenkettige Aldehyde oder hydratisierte Aldehyde vor (Beger and Bolton, 1998). Die hemiazetale Form der AP-Stelle stellt die reguläre AP-Stelle dar und wird über die short-patch BER prozessiert, dagegen sind oxidierte oder reduzierte Aldehyde resistent gegenüber der  $\beta$ -Elimination von Pol  $\beta$  und werden über ‘long-patch’ BER repariert (Christmann et al., 2003). Läsionen wie Tetrahydrofuran (THF) (Matsumoto et al., 1994), Uracil (Bennett et al., 2001) oder C1-oxidierte AP-Stellen (Sung et al., 2005) werden ebenso über ‘long-patch’ BER prozessiert. Proteininteraktionen der Komponenten der BER können ebenso Auswirkungen auf den BER Prozess über ‘short-’ oder ‘long-patch’ haben. Eine entscheidende Rolle in der Koordination der BER hat das Protein XRCC1 (‘X-ray repair cross complementing protein 1’) (Fortini and Dogliotti, 2007). Die Interaktion von XRCC1 mit verschiedenen Proteinen der BER führt zur Stabilität oder zur Aktivitätsveränderung der gebundenen Proteine. XRCC1 interagiert mit DNA Ligase III $\alpha$  (Caldecott et al., 1994), APE1 (Vidal et al., 2001), Pol $\beta$  (Kubota et al., 1996) und PCNA (Fan et al., 2004). Mutationen im XRCC1/DNA Ligase III $\alpha$  Komplex, welcher mit Pol $\beta$  interagiert, führt zum Abbruch der BER, da Pol $\beta$  keine Verbindung mit dem Komplex eingehen kann (Dianova et al., 2004). Welcher Weg der BER die DNA Läsion repariert, ist auch von der ATP Konzentration abhängig. So erfolgt bei niedriger ATP Konzentration eine Stimulierung der Strangverdrängung durch Pol $\beta$  mittels XRCC1 Interaktion, was ausschliesslich zur ‘long-patch’ Basenexzisionsreparatur führt (Petermann et al., 2006). Bei ATP Zugabe verhindert die Ligation mittels DNA Ligase III $\alpha$  die Strangverdrängung und leitet so die ‘short-patch’ BER ein.

Bei der ‘long-patch’ BER spielt auch die Interaktion von XRCC1 mit PCNA eine Rolle, da *in-vitro* Studien eine Abnahme der PCNA-abhängigen ‘long-patch’ BER (Matsumoto, 2001) von über 50% zeigten (Fan et al., 2004). Somit spielt XRCC1 in der ‘short’ und ‘long-patch’ BER eine Rolle.



**Abb. 1.6: Mechanismus der Basenexzisionsreparatur.** Links: Exzision eines einzigen Nucleotides („short-patch repair“); Rechts: Exzision mehrerer Nucleotide („long-patch repair“); Abbildung aus Christmann *et al.* (2003).

## 1.5 Apoptose

Apoptose (*griech.*: Das Fallen der Blätter im Herbst) (Arends and Wyllie, 1991) löst in der Zelle einen Prozess aus, der zu einem kontrollierten Absterben der Zelle führt und als programmierter Zelltod bezeichnet wird. Die Apoptose ist in der embryonalen Entwicklung, Seneszenz, Homöostase, Selektion von Immunzellen oder geschädigten Zellen u.v.m. von grosser Bedeutung (Arnold et al., 2006; Vaux and Korsmeyer, 1999), da unfunktionelle oder defekte Zellen eliminiert werden. Der apoptotische Prozess äußert sich durch Abnahme des Zell- und Kernvolumens, Kondensation und Fragmentation des Chromatins, zytoplasmatischen Zerfall in kleine membranumschlossene Körperchen, auch ‚Blebbing‘ genannt, und dem Lösen des Zell-Zell-Kontaktes (Wyllie et al., 1980). Zu den initiiierenden Stimuli einer Apoptose können exo- und endogene Noxen angehören. Dazu zählen UV- und  $\gamma$ -Strahlung (Chow and Tron, 2005; Mathieu et al., 1999), Beeinträchtigung der Ionenkanälen in der Plasmamembran (Suh and Yuspa, 2005), Hemmung der Proteinbiosynthese (Chang et al., 1997) oder DNA-Schädigungen durch Chemotherapeutika (Roos and Kaina, 2006), die zu einer Induktion der Apoptose führen. Für die Tumorthherapie sind Zytostatika von klinischer Relevanz, da sie eine DNA-schadensinduzierte Apoptose vor allem im schnellwachsendem Tumorgewebe auslösen. Somit stellen die Zytostatika induzierten DNA-Schäden und die hierüber vermittelte Induktion der Apoptose einen bedeutenden Faktor bei der Tumorthherapie dar. Zu den DNA-schädigenden Zytostatika gehören die DNA-Strangbruchinduktoren, wie Bleomycin (Povirk et al., 1977), die Basen-alkylierenden Verbindungen, wie Temozolomid, Procarbazin und Dacarbazin (Newell et al., 1987), die DNA-Quervernetzungsagenzien, wie Cisplatin und Cyclophosphamid (Anderson et al., 1995; Takahara et al., 1995). Neben den DNA-schadensinduzierten Zytostatika existieren auch Wirkstoffe, die in der Tumorthherapie zur Hemmung von Topoisomerasen eingesetzt werden, da Tumore eine erhöhte Expression von Topoisomerasen aufweisen (Dingemans et al., 1998). Dazu zählen die Topoisomeraseninhibitoren Doxorubicin, Etoposid, welche Topoisomerasen II inhibieren, und Topotecan, was Topoisomerase I inhibiert (Cummings and Smyth, 1993). Der molekulare Mechanismus der Apoptose ist in Abb. 1.6 dargestellt und kann grob in 2 Signaltransduktionswege eingeteilt werden, der rezeptorvermittelten (extrinsischen) und mitochondrialen (intrinsischen) Apoptose (Fulda and Debatin, 2006).

Die exogen initiierte Apoptose (Typ I) erfolgt durch die Bindung trimerer Liganden an die membranständigen Todes-Rezeptoren. Zu den Todes-Rezeptoren gehören Fas/CD95R, TNF Rezeptor 1(TNFR1), TRAIL-R1/2, DR3 und DR6, sowie deren Liganden Fas-Ligand (CD95-L), TNF $\alpha$ , Lymphotoxin- $\alpha$ , TRAIL und TWEAK (Fulda and Debatin, 2006). Nach der Bindung des Liganden FasL an den Rezeptor FasR wird eine Trimerisierung der C-terminalen Rezeptordomäne induziert (Huang et al., 1996). Es erfolgt nun die Anlagerung

des Scaffold-Proteins FADD (Fas-associated protein with death domain; MORT1) über die Homodimerisierung seiner Todes-Domäne (DD, death domain) mit der des Fas-Rezeptors (Chinnaiyan et al., 1995). Desweiteren bindet an FADD über die Homodimerisierung von Todes-Effektor-Domänen (DEDs, death effector domains) die Pro-Caspase-8 (FLICE). Dieser Proteinkomplex an der Membran wird als DISC (Todessignal-induzierter Komplex, death-inducing signaling complex) bezeichnet (Kischkel et al., 1995). Caspasen liegen in der Zelle inaktiv als Pro-Caspasen, sogenannte Zymogene, vor und sind Cystein-abhängige, Aspartat-gerichtete Proteasen (Cohen, 1997). Durch autokatalytische Proteolyse oder durch andere Caspasen werden diese inaktiven Pro-Caspasen in der apoptotischen Zelle aktiviert, was zur Degradierung ihrer Zielproteine und letztendlich zur DNA-Fragmentierung führt. Die autokatalytische Proteolyse zum Beispiel bei Caspase-8 kann über die räumliche Annäherung mehrerer Caspasen zueinander durch die Bindung an FADD initiiert werden (Chang et al., 2003). Nach der Bindung der inaktiven Pro-Caspase-8 an FADD erfolgt nun die Abspaltung der Caspase-8 Prodomäne und die autokatalytische Spaltung in eine p18 und p11 Untereinheit (Cohen, 1997). Die aktive Caspase-8 ist ein Tetramer und besteht aus zwei großen p18 und zwei kleinen p11 Untereinheiten (Watt et al., 1999). Caspase-8 aktiviert nun durch Proteolyse die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 (Earnshaw et al., 1999), welche weitere Substrate spalten, wie z.B. ICAD (inhibitor of caspase activated DNase). Durch diese Spaltung von ICAD entfällt die Inhibition der CAD (caspase activated deoxyribonuclease), was zur Fragmentierung der nukleären DNA führt (Enari et al., 1998). Andere Caspasesubstrate sind Strukturproteine wie G-Aktin oder Lamin A,B, sowie PARP, einem DNA-Reparaturprotein, deren Spaltung eine proapoptische Auswirkung auf die Zelle haben (Earnshaw et al., 1999; Kaufmann et al., 1993).

Bei der endogen induzierten Apoptose (Typ II) spielt das Mitochondrium und die Proteine der Bcl-2 Familie eine entscheidende Rolle. Mitglieder der Bcl-2 Familie werden funktionell in pro- und antiapoptische Proteine unterteilt. Dabei sind die Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> antiapoptisch, Bax, Bak, Bad, Bok und Bid sind pro-apoptisch (Reed, 2006). Bcl-2 ist ein intrazelluläres Membranprotein und kann als Heterodimer mit Bax in der äußeren Membran des Mitochondriums, des Endoplasmatischen Retikulums und der Kernmembran vorliegen (Krajewski et al., 1993; Oltvai et al., 1993). Bcl-2 spielt eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Apoptose. Eine Überexpression von Bcl-2 verhindert die Bax-Translokation in die mitochondriale Membran und somit den Signaltransduktionsweg der mitochondrialen Apoptose (Murphy et al., 2000). Die Induktion der mitochondrialen Apoptose kann über eine Abnahme des Bcl-2 Proteins durch Spaltung, proteosomale Degradierung oder Heterodimerisierung mit proapoptischen Proteinen (Bax, BAD) erfolgen, was zur Inaktivierung von Bcl-2 führt (Kroemer, 1997). Über die Freisetzung des im zytoplasmatischen Raum vorliegenden Bax Proteins kann es zu dessen Oligomerisierung

und Translokation in die mitochondriale Membran kommen. Diese Bax-Oligomere bilden in der Membran Poren, was zur Freisetzung von Cytochrom C und dem Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials führt (Jurgensmeier et al., 1998; Kroemer et al., 2007).(Antonsson et al., 2000). Cytochrom C bildet mit ATP, Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) und Pro-Caspasen-9 einen Komplex, welcher als Apoptosom bezeichnet wird (Li et al., 1997). In diesem Komplex erfolgt die Prozessierung und Aktivierung von Pro-Caspase-9, welche wiederum die Effektorcaspase-3 spaltet und aktiviert. Diese Effektorcaspase degradiert des weiteren spezifische Substrate wie z.B. ICAD und induziert letztendlich die Fragmentierung der DNA. Die strikte Unterteilung in mitochondriale und rezeptorabhängige Signaltransduktion wurde als nicht haltbar gezeigt, da es nach der CD95 Rezeptor Aktivierung zur Prozessierung des Mitglieds der Bcl-2 Familie Bid durch die aktive Caspase-8 kommen kann (Li et al., 1998). Dieses Phänomen scheint zelltypspezifisch zu sein. Aktives, gespaltenes tBid (truncated Bid) induziert nach der Translokation in die mitochondriale Membran die Freisetzung von Cytochrom C und führt zur Caspase-9 Aktivierung (Luo et al., 1998). Auch andere Mechanismen wie Aktivierung von Caspase-8 durch mitochondrial aktivierte Caspase-6 zeigen die Vernetzung innerhalb der apoptotischen Signaltransduktionswege (Slee et al., 1999).

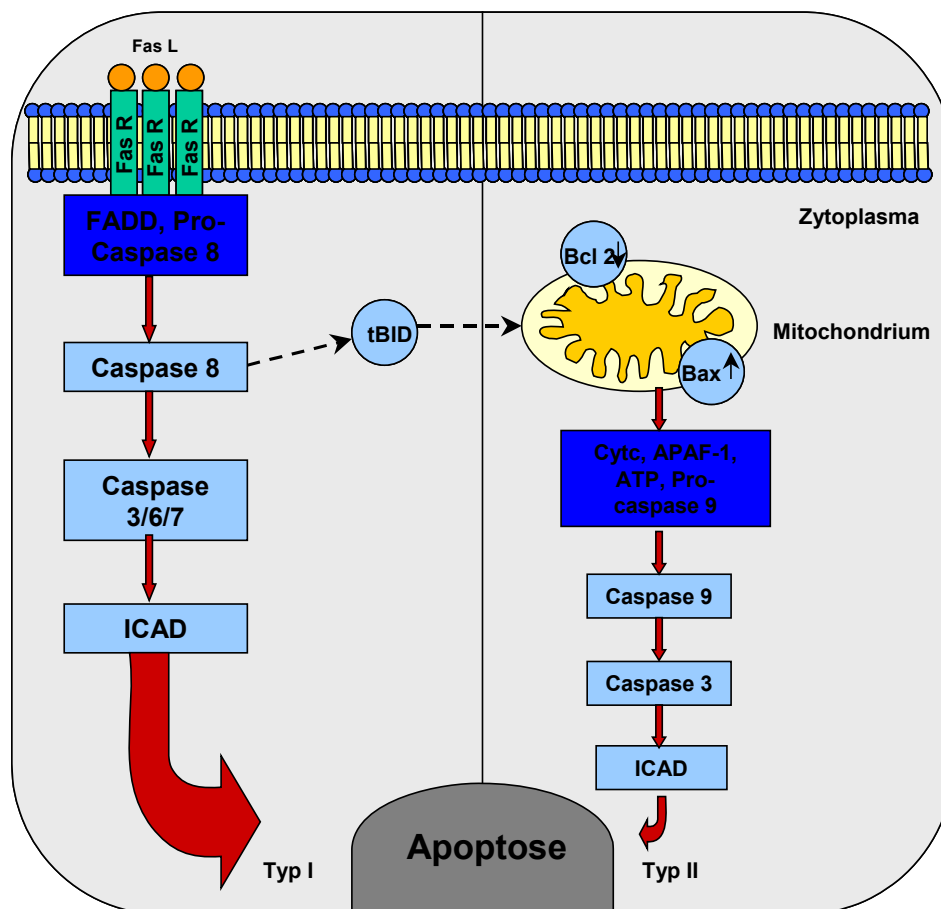


Abb. 1.7: Mechanismus der Rezeptor-vermittelten und mitochondrialen Apoptose

## 1.6 Fragestellung

Aus Monozyten abgeleitete Dendritische Zellen (DC) stellen eine wichtige Komponente in der Immunabwehr und der Tumorbekämpfung dar. Da diese Form der Immuntherapie mit der Alkylantien-basierten Chemotherapie ergänzt wird, ist die Untersuchung der Sensitivität von Immunzellen gegenüber Alkylantien von grosser Bedeutung. Zunächst sollten in der vorliegenden Arbeit die Protein- und Genexpression von DNA-Reparaturenzymen in Monozyten und den daraus abgeleiteten DC untersucht werden, um die Frage zu klären, ob eine Zytokin-induzierte Differenzierung der Monozyten zu DC einen Einfluss auf die Reparaturkapazität der Zelle hat. Dies könnte auch Auswirkungen auf die Sensitivität gegenüber Alkylantien haben, wenn unterschiedliche Expressionsintensitäten von Reparaturproteinen vorliegen. Generell stellt sich hier die Frage: wie sieht die Sensitivität der Immunzellen gegenüber Alkylantien aus und stimmt diese mit der Expression von DNA-Reparaturproteinen überein? Alkylantien induzieren DNA-Läsionen wie O<sup>6</sup>-Alkylguanin, welche durch das Enzym MGMT repariert werden, und auch N-Alkylierungen, die durch BER eliminiert werden. Daher stellt sich die Frage, welche DNA-Läsion die Zytotoxizität der Alkylantien bedingen und wie Unterschiede in der Sensitivität erklärt werden können? Werden diese DNA-Läsionen nicht eliminiert, führt dies zum Zelltod. Daher ist es weiterhin von Interesse zu erfahren, wie die Immunzellen nach Alkylantienbehandlung sterben und welcher Signaltransduktionsweg hierbei eine Rolle spielt. Da es sich bei Monozyten und DCs um nichtproliferierende Immunzellen handelt, ist es naheliegend andere proliferierende Zellen, wie T-Lymphozyten oder expandierte CD34<sup>+</sup>Stammzellen auf Sensitivität gegenüber Zytostatika zu untersuchen und deren Reparaturkapazität zu überprüfen. Da Tumorzellen auch eine erhöhte Expression von Topoisomerasen aufweisen, sind einige Zytostatika gegen die Aktivität dieser Relaxierungsenzyme gerichtet. Es wurden daher auch Arbeiten durchgeführt, mit dem Ziel, die Wirkung der Zytostatika Topotecan und Etoposid auf Topoisomerase I und II in Abhängigkeit von Protein p53 und deren Induktion von Strangbrüchen zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Tab. 2.1: Chemikalien- und Mutagenliste

Artikel	Firma
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Annexin V-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
APS	Merck, Darmstadt
Cisplatin	Sigma-Aldrich, München
Comassie Blue G-250	Bio-Rad, München
DNA Marker (pBR322 DNA/ <i>AluI</i> Marker, Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> Marker 3)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
DMSO	Fluka, Neu Ulm
DTT	Sigma-Aldrich, München
ECL- und ECL-Plus-Kit	Pharmacia/Amersham, Braunschweig
EDTA	Calbiochem, Darmstadt
Fotemusutin	Les Laboratoires Servier, Gidy
Giemsa	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
LMP-Agarose	Appligene, Heidelberg
Mafosfamid	Asta Medica, Frankfurt
Magermilchpulver	Reformhaus, Mainz
N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG)	Sigma, München
Methylmethansulfonat (MMS)	Sigma, München
N-Lauryl-Sarcosine	Sigma-Aldrich, München
Nonidet P40	Fluka, Neu Ulm
PBS	GIBCOBRL, Karlsruhe
PMSF	Sigma-Aldrich, München
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München
Propidiumjodid	Serva, Heidelberg
Prestained Proteinmarker	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Radioaktive Nukleotide ( <sup>32</sup> P-dATP)	NEN Dupoint, Zaventem, Belgien
RNAse A	Sigma-Aldrich, München
SDS	Bio-Rad, München

Szintillationslösung	Roth, Karlsruhe
TCA	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Temozolomid	Essex-Pharma, München
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypsin 250	Cambrex, Verviers, Belgien
Tween-20	Sigma-Aldrich, München

## 2.2 Geräte

Tab. 2.2: Geräteliste

Geräte	Firma
Autoklav Tuttnauer 5075 E	Heraeus, Hanau
Blot-Kammer, Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank (B5060 EK/CO2)	Heraeus, München
Elektrophoreseapparaturen (Protein)	Biometra, Göttingen
Elektrophoreseapparaturen (DNA)	Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät	Amaxa, Köln
FACScalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Elisa Reader Multiskan Ex	Thermo Electron, Vantaa, Finnland
Feinwaage	Satorius, Göttingen
Gel Doc 1000	Bio-Rad, München
Geldokumentationssystem	Syngene, Cambridge, UK
Kinetic Imaging Komet 4.0.2 Software	BFI Optilas, Puchheim
LightCycler	Roche, Mannheim
MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop BX 50	Olympus, Hamburg
Mikroskop Wilovert A	Hund, Wetzlar
ND 1000 Spektrophotometer	Nanodrop, Wilmington, USA
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Phosphor Imager Storm	Amersham Pharmacia, Freiburg
Polaroid-Kamera MP4 Standard	Polaroid, Offenbach
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	Kodak, Stuttgart
Schüttelinkubator Certomat	Braun Biotech. Int., Melsungen

Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
Spannungsquelle Power PAC 200/2.0	Bio-Rad, München
Spannungsquelle Power PAC 3000	Bio-Rad, München
Spektralphotometer Titertek Multiscan Plus	Labsystems, Finnland
Spektralphotometer Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank CLASSII A/B3	NUAIR Zapf, Sarstedt
Stickstofftank 35 HC	Taylor-Wharton, Indianapolis, USA
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph, Schwabach
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sorvall RC513, Rotor GSA	Heraeus, München

## 2.3 „Kits“

Tab. 2.3: „Kitliste

Kit	Firma
NucleoSpin®-RNA II Kit	MachereyNagel, Düren
NucleoSpin®-Tissue Kit	Macherey Nagel, Düren
Mini RNA Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript™nFirst Strang Synthesis System Kit	Invitrogen, Karlsruhe
LightCycler-FastStartDNA Master SYBR-GreenI	Roche Diagnostics, Mannheim
DNeasy®-Tissue Kit	Qiagen, Hilden
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
CD34 MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD14 MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CAT ELISA Kit	La Roche, Mannheim

## 2.4 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.4: Verbrauchsmaterialienliste

Verbrauchsmaterialien	Firma
Alkoholische Lösungen	Roth, Karlsruhe
Deckgläser 24x60 mm	Roth, Karlsruhe
Hyperfilm, ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Objektträger, 26x76 mm, frosted end	Menzel, Braunschweig
Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatmann 3 MM Filter paper	Schleicher & Schuell, Dassel

## 2.5 Humane Antikörper

Tab. 2.5: Primäre Antikörper

Antikörper	Firma	Nummer
anti Apex1	Novus Biologicals, Littleton, USA	NB 100-116
anti Apex2	Abcam, Cambridge, UK	13691
anti Bax	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	N 20
anti Bcl-2	BD Bioscience, Heidelberg	551107
anti Caspase 3	Cell Signaling, Frankfurt	Sc 9664
anti Caspase 8	Cell Signaling, Frankfurt	1C12
anti Caspase 9	Cell Signaling, Frankfurt	Sc 9502
anti ERCC1	NeoMarkers, Asbach	MS 67180
anti Fen1	BD Bioscience, Heidelberg	611294
anti LigIII	BD Bioscience, Heidelberg	611876
anti MGMT	Chemicon, Ochsenhausen	MAB 16200
anti MLH1	Pharmingen, Lexington	13271A
anti MPG	von Rabin	
anti iNOS	R&D, Wiesbaden	MAB 9501
anti p53	BD Bioscience, Heidelberg	554170
anti PCNA	Calbiochem, Schwalbach	NA 03

anti Polβ	NeoMarkers, Asbach	MS 669 P1
anti XRCC1	NeoMarkers, Asbach	MS 434
anti CD14	Coulter/Immunotech, Hamburg	
anti CD19	Coulter/Immunotech, Hamburg	
anti CD80	Coulter/Immunotech, Hamburg	MAB 104
anti CD83	Coulter/Immunotech, Hamburg	HB 15A
anti CD86	Coulter/Immunotech, Hamburg	IT2.2
anti HLA-DR	Serotec/Camon, Wiesbaden	

**Tab. 2.6: Sekundäre Detektionsantikörper**

Antikörper	Firma	Nummer
anti Maus Ig, horseradish peroxidase-konjugiert (aus Schaf)	Amersham Pharmacia, Freiburg	NA931
anti Kaninchen Ig, horseradish peroxidase-konjugiert (aus Esel)	Amersham Pharmacia, Freiburg	NA934
anti Maus Ig-FITC	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA	
anti Ratte Ig-PE	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA	

## 2.6 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden synthetisiert und aufgereinigt von MWG-Biotech (Ebersberg). Es handelt sich ausschließlich um humane Oligonukleotide.

**Tab. 2.7: Oligonukleotidliste**

Bezeichnung	Sequenzen 5' → 3'	Anwendung
3'-AP-1	5' AGTGGTGACTCATCACT 3'	EMSA
5'-AP-1	5' AGTGATGAGTCACCACT 3'	EMSA
3'-ape1	5' CCGAGGGCCTTGGAAACG 3'	RT-PCR
5'-ape1	5' CCGGCAGCGCTGGGATGAA 3'	RT-PCR
3'-ape2	5' GTACCCGGGTTTGATTGTTGTGCT 3'	RT-PCR
5'-ape2	5' CAGGGCGCAAGTGGATGGAC 3'	RT-PCR

3'- <i>ercc1</i>	5' AGGGCCGCCAGCAAGGAAGAAAT 3'	RT-PCR
5'- <i>ercc1</i>	5' TGCAGTCGGCCAGGATACACAT 3'	RT-PCR
3'- <i>mlh1</i>	5' TGGGCCTTGGCACAGCATC 3'	RT-PCR
5'- <i>mlh1</i>	5' CTTTTCTTCGTCCCAATTCACCTCA 3'	RT-PCR
<i>fasL</i> 3' (mouse)	5' CCCCTCCAGGCACAGTTCTTCC 3'	RT-PCR
<i>fasL</i> 5' (mouse)	5' CTTGTGGCTCAGGGGCAGGTTGT 3'	RT-PCR
<i>fasR</i> 3' (mouse)	5' AAGGGATTGGAATTGAGGAAGACTG 3'	RT-PCR
<i>fasR</i> 5' (mouse)	5' GTGGAATTGGCAAAGAAGAAGACA 3'	RT-PCR
3'- <i>fen-1</i>	5' TGCTGCAGAATGAGGAGGGTGAGA 3'	RT-PCR
5'- <i>fen-1</i>	5' ACAGGGCTGCCGAAGGTGAGG 3'	RT-PCR
3'- <i>gapdh</i>	5' GAAGATGGTGATGGGATTTTC 3'	RT-PCR
5'- <i>gapdh</i>	5' GAAGGTGAAGGTCGGAGT 3'	RT-PCR
3'- <i>ligIII</i>	5' TTGGGGAAGGTTAGTGGCAGATTT 3'	RT-PCR
5'- <i>ligIII</i>	5' GAGGGGCTGGTGCTGAAGGATG 3'	RT-PCR
3'- <i>pcna</i>	5' GAGAGTGGAGTGGCTTTTGTA 3'	RT-PCR
5'- <i>pcna</i>	5' ACCTTGCGCTAGTATTTGAA 3'	RT-PCR
3'- <i>polβ</i>	5' GGGTCCCGGTATTTCCACT 3'	RT-PCR
5'- <i>polβ</i>	5' GACCCATCCCAGCTTCACTTC 3'	RT-PCR
3'- <i>xrcc1</i>	5' ACGAATGCCAGGGAGGGGTTGTC 3'	RT-PCR
5'- <i>xrcc1</i>	5' AGCGGTGGCAGCGGAGATGAAG 3'	RT-PCR
5'-n MGMT	5' GCGTTTCGGATATGTTGGGATAGTT 3'	MSP
3'-n MGMT	5' AACTCCGCACTCTTCCGAAAAC 3'	MSP
5'-um MGMT	5' TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT 3'	MSP
3'-um MGMT	5' AACTCCACACTCTTCCAAAACAAAACA 3'	MSP
5'-m MGMT	5' TTTCGACGTTCTAGGTTTTTCGC 3'	MSP
3'-m MGMT	5' GCACTCTTCCGAAAACGAAACG 3'	MSP
SK12U	5' CCAGTGAATCCGGGGGUTCCGTCGACCTGCAGCCA 3'	APE1 Test
SK10	5' TGGCTGCAGGTCGACGGAGCCCCCGGATTCACTGG 3'	APE1 Test

## 2.7 Zellkulturmedien

Tab. 2.8: Medienliste

Medien	Firma
DMEM	BioWhittaker, Cambrex, Belgien

DMEM F12	BioWhittaker, Cambrex, Belgien
RPMI-1640	PAA, Pasching, Österreich
X-VIVO 15	BioWhittaker, Cambrex, Belgien

## 2.8 Zytokine

Tab. 2.9: Zytokinenliste

Zytokine	Firma
GM-CSF	Leukomax; Novartis, Basel, Schweiz
IL-1 $\beta$	Strathmann Biotech, Hannover
IL-4	Strathmann Biotech, Hannover
IL-6	Strathmann Biotech, Hannover
TNF $\alpha$	Strathmann Biotech, Hannover
PGE <sub>2</sub>	Minprostin; Pharmacia, Heppenheim
SCF	Peprotech
FLT-3	Immunex-Amgen
TGF $\beta$	Peprotech
CD40L	Immunex-Amgen

## 2.9 Adhärenente Zelllinien

BK4	p53 profiziente fibroblastoide Zellen der Maus, kultiviert in DMEM/10% FCS
CHO-9	XRCC1 profiziente epitheloide Ovarzelllinie des Chinesischen Hamsters, kultiviert in DMEM F12/5% FCS
E	p53 defiziente fibroblastoide Zellen der Maus, kultiviert in DMEM/10% FCS
EM-C11	XRCC1 defiziente epitheloide Ovarzelllinie des Chinesischen Hamsters, kultiviert in DMEM F12/5% FCS
HeLa-MR	humane Zelllinie eines Gebärmutterkarzinoms (Mex-), kultiviert in DMEM F12/5% FCS
HeLa-S3	humane Zelllinie eines Gebärmutterkarzinoms (Mex+), kultiviert in DMEM F12/5% FCS
MeWo	humane Melanomzelllinie, kultiviert in RPMI1640/10% FCS

## 2.10 Puffer

DNA-Stop-Puffer (5x)	4 M Harnstoff 50 % Saccharose 0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA 0,1 % Bromphenolblau
Protein-Transfer-Puffer	25 mM Tris/HCl (pH 8.0) 100 mM Glycin 25 % Methanol
SDS-Trenngel (15 %) (10 %) (7,5%)	4,5 (Fan et al.) (2,3) ml Acrylamid 3 ml 1,5 M Tris/HCl (pH. 8,8) 4,3 (5,7) (6,5) ml dH <sub>2</sub> O 60 µl 20 % SDS 60 µl 10% APS 6 ml TEMED
SDS-Sammelgel (5%)	570 µl Acrylamid 570 µl 1 M Tris/HCl (pH. 6,8) 3,3 ml dH <sub>2</sub> O 22,5 µl 20 % SDS 45 µl 10% APS 4,5 ml TEMED
SDS-Laufpuffer	57,6 g Glycin 12 g Tris 10 ml 20% SDS ad 2000 ml dH <sub>2</sub> O
20%iges Sequenziergel (Roth)	10 ml Sequenziergel-Konzentrat 0,5 ml Sequenziergel-Puffer 0,5 ml Sequenziergel-Verdünner 100 µl 10% APS 2 µl TEMED
10x TBE (Tris-Borat-EDTA)	900 mM Tris/HCl (pH 8,2) 900 mM Borsäure 12,5 mM Na <sub>2</sub> EDTA
TBS	24.2 g Tris/HCl, pH 7.6 80.0 g NaCl ad 1l with dH <sub>2</sub> O
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 8.0)

MACS	1 mM EDTA
	PBS
	2 mM EDTA
	0,5% BSA

## 2.11 Zellkulturarbeiten

### 2.11.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Adhärent wachsende Zellen wurden in Zellkulturflaschen im jeweiligen Kulturmedium unter wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und 7%CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Passagieren der Zellen wurde im subkonfluenten Stadium durch Absaugen des Mediums, Waschen mit PBS und Ablösen der Zellen durch die Zugabe von Trypsin (0,25% (w/v) in PBS) durchgeführt. Die Zellkryokonservierung von abtrypsinisierten Zellen erfolgte im jeweiligen Medium mit 10% FCS und 10% DMSO in Kryogefäßen bei -80°C. Für Dauerkonservierung wurden Kryoröhrchen in Tanks mit flüssigem Stickstoff (-195°C) überführt. Das Auftauen von kryokonservierten Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Um das verbleibende DMSO zu entfernen, wurden die aufgetauten Zellen sofort im Kulturmedium gewaschen (1200 Upm, 4 min, RT). Danach wurden die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt.

Bei Suspensionszellen handelt es sich hier um primäre Blutzellen, welche stets frisch isoliert und nicht konserviert wurden, da diese Zellen zu empfindlich auf das Einfrieren mit DMSO reagieren. Die Zelldichte der Suspensionszellen für die folgenden Untersuchungen betrug 0,5-1x10<sup>6</sup> Zellen/ml.

### 2.11.2 Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut

Die Isolation humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, „peripheral blood mononuclear cells“) erfolgte aus „Buffy Coat“ Präparationen, die bei der Aufarbeitung von Blutkonserven gesunder Spendern in Blutbanken anfallen. Die Buffy Coats wurden von der Transfusionszentrale der Universitätsklinik Mainz bezogen. Diese Leukozytenangereicherte Fraktion, sog. Buffy Coat, enthält neben Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten auch PBMCs, welche sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichten durch Dichtezentrifugation separieren lassen. Zellen mit einer Dichte über 1,077g/ml, wie z.B. Erythrozyten und Granulozyten, befinden sich nach einer Zentrifugation unterhalb der Ficoll-Schicht, während PBMC und Thrombozyten als Interphase auf der Ficoll-Schicht aufliegen.

Zur weiteren Aufreinigung der PBMC wurde die Interphase abgenommen und die Thrombozyten durch mehrfaches Waschen entfernt. In sterile 50 ml Falcon-Röhrchen wurde 10 ml Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml, Biochrom, Belgien) vorgelegt und vorsichtig mit 20ml „Buffy Coat“ Blut beschichtet. Nach Dichtezentrifugation (30min, 1200 Upm, RT, ohne Bremse) wurde das Serum/Plasma abgenommen, hitzeinaktiviert für 30min bei 56°C, durch hochtourige Zentrifugation von 3000 Upm für 8 min bei RT von ausgefallten Proteinen befreit und für die Kultivierung der Monozyten, DC und weiterer Immunzellen bei 4°C aufbewahrt. Die Interphase wurde in neue 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und auf 50 ml mit kaltem PBS aufgefüllt. Die PBMC wurden bei 1500 Upm für 5 min und 4°C abzentrifugiert und der thrombozytenhaltige Überstand entfernt. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Die isolierten PBMC wurden in RPMI mit 1,5% autologem Plasma resuspendiert, mit Trypan-Blau angefärbt und ausgezählt.

### **2.11.3 Anreicherung von Monozyten aus PBMCs**

Um die Monozyten zu separieren, wurde ihre Adhärenzfähigkeit auf Polystyrol-Platten ausgenutzt. Für DC oder Makrophagen Generierung aus Monozyten wurden 6 Wellplatten (Corning/Costar, Bodenheim) und zur Monozytenanreicherung die 14 cm Zellkulturschalen (Greiner) verwendet. Bei den 6 Wellplatten wurden 15-25 x 10<sup>6</sup> der aufgereinigten PBMCs in 2 ml RPMI/ 1,5% autologes Serum pro Well pipettiert und 45min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch mehrfaches, vorsichtiges Abspülen mit vorgewärmten PBS (37°C) entfernt. Bei den 14 cm Schalen wurden 150 x 10<sup>6</sup> Zellen in 15 ml RPMI/ 1,5% autologes Plasma inkubiert und ebenso gespült. Zum raschen Ablösen der Monozyten aus den Zellkulturschalen wurden die Monozyten über Nacht in 10% autologem Plasma/RPMI kultiviert.

### **2.11.4 Generierung von Dendritischen Zellen aus humanen Monozyten**

Zur Generierung von Dendritischen Zellen aus Monozyten wurde das Protokoll von Jonuleit *et al.* (1997) angewendet. Für die Differenzierung von Monozyten in unausgereifte Dendritische Zellen wurden adhärenente Monozyten mit 3 ml X-Vivo 15, 1,5% autologem Serum, 800 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 versetzt. Die Zellen wurden alle 3 Tage mit frischem Medium und Zytokinen versorgt, indem 900 µl pro Well abgenommen und verworfen wurden, und mit frischem 1000 µl X-Vivo 15 Medium mit 1,5% autologem Serum, 1600 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 versetzt wurden. Um reife DC zu generieren, wurden die Zellen nach 7 Tagen gesammelt und die Zellzahl bestimmt. 15 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Well

wurden in 3 ml X-Vivo 15 mit 800 U/ml GM-CSF, 1000 U/ml IL-4, 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 1000 U/ml IL-6 und 1  $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub> für weitere 2 Tage inkubiert und geerntet.

### **2.11.5 Generierung von Makrophagen aus humanen Monozyten**

Für die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen wurden adhärente Monozyten mit 2 ml X-Vivo 15, 1,5% autologem Serum mit oder ohne 800 U/ml GM-CSF versetzt. GM-CSF verstärkt die Induktion der Makrophagenausreifung. Die Zellen wurden alle 3 Tage mit frischem Medium und Zytokinen versorgt, indem 900  $\mu$ l pro Well abgenommen und verworfen wurden, und mit frischem 1000  $\mu$ l X-Vivo 15 Medium mit 1,5% autologem Serum und 1600 U/ml GM-CSF versetzt wurden. Nach 5 Tagen wurden die adhärennten Makrophagen für Experimente eingesetzt und mittels Accutase (PAA) von der Zellkulturplatte abgelöst.

### **2.11.6 Isolierung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen aus Nabelschnurblut**

Zur Isolierung von hämatopoetischen CD34<sup>+</sup> Stammzellen wurde Nabelschnurblut von Neugeborenen verwendet. Die Proben wurden von der Geburtsabteilung der Frauenklinik der Universitätsklinik Mainz in Kooperation mit Dr. Böhm nach Absprache und Einverständnis mit den Patienten und der Prüfung und Einverständnis der örtlichen Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz zur Verfügung gestellt.

50 ml Nabelschnurblut wurde in Heparin-beschichteten Monovetten (Sarstedt) abgenommen und daraus CD34<sup>+</sup> Stammzellen angereichert. Die Erzeugung von mononukleären Nabelschnurblutzellen (CBMCs) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation, wie in 2.11.2 beschrieben. Durch den hohen Erythrozytengehalt der CBMCs nach der Dichtezentrifugation muss eine Erythrozytenlyse mit Ammoniumchlorid erfolgen, um die anschließende CD34 Isolierung zu gewährleisten. Dazu wurden die CBMCs in 500  $\mu$ l PBS aufgenommen und mit 10 x Vol NH<sub>4</sub>Cl-Lysepuffer (0,15 M NH<sub>4</sub>Cl, 0,01 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA, pH 7,2-7,4) für 10-12 min auf Eis inkubiert, mit 50 ml PBS gewaschen und bei 1400 Upm für 5 min bei 4°C zentrifugiert, wiederholt mit 50 ml PBS gewaschen und bei 700 Upm für 20 min bei 4°C zentrifugiert, zur Thrombozytenentfernung.

Zur Anreicherung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen aus der CBMC-Gesamtpopulation wurde die MACS® Technologie (Magnetic Cell Sorting, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) verwendet. Das Prinzip der Methode beruht auf einer ferromagnetischen, hier indirekten Markierung der Zielzellen durch zelltypspezifische, monoklonale Hapten-Antikörper, welche mit Anti-Hapten konjugierten Mikropartikeln (Microbeads) interagieren können. Die Trennung

der indirekt magnetisch markierten Zielzellen von unmarkierten Zellen erfolgt dann in einer Magnetsäule. Zuerst wurden dazu die primären Gesamtzellen in MACS-Puffer (PBS, 0,5 % (w/v) BSA, 2 mM EDTA) auf eine Konzentration von  $1 \times 10^8$  Zellen/ 300  $\mu$ l eingestellt und mit 100  $\mu$ l/  $10^8$  Zellen FcR Blockreagenz, 100  $\mu$ l/  $10^8$  Zellen CD34 Hapten-Antikörper versetzt und für 15 min bei 6°C inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden 5 ml MACS-Puffer hinzugefügt und für 5 min bei 1500 rpm abzentrifugiert. Die Zellzahl wurde dann auf  $10^8$  Zellen/ 400  $\mu$ l MACS-Puffer eingestellt und mit 100  $\mu$ l/  $10^8$  Zellen Anti-Hapten spezifischen Microbeads versetzt, für weitere 15 min bei 6°C inkubiert und wiederholt gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl von  $10^8$  Zellen in 500  $\mu$ l MACS-Puffer eingestellt. Die Zellsuspension wurde im Magnetfeld auf eine mit 2 ml MACS-Puffer equilibrierte MS+ Positivselektionssäule gegeben. Zur Entfernung der Negativfraktion wurde die Säule 3x mit je 2 ml eiskaltem MACS-Puffer gewaschen. Nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt wurde, wurde die Positivfraktion mit 1ml MACS-Puffer eluiert. Um eine höhere Reinheit der Zellen zu erreichen, wurde dieses Eluat erneut auf eine Säule aufgetragen, gewaschen und eluiert. Anschliessend wurden die CD34 positiven Zellen abzentrifugiert und im Kulturmedium X-Vivo 15 resuspendiert. Der Reinheitsgrad der isolierten Zellpopulation wurde durch FACS-Analyse mit CD34 spezifischen Antikörpern (Becton-Dickinson, Heidelberg) bestimmt und betrug in der Regel 97-99 %.

### 2.11.7 Generierung von Langerhanszellen aus CD34<sup>+</sup> Stammzellen

Zur Generierung von Dendritischen Zellen, sog. Langerhans Zellen (LHZ), aus CD34<sup>+</sup> Stammzellen wurde das Protokoll von Herbert Strobl, Institut für Immunologie, Universität Wien (homepage: <http://www.meduniwien.ac.at/immunologie/strobl/>) angewendet. Für die Differenzierung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen in unausgereifte LHZ wurden CD34<sup>+</sup> Zellen *in vitro* expandiert über 2 d bei der je  $1 \times 10^5$  Zellen/ml X-Vivo 15 mit 100 ng/ml GM-CSF, 50 ng/ml SCF, 50 ng/ml FL und 50 ng/ml TPO versetzt wurden. Die expandierten Stammzellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und die Zellzahl auf  $2 \times 10^4$  Zellen/ml eingestellt und mit 100 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml SCF, 100 ng/ml FL, 2,5 ng/ml TNF $\alpha$  und 0,5 ng/ml TGF $\beta$  für 10 Tage inkubiert. Um reife DC zu generieren, wurden die Zellen gesammelt, gewaschen und die Zellzahl auf  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und für weitere 2 Tage mit 100 ng/ml GM-CSF und 500 ng/ml CD40L inkubiert

## 2.12 Phänotypcharakterisierung

Um die Reinheit der isolierten Monozyten bzw. die Ausreifung der kultivierten DCs zu ermitteln, wurden die Zellen einer Doppelmarkierung zur Phänotypisierung und anschließender FACS-Analyse unterzogen. Dazu wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen eingesetzt und nach folgendem Schema gefärbt:

**Tab. 2.10: Phänotypisierung von DC und Monozyten**

	Primär-Antikörper		Sekundär-Antikörper	
	Isotyp Maus	Isotyp Ratte	Ms-FITC	Rt-PE
Isotypkontrolle	Isotyp Maus	Isotyp Ratte	Ms-FITC	Rt-PE
Monozyten	CD14	HLA-DR	Ms-FITC	Rt-PE
B-Zellen	CD19	HLA-DR	Ms-FITC	Rt-PE
DC	CD80	HLA-DR	Ms-FITC	Rt-PE
DC	CD83	HLA-DR	Ms-FITC	Rt-PE
DC	CD86	HLA-DR	Ms-FITC	Rt-PE

Die Zellen wurden mit je 15  $\mu$ l der Primärantikörper (5  $\mu$ g/ml) für 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden alle Ansätze in 200  $\mu$ l FACS-Puffer (PBS/ 0,5% FCS (v/v)) gewaschen, zentrifugiert (3 min, 1500 Upm, 4°C), in je 15  $\mu$ l Sekundärantikörper ( $\alpha$ -Maus-FITC 5  $\mu$ g/ml,  $\alpha$ -Ratte-PE 5  $\mu$ g/ml) aufgenommen und für weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Überschüssige Sekundärantikörper wurden durch erneutes Waschen mit 200  $\mu$ l FACS-Puffer entfernt und die Zellen schließlich zur Messung in 250  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen. Im FACS wurden HLA-DR positive Zellen im FL-2-Kanal dargestellt, während CD14<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Zellen (Monozyten, DC, B-Zellen) im FL- 1-Kanal sichtbar wurden. Zur Auswertung wurden die Zellen im „Dot-Blot“ (FL-2 gegen FL-1) dargestellt und mit Quadrantenstatistik der Prozentsatz der einzelnen Zellpopulationen bestimmt.

## 2.13 Zytotoxizitätsuntersuchungen

### 2.13.1 Koloniebildungstest

Zytotoxizität bei adhärenenten Zellen wurde durch einen Koloniebildungstest ermittelt. Dazu wurden 350 Zellen in 5 cm-Zellkulturschalen ausgesät, nach 5 h behandelt und für 7 Tage im CO<sub>2</sub> Inkubator kultiviert. Die gebildeten Zellkolonien wurden ausgewertet, indem das Medium abgesaugt und die Kolonien mit MeOH fixiert wurden. Nach Lufttrocknung wurden

die Kolonien mittels Giemsa (1,25% (w/v))-Kristallviolett (0,125% (w/v)) angefärbt und ausgezählt. Ausgewertet wurden Kolonien, die aus mindestens 50 Zellen bestanden. Die Anzahl der gezählten Kolonien wurde relativ auf die Zahl der in den Kontrollen gewachsenen Kolonien bezogen.

### **2.13.2 Bestimmung metabolischer Zellaktivität**

Durch einen kolorimetrischen Assay mit dem WST-1-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) kann die Vitalität von Zellen bestimmt werden. Grundlage dieser Untersuchung ist, dass Tetrazoliumsalz WST-1 von mitochondrialen Dehydrogenasen je nach metabolischer Aktivität (Vitalität) der Zellen zu dunkelrotem Formazan reduziert und gespalten wird, welches photometrisch durch einen Mikrotiterplatten Reader detektiert werden kann. Entsprechend ausgesäte und behandelte Zellen in 96 Mikrotiterplatten wurden nach 72h mit WST-1 (1 : 10) versetzt, und nach 30 - 60-minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Bestimmung der Absorption bei 450 nm und 600nm als Referenzwellenlänge. Die Ergebnisse zeigen die Vitalitäten [%] der behandelten Zellen als Verhältnis der Absorption der Kontrolle zur behandelten Zelle.

### **2.13.3 Vitalitätsermittlung durch Trypan-Blau Detektion**

Zur Ermittlung der Zellvitalität von Suspensionszellen nach einer Isolierungen aus dem Blut oder nach einer Alkylantienbehandlung wurden diese mit 1 Volumen Trypan-Blau (0,04%) versetzt und in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind im Mikroskop durch ihre Blaufärbung erkennbar. Für die Sensitivitätsmessung nach Alkylantienbehandlungen wurden  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen pro ml ausgesät und nach 24h behandelt. Die Auswertung mittels Trypan-Blau Färbung erfolgte nach 72h. Die Zahl der lebenden Zellen in den behandelten Ansätzen wurde als prozentualer Anteil der unbehandelten Kontrolle angegeben.

### **2.13.4 Bestimmung der Apoptosefrequenz durch Sub-G1-Messung**

Die Apoptosefrequenz wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Apoptotische Zellen schnüren membranumhüllte Chromatinfragmente ab und besitzen im Vergleich zu G1-Phase-Zellen einen reduzierten DNA-Gehalt. Somit basiert die Messung der Sub-G1-Zellfraktion darauf, dass der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen unterhalb des DNA-Gehalts

einer Zelle in der G1-Phase liegt (Huschtscha et al., 1994; Nicoletti et al., 1991). Ausserdem lässt sich mit dieser Methode die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen ermitteln. Hierzu wurden die behandelten Zellen geerntet und mit PBS gewaschen. Durch tropfenweise Zugabe von 70%igen (v/v) EtOH wurden die Zellen mindestens 30 min bei -20°C fixiert. Nach erneuter Zentrifugation (1500 Upm, 4°C) wurden die Zellen in PBS aufgenommen und mit RNase A (Konz.<sub>End</sub>: 100 µg/ml) für 30 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von PI (Konz.<sub>End</sub>: 20 µg/ml), die Analyse am Durchflusszytometer *FACSort* und die Quantifizierung der apoptotischen Sub-G1-Fraktion mittels CellQuest Software (Becton Dickinson).

## **2.14 Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mittels Einzelzellgelelektrophorese (SCGE; „Comet-Assay“)**

Mittels SCGE können DNA-Strangbrüche auf Einzelzellebene detektiert werden. In Agarose eingebetteten Zellkerne wurden einer Elektrophorese unterzogen, wobei die Strangbrüche im elektrischen Feld aus dem Zellkern herauswanderten und einen Kometenschweif bildeten. Die Länge und Intensität der Kometen korreliert mit der Menge an DNA-Strangbrüchen. Zur Detektion von Doppelstrangbrüchen wurden neutrale Pufferbedingungen und von Einzel-/Doppelstrangbrüchen sowie alkalilabiler Stellen wurden alkalische Bedingungen nach einer modifizierten Methode von Singh *et al.* (1988) und Klaude *et al.* (1996) verwendet.

### **2.14.1 Neutrale Einzelzellgelelektrophorese**

10 µl der zu untersuchenden Zellsuspension ( $1 \times 10^6$ /ml) wurden in 120 µl LMP (0,5% (w/v) in dH<sub>2</sub>O, 37°C) auf Agarose-beschichteten Objektträgern (1,5% (w/v) in PBS) aufgetragen und mit einem Deckglas bedeckt. Nach 5 min Lagerung bei 4°C wurde das Deckglas abgezogen und die Präparate für 1 h bei 4°C in Lysepuffer (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS/HCl, 1% (w/v) Na-Laurylsarcosinat, 10% (v/v) DMSO, 1% (v/v) Triton X-100, pH 7,5) inkubiert. Danach erfolgte direkt die Elektrophorese in 4°C kaltem Puffer (90 mM TRIS, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 7,5) bei 25 V für 15 min mit anschliessendem Waschen in dH<sub>2</sub>O, Fixierung für 5 min in 98% EtOH und Trocknung.

### **2.14.2 Alkalische Einzelzellgelelektrophorese**

Bei der alkalischen SCGE erfolgte die Lyse im alkalischen Puffer (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS/HCl, 1% (w/v) Na-Laurylsarcosinat, 10% (v/v) DMSO, 1% (v/v) Triton X-100, pH 10), und vor der Elektrophorese erfolgte eine 25-minütige Denaturierung im Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH  $\geq$  13). Die Elektrophorese erfolgte bei 25 V mit 300 mA für 25 min. Anschliessend wurden die Präparate im Neutralisationspuffer (0,4 M TRIS/HCl, pH 7,5) gewaschen, in 98% EtOH fixiert und getrocknet. Zur Auswertung wurden die Objektträger mit 50  $\mu$ l EtBr (20  $\mu$ g/ml) gefärbt und bei 20facher Vergrösserung am Fluoreszenzmikroskop Olymp mit einer CCD-Kamera ausgewertet. Pro Messpunkt wurden 50 Zellen ausgewertet und die relative Kometlänge (Olive Tail Moment, OTM) als das Produkt der DNA-Menge (%) im Komet-Schwanz und der Distanz zwischen den Zentren der Masse vom Komet-Kopf und Komet-Schwanz definiert (Olive et al., 1991). Als Analysesoftware diente Kinetic Imaging Komet 4.0.2 (BFI Optilas, Puchheim).

## 2.15 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 2.15.1 Konzentrationsbestimmungen

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in wässriger Lösung wurde die Probe in dH<sub>2</sub>O verdünnt und im Spektralphotometer bei  $\lambda = 260/280/320$  nm gegen dH<sub>2</sub>O als Referenz gemessen. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml DNA oder 40  $\mu$ g/ml RNA. Das Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> gibt Aufschluss über Reinheit der DNA-Lösung. Sie beträgt bei reiner DNA 1,8 und bei RNA  $\geq 2,0$ . Verunreinigung durch Proteine können bei einer Wellenlänge von 320 nm detektiert werden.

### 2.15.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA nach Molekulargewicht wurde die DNA-haltige Lösung mit 6 x Ladepuffer (MBI Fermentas) versetzt und in die Geltaschen eines horizontalen Agarosegels (1% in TBE, 0,5  $\mu$ g/ml EtBr) pipettiert. Als Molekulargewichtsstandards wurden EcoR I/Hind III-geschnittene  $\lambda$ -Phagen-DNA oder Alu I-geschnittene pBR322-DNA verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Die Visualisierung und Dokumentierung des Gels per UV-C erfolgte mit GeneSnap (Syngene) und der GeneTools Software.

## 2.15.3 Untersuchung der Genexpression

### 2.15.3.1 RNA-Isolation

Isolierung gesamter RNA wurde mittels NucleoSpin®-RNA II Kit (Macherey Nagel, Düren) nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Zellen wurden zunächst lysiert mit 350 µl RP1 Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol und filtriert über eine NucleoSpin® Filtersäule bei 12000 Upm für 1 min. Nach Zugabe und Mischen des Filtrates mit 350 µl 70%igem EtOH wurde die Lösung durch die NucleoSpin® RNA Säule in ein 2 ml Sammelgefäß zentrifugiert (30 s, 12000 Upm). Die an das Trägermaterial adsorbierte RNA wurde durch Zugabe von 350 µl MDB Puffer gewaschen und mit 95 µl DNA-Verdaulösung (90 µl DNase-Puffer, 10 µl DNase I) für 15 min bei RT inkubiert. Anschliessend erfolgte das Waschen mit 200 µl RA2 Puffer, Zentrifugation, und 2maliger Zugabe von je 200 und 600 µl RA3 Puffer mit anschließender Zentrifugation. Durch wiederholte Zentrifugation erfolgte die Trocknung der Membran. Zur Elution der RNA wurde die Säule mit 60 µl H<sub>2</sub>O (RNase frei) versetzt und abzentrifugiert. Die RNA Konzentration im Eluat wurde mittels Spektrophotometrie ermittelt.

### 2.15.3.2 Reverse Transkription

Um die Expression eines Gens auf mRNA Ebene zu untersuchen, wurden RT-PCR Experimente ausgehend von gesamtzellulärer RNA durchgeführt. Zunächst wurde die mRNA durch die enzymatische Aktivität der Reversen Transkriptase unter Verwendung eines Oligo dT Primers in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese wurde im Anschluß als Matrize für eine genspezifische PCR Reaktion verwendet. Als Kontrolle wurde die Expression von GAPDH mRNA analysiert, ein konstitutiv exprimiertes Gen, dessen Signal in allen Ansätzen gleich stark sein sollte. Die Reverse Transkription wurde mittels SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. 1 µg RNA wurde mit 0,5 µg Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer und 10 mM dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in einem Volumen von 10 µl H<sub>2</sub>O zur Zerstörung von Sekundärstrukturen für 5 min auf 65° C erhitzt und anschließend sofort auf Eis transferiert. Nach Zugabe von 2 µl 100 mM DTT, 2 µl 10x RT Puffer, 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl RNase Inhibitor wurde für 2 min bei 42°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase (SuperScript II RT, 50 U) und Inkubation für 50 min bei 42°C. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz anschließend 15 min auf 70°C erhitzt und zum Verdau restlicher RNA wurde der Ansatz mit 1 µl RNase H (1 U) für 20 min bei 37°C inkubiert. Jeweils 2 µl der Ansätze wurden in der Standard-PCR verwendet.

### 2.15.3.3 Semiquantitative RT-PCR

Die sich anschließende PCR Reaktion wurde durchgeführt mit 15 µl REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaktionsmix, 2 µl cDNA, 1 µM Primer in einem Endvolumen von 30 µl. PCR Parameter waren folgende: initialer Denaturierung: 94°C, 2 min; 20-35 Amplifikationszyklen zur Vervielfältigung des gewünschten DNA-Fragments mit Denaturierung: 94°C, 45 s; Annealing: 50-65°C, 1 min; Elongation: 72°C, 1 min und terminale Elongation: 72°C, 10 min. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über 1 %-Agarose-Gele, die Visualisierung der DNA mit Hilfe von Ethidiumbromidfärbung und des Geldokumentationssystems GeneSnap (Syngene).

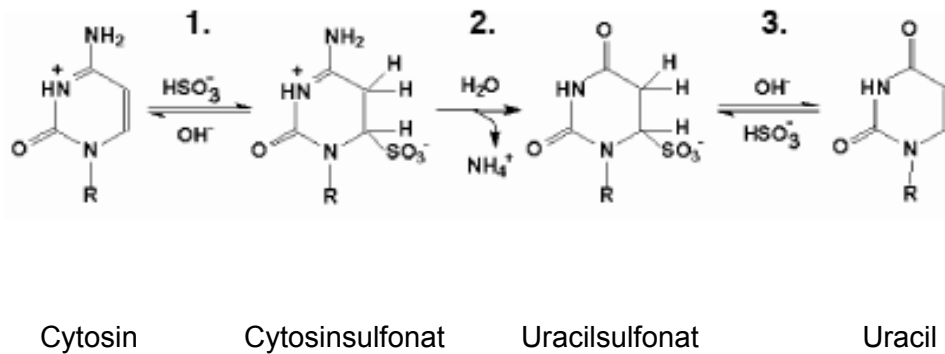
### 2.15.3.4 Quantitative RT-PCR

Eine Quantifizierung der RNA-Expression erfolgte mittels „real time-PCR“, wobei „SYBRgreen“ (Roche Diagnostics, Mannheim) als Fluoreszenzfarbstoff verwendet wurde. Der Reaktionsansatz wie vom Hersteller angegeben wurde mit 2 µl cDNA, 10 µM Primer versetzt und im Bio-Rad-iCycler™ IQ in 45 Zyklen einer Hot-Start-PCR unterzogen (1 Zyklus: Hot-Start: 95°C, 10 min; 45 Zyklen: Denaturierung: 95°C, 10 s; Annealing: 63-52°C, 10 s; Elongation: 72°C, 20 s, 1 Zyklus: Melting: 60-90°C). Zur internen Normierung wurde unter Verwendung geeigneter Primer ein DNA-Fragment des GAPDH-Gens parallel mitamplifiziert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der iCycler™-Software von Bio-Rad.

### 2.15.4 Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Zur Ermittlung des Methylierungsstatus von Promotorregionen wurde die Methylierungsspezifische PCR (MSP) von Herman *et al.* (1996) verwendet. Diese Methode wurde durch eine ‚nested‘ PCR weiter modifiziert (House *et al.*, 2003), um eine erhöhte Sensitivität der zu detektierenden Hypermethylierungen von Zielsequenzen zu erreichen. Die DNA Methylierung von CpG Inseln im Promotor wurde mittels Bisulfitmodifikation von unmethyliertem Cytosin zu Uracil und einer anschließenden PCR mit spezifischen Primern für die modifizierte unmethylierte oder methylierte DNA bestimmt. Wie in Abb. 2.1 erfolgt durch Natriumbisulfitbehandlung die Konvertierung von Cytosin zu Uracil durch saure Sulfonierung, hydrolytische Deaminierung und alkalische Desulfonierung, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt. Die anschließende PCR bewirkt bei der modifizierten DNA mit Uracil den Einbau von Adenin und dem Austausch eines GC-Basenpaares durch ein AT-

Basenpaar, während 5-Methylcytosin erhalten bleibt, wird unmethyliertes Cytosin durch Thymin ersetzt.



**Abb. 2.1: Bisulfit-Modifikation von Cytosin zu Uracil durch hydrolytische Desaminierung. 1: Sulfonierung; 2: Hydrolytische Desaminierung; 3: Alkalische Desulfonierung**

#### 2.15.4.1 Isolierung genomischer DNA

Isolierung genomischer DNA wurde mittels NucleoSpin®-Tissue Kit (Macherey Nagel, Düren) nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Zellen wurden zunächst lysiert bei 1h, 56°C mit 200 µl T1 Puffer und 25 µl Proteinase K und weiter durch Zugabe von 200 µl B3 Puffer für 10 min bei 70°C. Nach Zugabe und Mischen des Lysates mit 210 µl 70%igen EtOH wurde die Lösung durch die NucleoSpin Tissue Säule in ein 2 ml Sammelgefäß zentrifugiert (1 min, 12000 Upm). Die an das Trägermaterial adsorbierte DNA wurde durch Zugabe von 500 µl BW Puffer, Zentrifugation, und 2maliger Zugabe von 600 µl B5 Puffer mit anschließender Zentrifugation gewaschen und durch wiederholte Zentrifugation erfolgte die Trocknung der Membran. Zur Elution der DNA wurde die Säule mit 100 µl BE Puffer (70°C) für 1 min inkubiert und abzentrifugiert. Die DNA Konzentration im Eluat wurde mittels Spektrophotometrie ermittelt.

#### 2.15.4.2 Bisulfit Modifikation

DNA (0.5 mg) wurde denaturiert mit 0,2 M NaOH für 10 min bei 37°C in einem Volumen von 50 µl. 30 µl 10 mM Hydrochinon (Sassanfar et al.) und 520 µl 3 M NaHSO<sub>3</sub> (Sassanfar et al.), beides wurde stets frisch angesetzt und zugegeben, gemischt, mit einer Mineralölschicht

bedeckt und für 16 h bei 50°C inkubiert. Modifizierte DNA wurde aufgereinigt mittels Wizard® DNA clean-up System Kit (Promega) nach Anleitung des Herstellers. Dazu wurde die DNA mit der Wizard®-Gebrauchslösung gemischt, auf die mitgelieferte Säule gegeben, abzentrifugiert und mit 80%igem Isopropanol gewaschen und mit 70°C warmen 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Die Modifikation wurde komplettiert durch die Behandlung mit 0,3 M NaOH für 5 min bei RT und anschließender Reinigung mittels EtOH Präzipitation. DNA wurde in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### **2.15.4.3 PCR**

MSP wurde mit der Bisulfit behandelten DNA durchgeführt unter folgenden Bedingungen: Reaktionsvolumen für MSP war 30 µl, 15 µl Red *Taq* DNA Polymerase (Sassanfar et al.), 2 µl DNA und je 2 µl Primer. Die PCR Bedingungen für die ‚nested‘ PCR waren: 5 min bei 95°C ‚Hot start‘, dann 40 wiederholende Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei 56°C für 30 s, Elongation bei 72°C für 30 s und Abschluss bei 72°C für 5 min. Der zweite Schritt der MSP verlief unter denselben Bedingungen mit 30 Zyklen und den Annealing-Temperaturen bei unmethylierten Primern von 61°C und bei methylierten Primern von 58°C. MSP Produkte wurden im 3,5%igen Agarosegel separiert und mittels UV Illumination visualisiert. Die Amplifikatprodukte für ‚nested‘, methylierte und unmethylierte MSP sind folgende: hMGMT-nested 135 bp; hMGMT-unmethylierte 93 bp; hMGMT-methylierte 81 bp.

## **2.16 Untersuchung der Proteinexpression**

### **2.16.1 Präparation von Gesamtzellproteinen**

Die Zellen wurden in PBS gewaschen und in 100 µl Ultraschallpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoethanol, 5% (v/v) Glycerin, 1 mM PMSF) resuspendiert und auf Eis sonifiziert (Branson Sonifier 250; 30kHz, 3 x 10 Impulse). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 14000 Upm und 4° C für 15 min abgetrennt. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford (1976) bestimmt.

### 2.16.2 Präparation von Zellkernproteinen

Zur Extraktion von Kernextrakten wurden die Zellen in 1 ml Lysispuffer (10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM DDT, 2 mM PMSF) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl 10%igem (v/v) NP40 wurden die Zellmembranen durch eine 5 minütige Inkubation aufgebrochen und zentrifugiert (3200 Upm, 5 min). Nach einmaligem Waschen des Pellets in Lysepuffer wurden die Zellkerne in 100 µl MAP-Kinase-Puffer [20 mM Tris-HCl (pH7,4), 40 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaF, 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% SDS] aufgenommen, sonifiziert (Branson Sonifier 250; 30kHz, 3 x 10 Impulse) und zentrifugiert (4°C, 15 min, 14000 Upm). Der Überstand wurde in N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry *et al.* (1951) bestimmt.

### 2.16.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach *Bradford*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) beruht auf der Bindung von Coomassie Blue G250 an die Aminogruppe der Proteine in saurer Lösung. Dieser Farbkomplex kann photometrisch bei 595 nm detektiert werden. Durch Erstellung der Eichkurve mit BSA konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden. Aliquots (10 µl) der zu bestimmenden Proben wurden in 96-Microtiterplatten pipettiert, mit 200 µl Bradford-Lösung (25 mg Coomassie G250 Brillant Blue, 12,5 ml 100% EtOH, 25 ml 85% Phosphorsäure, 212,5 ml dH<sub>2</sub>O, filtriert) versetzt und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Absorption wurde bei λ=600 nm gemessen.

### 2.16.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach *Lowry*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry *et al.* (1951) beruht auf einer chemischen Reaktion, wobei die reduktiven Gruppen der Proteine unter alkalischen Bedingungen Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup>-Ionen reduzieren. Die Cu<sup>+</sup>-Ionen reagieren mit Folin-Reagenz zu einem blau gefärbten Komplex, dessen Absorption bei 600 nm gemessen werden kann. Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde anhand der Eichkurve mit BSA bestimmt. Zur Proteinbestimmung der Versuchsproben wurden je 10 µl Kernproteinlösung mit 140 µl Lowry I-Lösung (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 M NaOH) versetzt. Zu allen Proben wurden 250 µl Lowry IV-Lösung (2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 M NaOH, 0,02% Na-K-Tatrat, 0,01% CuSO<sub>4</sub>) und 30 µl 50% Folin-Reagenz gegeben. Nach 30 min Inkubation in Dunkelheit und bei RT wurden je 100 µl zur

Doppelbestimmung in eine Mikrotiterplatte pipettiert und im Photometer bei 600 nm vermessen.

### **2.16.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Proteinextrakte wurden in denaturierenden Polyacrylamidgelen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Diese Gele bestanden aus einem 7,5, 10 oder 15 %igen Trenngel und einem 5 %igen Sammelgel. Die Trenngellösung (7 - 15 % PAA, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,005 % TEMED) wurde zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit n-Butanol überschichtet. Nach Entfernen des n-Butanols wurde das Sammelgel (5 % PAA, 125 mM Tris- HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,005 % TEMED) auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Aussparung von Taschen eingesteckt. Jeweils 20 - 30 µg Protein wurden mit 1/4 Volumen Ladepuffer (Roth, Karlsruhe) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in die Taschen des Sammelgels überführt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) bei 30 mA pro Gel.

### **2.16.6 Western-Blot**

Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Polyacrylamidgel wurde in Protein-Transfer- Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM Glycin, 25 % MeOH) äquilibriert und auf die äquilibrierte Nitrozellulosemembran blasenfrei aufgelegt und beidseitig mit eingeweichem Filterpapier (3MM-Papier) bedeckt. Anschließend wurde das Gel in einem mit zwei angefeuchteten Schwämmen versehenen Gelhalter fixiert und vertikal in eine mit Protein-Transfer-Puffer gefüllte Transferkammer (Bio-Rad, München) eingesetzt, so dass der Nitrozellulosefilter zur Anode orientiert war. Die Überführung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 180 mA über Nacht oder bei 350 mA für 2 h. Nach Beendigung des Transfers erfolgte eine Überprüfung der Proteinübertragung durch Anfärben des Filters mit Ponceau S – Lösung (1% (w/v) Ponceau S, 3% (w/v) TCA) und die Entfärbung mittels Waschen mit PBS. Zur Antikörperdetektion von Proteinen wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 2 h bei RT in Blocklösung (5% (w/v) Milchpulver in PBS, 0,2% (v/v) Tween 20) geschwenkt. Der Filter wurde dann mit dem primären Antikörper (1 : 500-3000) in Blocklösung für 2 h bei RT oder bei 4°C über Nacht inkubiert und anschließend 3 x 10 min mit PBS, 0,2 % Tween-20 gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde die Membran mit dem entsprechenden Peroxidase-konjugierten

Sekundärantikörper (1 : 3000 in Blockierungslösung, 1 h, RT) inkubiert und erneut gewaschen (3 x 10 min in PBS, 0,2 % Tween-20, RT). Die gebundenen Antikörper-Antigen Komplexe wurden mittels ECL-Kit (Amersham, Freiburg) und High performance chemiluminescence Film (Amersham, Freiburg) detektiert. Um eine weitere Inkubation desselben Filters mit anderen Primärantikörpern zu ermöglichen, erfolgte ein Waschvorgang mit 100 mM Glycin-Lösung (pH 2,8)(2 x 10 min, RT), um gebundene Antikörper zu entfernen (membrane stripping).

## 2.17 Gelretardationsexperiment (EMSA)

Die Bestimmung der Bindungsaktivität von Proteinen beruht auf einer Bindung des zu detektierenden Proteins an ein definiertes, radioaktiv markiertes Oligonukleotid (hier AP-1-Oligo).

### 2.17.1 Präparation von Kernextrakten für EMSA

Die Zellen wurden in 1 ml Lysispuffer I (10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4) resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert, und durch Zugabe von 50 µl 10%-igem NP40 für weitere 5 min wurde die Zellmembran aufgebrochen. Zellkerne wurden abzentrifugiert bei 3200 Upm, 4°C und 5 min, resuspendiert in Lysispuffer und erneut abzentrifugiert. Die Zellkerne wurden in 2 Vol Kernlysispuffer (0.2 mM EDTA, 20 mM Hepes-KOH, pH 7.4, 1 mM DTT, 2 mM PMSF) mit 600 mM KCl resuspendiert und lysiert für 30 min auf Eis. Zellkerntümmer wurden bei 14000 Upm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 Vol Kernlysispuffer ohne KCl verdünnt, auf 20% Glycerin eingestellt, in N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Bradford.

### 2.17.2 Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden

Zur radioaktiven Markierung von doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden mit einer AP-1 Bindesequenz wurden 1.4 µl (3.5 pmol) des Oligonukleotids mit 1 µl 10 x Polynukleotidkinase (PNK)-Puffer und 3 µl γ-<sup>32</sup>P-ATP, und 1 µl PNK gemischt und der Reaktionsansatz mit dH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Nach 60 minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Zugabe von 90 µl dH<sub>2</sub>O. Anschließend wurde die DNA durch die Zugabe von 250 µl 95% EtOH üN bei -20°C gefällt. Die DNA wurde für 30 min bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert, mit 70% EtOH

gewaschen, in 100 µl dH<sub>2</sub>O gelöst und erneut mit 2.5 Vol 95% EtOH üN bei -20°C gefällt, für 30 min bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert, mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 100 µl dH<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.17.3 EMSA-Assay

Zur Ermittlung der Bindung von Proteinen an AP-1 DNA-Oligonukleotide wurde 4 µg Kernextrakt mit 15 µl Reaktionspuffer (10% Glycerin, 10 mM Hepes/KOH, pH 7,9, 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM Tris/HCl, 0,5 mM EDTA, 0,005% BSA, 0,005% poly(dI-dC)) versetzt. Anschliessend wurden 2 µl (25 fmol) des radioaktiv markierten AP-1-Oligonukleotids zugegeben, der Ansatz mit dH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt und für 30 min bei RT inkubiert. Zum Abschluß wurden die Proben neben einem Laufmarker (Bromphenolblau/Xylen-Cyanol FF) auf ein 4% natives Polyacrylamidgel (4% PAA, 0,25% TBE, 0,05% APS, 0,005% TEMED) aufgetragen und in 0,25% TBE-Puffer bei 100 mV separiert bis BPB-Marker ca. 1-2 cm vor dem Auslaufen war. Das Gel wurde vorher 1 h bei 100 mV voräquilibriert. Danach wurde das Gel abgebaut, und mittels eines Geltrockners (Unterdruck bei 80°C) für 2 h getrocknet. Danach wurde das Gel auf einen Röntgenfilm üN bei -80°C exponiert.

### 2.18 O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Aktivitätstest

Das Prinzip beruht auf die Übertragung der radioaktiv markierten Methylgruppe von O<sup>6</sup>-Methylguanin auf das MGMT Protein im Zellextrakt. Die Radioaktivität, die von der DNA auf das MGMT-Protein übertragen wurde, ist ein Maß für die Methyltransferaseaktivität im Zellextrakt. Zur Aktivitätsmessung wurde 150 µg Gesamtprotein und 15 µl [<sup>3</sup>H]-DNA (ca. 80000 cpm) in 200 µl Reaktionspuffer (70 mM Hepes/KOH, pH 7,8, 1 mM DTT, 5 mM EDTA) aufgenommen und bei 37°C für 90 min inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch die Zugabe von 400 µl 13% TCA mit 150 µg BSA und der Hydrolyse der DNA durch das Aufkochen bei 95°C für 15 min. Die Proben wurden anschließend auf Eis abgekühlt, wobei die Proteine gefällt wurden. Die Proteine wurden abzentrifugiert bei 4°C mit 14000 Upm für 10 min und mit 400 µl 5% TCA 3 x gewaschen. Das Proteinpellet wurde in 200 µl 0,1 M NaOH hydrolysiert und in 4 ml Liquid-Scintillator überführt. Die gebundene Radioaktivität wurde am Szintillationszähler bestimmt.

## 2.19 Apurine Endonuklease 1 (APE1)-Aktivitätstest

Die Untersuchung der Aktivität einer apurinen/apyrimiden Endonuklease im Gesamtextrakt basiert auf einer Sichtbarmachung der enzymatischen Spaltung von der apurinen (AP)-Stelle eines 5' Ende radioaktiv markiertem, doppelsträngigem Oligonukleotid mit einer AP-Stelle. Die entstehenden Fragmente lassen sich im 20%igen Harnstoffgel auftrennen und quantifizieren. Mittels Detektion am Phospho-Imager werden zwei Banden sichtbar gemacht. Die obere Bande entspricht dem ungeschnittenen, radioaktiv markiertem Oligonukleotid und die untere Bande dem geschnittenen, radioaktivem Oligonukleotid. Mit Hilfe der Software Image Quant kann die Intensität der Banden ausgewertet und die relative Umsatzrate pro Zeit ermittelt werden.

### 2.19.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden für den APE1-Aktivitätstest

Das Oligonukleotid SK12U (Sequenz siehe Kapitel 2.6) wurde mittels der T4-Polynukleotidkinase (Roche, Mannheim) radioaktiv markiert. Hierzu wurden 10 pmol SK12U mit 2  $\mu$ l 10 x PNK-Puffer (500 mM Tris/HCl, pH 7,6, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM EDTA), 6  $\mu$ l  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) und 1  $\mu$ l T4-Polynukleotidkinase (10 U/ $\mu$ l) gemischt und mit dH<sub>2</sub>O auf 20  $\mu$ l aufgefüllt, bei 37°C für 30 min inkubiert. Zur Entfernung ungebundener  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP wurde das markierte Oligonukleotid mittels QIAquick Nucleotide Removal Kit gereinigt. Hierzu wurde das markierte Oligonukleotid mit 200  $\mu$ l PN-Bindpuffer gemischt und auf QIAquick Säule aufgetragen, abzentrifugiert für 1 min bei 6000 Upm, gespült mit 2 x 500  $\mu$ l PE-Waschpuffer und getrocknet bei 13000 Upm für 1 min. Die Elution erfolgte mit 40  $\mu$ l EB-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) für 1 min bei 6000 Upm. Danach erfolgte die DNA Hybridisierung, bei der 10 pmol radioaktives SK12U Oligonukleotid mit 20 pmol komplementärem SK10 Oligonukleotid versetzt wurde, auf 50  $\mu$ l mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt, bei 95°C für 6 min inkubiert und langsam auf RT abgekühlt.

### 2.19.2 Erzeugung und Stabilisierung einer apurinen (AP) Stelle

Die Uracil-DNA-Glykosylase (Sigma-Aldrich, München) entfernt die Base Uracil aus dem SK12U Oligonukleotid und erzeugt so eine AP-Stelle. Hierzu wurde das hybridisierte Oligonukleotid 1 h bei 37°C mit 1 U Uracil-DNA-Glykosylase und 10  $\mu$ l 5 x Uracil-DNA-Glykosylase Puffer (300mM TRIS/HCl, pH 8,0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA) inkubiert. Zur Stabilisierung der erzeugten AP-Stelle wurde sie mit NaBH<sub>4</sub> reduziert, durch Inkubation des Oligonukleotids mit 0,1 M NaBH<sub>4</sub> für 5 min auf Eis. Zur Entfernung von NaBH<sub>4</sub> wurde eine Gelfiltration über Microspin G25 Columns durchgeführt, bei der die Sephadex-

Matrix bei 3000 Upm für 1 min vorzentrifugiert und das Oligonukleotid/ $\text{NaBH}_4$  Gemisch auf das Sephadex-Bett aufgetragen und bei 3000 Upm für 2 min abzentrifugiert wurden. Das aufgereinigte Eluat mit dem markiertem Oligonukleotid und einer AP-Stelle kann bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

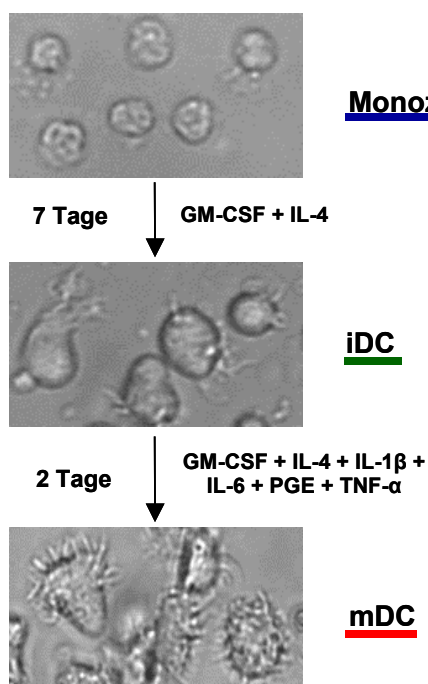
### **2.19.3 APE1-Aktivitätstest**

Hierfür wurde pro Zeitwert 5  $\mu\text{g}$  Gesamtproteinextrakt mit 2  $\mu\text{l}$  5 x APE1-Puffer (250 mM TRIS/HCl, pH 7,4, 500 mM KCl, 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  BSA) und 2,5  $\mu\text{l}$  (ca. 0,5 pmol) APE1 Oligonukleotid bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach 1, 2, 5, 10, 15 und 30 min wurden aus dem Reaktionsansatz je 10  $\mu\text{l}$  Aliquots entnommen und mit 10  $\mu\text{l}$  Stopp-Puffer (98% Formamid, 10 mM EDTA, 0,025% Xylencyanol FF, 0,025% Bromphenolblau) versetzt. Die Reaktion wurde zusätzlich inaktiviert durch eine 2 minütige Inkubation bei  $95^\circ\text{C}$ . Zur Abkühlung wurden die Proben auf Eis gestellt. Also Kontrolle wurde das Oligonukleotid mit 5 $\mu\text{g}$  BSA inkubiert. Davon wurde 15  $\mu\text{l}$  auf ein 20%iges Sequenziergel (20% PAA, 0,1 M Trisborat, 2mM EDTA, 8,3 M Harnstoff, pH 8,3, 2  $\mu\text{l}$  TEMED, 100  $\mu\text{l}$  10%iges APS) aufgetragen und bei 300 V für 1 h bei RT aufgetrennt, auf Phospho-Imager-Screen  $\text{üN}$  exponiert und am Phospho Imager aufgenommen und mittels Software Image Quant ausgewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Generierung von Monozyten-abgeleiteten DC aus PBMC mittels Zytokine

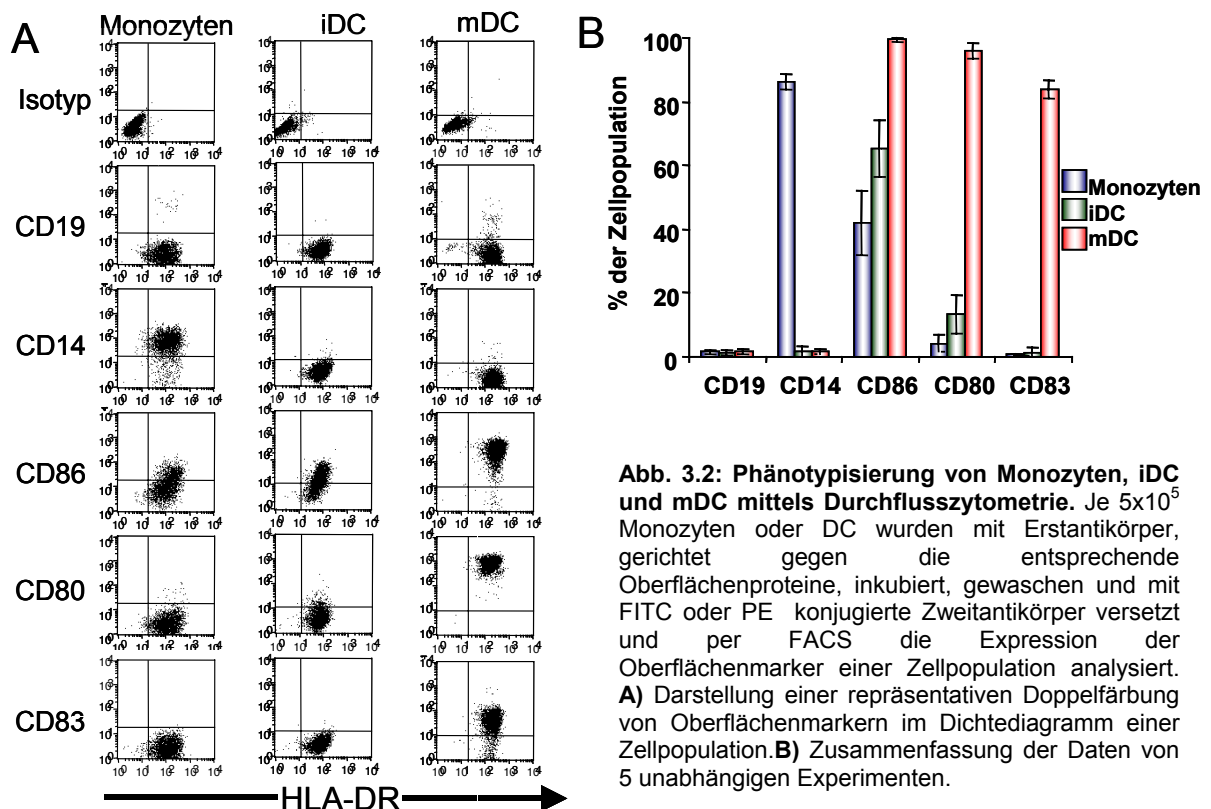
Zur Untersuchung der Proteinexpression von DNA-Reparaturgenen, der DNA Reparaturkapazitäten und der Sensitivität gegenüber alkylierenden Agenzien wurde das Modell der Zytokin-induzierten Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen (DC) verwendet. Obwohl DC in der Immuntherapie zur Behandlung verschiedener Tumore eingesetzt werden und diese Therapie mit Chemotherapie ergänzt wird, war die Sensitivität und Reparatur von alkylierenden DNA Schäden, sowie der Expression von DNA-Reparaturgenen in DC und der Vorläuferzelle Monozyt zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen nichts bekannt. Die Ausreifung von Monozyten zu DC erfolgte *in vitro* durch eine Zytokinbehandlung nach dem Protokoll von Jonuleit *et al.* (1997). Zunächst wurden Monozyten aus PBMC durch Plastikadhärenz angereichert und über 7 Tage mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC (iDC) stimuliert. Durch eine weitere Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE und TNF $\alpha$  über 2 Tage wurden reife DC (mDC) generiert. Eine mikroskopische Aufnahme der Zellen zeigt die unterschiedliche Morphologie (Abb.3.1), ausgehend von runden Monozytenzellen, die wenig verzweigte Ausläufer (Dendriten) nach der ersten Zytokinbehandlung ausbilden und sich zu iDC differenzieren. Diese bilden nach Behandlung mit weiteren proinflammatorischen Zytokinen über die Oberfläche verstärkt verzweigte Dendriten aus und stellen die endgültige Ausreifung zu mDC dar.



**Abb. 3.1: Differenzierung von Monozyten zu unangereiften (i) und angereiften (m) DC.** Lichtmikroskopische Aufnahmen (400fach) verdeutlichen die morphologische Veränderung von Monozyten zu DC mittels Zytokine. Monozyten wurden mittels Plastikadhärenz angereichert, stimuliert über 7 Tage mit GM-CSF und IL-4 zu unangereiften DC (iDC) und zu reifen DC (mDC) durch weitere Zugabe proinflammatorischer Zytokine über 2 Tage.

### 3.2 Phänotypcharakterisierung von Monozyten, unausgereiften und ausgereiften DC

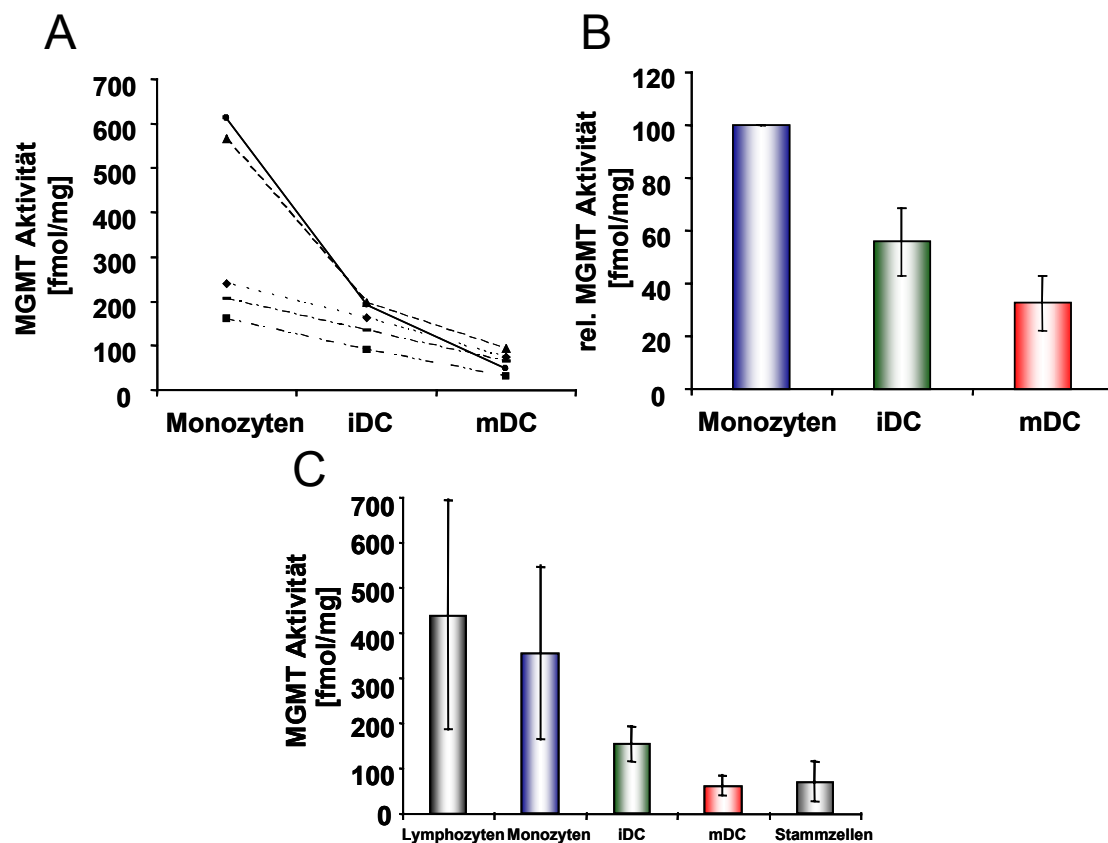
Zur Überprüfung der Reinheit einer Zellpopulation, hier der Monozyten, und deren durch Zytokin stimulierte Ausreifung zu DC wurde eine Phänotypisierung basierend auf der Expression von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt. Auf der y-Achse sind die Oberflächenmarker dargestellt, während HLA-DR auf der x-Achse abgebildet ist (Abb. 3.2A). Doppelt positiv gefärbte Zellen sind im oberen rechten Quadranten zu sehen. Monozyten weisen eine Expression von CD14 und CD86 auf. Die Reinheit der durch Plastikadhärenz isolierten Monozyten betrug zwischen 85-90%. DC exprimieren kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie CD80, CD86 und CD83, welche bei der DC Differenzierung hochreguliert werden. 70% unausgereifte DC weisen CD86 und CD80 auf. Durch die Stimulierung mit proinflammatorischen Zytokinen wird die Ausreifung der iDC zu mDC induziert, was sich in der Hochregulation der Oberflächenproteine CD80 und CD86, sowie des Ausreifungsmarkers CD83 zeigt. Über 90 % der Zellpopulation exprimieren die mDC Oberflächenmarker. Alle Populationen zeigen eine marginale Kontamination von unter 5% mit B-Lymphozyten, was anhand des Oberflächenmarkers CD19 gezeigt wurde. In Abb. 3.2B sind die Expressionshöhen der Oberflächenmarker von Monozyten, iDC und mDC von 5 verschiedenen Spendern zusammengefasst dargestellt.



**Abb. 3.2: Phänotypisierung von Monozyten, iDC und mDC mittels Durchflusszytometrie.** Je  $5 \times 10^5$  Monozyten oder DC wurden mit Erstantikörper, gerichtet gegen die entsprechenden Oberflächenproteine, inkubiert, gewaschen und mit FITC oder PE konjugierte Zweitantikörper versetzt und per FACS die Expression der Oberflächenmarker einer Zellpopulation analysiert. **A)** Darstellung einer repräsentativen Doppelfärbung von Oberflächenmarkern im Dichtediagramm einer Zellpopulation. **B)** Zusammenfassung der Daten von 5 unabhängigen Experimenten.

### 3.3 Ermittlung der MGMT Aktivität in Monozyten, *in vitro* generierten iDC und mDC, sowie in Lymphozyten

MGMT Aktivitäten wurden in Monozyten und den daraus Zytokin-generierten DC von 5 verschiedenen Blutspendern in 5 unabhängigen Experimenten bestimmt. Die Monozyten zeigen eine hohe Variabilität der MGMT Aktivität von 160-620 fmol/mg Protein (Abb. 3.3A). Durch die Differenzierung der Monozyten in unausgereifte (i) und ausgereifte (m) DC nahm die MGMT Aktivität auf 56 und 32 % im Vergleich zu den Monozyten ab (Abb. 3.3B). Die mDC weisen die niedrigste MGMT Aktivität in allen Spendern auf. Der Vergleich der MGMT Aktivität mit peripheren Lymphozyten und Stammzellen zeigt, dass mDC eine ähnliche Aktivität wie Stammzellen aufweisen, wohingegen die MGMT Aktivität in Monozyten den der peripheren Lymphozyten ähnelt (Abb. 3.3C).

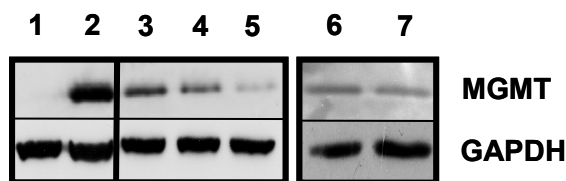


**Abb. 3.3: MGMT Aktivität in Monozyten, iDC und mDC, und weiteren Immunzellen. A)** MGMT Aktivität in Monozyten, iDC und mDC von 5 Spendern. **B)** Relative MGMT Aktivität in Monozyten, iDC und mDC. MGMT Aktivität in Monozyten wird 100% gesetzt. **C)** MGMT Aktivitätsvergleich mit Lymphozyten und Stammzellen.

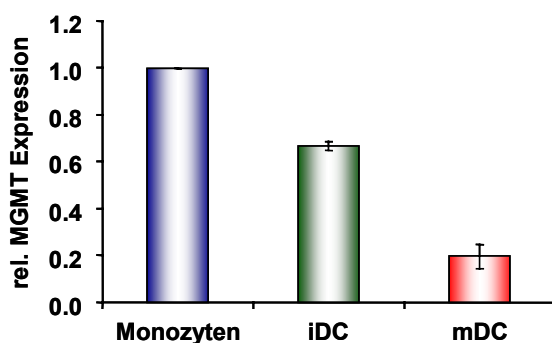
### 3.4 Protein- und Genexpression von MGMT in Monozyten und DC

Zur Untersuchung der Abnahme der MGMT Aktivität bei der Differenzierung von Monozyten zu DC wurden Protein- und Genexpressionsanalysen des Reparaturenzyms durchgeführt. Die Proteinexpression von MGMT wurde durch Western-Blot Analysen ermittelt (Abb. 3.4A, repräsentativer Western-Blot) und zeigt eine Abnahme der MGMT Proteinexpression von Monozyten zu iDC und mDC. Als Positiv- und Negativkontrolle wurden MGMT profiziente HeLa S3 Zellen und MGMT defiziente HeLa MR Zellen verwendet. Die Quantifizierung der Western-Blots zeigten eine vergleichbare Abnahme des MGMT Proteins und der Aktivität (Abb. 3.4B). Da eine posttranslationale Regulation des MGMT Proteins nicht bekannt ist, ist anzunehmen, dass die abnehmende MGMT Aktivität und Proteinexpression während der Ausreifung zu DC durch eine Abnahme der Genexpression verursacht wird. Um dies zu untersuchen, wurden semiquantitative und quantitative RT-PCRs durchgeführt (Abb. 3.4C). Das Experiment zeigt, dass die *mgmt* mRNA Expression mit der Differenzierung von Monozyten zu DC abnimmt. Offensichtlich erfolgt die Regulation der MGMT Genexpression auf transkriptioneller Ebene.

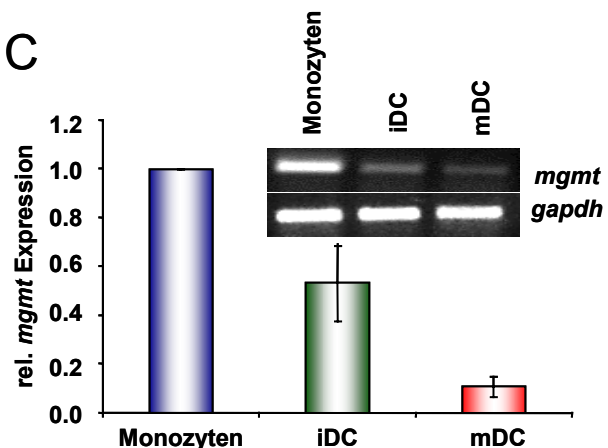
A



B



C

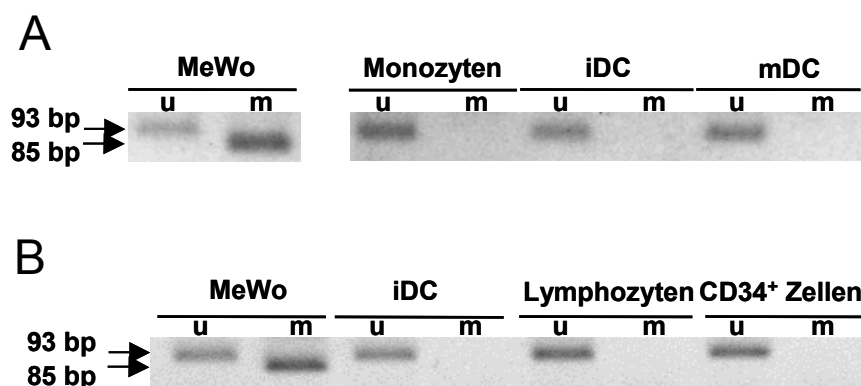


**Abb. 3.4: MGMT Protein und Genexpression.** **A)** MGMT Proteinexpression in Monozyten (Spur 3), iDC (Spur 4) und mDC (Spur 5) in einem repräsentativen Western-Blot dargestellt. HeLa S3 (Spur 2) und MR (Spur 1) Zellen dienen als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Vergleich von nichthungernden (Spur 6) und hungernden (Spur 7) (für 48 h in 1,5% autologes Serum) Monozyten. Zur Beladungskontrolle wurden die Immunoblots mit anti GAPDH-Antikörper hybridisiert. **B)** Quantifizierung der MGMT Proteinexpression von 3 unabhängigen Experimenten. **C)** Expression der *mgmt* mRNA wurde mittels RT-PCR ermittelt. Eine repräsentative semiquantitative RT-PCR ist hier mit der Quantifizierung von 3 unabhängigen Experimenten durch real-time PCR dargestellt. Die *gapdh* RT-PCR dient zum Abgleich der eingesetzten RNA Menge.

Da Monozyten aus einem serumreichen Milieu stammen und deren Ausreifung im serumarmen Medium stattfindet, ist es wichtig zu untersuchen, ob eine Serumdepletion zur Verminderung der MGMT Proteinexpression führt oder ob dies durch eine Zytokin-induzierte Ausreifung zu DC verursacht wird. Dazu wurden Monozyten in 10% oder 1,5% autologem Serum über 48 h kultiviert und die MGMT Expression ermittelt. Weder die Aktivität (bei 10% autologem Serum mit 906 fmol/mg Protein und bei 1,5% Serum mit 936 fmol/mg Protein), noch die Proteinexpression nahm durch die Serumdepletion ab (Abb. 3.4 A). Somit wird die Abnahme der MGMT Protein- und Genexpression durch die Zytokinbehandlung, die zur Ausreifung von DC erforderlich ist, verursacht.

### 3.5 Untersuchung der MGMT Promotormethylierung in Monozyten, iDC, mDC, Lymphozyten und CD34<sup>+</sup>Stammzellen

Ein Mechanismus der Regulation der *mgmt* Genexpression ist die Promotorhypermethylierung (Esteller et al., 2002). Zur Ermittlung des CpG Methylierungsstatus des *mgmt* Promotors wurde eine methylierungsspezifischen PCR (MSP) von Herman *et al.* (1996) angewendet. Wie aus Abb. 3.5A ersichtlich wird, ist die *mgmt* Promotorregion in Monozyten, iDC und mDC unmethyliert. Als Positivkontrolle wurden MeWo Zellen verwendet, die einen hypermethylierten *mgmt* Promotor aufweisen, was zu einer verminderten MGMT Expression führt. Interessanterweise zeigten auch Lymphozyten (mit hoher MGMT Aktivität) und CD34<sup>+</sup>Stammzellen (mit niedriger MGMT Aktivität) einen unmethylierten *mgmt* Promotorstatus (Abb. 3.5B). Die Daten zeigen, dass die *mgmt* Promotormethylierung nicht die Ursache für die Abnahme der MGMT Expression während der Ausdifferenzierung von Monozyten zu DC ist.

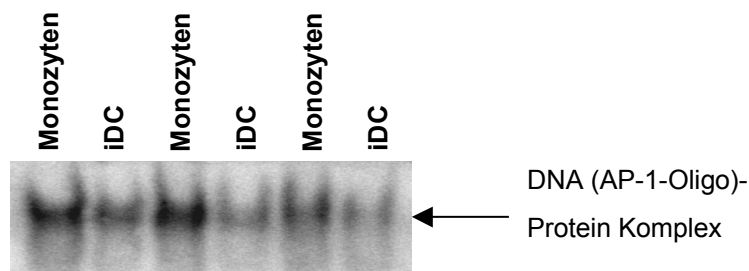


**Abb. 3.5: MGMT Promotormethylierung.** **A)** MGMT Promotorstatus von Monozyten und DC ermittelt durch MSP. MeWo Zellen dienen als Positivkontrolle für methylierten MGMT Promotor. **B)** Promotormethylierung in Lymphozyten aus Buffy coats und CD34<sup>+</sup>Stammzellen aus Nabelschnurblut mit der Positivkontrolle MeWo und der Negativkontrolle iDC.

### 3.6 Regulation der *mgmt* Genexpression durch den Transkriptionsfaktor AP-1

Aus der Literatur ist bekannt, dass die *mgmt* Genexpression durch AP-1 (activator protein 1) stimuliert werden kann, da der *mgmt* Promotor 2 Bindungsstellen für AP-1 aufweist (Boldogh et al., 1998). AP-1, ein dimeres Protein, bestehend aus Mitgliedern der Jun, Fos, ATF und Fra2 Familie (van Dam and Castellazzi, 2001), interagiert mit der DNA Promotorregion und induziert eine zunehmende Genexpression. Um zu untersuchen, ob AP-1 die *mgmt* Expression reguliert, wurde die AP-1 Bindungsaktivität mittels EMSA und radiativ markierten Oligonukleotiden, die eine AP-1 Bindungsstelle enthalten, in Monozyten und iDC überprüft.

Monozyten weisen eine höhere AP-1 Bindungsaktivität als iDC auf, was in Abb. 3.6 dargestellt ist. Dies könnte dazu führen, dass Monozyten eine erhöhte *mgmt* Genexpression zeigen, da sie erhöhte AP-1 Aktivitäten besitzen. Im Vergleich dazu, zeigen iDC eine verminderte AP-1 Aktivität, was mit der verringerten *mgmt* Genexpression korreliert.



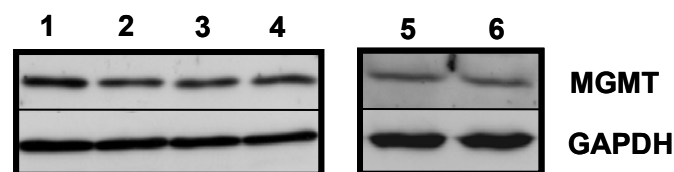
**Abb. 3.6: AP-1 Bindungsaktivität in Monozyten und iDC.** EMSA wurde mit  $^{32}\text{P}$ -markierten Oligonukleotid mit einer AP-1 Bindungsstelle und 4  $\mu\text{g}$  Kernextrakt durchgeführt, auf 4% Polyacrylamidgel separiert und per Autoradiographie ausgewertet.

### 3.7 Auswirkungen der Zytokine GM-CSF und IL-4, sowie der Monozytenanreicherung per MACS auf die MGMT Proteinexpression

Über die Regulation der MGMT Proteinexpression durch Behandlung von Zellen mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 ist in der Literatur nichts bekannt. Selbst der Signalpathway von GM-CSF ist noch nicht aufgeklärt. Es besteht aber die Möglichkeit, dass Zytokine Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder p53 aktivieren oder hemmen und somit die MGMT Expression beeinflussen können. Um dies zu prüfen, wurden Monozyten mit den Zytokinen GM-CSF, IL-4 oder GM-CSF mit IL-4 über eine Woche behandelt und die MGMT Proteinexpression per Western Blot ermittelt. Diese Ergebnisse befinden sich in Abb. 3.7.

Nach den Behandlungen ist eine schwache und vergleichbare Abnahme der MGMT Proteinexpression sichtbar. Somit kann die MGMT Expression nicht durch ein bestimmtes Zytokin erfolgen, da GM-CSF, IL-4 oder beide zusammen die Expression reprimieren.

Da die Monozytenanreicherung *in vitro* per Plastikadhärenz durchgeführt wurde, stellt sich die Frage, ob durch eine andere schnellere Methode, mittels MACS Technologie, die Monozytenanreicherung dieselbe MGMT Expression aufweisen. Auch hierbei zeigte sich (Abb. 3.7, Spur 5 und 6), dass die MGMT Expression durch beide Methoden der Monozytenanreicherung, Plastikadhärenz und MACS, unverändert bleibt. Somit führte die unterschiedliche Monozytenisolierung zu keinem Unterschied in der MGMT Proteinexpression.

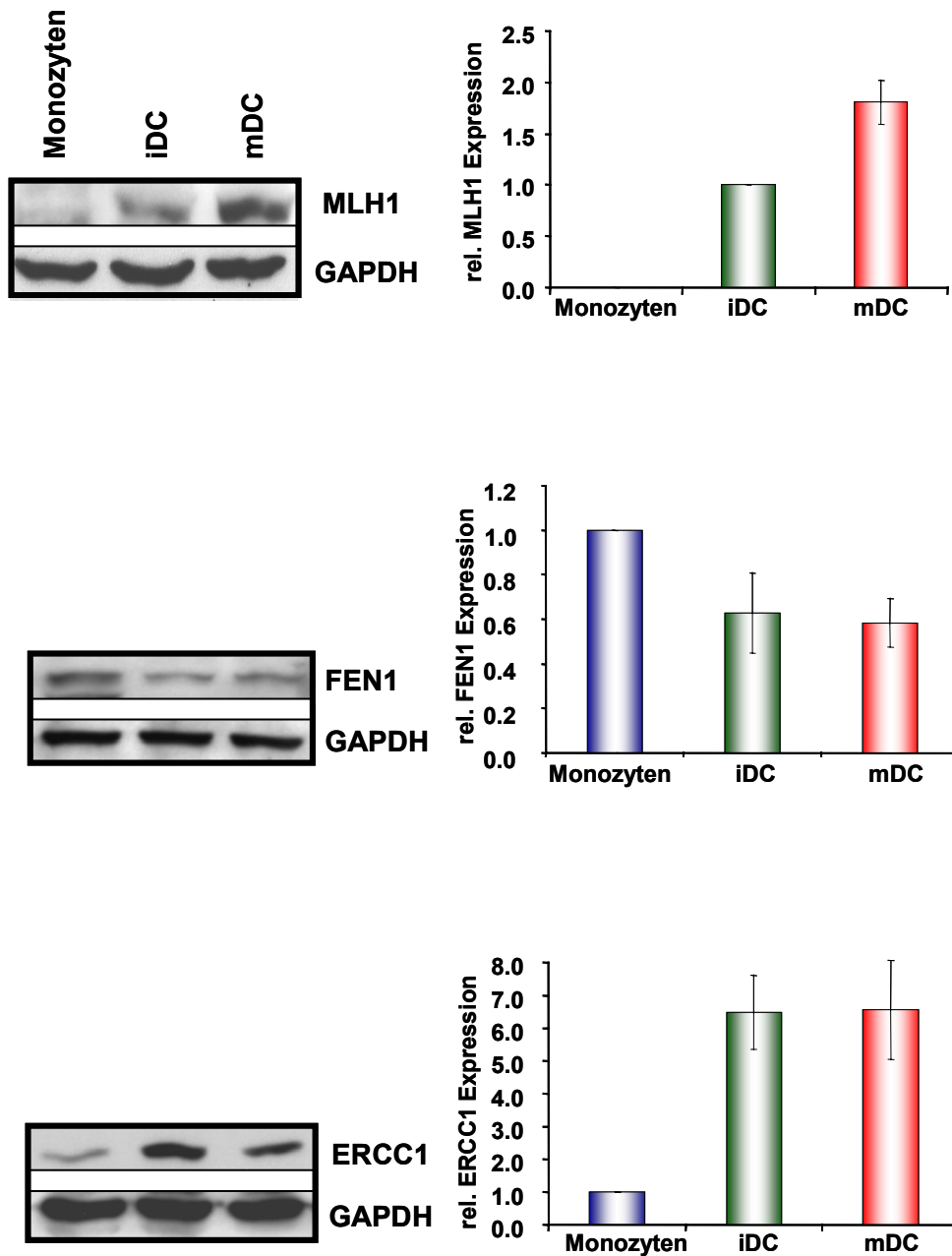


**Abb. 3.7: MGMT Proteinexpression in Monozyten behandelt mit Zytokine und der Vergleich der Anreicherung per Plastikadhärenz versus MACS.** Repräsentativer Western Blot der MGMT Proteinexpression von Monozyten (1) und behandelten Monozyten mit GM-CSF (2), IL-4 (3) oder GM-CSF mit IL-4 (4) über 7 d. Auswirkung der Monozytenanreicherung durch Plastikadhärenz (5) versus MACS (6). Zur Beladungskontrolle wurden die Immunoblots mit anti GAPDH-Antikörper inkubiert.

### 3.8 Protein- und Genexpression weiterer DNA-Reparaturproteine

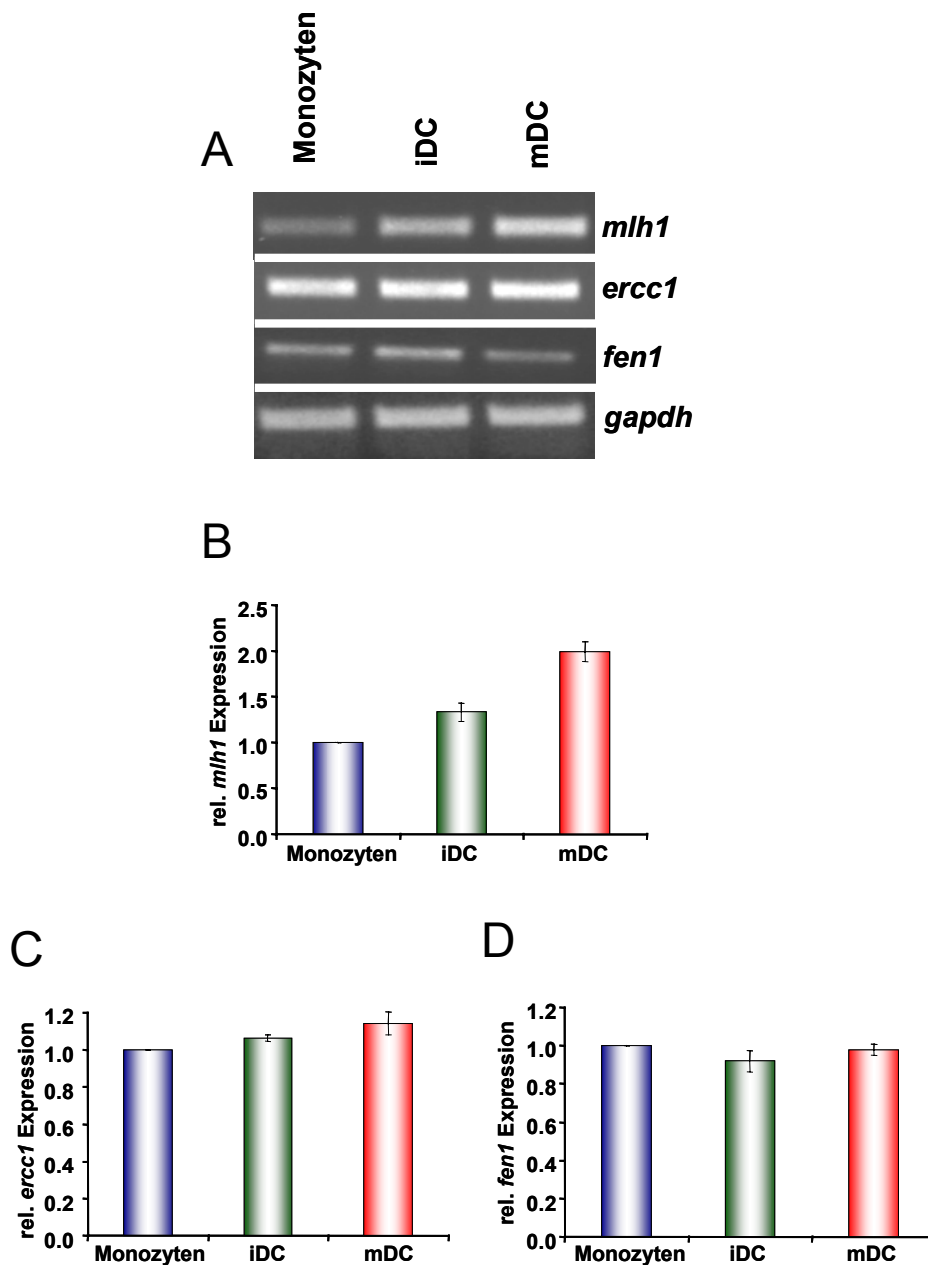
Durch die Zytokin-vermittelte Ausreifung der Monozyten zu DC könnten weitere DNA-Reparaturproteine unterschiedlich exprimiert werden. Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurde die Expression mehrerer Proteine, die an verschiedenen DNA-Reparaturwegen beteiligt sind, analysiert. Es wurden folgende Proteine untersucht, MLH1 ein Enzym aus der Mismatch-Reparatur, ERCC1 ein Enzym aus der Nukleotidexzisionsreparatur und Fen1, ein Enzym aus der Basenexzisionsreparatur.

Die Untersuchung der Proteinexpression (Abb. 3.8) ergab eine Hochregulation der Proteine MLH1 und ERCC1 und eine Herabregulation des Proteins FEN1 während der Ausreifung von Monozyten durch Zytokine zu iDC und mDC. Die Daten sind als repräsentativer Western Blot in Abb. 3.8 dargestellt. Die quantitative Analyse verdeutlicht die Ergebnisse der Proteinregulation von Monozyten zu DC und fasst sie zusammen.



**Abb. 3.8: MLH1, FEN1 und ERCC1 Proteinexpression in Monozyten, iDC und mDC.** Untersuchung der Proteinexpression in Monozyten, iDC und mDC mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Western Blots mit densitometrischer Quantifikation von 3 Blots verschiedener Spender. Zur Beladungskontrolle wurden die Immunoblots mit anti GAPDH-Antikörper inkubiert.

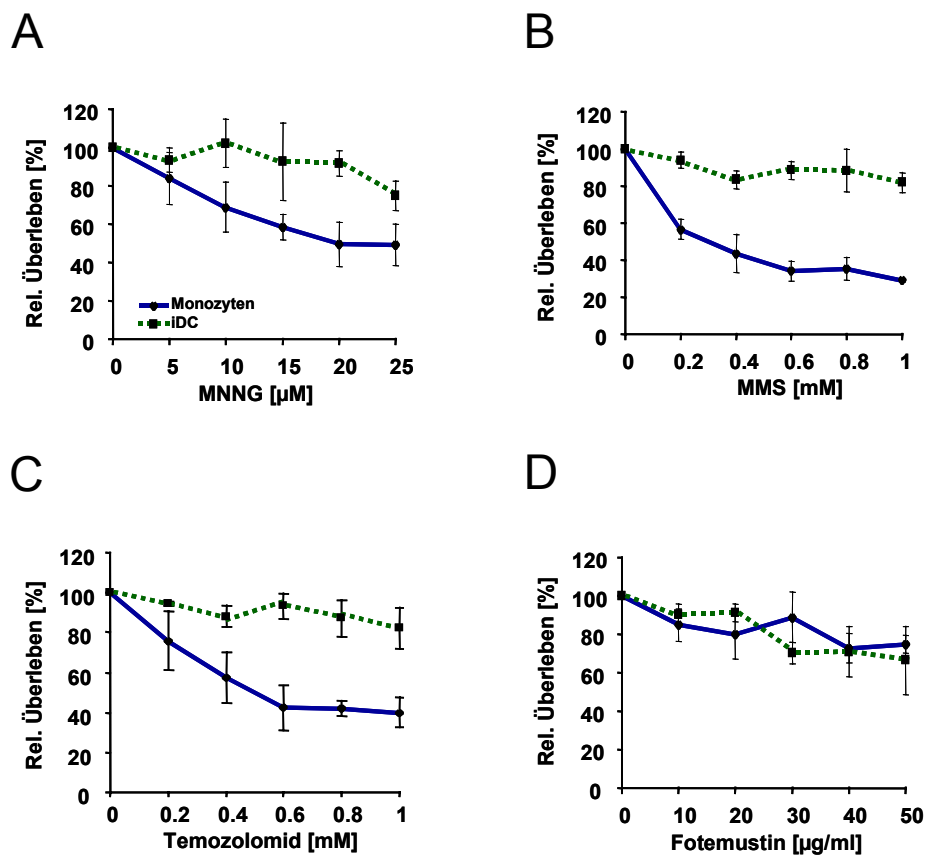
Die Untersuchung der Expression der mRNA von *mlh1*, *fen1* und *ercc1* ergab, dass nur die Genexpression von *mlh1* mit der Proteinexpression korreliert. Somit kann eine transkriptionelle Regulation bei MLH1 vorliegen. Bei der mRNA Expression von *fen1* und *ercc1* konnte keine Korrelation mit der Proteinexpression festgestellt werden. Daher könnten posttranskriptionelle Regulationen und/ oder Proteindegradation bei FEN1 eine mögliche Ursache sein, was in der Literatur noch nicht beschrieben wurde.



**Abb. 3.9: *mlh1*, *ercc1* und *fen1* Genexpression in Monozyten, iDC und mDC.** RT-PCR-Analyse der *mlh1*, *ercc1* und *fen1* mRNA in Monozyten und DC, Darstellung einer repräsentativen RT-PCR im Agarosegel und deren Densitometrischer Quantifikation von 3 Blots verschiedener Spendern. Die *gapdh* RT-PCR diente zum Abgleich der eingesetzten RNA Menge.

### 3.9 Sensitivität von Monozyten und iDC gegenüber Alkylantien

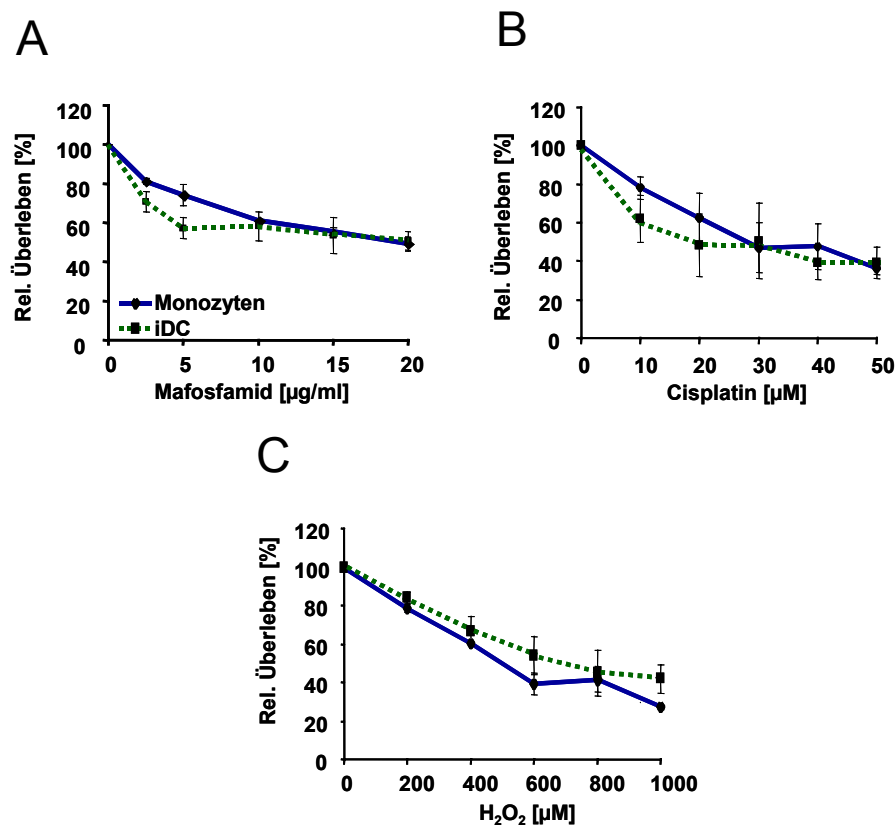
Zur Untersuchung der Sensitivität gegenüber Alkylantien wurden nur Monozyten und iDC eingesetzt, da mDC ihren eigenen Zelltod mit der Ausreifung induzieren und daher nur 2-4 Tage überleben. Die Zellen wurden mit den angegebenen Dosen von MNNG, Temozolomid, MMS und Fotemustin behandelt und nach 72 h mit Trypan Blau angefärbt und die lebenden Zellen ausgezählt. Die Dosiswirkungskurven der Alkylantien MNNG, MMS und Temozolomid zeigen, dass Monozyten deutlich sensibler sind als iDC (Abb. 3.10). Bei der Fotemustinbehandlung zeigte sich kein Vitalitätsunterschied zwischen Monozyten und iDC (Abb. 3.10D). Da Fotemustin neben den zytotoxischen chlorethylierenden DNA-Läsionen auch ‚Interstrangcrosslinks‘ bildet, ist anzunehmen, dass der Zelltod in Monozyten und iDC auf die durch Cross-Links gebildeten DNA Läsion zurückgeht. Somit kann die Hypersensitivität durch monofunktionale Alkylantien bei den Monozyten auf die Wirkung der DNA-Methylierung zurückgeführt werden.



**Abb. 3.10: Sensitivität von Monozyten und iDC gegenüber Alkylantien.** Dosiswirkungskurven folgender Behandlungen: **A)** Trypanblaufärbung MNNG behandelter Monozyten und iDC. **B)** Trypanblaufärbung MMS behandelter Monozyten und iDC. **C)** Trypanblaufärbung Temozolomid behandelter Monozyten und iDC. **D)** Trypanblaufärbung Fotemustin behandelter Monozyten und iDC. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten und unterschiedlichen Spendern.

### 3.10 Sensitivität von Monozyten und iDC gegenüber DNA interkalierenden Verbindungen („Cross-linker“) und oxidativem Stress

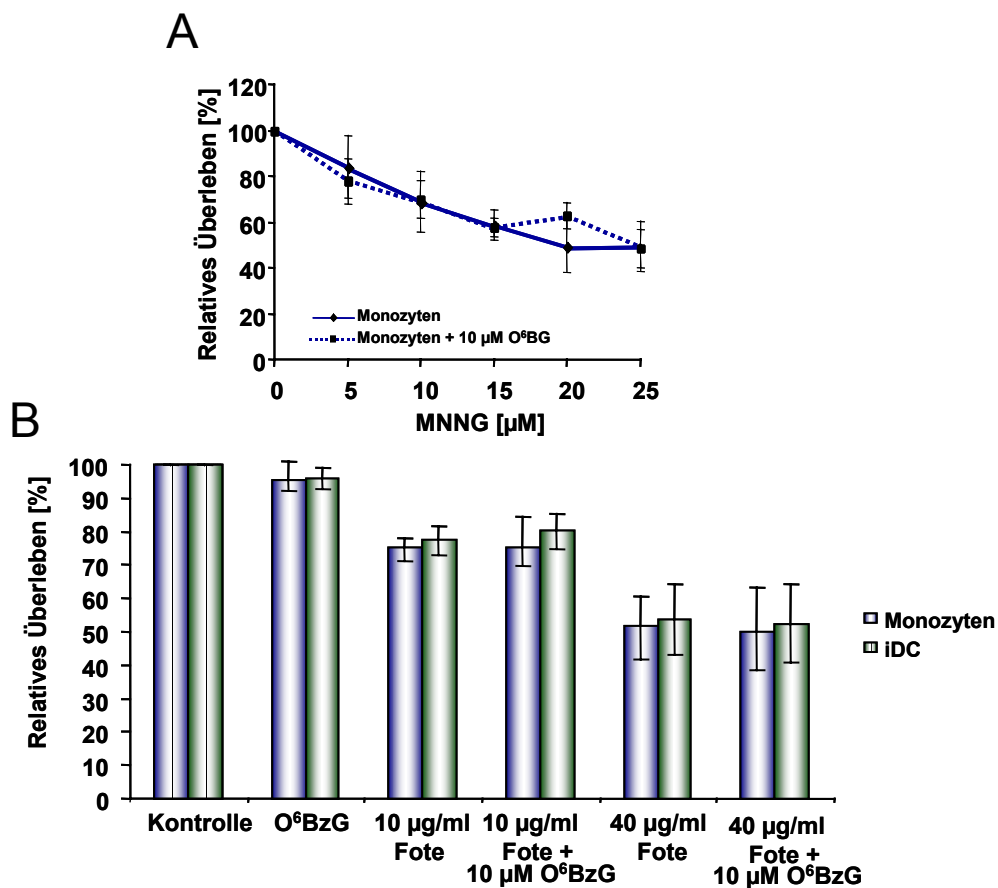
Zwecks Überprüfung der Vitalität gegenüber DNA interkalierenden Agenzien („Cross-Linker“) und oxidativem Stress wurden behandelte Monozyten und iDC durch Trypanblau angefärbt und ausgezählt. Hierbei zeigte sich, dass weder Cross-Linker-induzierende Agenzien wie Mafosamid und Cisplatin noch die oxidativem Stress induzierende  $H_2O_2$  Behandlung zu einem Sensitivitätsunterschied zwischen Monozyten und iDC führte. Beide Populationen zeigten die gleiche Empfindlichkeit gegenüber den gentoxischen Behandlungen (Abb. 3.11). Auch die Hochregulation der Expression von ERCC1, einem Protein der NER, in DC zeigte keinen Einfluss auf die Vitalität.



**Abb. 3.11: Sensitivität von Monozyten und iDC gegenüber Cross-Linker und oxidativem Stress.** Dosiswirkungskurven folgender Behandlungen: **A)** Trypanblaufärbung Mafosamid behandelter Monozyten und iDC. **B)** Trypanblaufärbung Cisplatin behandelter Monozyten und iDC. **C)** Trypanblaufärbung  $H_2O_2$  behandelter Monozyten und iDC. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.11 Einfluss von MGMT auf die Sensitivität der Monozyten und iDC nach Alkylantienbehandlung

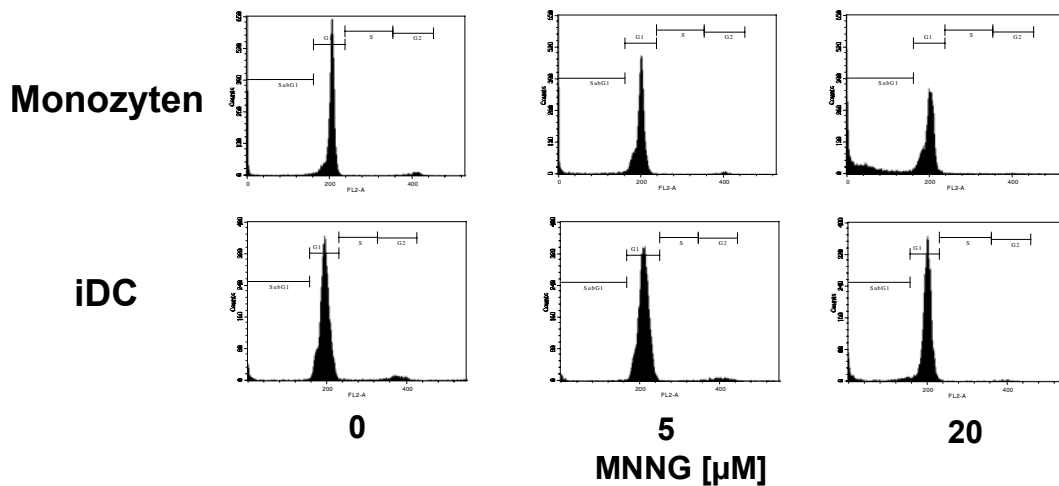
Zytotoxische O<sup>6</sup>-Methylguanin DNA Läsionen werden von MGMT erkannt und über eine Einschritt-Reaktion repariert, wobei die Methylgruppe auf das Enzym übertragen wird. Durch Inhibitoren, wie O<sup>6</sup>-Benzylguanin, kann MGMT inaktiviert werden. Um den Einfluss von MGMT auf die Sensitivität gegenüber Alkylantien in Monozyten zu untersuchen, wurden Monozyten zwecks MGMT Depletion 1 h mit 10 µM O<sup>6</sup>-Benzylguanin (O<sup>6</sup>BzG) versetzt und anschließend mit zunehmenden Dosen MNNG behandelt. Die Depletion der MGMT Aktivität führte nach 72 h zu keiner erhöhten Mortalität in Monozyten, gemessen mittels Trypanblaufärbung (Abb. 3.12A). Auch die Untersuchung der Sensitivität durch dosisabhängige Fotemustinbehandlung und deren MGMT Depletion in Monozyten und iDC führte zu keinem Unterschied (Abb. 3.12B). Aus diesen Untersuchungen kann geschlossen werden, dass O<sup>6</sup>-Alkylguanin nicht die zytotoxische DNA Läsion in Monozyten ist, sondern N-Alkylierung.



**Abb. 3.12: Sensitivität gegenüber MNNG, Fotemustin und MGMT Depletion. A)** Trypanblaufärbung (72 h) nach 1 h Vorbehandlung mit 10 µM O<sup>6</sup>-BzG und zunehmender Dosis MNNG in Monozyten. **B)** Trypanblaufärbung (72 h) nach 1 h Vorbehandlung mit 10 µM O<sup>6</sup>-BzG und zunehmender Dosis Fotemustin in Monozyten und iDC. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten.

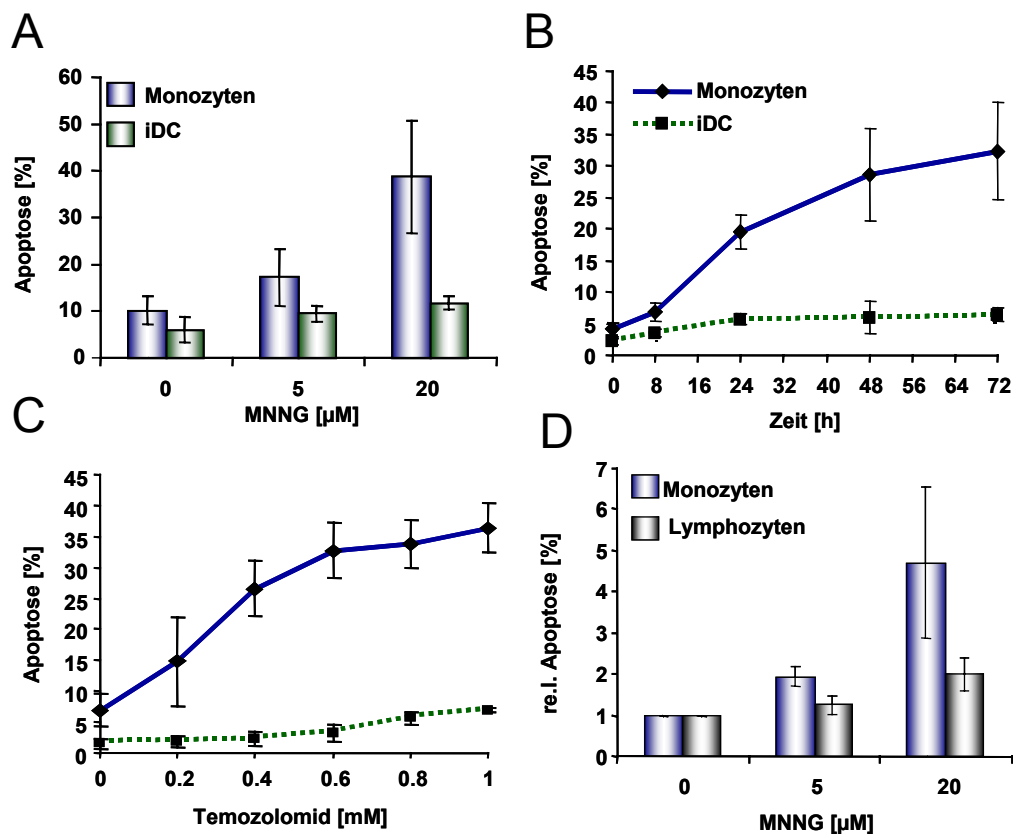
### 3.12 Alkylantien-induzierte Apoptose in Monozyten und iDC, sowie der Vergleich zu Lymphozyten

Zur Klärung der Frage, inwieweit die durch Alkylantien bedingte Zytotoxizität ihre Ursache in der Induktion von Apoptose findet, wurden Monozyten, die daraus abgeleiteten iDC und isolierten Lymphozyten mit alkylierenden Gentoxinen behandelt und die Apoptoseinduktion quantitativ bestimmt. Zur exakten Quantifizierung des apoptotischen Zelltods wurden SubG1 Messungen der zeit- und dosisabhängig Alkylantien-behandelten Monozyten und iDC durchgeführt und durchflusszytometrisch analysiert. Außerdem fungierte diese Messung auch zur Erfassung der Zellproliferation und der Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen. MNNG zeigte eine dosisabhängige Apoptoseinduktion nach 72 h in Monozyten, erkennbar an der Zunahme der apoptotischen SubG1-Zellpopulationen. Vergleichend dazu induzierte die MNNG Behandlung in iDC nur gering Apoptose. Außerdem wurde mit den Untersuchungen gezeigt, dass Monozyten und iDC nicht proliferieren und sich in der G1-Zellzyklusphase befinden (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13: MNNG-induzierte Apoptose in Monozyten und iDC.** Eine repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen SubG1-Messung von Monozyten und iDC 72h nach 5 µM und 20 µM MNNG Behandlung.

Die Quantifizierung der SubG1 Fraktion von dosisabhängigen MNNG Behandlungen verdeutlicht eine signifikante Apoptoseinduktion in Monozyten (bis zu 40%), wohingegen MNNG in iDC ca. 10% Apoptose auslöst (Abb. 3.14A). Dies wurde auch in einer zeitabhängigen Untersuchung bestätigt, welche zeigte, dass die Apoptoseinduktion bei mit 20  $\mu\text{M}$  MNNG behandelten Monozyten nach 24 h eintritt und stetig mit zunehmender Zeit ansteigt. Für alle Zeitpunkte konnte gezeigt werden, dass die Apoptose durch die DNA Alkylierung in Monozyten stets höher als in den von ihnen abgeleiteten iDC war (Abb. 3.14B). Dies wurde ebenso mit der dosisabhängigen Behandlung von Temozolomid- einem repräsentativen methylierenden Agenz bei der Chemotherapie- bestätigt. Mit zunehmender Dosis von Temozolomid konnte eine zunehmende Apoptoseinduktion in Monozyten detektiert werden (Abb. 3.14C). Die durch MNNG induzierte Apoptosefrequenz war in Monozyten höher als in nichtproliferierende periphere Lymphozyten vom selben Spender (Abb. 3.14D). Dieses Resultat zeigt, dass Monozyten eine Blutzellpopulation repräsentiert, welche empfindlich auf DNA methylierende Agenzien reagiert.

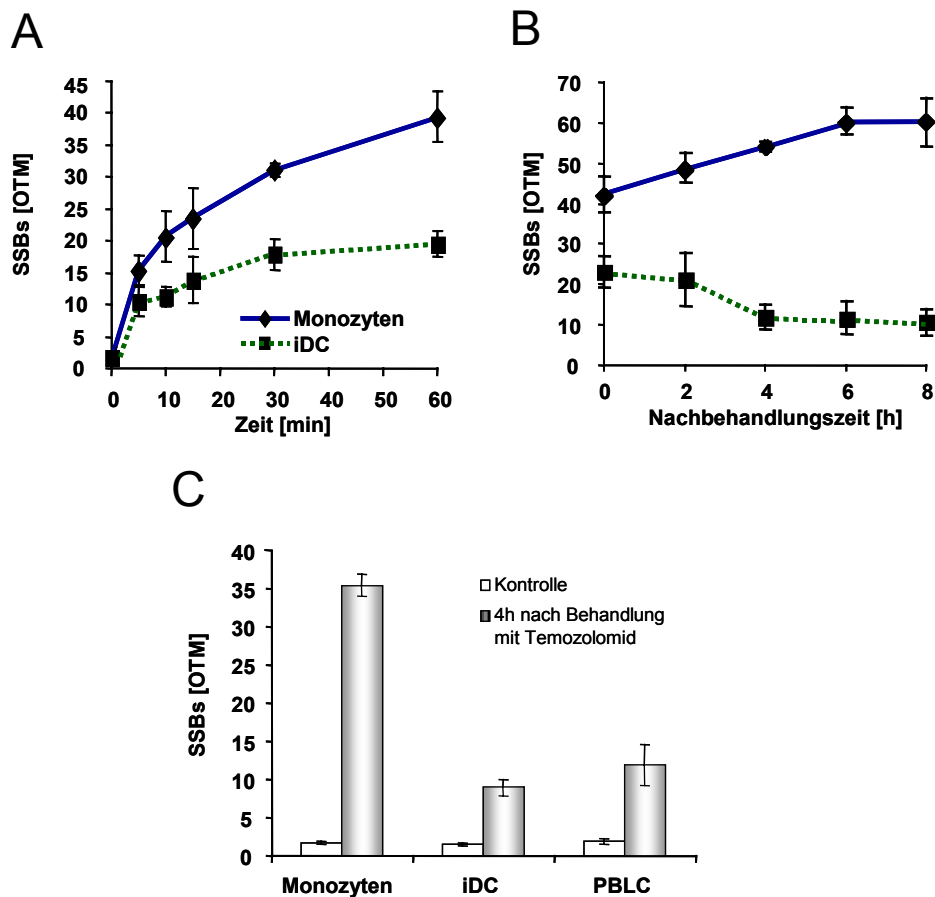


**Abb. 3.14: Dosis- und Zeitabhängigkeit der Apoptosefrequenz in Monozyten und iDC nach Alkylantienbehandlung.** **A)** Quantifizierung apoptotischer SubG1-Zellen 72 h nach 5  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  MNNG in Monozyten und iDC. **B)** Zeitabhängige Quantifizierung der Apoptose in Monozyten und iDC mit 20  $\mu\text{M}$  MNNG. **C)** Dosisabhängige Quantifizierung der Apoptose in Monozyten und iDC nach 72 h. **D)** Relative Quantifizierung apoptotischer SubG1-Zellen 72 h nach 5  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  MNNG in Monozyten und Lymphozyten. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.13 SSBs Reparatur in Monozyten und iDC nach Alkylantienbehandlung

Die meisten DNA Läsionen, welche durch methylierende Agenzien induziert werden, sind N-Methylpurine, die ebenso wie O<sup>6</sup>-Alkylguanin zum Zelltod führen. Diese Läsionen werden durch die Basenexzisionsreparatur (BER) prozessiert und entfernt. Mit der zunehmenden Sensitivität gegenüber Alkylantien und dem Nachweis, dass O<sup>6</sup>-Methylguanin nicht die zytotoxische DNA Läsion darstellt, sowie der Induktion der Apoptose durch methylierende Agenzien, wurde als Leitfaden für die weiteren Untersuchungen die Hypothese aufgestellt, dass Monozyten einen Defekt in der BER und damit in der Entfernung von N-Methylpurinen aufweisen. Zur Ermittlung der BER Reparaturkapazität wurden Monozyten und Monozyten-abgeleitete iDC mit 20 µM MNNG behandelt und nach entsprechender Zeit eine SCGE durchgeführt. Die Behandlung der Monozyten und iDC mit MNNG über eine Zeitperiode von 60 min zeigte eine höhere Bildung von DNA Einzelstrangbrüchen (SSBs) in Monozyten als in iDC (Abb. 3.15A). Diese SSBs verschwinden innerhalb von 4 h der Nachbehandlungszeit in iDC, was auf Basenexzisionsreparatur hinweist, während in den Monozyten die Menge an SSBs zunimmt (Abb. 3.15B). Ebenso wurde nach einer Behandlung für 1 h mit 1 mM Temozolomid und einer Nachwirkzeit von 4 h eine signifikant höhere Bildung von SSBs in Monozyten als in iDC vom selben Spender beobachtet (Abb. 3.15C). Hierbei wurden auch vom selben Spender die BER Reparaturkapazität gegenüber Temozolomid in peripheren Blutlymphozyten (PBLC) gemessen. Diese zeigten die gleiche Reparaturkapazität wie iDC (Abb. 3.15C).

Die beobachteten SSBs während der Reparatur von N-Alkylierungen werden durch BER durch die Spaltung von apurinen Stellen mittels Apuriner Endonuklease (APE-1) erzeugt, und in weiteren Schritten wieder ligiert. Dies berücksichtigt kann die These aufgestellt werden, dass Monozyten, aber nicht iDC und PBLC einen Defekt im letzten Schritt der BER, der Ligation, aufweisen. Durch diesen Ligationsdefekt sind die Monozyten nicht fähig, SSBs zu ligieren; es erfolgt somit eine Ansammlung von BER Intermediaten.

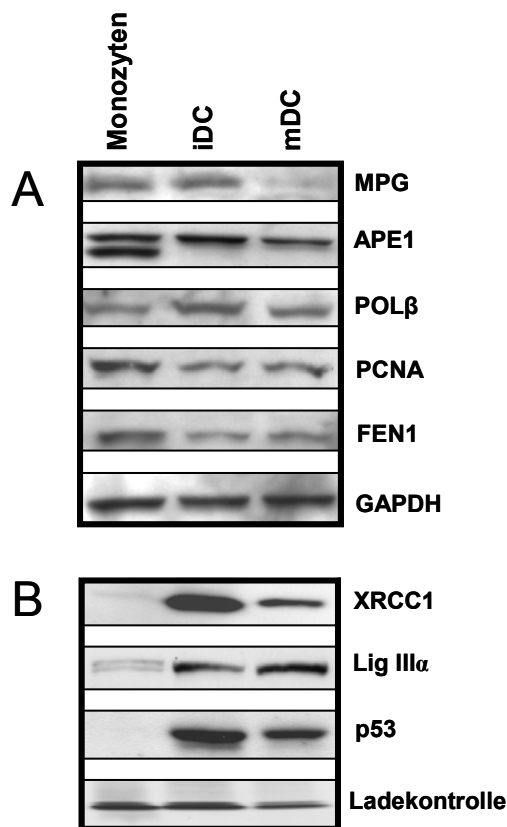


**Abb. 3.15: Bildung von DNA Einzelstrangbrüchen in Monozyten, iDC und PBLC.** Die Zellen wurden mit 20  $\mu\text{M}$  MNNG behandelt. DNA Einzelstrangbruchbildung mittels alkalischen Comet Assay gemessen. **A)** SSBs Frequenz über 60 min mit 20  $\mu\text{M}$  MNNG. **B)** Frequenz der SSBs zeitabhängig nach 1h Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  MNNG. **C)** Frequenz der SSBs in Monozyten, iDC und PBLC exponiert mit 1 mM Temozolomid für 1h. Die Messung erfolgte 4 h nach Behandlung. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.14 Expression an der Basenexzisionsreparatur (BER) beteiligter Proteine

Zur Untersuchung des BER Defekts in Monozyten wurde die Expression der BER Proteine in Monozyten, iDC und mDC genauer analysiert. Ein repräsentativer Western Blot zeigt (Abb. 3.16A), dass die N-Methylpurin-DNA Glykosylase (MPG) und die Apurine Endonuklease (APE-1) in gleicher Intensität in Monozyten und iDC exprimiert vorliegen. Expressionsabnahmen traten nur in der mDC Population auf. Die Expression des ‚Proliferating Cell Nuclear Antigen‘ (PCNA) und der ‚Flap Endonuklease 1‘ (FEN1) wurde während der Ausreifung leicht herunterreguliert. Die Expression der DNA Polymerase  $\beta$  wurde in iDC leicht hochreguliert. Den größten Unterschied in der Proteinexpression zwischen Monozyten und DC zeigte sich für das ‚X-ray repair cross complementing protein 1‘

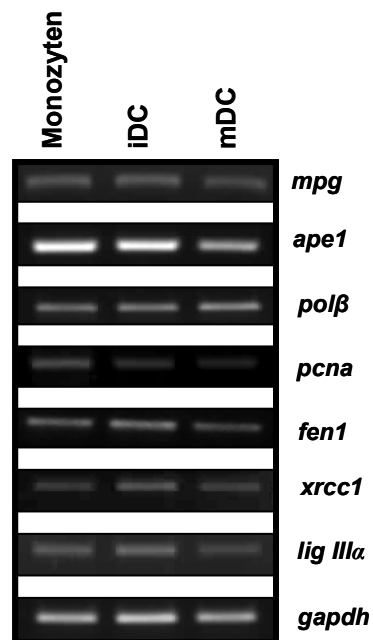
(XRCC1) und die DNA Ligase III $\alpha$  (Lig III $\alpha$ ). Monozyten zeigten keine oder sehr geringe Expression beider Proteine, wohingegen in DC diese Proteine gut exprimiert vorlagen (Abb. 3.16B). Interessanterweise zeigte sich, dass auch p53, welches die BER stimuliert, nur in DC exprimiert wird, aber nicht in Monozyten (Abb. 3.16B). Da XRCC1 und Lig III $\alpha$  als dimerer Komplex für die Ligation in der BER notwendig sind, kann durch die fehlende Expression beider Proteine in Monozyten der Defekt in der BER erklärt werden, der sich dadurch auszeichnet, dass es zur Anreicherung von SSBs in Monozyten kommt, welche zur Apoptose führen.



**Abb. 3.16: BER Proteinexpression in Monozyten, iDC und mDC.** A) Proteinexpression von MPG, APE-1, POL $\beta$ , PCNA und FEN1 von Gesamtextrakten. Zur Beladungskontrolle wurden die Immunoblots mit anti GAPDH-Antikörper inkubiert. B) Proteinexpression von XRCC1, Lig III $\alpha$  und p53 von Kernextrakten. Als Ladekontrolle diente Ponceaufärbung.

### 3.15 Genexpression der BER

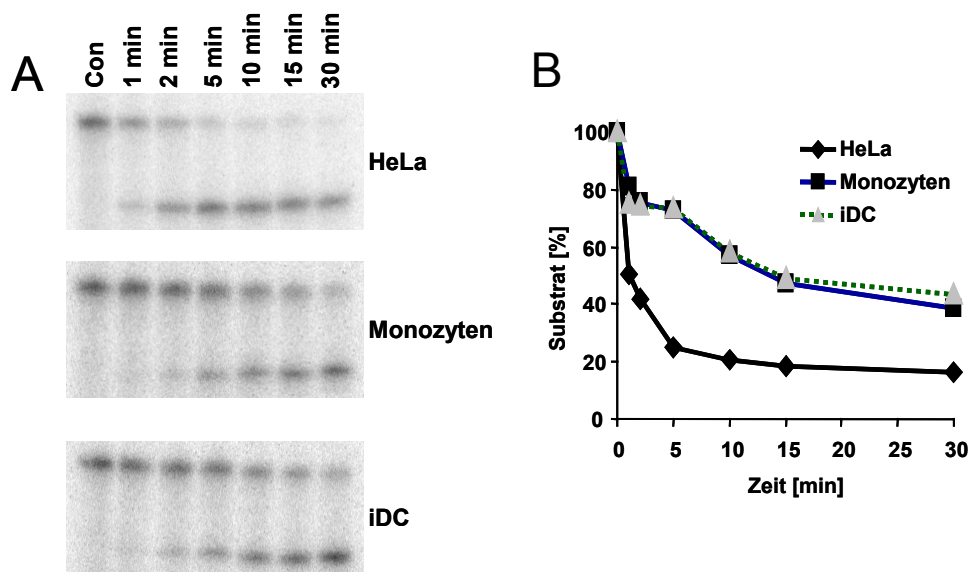
Die unterschiedliche Proteinexpression kann möglicherweise durch unterschiedliche Expression der BER Gene erklärt werden. Die durch semiquantitative RT-PCR ermittelten mRNA Expressionen in Monozyten und DC ergaben keinen Hinweis auf eine Genregulationen. Sowohl Monozyten als auch DC exprimieren *xrcc1* und *lig III $\alpha$*  mRNA, was die fehlende Proteinexpression in Monozyten nicht erklärt. Daher ist anzunehmen, dass hier posttranskriptionelle Regulationsmechanismen vorliegen.



**Abb. 3.17: BER Genexpression in Monozyten, iDC und mDC.** Semiquantitative RT-PCR Analyse von *mpg*, *ape1*, *pol $\beta$* , *pcna*, *fen1*, *xrcc1* und *lig III $\alpha$*  in Monozyten, iDC und mDC. *Gapdh* RT-PCR diente zum Abgleich der eingesetzten RNA Menge.

### 3.16 APE-1 Aktivität in Monozyten und iDC

Die Western Blot Analyse von APE-1 in Monozyten (Abb. 3.16A) zeigte zwei Banden, was auf eine erhöhte APE-1 Aktivität in Monozyten im Vergleich zu iDC hinweisen könnte, welches die stetige Zunahme der SSBs in Monozyten erklären könnte. Somit wurde ein APE-1 Enzymaktivitätsnachweis durchgeführt, bei der ein radioaktiv-markiertes, doppelsträngiges Oligonukleotid mit einer apurinen Stelle (AP) als Substrat verwendet wurde. Durch die Spaltung des 35 bp großen Substrates durch APE-1 entsteht ein 15 bp großes Produkt. Ein repräsentatives Experiment mit Monozyten, iDC und HeLa S3 ist in Abb. 3.18A dargestellt, welches verdeutlicht, dass Tumorzellen (HeLa S3) im Vergleich zu Monozyten und iDC die AP-Stelle schneller prozessieren. Die Quantifizierung zeigte, dass die Kinetik der Substratspaltung signifikant höher in HeLa S3 Zellen als in Monozyten und iDC ist. Außerdem wurde kein Unterschied in der APE-1 Aktivität zwischen Monozyten und deren abgeleiteten iDC detektiert. Somit besteht der BER Defekt in den Monozyten nicht in fehlender APE-1 Enzymaktivität

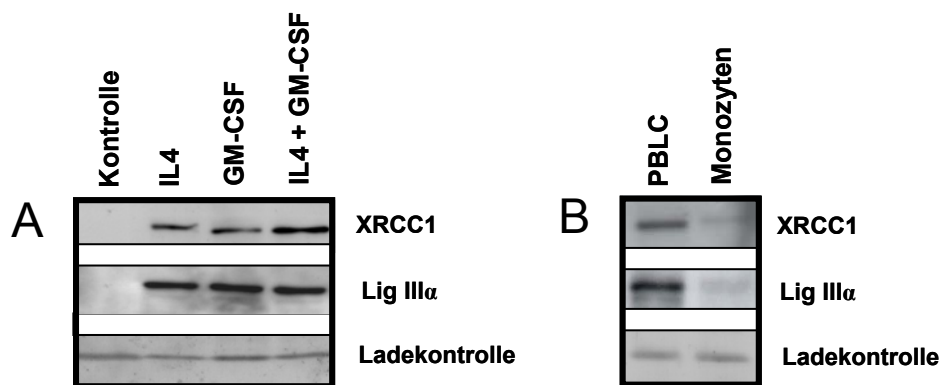


**Abb. 3.18: Aktivität der Apurinen Endonuklease (APE-1) in HeLa S3, Monozyten und iDC. A)** Gesamtzellextrakt von HeLa, Monozyten und iDC wurden auf APE-1 Aktivität untersucht. Nach unterschiedlicher Zeitinkubation wurden Aliquots entnommen und auf ein 20% Sequenziergel separiert. Als Kontrolle (Con #0) wurde BSA inkubiert. Die obere Bande stellt das 35 bp große Substrat und die untere Bande das geschnittene 15 bp Produkt dar. **B)** Densitometrische Quantifizierung der kinetischen Spaltung des radioaktiv-markierten Substrates.

### 3.17 XRCC1 und Lig III $\alpha$ Proteinexpression in Zytokin-behandelten Monozyten, sowie der Vergleich unbehandelter Monozyten mit PBLC

Die Differenzierung der Monozyten zu iDC erfolgte durch die Behandlung der Zytokine GM-CSF und IL-4. Deshalb stellt sich hier die Frage, welches der beiden Zytokine eine Hochregulation der XRCC1 und Lig III $\alpha$  Proteinexpression auslöst oder ob dies nur durch die Kombination beider Zytokine erfolgt. Die Western Blot Analyse in Abb. 3.19A zeigt, dass die Behandlung der Monozyten mit IL-4 oder GM-CSF die XRCC1 und Lig III $\alpha$  Proteinexpression induziert. Bei XRCC1 scheint hier ein additiver Effekt vorzuliegen, da bei der Behandlung mit beiden Zytokinen eine leicht stärkere Proteinexpression induziert wurde. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass beide Zytokine die BER Proteine XRCC1 und Lig III $\alpha$  hochregulieren können.

Interessanterweise zeigten auch nichtproliferierende PBLC eine stärkere XRCC1 und Lig III $\alpha$  Expression als Monozyten (Abb. 3.19B), was auch die BER Reparatur der DNA Methylierung durch Temozolomidbehandlung in Abb. 3.15C erklärt.

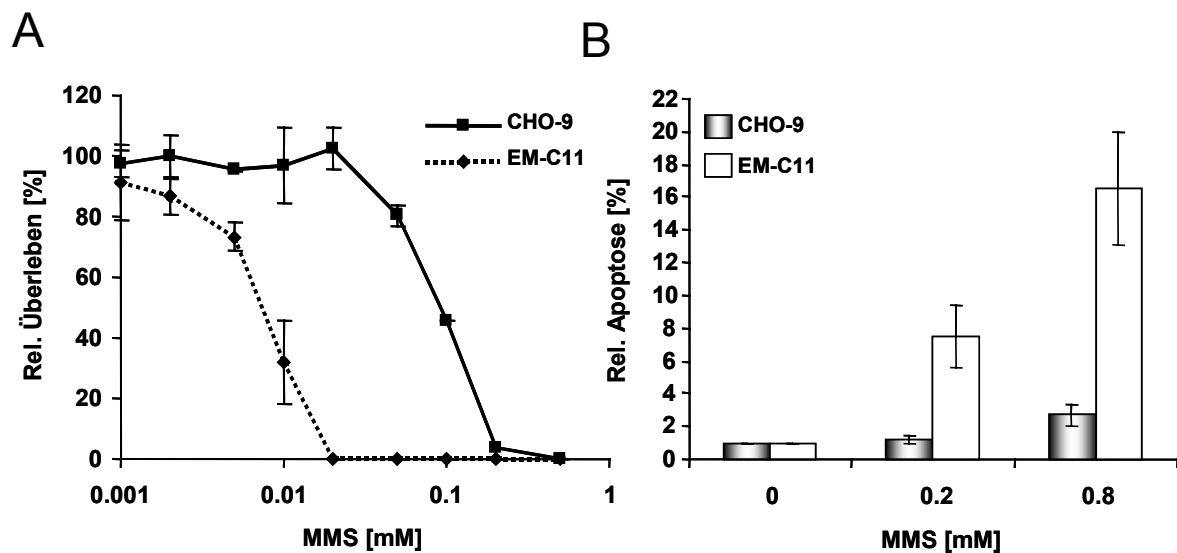


**Abb. 3.19: XRCC1 und Lig III $\alpha$  Expression von unbehandelten versus Zytokin-behandelten Monozyten, sowie Expressionsvergleich von PBLC mit Monozyten. A)** Unbehandelte Monozyten (Kontrolle), IL-4, GM-CSF und IL4 mit GM-CSF behandelte (7 d) Monozyten Expressionsanalyse von XRCC1 und Lig III $\alpha$  per Western Blot. **B)** Vergleich PBLC mit deren Monozyten auf XRCC1 und Lig III $\alpha$  Expression per Western Blot. Als Ladekontrolle diente Ponceaufärbung.

### 3.18 Sensitivität und Apoptose von XRCC1 pro- und defizienten CHO Zellen nach MMS Behandlung

Die Hypersensitivität von Monozyten gegenüber alkylierender Agenzien wurde durch die fehlende Ligation in der BER erklärt. Zur Überprüfung, ob es durch Mutation von XRCC1 in den Zellen zu einem Defekt in der BER kommt, welches wiederum zur verstärkten Sensitivität gegenüber Alkylantien führt, wurde die Vitalität und Apoptosefrequenz in XRCC1 defizienten CHO Zellen (EM-C11) und den korrespondierenden wt Zellen (CHO-9) nach MMS Behandlung untersucht.

Durch Koloniebildungstests wurde gezeigt, dass XRCC1 defiziente Zellen sensitiver als wt Zellen gegenüber MMS reagieren (Abb. 3.20A). Zur Untersuchung der Apoptoseinduktion wurden konfluente, nichtproliferierende Zellen verwendet, welche sich im G1 Zellzyklusblock befanden, um eine Vergleichbarkeit mit nichtproliferierenden, G1 arretierenden Immunzellen zu gewährleisten. Auch hier zeigte sich, dass XRCC1 defiziente, nichtproliferierende Zellen eine erhöhte Apoptosefrequenz nach 72 h MMS-Behandlung aufweisen, welche mit zunehmender MMS Dosis anstieg (Abb. 3.20B). Diese Daten zeigen, dass fehlende Expression von XRCC1 eine erhöhte Sensitivität gegenüber methylierenden Agenzien bewirkt.

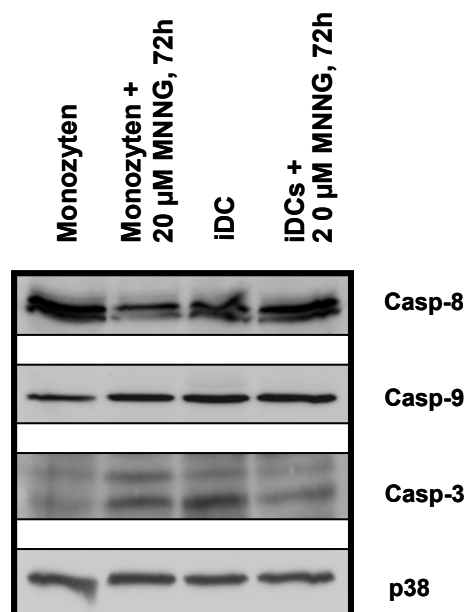


**Abb. 3.20: Sensitivität und Apoptosefrequenz von XRCC1 pro- und defizienten CHO Zellen gegenüber MMS. A)** Koloniebildungstest MMS behandelter CHO-9 (wt) Zellen und EM-C11 (XRCC1 mutiert) Zellen. **B)** Konfluente CHO-9 und EM-C11 Zellen wurden mit MMS behandelt, nach 72 h die Apoptose durch SubG1 Messung ermittelt.

### 3.19 Untersuchung von zellulären DNA-schadensinduzierten apoptotischen Signaltransduktionswegen nach MNNG-Behandlung in Monozyten und iDC

#### 3.19.1 Caspasen-Aktivierung nach MNNG-Behandlung in Monozyten und iDC

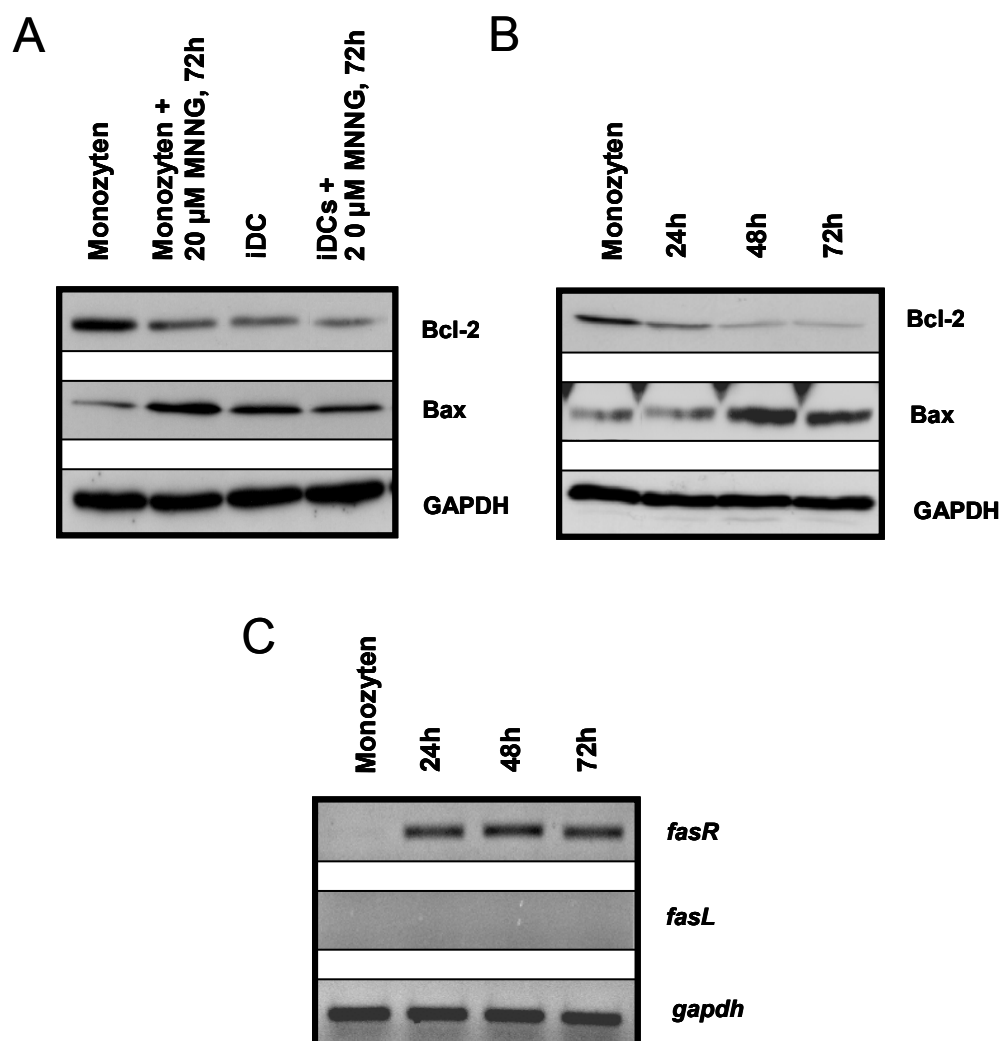
Da Alkylantien in Monozyten eine höhere Sensitivität im Vergleich zu iDC auslösen, welche zur DNA-schadensinduzierten Apoptose führen, sollte der molekulare Mechanismus der Apoptoseinduktion anhand der Aktivierung von Caspasen untersucht werden. Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Proenzyme vor, die durch Eigenproteolyse oder durch Spaltung durch andere Proteasen zu einem aktiven Enzym prozessiert werden. Zur Bestimmung der Caspase-Aktivität wurden Monozyten und iDC mit 20  $\mu\text{M}$  MNNG über 72 h behandelt und im Gesamtextrakt die aktive Form der Initiatorcaspasen 8 und 9, sowie der exekutiven Caspase-3 per Western Blot Analyse ermittelt. Nach Behandlung mit MNNG ist in Monozyten und iDC zu erkennen, dass die aktive Form von Caspase-8 in beiden Zellpopulationen unverändert vorliegt. Im Gegensatz hierzu nimmt die aktive Caspase-9 und 3 in den behandelten Monozyten zu, während sie in den behandelten iDC gleich bleibt (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21: Ermittlung aktiver Caspase-3, -8 und -9 in MNNG behandelten Monozyten und iDC per Western Blot.** Untersuchung aktiver Caspasen im Gesamtextrakt von Monozyten und iDC nach 72 h Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  MNNG. Als Beladungskontrolle wurden die Immunoblots mit anti p38-Antikörper inkubiert.

### 3.19.2 Proteinexpression von Bcl-2 und Bax, sowie Genexpression von *fasR* und *fasL* nach MNNG-Behandlung

Die Aktivierung der Caspasen-3 und -9 weist auf eine Induktion der Apoptose über den mitochondrialen Signaltransduktionweg hin. Eine zentrale Funktion bei dieser DNA-schadensinduzierten Apoptose kommt den pro- und antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern zu, die u.a. die Freisetzung von Cytochrom C und damit die Aktivierung von Caspase-9 induzieren. Western-Blot Analysen von Gesamtextrakten MNNG behandelte Monozyten und iDC nach 72 h zeigten, dass in Monozyten die Expression von Bcl-2 abnahm und von Bax zunahm, während es in den iDC unverändert blieb (Abb. 3.22A).



**Abb. 3.22: Bcl-2 und Bax Expression in MNNG behandelten Monozyten und iDC, sowie mRNA Expression von *fasR* und *fasL*.** **A)** Bcl-2 und Bax Proteinexpression in mit 20 µM MNNG (72 h) behandelten Monozyten und iDC. **B)** Zeitabhängigkeit der Proteinexpression von Bcl-2 und Bax in mit 20 µM MNNG behandelten Monozyten. Als Beladungskontrolle wurden die Immunoblots mit anti GAPDH-Antikörper inkubiert. **C)** Zeitabhängige *fasR* und *fasL* mRNA-Expression in 20 µM MNNG behandelte Monozyten. *gapdh* RT-PCR diente zum Abgleich der eingesetzten RNA Menge.

Ebenso zeigte die zeitabhängige Untersuchung der Bcl-2 und Bax Expression in behandelten Monozyten eine Abnahme von Bcl-2 und eine Zunahme von Bax beginnend 24 h nach Mutagenbehandlung (Abb.3.22B).

Offensichtlich führen unreparierte Alkylantien-induzierte DNA-Läsionen in Monozyten zur Erniedrigung der Bcl-2 und Erhöhung der Bax-Expression. Kinetische Untersuchungen zeigten, dass der Bcl-2 Abfall und die Bax-Zunahme in Monozyten 24 h nach MNNG Schädigung einsetzt und somit die Apoptose vorangeht.

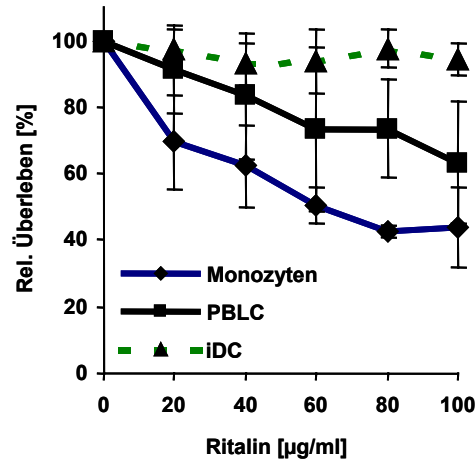
Zur Klärung, ob es durch MNNG induzierte DNA-Läsionen nicht auch zur Aktivierung des apoptotischen Todesrezeptors Fas/CD95 kommt, wurden Monozyten mit 20 µM MNNG behandelt und zeitabhängige RT-PCR Analysen von *fasR* und *fasL* durchgeführt. Die RT-PCR Untersuchungen ergaben zwar eine Zunahme der mRNA Expression des *fasR*, jedoch keine mRNA Expression des *fas* Liganden (Abb. 3.22C). Dies deutet darauf hin, dass der rezeptorvermittelte Signaltransduktionsweg in Alkylantien-behandelten Monozyten möglicherweise nicht induziert wird.

### **3.20 Sensitivität von Monozyten, iDC und PBLC gegenüber Methylphenidat**

Methylphenidat (C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>, Ritalin) wird derzeit hauptsächlich in der medikamentösen Behandlung von Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörungen (ADS/ADHS) bei Kindern eingesetzt. Daneben findet Methylphenidat auch Anwendung bei der Narkolepsie und Depression. Aus einem Bericht El-Zein *et al.* (2005) geht hervor, dass bei über 3 Monate mit Ritalin behandelten Kindern eine Anhäufung von chromosomalen Aberrationen, Schwesterchromatid-Austauschen und Kleinkernbildungen in peripheren Lymphozyten auftraten.

Über die Zytotoxizität des Psychopharmakons auf Immunzellen ist bisher nichts bekannt. Daher wurden Lymphozyten, Monozyten und iDC jeweils von einem Spender mit Ritalin versetzt und nach 72 h die Überlebensrate durch Trypanblaufärbung ermittelt. Die dosisabhängige Wirkungskurve von Ritalin zeigt, dass Monozyten die höchste Zytoxizität nach Ritalin Behandlung aufweisen. Auch PBLC (Lymphozyten) zeigten eine zunehmende Empfindlichkeit gegenüber Ritalin, wohingegen die iDC resistent sind (Abb. 3.23). Somit konnte gezeigt werden, dass Methylphenidat zytotoxisch nicht nur auf Lymphozyten, sondern stärker zytotoxisch auf Monozyten wirkt und es keinen Einfluss auf die Vitalität von iDC hat. Untersuchungen hinsichtlich einer Induktion von Apoptose oder Bildung von DNA-Läsionen, sowie deren Reparatur müssten zwecks Aufklärung der unterschiedlichen zytotoxischen

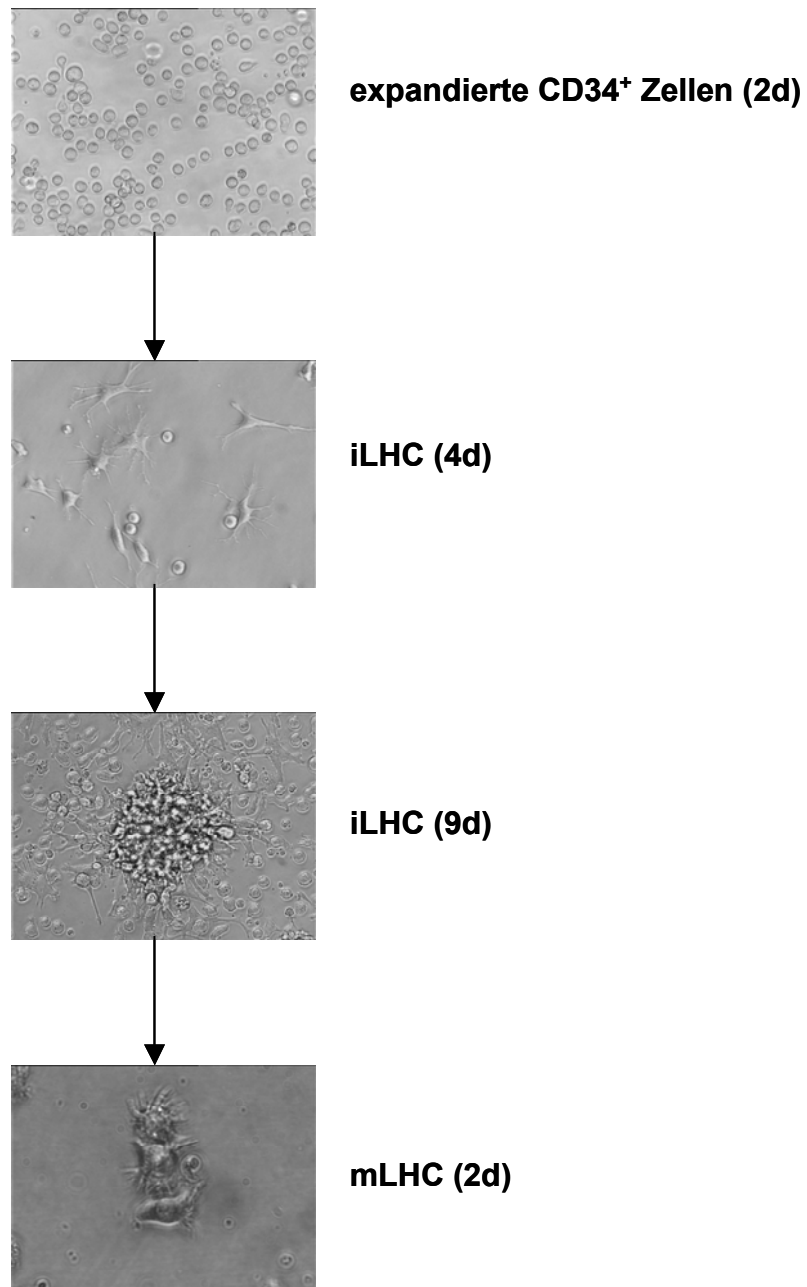
Auswirkungen noch genauer analysiert werden. Über mögliche DNA-Adduktbildungen von Ritalin ist ebenfalls nichts bekannt.



**Abb. 3.23: Sensitivität von Monozyten, PBLC und iDC gegenüber Ritalin.** Dosiswirkungskurve von Ritalin behandelten Monozyten, PBLC und iDC vom selben Spender. Auswertung erfolgte durch Trypanblaufärbung. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten und unterschiedlichen Spendern.

### 3.21 Generierung von Langerhans-Zellen (LHC) aus expandierten CD34<sup>+</sup>Stammzellen aus Nabelschnurblut

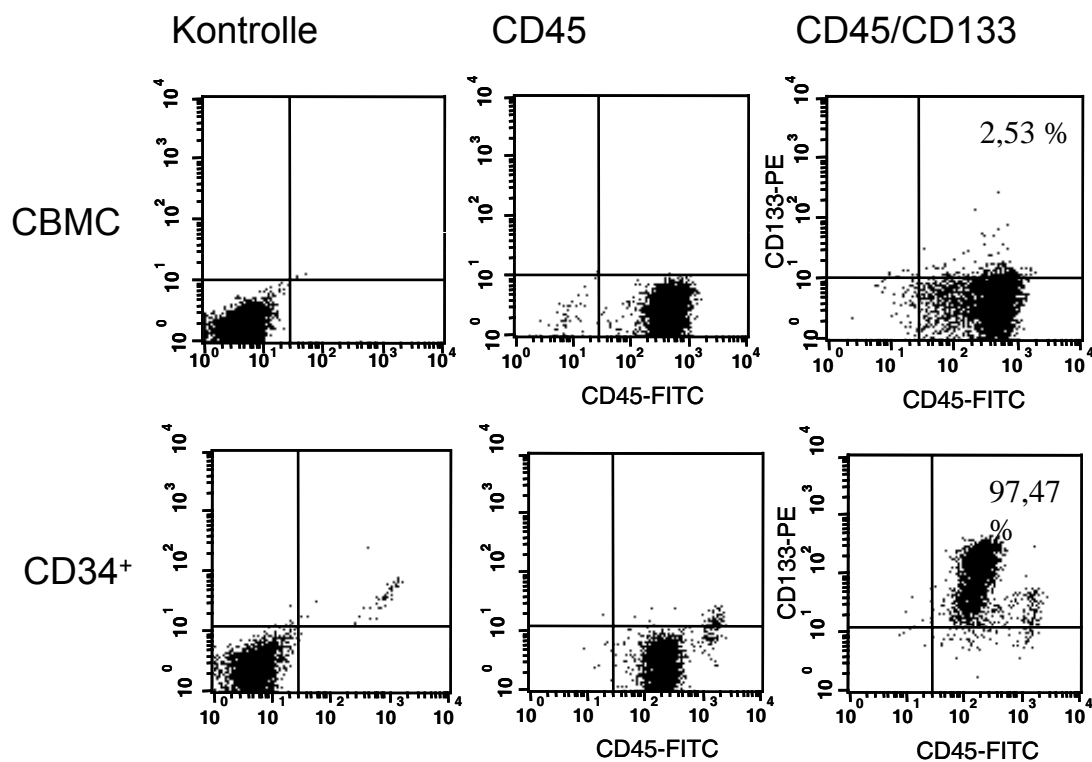
Eine weitere immunologisch interessante DC Population stellen die Langerhans Zellen (LHC) dar, welche vorwiegend in der Haut vorliegen, die gleichen Funktionen wie DC aufweisen und in der Immuntherapie zur Tumorbekämpfung eingesetzt werden. Diese LHC besitzen aber im Vergleich zu den aus Monozyten generierten DC die Fähigkeit zu proliferieren, da sie aus proliferierenden CD34<sup>+</sup>Stammzellen hervorgehen. Für die Untersuchung von Genexpressionen und Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika wurde die Generierung von unausgereiften (i, immature) und ausgereiften (m, mature) Langerhans-Zellen aus expandierten CD34<sup>+</sup>Stammzellen aus Nabelschnurblut nach dem Protokoll von Strobl (siehe Material und Methoden) etabliert. Die angereicherten CD34<sup>+</sup>Stammzellen aus Nabelschnurblut wurden über 2 Tage expandiert und weiter zu unausgereiften Langerhans-Zellen differenziert. Die morphologische Veränderung von einer runden expandierten Stammzelle zur LHC mit dendritenartigen Ausläufern, welche sich mit zunehmender Ausreifung verstärkt bilden und verzweigen, sind in der Abb. 3.24 deutlich zu erkennen. Auch die Eigenschaft der Proliferation wird bei den unausgereiften Langerhans-Zellen deutlich durch die Zunahme der Zellzahl über die Tage der Differenzierung.



**Abb. 3.24: Generierung von iLHC und mLHC aus expandierte CD34<sup>+</sup>Stammzellen.** Die aus Nabelschnurblut angereicherten CD34<sup>+</sup>Stammzellen wurden expandiert und zu iLHC und mLHC ausdifferenziert. Lichtmikroskopische Aufnahmen (400fach) verdeutlichen die morphologische Veränderung von CD34<sup>+</sup>Stammzellen zu LHC mittels Zytokine.

### 3.22 Phänotypisierung von CD34<sup>+</sup>Stammzellen aus Nabelschnurblut angereichert durch MACS

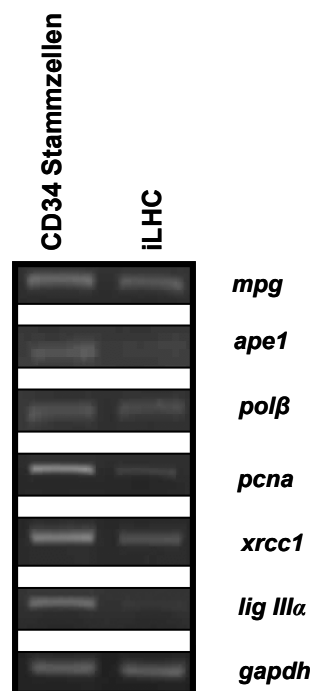
Zur Überprüfung der Reinheit der durch MACS angereicherten CD34<sup>+</sup>Stammzellen und der vollständigen Anreicherung dieser Zellen aus dem Blut wurde eine Phänotypisierung basierend auf der Expression von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt. Auf der y-Achse ist der Oberflächenmarker CD133, ein Stammzellmarker, der unverändert exprimiert auf der Zelloberfläche vorliegt, dargestellt, während CD45, ein Oberflächenmarker für Blutzellen, auf der x-Achse abgebildet ist (Abb. 3.25). Doppelt positiv gefärbte Zellen sind im oberen rechten Quadranten zu sehen. Dazu wurde der unmarkierte Rest von CBMC mit den durch Microbeads markierten CD34<sup>+</sup>Stammzellen nach der Aufreinigung per MACS verglichen. Die Isolierung zeigte eine Reinheit von über 97% an CD133<sup>+</sup>Stammzellen und eine effiziente Anreicherung aus CBMC, da der Rest nur noch 3% positive CD133<sup>+</sup> markierte Zellen enthielt (Abb. 3.25).



**Abb. 3.25: Phänotypisierung von Stammzellen und CBMC mittels Durchflusszytometrie.** Je  $5 \times 10^5$  Stammzellen oder CBMC wurden mit Erstantikörper CD45-FITC inkubiert, gewaschen und mit CD133-PE konjugierten Zweitantikörper versetzt und per FACS die Expression der Oberflächenmarkers CD133 und CD45 von einer aufgereinigten Zellpopulation versus CBMC analysiert.

### 3.23 BER Genexpression in expandierten CD34<sup>+</sup>Stammzellen versus iLHC

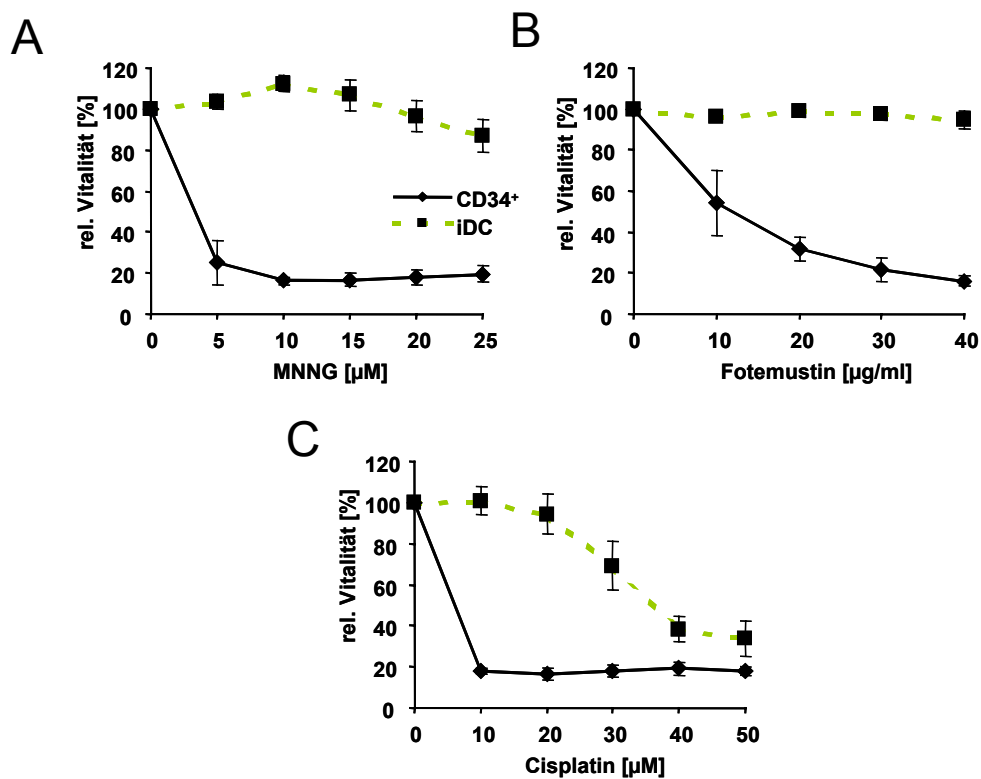
Zur Überprüfung der Expression von Basenexzisionsreparaturgenen in expandierten Stammzellen und den daraus generierten unausgereiften Langerhans-Zellen wurden semiquantitative RT-PCR Analysen durchgeführt. Expandierte Stammzellen zeigten eine mRNA Expression von *mpg*, *ape1*, *polβ*, *pcna*, *xrcc1* und *lig IIIα*. Die Genexpression der BER in iLHC war bei allen betrachteten Genen vermindert oder zeigte bei *ape1* und *lig IIIα* kaum eine Expression. Diese Genexpressionsanalyse verdeutlicht einen möglichen Unterschied in der BER zwischen *in vitro* expandierten CD34<sup>+</sup>Stammzellen und den daraus abgeleiteten iLHC.



**Abb. 3.26: BER Genexpression in expandierten CD34<sup>+</sup>Stammzellen und iLHC.** Semiquantitative RT-PCR Analyse von *mpg*, *ape1*, *polβ*, *pcna*, *xrcc1* und *lig IIIα* in expandierte CD34<sup>+</sup>Stammzellen und iLHC. *gapdh* RT-PCR diente zum Abgleich der eingesetzten RNA Menge.

### 3.24 Sensitivität expandierter CD34<sup>+</sup>Stammzellen aus Nabelschnurblut versus nichtproliferierender iDC aus PBMC gegenüber MNNG, Fotemustin und Cisplatin

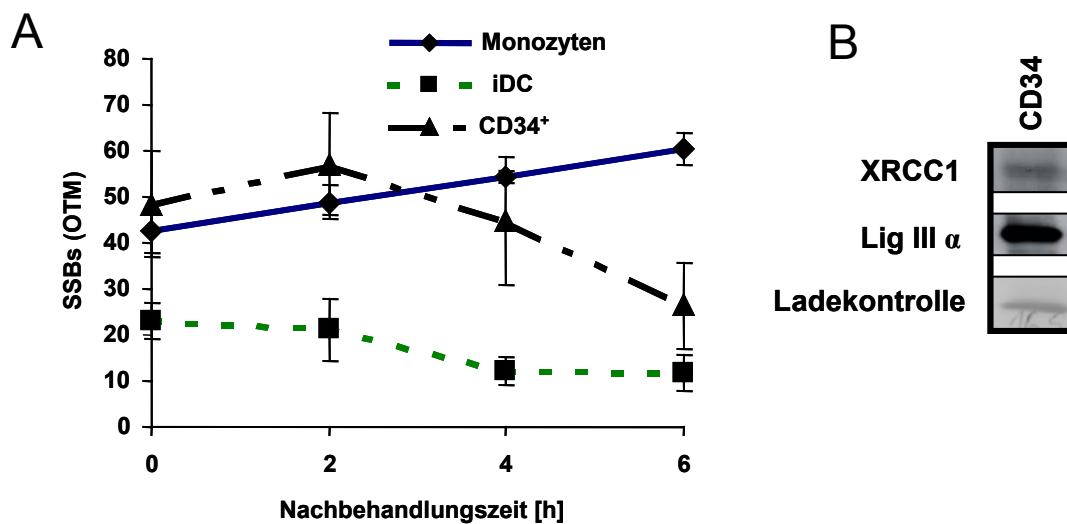
Für eine effiziente Tumorthherapie werden heute verschiedene Behandlungsformen eingesetzt. Ein Beispiel hierzu ist die Behandlung von Magentumoren, welche mit einer hohen Dosis an Chemotherapeutika, einer Blutstammzelltransfusion und einer DC Vakzinierung therapiert wurden (Ueda et al., 2004). Über die Sensitivität der CD34<sup>+</sup> Stammzellen und den daraus generierten DC ist wenig bekannt. Zur Untersuchung der Empfindlichkeit von Blutzellen und des Einflusses der Proliferation, wurden expandierte CD34<sup>+</sup> Stammzellen und nichtproliferierende iDC mit MNNG, Fotemustin und Cisplatin über 72 h behandelt und die Vitalität mittels WST Assay ausgewertet (Abb. 3.27). Bei der Behandlung mit Alkylantien und ‚Cross-Linker‘ Agenzien zeigten expandierte CD34<sup>+</sup> Stammzellen eine starke Sensitivität bei niedrigen Dosen. Nichtproliferierende iDC blieben bei der MNNG (A) und Fotemustinbehandlung (B) resistent und zeigten eine zunehmende Empfindlichkeit bei hohen Dosen von Cisplatin (C). Die Proliferation induziert in CD34<sup>+</sup> Blutzellen eine verstärkte Sensitivität gegenüber Alkylantien.



**Abb. 3.27: Vitalität expandierter CD34<sup>+</sup>Stammzellen und iDC gegenüber MNNG, Fotemustin, Cisplatin.** Dosiswirkungskurven folgender Behandlungen: **A)** WST Assay MNNG behandelter CD34 Zellen und iDC. **B)** WST Assay Fotemustin behandelter CD34 Zellen und iDC. **C)** WST Assay Cisplatin behandelter CD34 Zellen und iDC. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten und unterschiedlichen Spendern.

### 3.25 BER-Reparaturkapazität nach MNNG-Behandlung, sowie XRCC1 und Lig III $\alpha$ Proteinexpression in CD34<sup>+</sup>Stammzellen aus der Leukopherese eines Patienten

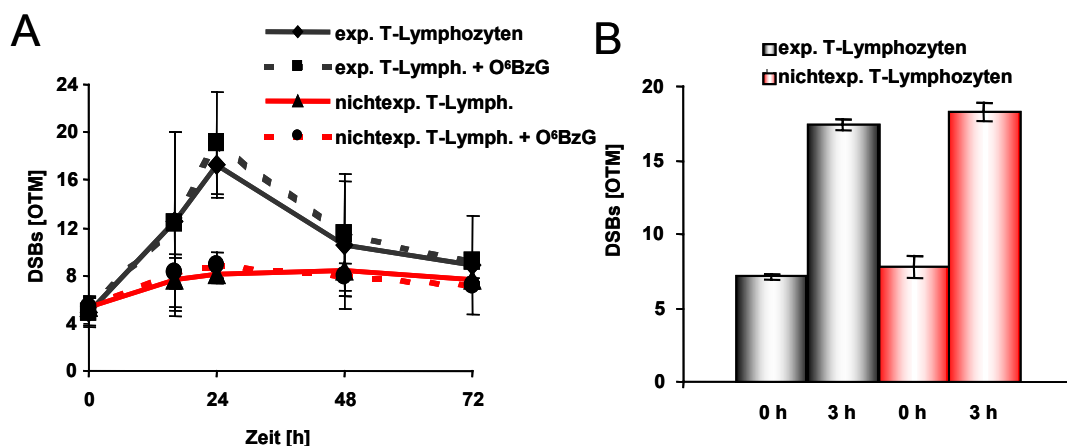
Zur Ermittlung der BER-Reparaturkapazität und der Proteinexpression von XRCC1 und Lig III $\alpha$  wurden angereicherte CD34<sup>+</sup>Blutstammzellen aus der Leukopherese eines Patienten von der Stammzelltransplantation der Uniklinik Mainz zur Verfügung gestellt. CD34<sup>+</sup>Stammzellen wurden mit 20  $\mu$ M MNNG für 1 h behandelt, gewaschen und nach entsprechender Zeit die SCGE durchgeführt. Die kinetische Untersuchung der BER Kapazität zeigte, dass CD34<sup>+</sup>Stammzellen nach einer 1 h Behandlung eine hohe initiale Einzelstrangbruchrate ähnlich der Monozyten aufweisen, diese Strangbrüche aber über die Zeit repariert und ligiert werden (Abb. 3.28A). Durch Western Blot Analyse wurde eine schwache Expression von XRCC1 und eine starke Expression von Lig III $\alpha$  detektiert (Abb. 3.28B). XRCC1 bildet mit Ligase III einen dimeren Komplex und stabilisiert die Interaktion der Ligase III mit der DNA. Durch die geringe XRCC1 Expression könnte die Ligation etwas verzögert sein, was die hohe Einzelstrangbruchrate nach 1 h erklären könnte.



**Abb. 3.28: Vergleich SSBs Reparatur in Monozyten, iDC und CD34<sup>+</sup>Stammzellen und XRCC1, Lig III $\alpha$  Expression in CD34<sup>+</sup>Stammzellen.** **A)** Zeitabhängige SSB Reparatur von 20  $\mu$ M MNNG (1 h) behandelten CD34<sup>+</sup>angereicherten Stammzellen aus Leukopherese eines Patienten mittels SCGE. **B)** Proteinexpression von XRCC1 und Lig III $\alpha$  durch Western Blot Analyse von Kernextrakten aus CD34<sup>+</sup>Stammzellen. Als Ladekontrolle diente Ponceaufärbung.

### 3.26 DNA-Reparatur und Apoptoseuntersuchung in expandierten versus nichtexpandierten T-Lymphozyten nach Alkylantienbehandlung

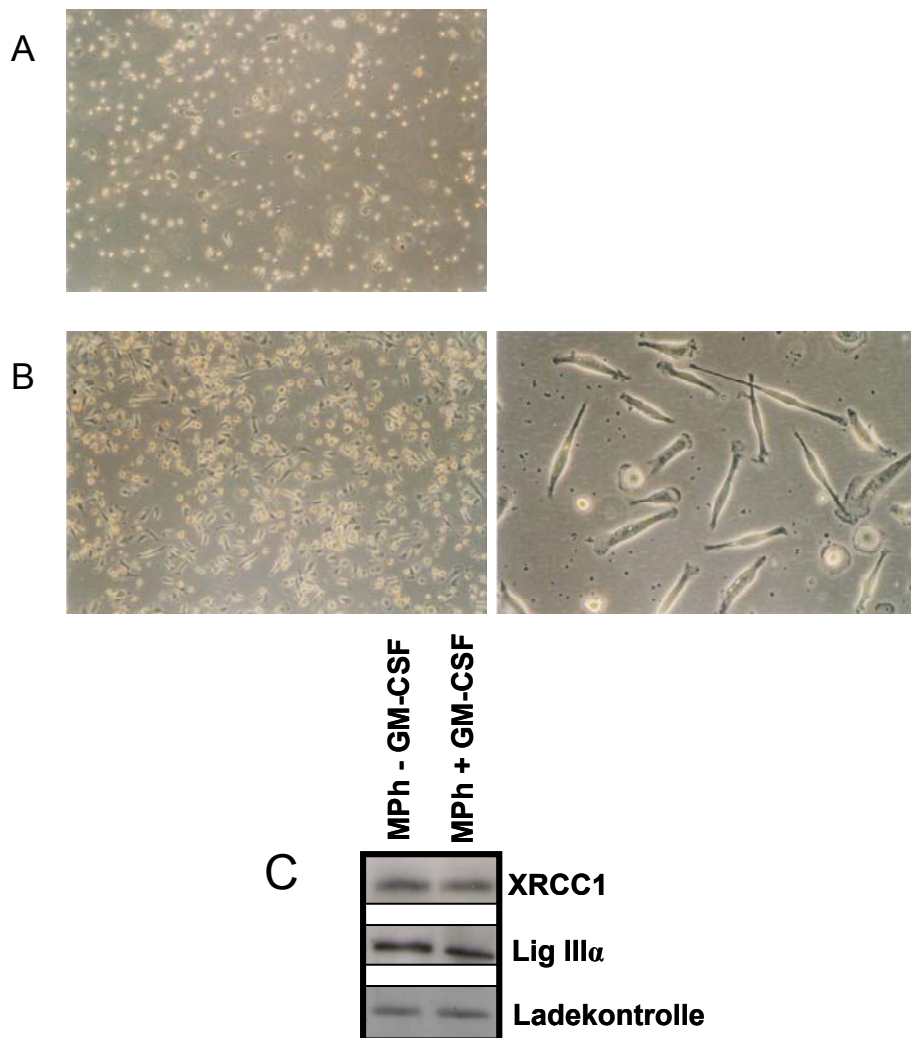
Aus der Literatur ist bekannt, dass Alkylantien induzierte Apoptose durch die replikationsabhängige Umwandlung des  $O^6$ -Methylguanin in Doppelstrangbrüche (DSBs) ausgelöst wird (Ochs and Kaina, 2000). Zur Untersuchung der replikationsabhängigen Bildung von DSB wurden T-Lymphozyten zur Proliferation mit CD3/28 Antikörpern stimuliert, für 24 h expandiert und mit nichtexpandierten T-Lymphozyten verglichen. Dazu wurden expandierte versus nichtexpandierte T-Zellen mit 10  $\mu$ M MNNG behandelt und die zeitabhängige Bildung von DSB per neutralen Comet assay ermittelt (Abb. 3.29A). Zum Vergleich wurden diese Zellen zur Depletion der MGMT Aktivität parallel mit 10  $\mu$ M  $O^6$ BG 1 h vor der MNNG Behandlung präinkubiert, um die Entstehung von DSB aus  $O^6$ -Methylguanin zu detektieren. Hierbei zeigten die expandierten T-Lymphozyten, mit oder ohne MGMT Inaktivierung, eine steigende Zunahme von DSB bis zu 24 h und deren anschließende Abnahme bis zu 72 h. Im Gegensatz dazu wiesen nichtexpandierte T-Zellen keine Zunahme von DSB auf. Die Depletion von MGMT hatte keinen Einfluss auf die DSB Bildung. Somit konnte das Model der replikationsabhängigen DSB Bildung aus  $O^6$ -Methylguanin bestätigt werden. Bei hohen Dosen MNNG scheint die DSB Bildung in expandierten und nichtexpandierten T-Lymphozyten direkt zu erfolgen, wie in Abb. 3.29B nach 3 h Behandlung mit 25  $\mu$ M MNNG deutlich wird. Diese replikationsunabhängige DSB Bildung bei hoher MNNG Dosis zeigte ebenso eine replikationsunabhängige Apoptoseinduktion im hohen Dosisbereich, siehe (Roos et al., 2004).



**Abb. 3.29: DNA DSBs Bildung ermittelt durch neutrale Einzelzellgelelektrophorese in expandierten und nichtexpandierten PBLC. A)** Zeitabhängige DSB Bildung nach 10  $\mu$ M MNNG Behandlung. **B)** DSB Bildung nach 25  $\mu$ M MNNG Behandlung. Expansion wurde über 24 h mit CD3 und CD28 Antikörpern stimuliert.

### 3.27 Generierung von Makrophagen aus Monozyten und deren Proteinexpression von XRCC1 und Lig III $\alpha$

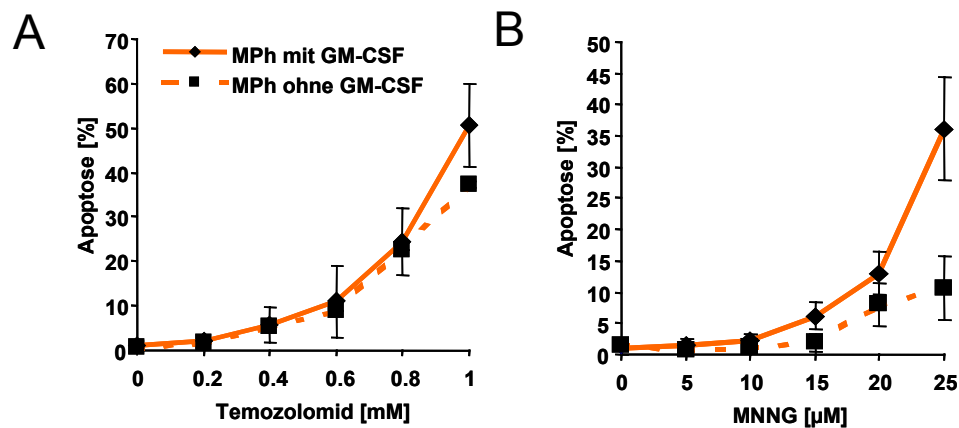
Makrophagen wurden aus adhärennten Monozyten generiert und weiter mit GM-CSF über 5 d stimuliert. Somit wurden aus runden adhärennten Makrophagen (Abb. 3.31A) verstärkt langgestreckte Zellen mit verjüngten Enden (Abb. 3.31B) gebildet. Da Makrophagen aus Monozyten hervorgehen, war die Untersuchung der fehlenden BER Reparaturproteine XRCC1 und Lig III $\alpha$  per Western Blot Analyse interessant und zeigte dass Makrophagen oder durch GM-CSF stimulierte Makrophagen die Proteine XRCC1 und Lig III $\alpha$  exprimieren. Damit scheint die fehlende Expression dieser BER Proteine ein Phänomen der Monozytenpopulation zu sein.



**Abb. 3.30: Makrophagen und deren Expression von XRCC1 und Lig III $\alpha$ .** Lichtmikroskopische Aufnahmen von Makrophagen (**A**, 200fach) und GM-CSF stimulierten Makrophagen (**B**, 200 und 400fach) über 5 d. **C**) Proteinexpression von XRCC1 und Lig III $\alpha$  aus Kernextrakte von Makrophagen und GM-CSF stimulierten Makrophagen. Als Ladekontrolle diente Ponceaufärbung.

### 3.28 Untersuchung der Apoptose in Makrophagen nach Temozolomid und MNNG Behandlung

Da Makrophagen die BER Proteine XRCC1 und Lig III $\alpha$  exprimieren, ist anzunehmen, dass eine vollständige Basenexzisionsreparatur vorliegt, welche Alkylantien-induzierte DNA-Läsionen entfernt und vor Apoptose schützt. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurden Makrophagen und GM-CSF-stimulierte Makrophagen mit Temozolomid und MNNG behandelt und nach 72 h die SubG1-Zellpopulation durch FACS Analyse ermittelt. Die dosisabhängige Untersuchung nach Temozolomid Behandlung ergab eine zunehmende Apoptoserate ab einer Dosis von 0,6 mM, wobei kaum ein Unterschied zwischen stimulierten versus nichtstimulierten Makrophagen auftrat (Abb.3.32A). Die Behandlung mit MNNG hingegen zeigte, dass ab einer hohen MNNG Dosis von 20  $\mu$ M Apoptose vor allem in GM-CSF stimulierten Makrophagen induziert wurde (Abb. 3.32B). Eine mögliche Ursache der erhöhten Apoptoseinduktion in GM-CSF stimulierten Makrophagen bei hohen Alkylantiendosen könnte eine GM-CSF vermittelte Stimulation des apoptotischen Signaltransduktionsweges sein.



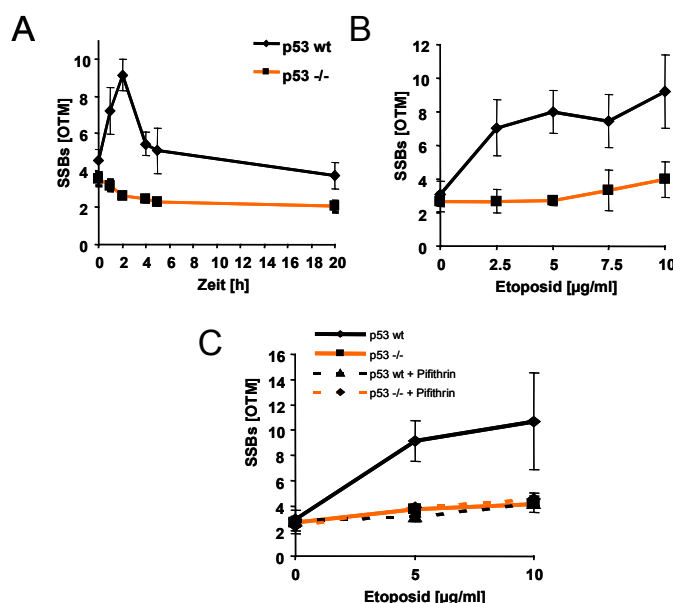
**Abb. 3.31: Dosisabhängigkeit der Apoptosefrequenz in Makrophagen und GM-CSF stimulierten Makrophagen nach Alkylantienbehandlung. A)** Quantifizierung apoptotischer SubG1-Zellen 72 h nach zunehmender Temozolomidosis in Makrophagen versus GM-CSF stimulierte Makrophagen. **B)** Dosisabhängige Quantifizierung der Apoptose in Makrophagen und GM-CSF stimulierten Makrophagen nach MNNG Behandlung. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.29 Auswirkung von Topoisomeraseinhibitoren in Abhängigkeit von p53

#### 3.29.1 Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Etoposid und Einfluss von Pifithrin auf die SSB Bildung in p53 wt und knockout Mausfibroblasten

Da Tumore hohe Enzymaktivitäten an Topoisomerasen aufweisen, wurden Chemotherapeutika entwickelt, um diese Enzyme zu inhibieren. So findet, zum Beispiel, Etoposid in der heutigen Chemotherapie eine Anwendung in der Behandlung von Gehirn-, Lungen- und Hodentumoren. Um den Einfluss von Etoposid, einem Topoisomerase II Inhibitor, auf die Bildung von Einzelstrangbrüchen (SSBs) in Abhängigkeit von p53 zu untersuchen, wurden zeit- und dosisabhängige Einzelstrangbruchraten in p53 wt Zellen (BK4) und p53 knockout Mausfibroblasten (E) per SCGE ermittelt. Die zeitabhängige Untersuchung mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Etoposid für 1 h ergab eine zunehmende SSB Induktion in p53 wt Zellen mit einem Maximum bei 2 h und einer darauf folgenden abnehmenden Frequenz an SSB zum Ausgangslevel (Abb. 3.33A). Auch die dosisabhängige Untersuchung mit Etoposid ergab eine Zunahme von SSB mit zunehmender Dosis in p53 wt Mausfibroblasten und kaum eine Induktion von SSB in p53 knockout Zellen. Die Daten deuten auf eine p53 abhängige Modulation von DNA Strangbruchbildungen in Etoposid-behandelten Zellen hin.

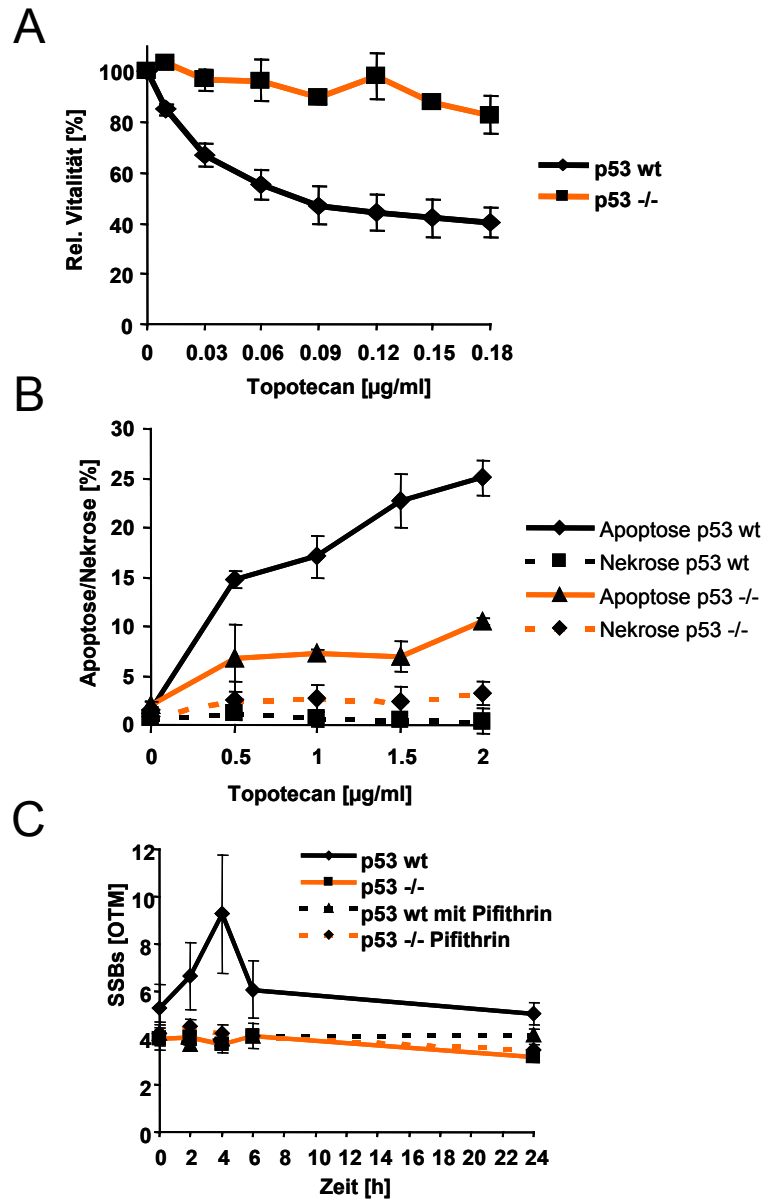
Zur Überprüfung, ob p53 wirklich bei der durch Etoposid induzierten DNA Strangbruchbildung eine Rolle spielt, wurde ein p53 Inhibitor, Pifithrin, verwendet. Dazu wurden p53 wt und knockout Zellen 1 h mit 0,25  $\mu\text{g/ml}$  Pifithrin vorbehandelt, anschließend mit 5 oder 10  $\mu\text{g/ml}$  Etoposid versetzt und die SSB Rate nach 2 h durch SCGE ermittelt. Das Ergebnis in Abb. 3.33C zeigt, dass Pifithrin den Effekt der p53-abhängigen Erzeugung von DANN-Strangbrüchen inhibiert.



**Abb. 3.32: Etoposid-induzierte DNA-Strangbrüche in p53 wt und knockout Zellen.** **A)** Zeitabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen in p53 wt und knockout Zellen nach 1 h Etoposidbehandlung mit 5  $\mu\text{g/ml}$ . **B)** Dosisabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen in p53 wt und knockout Zellen nach 2 h Etoposidbehandlung. **C)** Einfluss von Pifithrin (1 h Vorbehandlung mit 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ) auf Dosisabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen in p53 wt und knockout Zellen nach 2 h Etoposidbehandlung mit 5 und 10  $\mu\text{g/ml}$ .

### **3.29.2 Sensitivität, Apoptose/Nekroseuntersuchungen und SSBs Bildung von Topotecan bei wt und p53 defizienten Mausfibroblasten**

Topotecan, ein neuer Inhibitor der Topoisomerase I, findet seine Anwendung in der Chemotherapie. Auch hier soll die Vitalität, Apoptoseinduktion und DNS-Strangbruchbildung durch Topotecan behandelte p53 wt und knockout Mausfibroblasten untersucht werden. Zur Untersuchung der Sensitivität von p53 wt und knockout Zellen gegenüber Topotecan wurde ein WST Assay durchgeführt. Das Ergebnis zeigt ein zunehmendes Absterben von p53 wt Zellen bei zunehmender Dosis von Topotecan (Abb. 3.34A). Ob Topotecan in p53 wt Zellen Apoptose oder Nekrose induziert, wurde durch Annexin/PI Färbung und FACS Messung ermittelt. Auch hier wurde gezeigt, dass mit zunehmender Dosis an Topotecan in p53 wt Zellen eine stärkere Apoptose als in p53 knockout Zellen induziert wurde. In beiden Zellen wurde keine Nekrose detektiert (Abb. 3.34B). Zum Einfluss von p53 auf die Topotecan-induzierte DNA-Strangbruchbildung wurden p53 wt und knockout Zellen mit Pifithrin vorbehandelt und mit 1 µg/ml Topotecan versetzt und die zeitabhängige DNA-Strangbruchbildung gemessen. Auch hier wird eine p53 abhängige DNA-Strangbruchbildung nach Topotecanbehandlung gezeigt, und deren Inhibierung mit Pifithrin (Abb. 3.34C). Somit wurde gezeigt, dass p53 bei der DNA-Strangbruchbildung durch Topotecan eine Rolle spielt und dieses zu einer zunehmenden Sensitivität und Apoptose der Zellen führt.



**Abb. 3.33: Vitalität, Apoptose/Nekroseinduktion durch Topotecan und Topotecan-induzierte DNA-Strangbrüche in p53 wt und knockout Zellen.** **A)** Vitalität von Topotecan behandelten p53 wt und knockout Zellen durch WST-Assay ermittelt. **B)** Dosisabhängige Apoptose/Nekroseinduktion von Topotecan behandelten p53 wt und knockout Zellen nach 72 h. **C)** Einfluss von Pifithrin (1 h Vorbehandlung mit 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ) auf Zeitabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen in p53 wt und knockout Zellen mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Topotecan, gemessen durch SCGE.

## 4 Diskussion

Die Aufgabe des Immunsystems besteht in der Erkennung von viralen oder bakteriellen Infektionen und deren Eliminierung. Diese Eigenschaft wird in der Tumormimmuntherapie zu Nutze gemacht, indem Immunzellen Tumorzellen erkennen und eine gezielte Immunantwort gegen Tumore auslösen. Die heutige Immuntherapie ist vielfältig. Dabei können Antikörper, Zytokine oder Immunzellen, wie DCs, zum Einsatz kommen. DCs spielen bei der Tumorabwehr eine Rolle, da diese zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) aktivieren, welche den Zelltod der Tumorzellen induzieren. Dazu müssen die DCs als Tumorzellen aus Monozyten generiert und mit Tumorantigenen beladen werden. Tumore können sich aber vor einer DC-induzierten Immunreaktion schützen, durch die Sekretion von IL-10 (Wittke et al., 1999) oder durch andere tumorartige Faktoren (Enk et al., 1997), welche DCs zu toleranten Immunzellen gegenüber dem Tumor werden lassen. Daher werden *in vitro* generierte DCs in der Therapie verwendet, um eine Tumortoleranz oder Tumorrogression zu vermeiden (Tong et al., 2001). Die Verwendung von DC-Vakzine zusammen mit Chemotherapeutika wird zur Zeit noch getestet und soll die Effizienz der Tumorthherapie verbessern (Holtl et al., 2005). Chemotherapeutika wirken hochzytotoxisch und in den meisten Fällen nicht tumorspezifisch, da es den Zelltod in Tumorzellen und normalen Zellen, wie Immunzellen, induziert. Daher wären Zytostatika-resistente DCs, welche die Chemotherapie unterstützen, von großem Interesse.

### 4.1 Expression von DNA-Reparaturproteinen in Monozyten und deren *in vitro* generierten DC

#### 4.1.1 MGMT Expression und Regulation in Monozyten und den daraus abgeleiteten DC

Voraussetzung für eine erfolgreiche Tumorbekämpfung durch DC-Vakzine und deren Kombination mit Chemotherapeutika ist die Unversehrtheit von DCs und ihrer Vorläuferzellen, den Monozyten, gegenüber den stark zytotoxisch wirkenden Zytostatika. Da die meisten Zytostatika tumorspezifisch wirken, und somit den Zelltod von Tumorzellen und normale Zellen auslösen, kann der DC-vermittelte Zelltod an Tumorzellen stark beeinträchtigt durch das massive Absterben von DC und Monozyten werden. Die meisten Zytostatika wirken auf die DNA ein. Daher spielt die DNA-Reparaturkapazität von

Immunzellen eine bedeutende Rolle für das Überleben nach einer Behandlung mit DNA-schadeninduzierenden Agenzien. Interessanterweise wurde die DNA-Reparaturfähigkeit und die Zytotoxizität von Monozyten und den daraus abgeleiteten DC gegenüber Zytostatika noch nicht untersucht. Zunächst wurde das DNA-Reparatursystem MGMT auf Gen- und Proteinexpression und deren Einfluss auf die Sensitivität hin untersucht. Monoalkylierende Agenzien wirken mutagen durch die Alkylierung der O<sup>6</sup>-Position des Guanins. Die Alkylgruppe kann durch MGMT wieder entfernt werden, dabei wird die Alkylgruppe auf das Protein übertragen und inaktiviert dadurch das Enzym. Erfolgt diese Reparatur nicht, führt O<sup>6</sup>-Alkylguanin zum apoptotischen Zelltod durch S<sub>N</sub>1 Alkylantien (Kaina et al., 1997; Meikrantz et al., 1998; Tominaga et al., 1997). Hierbei kommt es zur Bildung von O<sup>6</sup>-Alkyl-GT Basenfehlpaarungen (Eadie et al., 1984), welche durch die Basenfehlpaarungsreparatur (MMR, mismatch repair) erkannt und prozessiert wird. Diese Reparatur ist fehlerhaft und führt zum Tod der Zelle durch Apoptose (Ochs and Kaina, 2000). MGMT wird als Resistenzfaktor von Tumoren gegenüber Zytostatika wie Procarbazin, Dacarbazin (DTIC), Streptozotocin und Temozolomid betrachtet, welche bei der Behandlung von Glioblastomen, maligne Melanomen, Pankreaskarzinomen oder hämatopoetische Tumoren wie dem Hodgkin-Lymphom verwendet werden (Atallah and Flaherty, 2005; Kaina and Christmann, 2002; Macdonald et al., 2005; Stupp et al., 2005; Zekri et al., 2004; Zimmerman et al., 1981). Die häufigste Nebenwirkung dieser Agenzien ist Lymphozytopenie und Thrombozytopenie auf Grund ihrer Hämatotoxizität (Li et al., 2005; Su et al., 2004). Ob und in welchem Ausmaß diese Alkylantien Monozyten und DCs schädigen, war bisher unbekannt.

In dieser Arbeit wurde herausgefunden, dass MGMT Protein unterschiedlich stark exprimiert in Monozyten vorliegt, und deren Aktivität sehr mit denen von peripheren Lymphozyten (Janssen et al., 2001) ähnelt. Interessanter Weise nimmt die MGMT Aktivität bei der DC Ausreifung ab, wobei DCs ein ähnliches Aktivitätsniveau wie hämatopoetische Stammzellen aufweisen. Die Aktivitätsabnahme von MGMT in Monozyten, zu unausgereifte und ausgereifte DCs korreliert mit der MGMT Protein- und mRNA-Abnahme. Für die Verminderung von MGMT-Expression kann die Promotermethylierung eine Rolle spielen, denn die Abnahme der MGMT Genexpression korreliert mit der Hypermethylierung der CpG Inseln im Promoter (Qian and Brent, 1997) und führt zu Heterochromatisierung (Bhakat and Mitra, 2003; Patel et al., 1997; Watts et al., 1997). Bei dieser Untersuchung wurde herausgefunden, dass die Genexpressionsabnahme bei der Ausreifung von Monozyten zu DCs nicht durch Promotermethylierung erfolgt, da der Promoter in Monozyten und DCs unmethyliert war. Daher kann man schlussfolgern, dass die Herabregulation des MGMT-Gens in DCs durch Transkriptionsfaktoren hervorgerufen werden (Briegert et al., 2007). Es ist bekannt, dass die MGMT-Genexpression durch Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Margison et al., 2003), wie zum Beispiel durch den Transkriptionsfaktor AP-1, welcher in

Monozyten eine stärkere Bindungsaktivität und somit höhere Präsenz aufwies, als in DCs. Daraus kann man schlussfolgern, dass eine erhöhte Expression von MGMT in Monozyten möglicherweise auf eine erhöhte AP-1 Aktivität zurückzuführen ist. Desweiteren wurde das Tumorsuppressorprotein p53 in Monozyten und DCs untersucht. Zur Funktion von p53 gehört neben der Genaktivierung als Transkriptionsfaktor auch die Protein-Proteininteraktion (Levine, 1997). Somit ist dieses Protein an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Es zeigt einen inhibierenden Einfluss auf die Genexpression von MGMT (Grombacher et al., 1998). Proteinexpressionsanalysen detektierten p53 ohne gentoxische Behandlung nur in DCs. Dies könnte zu einer Hemmung der MGMT Transkription führen und somit die verminderte MGMT Proteinexpression erklären.

#### **4.1.2 Expression weiterer DNA-Reparaturproteine in Monozyten und DCs**

Zytokine spielen in vielen zellulären Prozessen wie der Zellproliferation und –Differenzierung, in der Immunantwort, im entzündlichen Geschehen und in der Tumorgenese eine wichtige Rolle. Jedoch ist kaum die Bedeutung von Zytokinen für die DNA-Reparatur und für das Überleben von Zellen untersucht worden. Zytokine können den Resistenzstatus von Tumorzellen beeinflussen (Frassanito et al., 2001). Dies weist auf eine Wirkung von Zytokinen als Modulator der DNA-Reparatur und der durch DNA-Schäden induzierten Apoptose hin. Somit könnten Zytostatika die Expression von Reparaturgenen und deren Resistenzstatus beeinflussen. Reparaturdefekte Mutanten sind fast immer hypersensitiv gegenüber DNA-schädigenden Agenzien. Besonders gut ist die Regulation des Reparaturgens Alkyltransferase (MGMT) sowie dessen Schutzeffekt untersucht worden. Die Alkyltransferase, welche ein wichtiger Resistenzmarker für Alkylantien ist, ist durch eine Reihe von Stressfaktoren induzierbar (Fritz et al., 1991) und steht unter Kontrolle von p53 und AP-1 (Margison et al., 2003). Ob Zytokine die MGMT-Expression oder weiterer DNA-Reparaturproteine wie MLH1, ein Enzym der Basenfehlpaarungsreparatur, ERCC1, ein Enzym der Nukleotidexzisionsreparatur und Fen1, ein Enzym der Basenexzisionsreparatur beeinflussen, war nicht bekannt. Zur Untersuchung dieser Frage wurde das Zellsystem verwendet, bei dem Zytokine die Ausreifung von Monozyten zu unreifen und reifen dendritischen Zellen induziert, wobei GM-CSF, IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE und TNF- $\alpha$  involviert sind. Die Untersuchung der Alkyltransferase zeigte, dass deren Expression mit der zytokininduzierten Ausreifung von Monozyten zu DCs abnahm. Da für die Ausreifung der DCs ein Zytokincocktail, bestehend aus 6 Zytokinen, benötigt wurde, konnte nur der Einfluss von GM-CSF und IL-4 bei der Differenzierung zu unreifen DCs untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass beide Zytokine GM-CSF und IL-4 die Expression des MGMT Proteins herunterregulieren. Wie der Mechanismus dieser Herabregulation durch die Zytokine GM-

CSF und IL-4 aussieht, ist bisher unbekannt. Die Proteinexpressionsanalyse ergab bei MLH1 und ERCC1 eine Hochregulation und bei Fen1 eine Herabregulation. Nur bei *mlh1* wurde eine Zunahme der Genexpression detektiert, welche mit der Proteinexpression korreliert. Hierbei scheinen transkriptionelle Regulationsmechanismen eine Rolle zu spielen, da Promoterhypermethylierungen keinen Einfluss auf die zunehmende Expression zeigte (Daten nicht gezeigt)(Deng et al., 1999; Quaresima et al., 2001). Die Genexpressionsanalyse von Fen1 und ERCC1 zeigte kaum veränderte Genexpressionen; somit könnten hier posttranskriptionelle Regulationen oder Proteindegradierungen eine Rolle spielen, welche möglicherweise durch Zytokine induziert werden. In der Literatur ist dieses Phänomen bisher nicht beschrieben worden.

#### **4.2 Sensitivität und Apoptoseinduktion von Monozyten, DC, PBLC und CD34<sup>+</sup> Stammzellen und Makrophagen nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien**

Alkylantien wirken nicht nur auf Tumorzellen zytotoxisch, sondern induzieren auch in Immunzellen den Zelltod, was zur Leukozytopenie, Lymphozytopenie und Thrombozytopenie führt (Batts et al., 2007) (Schwarzberg et al., 2007). Somit könnten Monozyten und DCs während einer Chemotherapie mit Alkylantien abgetötet werden, was einen Einfluss auf den Immunstatus und einer erfolgreichen Tumorstabilisierung haben könnte. Mit der Zytokin-induzierten Differenzierung von Monozyten zu DCs wurde der Einfluss auf die Sensitivität der Zellen nach Behandlung mit DNA-schädigenden Zytostatika untersucht. Gleichzeitig wurde die Sensitivität gegenüber Zytostatika von Leukozyten (PBLC), CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, CD4/25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (Treg), CD34<sup>+</sup>Stammzellen und Makrophagen bestimmt und verglichen. Das MGMT Protein repariert O<sup>6</sup>-Alkylguanin in der DNA und wirkt somit protektiv gegenüber der Mutagenese und Karzinogenese durch Alkylantien (Margison et al., 2003). Somit stellt MGMT einen Haupt-Resistenzfaktor der Alkylantientherapeutika in der Chemotherapie dar (Kaina and Christmann, 2002). Die Expression von MGMT in Normalgeweben und Tumoren wurden untersucht, jedoch wurde dieses wichtige Reparaturenzym noch nicht in Monozyten und DCs betrachtet, sowie deren Auswirkung auf die Sensitivität gegenüber Alkylantien. MGMT Untersuchungen zeigten, dass die Protein- und Genexpression abnimmt mit der zunehmenden Ausdifferenzierung von Monozyten zu reifen DCs. Mit der abnehmenden Expression des Reparaturenzyms MGMT wurde eine zunehmende Sensitivität von DCs nach Behandlung mit Alkylantien erwartet. Trotz niedriger MGMT-Expression erwiesen sich DCs verglichen mit Monozyten als resistent gegenüber Alkylantien, wie MNNG, MMS und Temozolomid. Fotemustin zeigte keinen

Sensitivitätsunterschied zwischen Monozyten und DCs. Das Zytostatika Fotemustin weist primär zytotoxische chlorethylierenden DNA-Läsionen und sekundär auch DNA-„Interstrangcrosslinks“ auf. Es ist anzunehmen, dass der Zelltod in Monozyten und iDC auf die durch Cross-Links gebildeten DNA Läsionen zurückgeht. Auch gegenüber Mafosfamid, einem bifunktionellen Zytostatikum, welches primär DNA-Alkylierungen und sekundär DNA-Interkalierungen macht, wurden keine Sensitivitätsunterschiede zwischen Monozyten und DCs beobachtet. Das gleiche Resultat wurde auch bei Cisplatin, einem DNA-interkalierenden Zytostatikum und bei oxidativem Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beobachtet. Bei den monofunktionalen Alkylantien kann die Hypersensitivität bei den Monozyten auf die Wirkung der DNA Alkylierung zurückgeführt werden. DNA-Interkalation werden durch Nukleotid-exzisionsreparatur (NER) eliminiert. Die Expressionszunahme von ERCC1 in DCs, einem Protein der NER, zeigte keinen Einfluss auf die Vitalität der DCs.

In proliferierenden Lymphozyten und Glioblastomen stellt O<sup>6</sup>-Methylguanin die zytotoxische Hauptläsion in der DNA dar (Roos et al., 2004). Dieser DNA-Schaden scheint nicht die Ursache der Sensitivität in Monozyten zu sein, da eine Inhibition von MGMT durch O<sup>6</sup>-Benzylguanin nicht zu einer Sensitivitätssteigerung von Monozyten führte. Die Untersuchung mit expandierten CD34<sup>+</sup>Stammzellen auf MNNG, Fotemustin und Cisplatin zeigte, dass alle drei Zytostatika zytotoxisch auf diese Blutvorläuferzellen wirkten. Alkylantien induzieren Apoptose, daher stellen sich hierzu die Fragen, wie gehen die Monozyten nach der Exposition mit alkylierenden Zytostatika in die Apoptose und welcher DNA-Schaden scheint kritisch hierfür zu sein? Untersuchungen an CD3/28 stimulierten T-Lymphozyten zeigten im niedrigen Dosisbereich von Alkylantien eine Apoptoseinduktion, wobei der Fas/CD95 Signaltransduktionsweg durch den DNA-Schaden O<sup>6</sup>-Methylguanin über DNA-Brüche aktiviert wird (Roos et al., 2004). Cisplatin induziert Apoptose über den MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg (Brozovic et al., 2004). Somit können unterschiedliche apoptotische Signaltransduktionswege durch spezifische DNA-Schäden des jeweiligen Zytostatikums induziert werden (Roos and Kaina, 2006). Untersuchungen der durch Alkylantien induzierten Apoptose in Monozyten und DCs zeigten eine zunehmende Induktion der Apoptose nach 24 Stunden, sowie mit steigender Alkylantiendosis. Auch der Vergleich zu Lymphozyten zeigte, dass Monozyten eine erhöhte Apoptoseinduktion aufwiesen. Monozyten und DCs zeigten auch bei dieser Untersuchung, dass die Zellen im G1-Zellzyklus arretiert sind und somit nicht proliferieren. Daher ist die Apoptoseinduktion in diesem Modellsystem proliferationsunabhängig und die zytotoxische DNA-Läsion O<sup>6</sup>-Methylguanin spielt hierbei keine Rolle. Auch weitere nichtproliferierende Leukozytenpopulationen wurden auf Alkylantien-induzierte Apoptose hin untersucht. Mono- und bifunktionale Alkylantien, wie Temozolomid und Mafosfamid, wiesen in nichtproliferierenden CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD4/25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen nur bei niedriger Zytostatikadosis eine erhöhte

Apoptoseinduktion auf. Worauf diese Sensitivität beruht, ist noch unklar und müsste weiter untersucht werden. Makrophagen, angereichert aus Monozyten durch Behandlung mit dem Zytokin GM-CSF zeigten bei einer Behandlung mit den Alkylantien Temozolomid und MNNG erst bei hohen Dosen der Zytostatika eine zunehmende Apoptose. Die GM-CSF stimulierten Makrophagen zeigten dabei eine leicht erhöhte Apoptoserate. Eine mögliche Ursache der erhöhten Apoptoseinduktion in GM-CSF stimulierten Makrophagen bei hohen Alkylantiendosen könnte eine GM-CSF vermittelte Stimulation des apoptotischen Signaltransduktionsweges sein.

Die Ursache der verstärkten Sensitivität und Apoptose von nichtproliferierenden Monozyten gegenüber methylierenden Agenzien könnte in einem DNA-Reparaturdefekt von N-Alkylierungen der DNA liegen, welche durch die Basenexzisionsreparatur (BER) eliminiert werden. Jedoch welcher apoptotische Signaltransduktionsweg wird durch den BER Defekt ausgelöst? Man unterscheidet zwei Apoptosewege. Bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose erfolgt nach der Expressionssteigerung des Fas-Rezeptors und des Fas-Liganden eine Aktivierung von Caspasen, welche letztendlich iCAD aktivieren und die DNA fragmentieren, was zum Zelltod führt (Srinivasula et al., 1996). Bei der Mitochondrien-vermittelten Apoptose spielen das anti-apoptotische Protein Bcl-2 und das pro-apoptotische Protein Bax eine bedeutende Rolle (Hanada et al., 1995; Zhan et al., 1994). Beide Proteine sind in der mitochondrialen Membran lokalisiert und können miteinander Heterodimere bilden. Bei dieser Apoptose erfolgt durch den Bcl-2 Abbau die Bildung von Bax Homodimeren, welche in der Membran Poren bilden. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium. Es erfolgt dann die Aktivierung der Caspase-9 durch einen Komplex bestehend aus Cytochrom C, Apaf-1, ATP und Pro-Caspase-9 (Li et al., 1997). Mit der Aktivierung von Caspase-3 durch Caspase-9, welche weiter CAD aktiviert, kann die DNA fragmentiert werden. Zunächst zeigte die Untersuchung aktiver Caspasen in behandelten Monozyten und unausgereiften DCs, dass die Caspase-8 Expression keinen Unterschied in beiden Zelltypen aufwies, Caspase-9 und -3 jedoch in behandelten Monozyten zunimmt. Diese Tendenz deutet auf die Involvierung der mitochondrialen Signaltransduktionsweges bei der Apoptose hin. Bei den unausgereiften DCs sind bereits aktivierte Caspase-3,-8 und -9 vorhanden und verändern sich nicht mit der Alkylantienbehandlung. Es könnte möglich sein, dass aktivierte Caspasen auch an nicht-apoptotischen zellulären Prozessen, wie Differenzierung, T-Zellproliferation oder Zellzyklusregulation beteiligt sind (Schwerk and Schulze-Osthoff, 2003). Auch wurde gezeigt, dass unausgereifte DCs Caspaseaktivitäten aufweisen, welche beim Überleben und der Ausdifferenzierung der Zellen eine bedeutende Rolle spielen (Franchi et al., 2003). Ebenso zeigte die Untersuchung der Proteinexpression der an der Apoptose beteiligten Proteine Bcl-2, Bax und der Genexpression von fasR und fasL eine Abnahme von Bcl-2 und die Zunahme von Bax nach 72 Stunden Behandlung mit

dem Alkylanz MNNG in Monozyten, jedoch in DCs keine Expressionsveränderung. In der Untersuchung von Bax und Bcl-2 zeigte sich schon nach 24 Stunden die entsprechende Zu- und Abnahme der Proteinexpression in den Monozyten. Die Genexpression von fasR und fasL zeigte, dass in Monozyten der fasR 24 Stunden nach Zugabe von MNNG hochreguliert wird, jedoch sieht man keine Genexpression von fasL. Hierbei scheint in Monozyten der rezeptorvermittelte Signaltransduktionsweg der Apoptose keine Rolle zu spielen, sondern der mitochondriale Apoptoseweg. Auch hier zeigen Daten aus der Literatur, dass der Fas Rezeptor nicht nur in der Apoptose involviert ist, sondern auch eine Rolle bei der Differenzierung von Monozyten zu DCs spielt (Guo et al., 2003; Rescigno et al., 2000). Ebenso weisen DCs Proteine auf, welche den rezeptorvermittelten Zelltod inhibieren (Leverkus et al., 2000; Lundqvist et al., 2002). Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass Monozyten nach einer Alkylantienbehandlung in den Zelltod über den mitochondrialen Signaltransduktionsweg gehen, wobei O<sup>6</sup>-Methylguanin nicht als DNA-Schaden die Apoptose induziert, sondern N-Alkylierungen der DNA.

### **4.3 BER-Reparaturkapazität und -Proteinexpression in Monozyten, DC, PBLC und CD34<sup>+</sup> Stammzellen**

Alkylantien induzieren in der DNA neben O<sup>6</sup>-Methylguanin auch N-Alkylierungen, welche durch die Basenexzisionsreparatur entfernt werden. Dieses Phänomen wurde mittels Einzelzellgelelektrophorese (SCGE) untersucht, wobei hier die Messung der Einzelstrangbruchbildung und -reparatur während der Behandlung mit dem Alkylanz MNNG erfolgte. Die Einzelstrangbruchrate in behandelten Monozyten stieg deutlich höher als in den unausgereiften DCs. Diese Einzelstrangbrüche reduzieren sich innerhalb von 4 h in der Nachbehandlungszeit (d.h. nach der Zugabe von MNNG) in iDCs, welches auf eine BER hinweist, während in den Monozyten die Einzelstrangbruchrate weiter stetig zunimmt. Auch nach einer Behandlung für 1 h mit Temozolomid und einer Nachwirkzeit von 4 h wurde eine signifikant höhere Bildung von Einzelstrangbrüchen (SSBs) in Monozyten als in iDC vom selben Spender beobachtet. Hierbei wurde auch vom selben Spender die BER Reparaturkapazität gegenüber Temozolomid in peripheren Blutlymphozyten (PBLC) gemessen, welche die gleiche Reparaturkapazität wie die der iDC zeigten. Ebenso zeigten CD34<sup>+</sup>Stammzellen eine ähnlich hohe Einzelstrangbruchrate nach 1 h MNNG Inkubationszeit, welche dann wieder abnimmt, was auf eine vollständige Basenexzisionsreparatur hinweist. Die beobachteten SSBs während der Reparatur von N-Alkylierungen erfolgen durch BER durch die Entfernung der geschädigten Base durch eine N-Methylpurine Glykosylase (MPG) und der Spaltung von apurinen Stellen mittels Apuriner

Endonuklease (APE-1), welche in weiteren Schritten wieder ligiert werden. Dies führte zu der Hypothese, dass Monozyten, nicht aber iDC und PBLC einen Defekt im letzten Schritt der BER, der Ligation, aufweisen. Durch diesen Ligationsdefekt sind die Monozyten nicht fähig, SSBs zu ligieren und es erfolgt somit eine Ansammlung von BER Intermediaten.

Die Untersuchung der BER Proteinexpression ergab, dass Monozyten und iDCs den gleichen Expressionslevel der Proteine MPG, APE1, Pol $\beta$  und Fen1 aufweisen. Diese Proteine spielen bei der Basenentfernung, Einschnitt an der apurinen DNA-Stelle, Verdrängung des dRP-Restes und Einbau eines neuen Nukleotides eine Rolle (Christmann et al., 2003). Jedoch zeigten Monozyten eine schwache oder fehlende Proteinexpression von XRCC1 und Lig III, welche als Komplex die Ligation von SSBs durchführen (Tomkinson and Mackey, 1998). Die schwache Expression beider Proteine kann auf eine Herabregulation der Proteinexpression deuten, was in der Literatur noch nicht beschrieben worden ist. Im Vergleich zu Monozyten exprimieren DCs, PBLC, Makrophagen und CD34<sup>+</sup>Stammzellen die fehlenden oder schwach exprimierenden BER Enzyme. Die Untersuchung der Frage, welches Zytokin die Hochregulation von XRCC1 und Lig III in Monozyten verursacht, zeigte, dass IL-4 und GM-CSF beide fehlende Proteine induzieren. Bei der geringen XRCC1 Expression in den CD34<sup>+</sup>Stammzellen kann die Ligation etwas verzögert sein, was die hohe Einzelstrangbruchrate nach 1 h Behandlung erklären könnte. Interessanterweise exprimieren Monozyten kein p53 Protein im Vergleich zu DCs. Für p53 wurde gezeigt, dass es die BER stimuliert (Seo et al., 2002; Zhou et al., 2001), und dass Zellen ohne exprimierendes p53 eine Hypersensitivität gegenüber Alkylantien aufweisen (Lackinger et al., 2001). Somit wird der Defekt der BER in Monozyten durch das Fehlen oder der Herabregulation von drei Proteinen der BER verursacht, dem XRCC1, Lig III und p53, wobei XRCC1 die Lig III stabilisiert und durch das Fehlen dieses Komplexes die Ursache für den sensiblen Phänotyp der Monozyten darstellt. Auch weitere Daten von XRCC1-mutierten, nichtproliferierenden Zellen zeigten, dass diese empfindlich auf Alkylantien reagieren. Es konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von XRCC1 und Lig III essentiell für eine erfolgreiche BER ist (Briegert and Kaina, 2007).

#### **4.4 Alkylantien induzierte DSBs und Apoptose in proliferierenden versus nichtproliferierenden Lymphozyten**

DNA-Läsionen können intrazelluläre apoptotische Signalwege aktivieren, welche zum Zelltod führen. Es wurde für O<sup>6</sup>-Methylguanin in MGMT-defizienten oder MMR-defizienten Zelllinien gezeigt, dass diese DNA-Läsion die Ursache für eine Induktion des Zelltodes ist (Brennand and Margison, 1986; Kaina et al., 1991). Hauptsächlich induziert O<sup>6</sup>-Methylguanin Apoptose

und nur geringfügig Nekrose (Kaina et al., 1997; Meikrantz et al., 1998). Bei der durch O<sup>6</sup>-Methylguanin induzierten Apoptose ist die DNA Mismatch-Reparatur (MMR, Basenfehlpaarungsreparatur) involviert. MMR erkennt die O<sup>6</sup>-MeG/T Fehlpaarung und verursacht eine fehlerhafte Reparatur, wobei eine sekundäre Läsion entsteht, die über weitere Prozesse wie der DNA-Replikation zu Doppelstrangbrüchen führt, die letztendlich die Apoptose auslösen (Karran and Bignami, 1994; Ochs and Kaina, 2000). Ob DNA-Replikation und Bildung von Doppelstrangbrüchen essentiell für die O<sup>6</sup>MeG-ausgelöste Apoptose ist, sollte anhand von proliferierenden und nichtproliferierenden humanen T-Lymphozyten untersucht werden. DNA-Doppelstrangbrüche wurden bei einer geringen Dosis (10 mM) von MNNG in proliferierenden T-Lymphozyten detektiert. Diese waren MGMT depletiert durch O<sup>6</sup>-Benzylguanin Behandlung zwecks Inhibierung der O<sup>6</sup>-MeG Reparatur. In nichtproliferierenden T-Lymphozyten wurden keine Doppelstrangbrüche beobachtet. Die DNA-Doppelstrangbrüche in proliferierenden T-Lymphozyten traten nach 24 h vor einer eingehenden Apoptose auf. Interessanterweise traten auch Doppelstrangbrüche bei nichtproliferierenden T-Lymphozyten bei einer hohen Dosis (25 mM) von MNNG auf, was auf eine replikationsunabhängige Apoptoseinduktion hinweist. Diese Form der replikationsunabhängigen Apoptose geht aus Doppelstrangbrüche hervor, welche durch überlappende Einzelstrangbrüche der BER entstehen können, die bei einer hohen DNA-Alkylierungsmenge auftreten können (Coquerelle et al., 1995).

Untersuchungen von Apoptoseinduktionen durch Alkylantien bei proliferierenden und nichtproliferierenden T-Lymphozyten zeigten eine starke Apoptoserate in proliferierenden T-Zellen und eine Resistenz in nichtproliferierenden T-Zellen. Dieses Resultat zeigt, dass nichtreparierte O<sup>6</sup>-MeG Läsionen replikationsabhängige Apoptose auslösen. Nur bei sehr hoher MNNG Dosis wurde auch Apoptose in nichtproliferierenden T-Zellen nachgewiesen, wobei hier N-Alkylierungen der DNA eine Rolle spielen. Somit induzieren nicht- oder fehlerhaft reparierte N-Alkylierungen der DNA eine replikationsunabhängigen Apoptose (Roos et al., 2004).

#### **4.5 Wirkung von Topoisomeraseinhibitoren in Abhängigkeit von p53**

Tumore weisen hohe Topoisomeraseaktivitäten auf, welche durch spezifische Chemotherapeutika inhibiert werden können (Topcu, 2001). Die Funktion einer Topoisomerase ist es, die DNA zu relaxieren, um weitere zelluläre Prozesse, wie die Replikation, DNA-Reparatur oder Rekombination zu ermöglichen. Die Topoisomerase II wird durch den Wirkstoff Etoposid und Topoisomerase I durch Topotecan inaktiviert. Hierbei wird speziell die Ligation bei der Relaxierung der DNA inhibiert (Osheroff, 1989). Tumore weisen auch mutiertes p53 Protein auf, welches ebenso einen Einfluss auf die Sensitivität

gegenüber dem Chemotherapeutika Etoposid hat (Dudley et al., 2008). Außerdem wurde gezeigt, dass p53 einen Einfluss auf die Aktivität und Expression von Topoisomerasen I und II hat (Hochhauser et al., 1999; Liu et al., 2002; Soe et al., 2002). Dabei spielt der C-Terminus von p53 eine Rolle bei der Interaktion mit der Topoisomerase II (Cowell et al., 2000). Um die Rolle von p53 bei der Sensitivität, den Zelltod und der DNA-Strangbruchbildung gegenüber Topoisomeraseinhibitoren zu verstehen, wurden p53-profiziente (p53+) und defiziente (p51-) Mausfibroblasten verwendet. Über Etoposid ist bekannt, dass die Ligation von Topoisomerase II inhibiert wird, was zu DNA-Doppelstrangbrüchen führt, welche letztendlich den Zelltod auslösen (Osheroff, 1989). Die Untersuchung der DNA-Strangbruchrate zeigte in p53-Wildtyp (wt) eine Induktion von DNA-Strangbrüchen nach 2 h, wohingegen bei den p53-defizienten Zellen keine Strangbrüche detektiert wurden. Auch in der Dosiswirkungskurve wird deutlich, dass die p53-Wildtypzellen eine zunehmende Strangbruchrate mit zunehmender Etoposidkonzentration aufweisen im Vergleich zu p53-defizienten Zellen. Um den Effekt von p53 bei der Wirkung von Etoposid auf Topoisomerase II besser zu verdeutlichen, wurde ein p53 Inhibitor, Pifithrin, verwendet. In Mäusen wurde gezeigt, dass Pifithrin p53 inhibiert und sie somit vor Nebenwirkungen gegenüber der Krebstherapie schützt (Komarov et al., 1999). Der Untersuchung mit Pifithrin zeigte, dass die Strangbruchbildung in p53-Wildtypzellen inhibiert wird. Somit spielt p53 eine Rolle bei der Wirkung von Etoposid, dessen Funktion die Inhibierung der Ligation von Topoisomerase II ist. Die Bildung von DNA-Strangbrüchen durch Etoposid ist somit p53 abhängig. Diese Strangbrüche führen zur verstärkten Sensitivität in p53 Wildtypzellen und letztendlich zur Apoptose (Dunkern et al., 2003). Da die Etoposid-induzierte Strangbruchbildung von der Inhibierung der Ligation von Topoisomerase II hervorgerufen werden, entsteht natürlich die Frage, weshalb p53-defiziente Zellen keine Induktion von DNA-Strangbrüchen aufweisen. Könnte p53 einen Einfluss auf die Topoisomeraseaktivität haben? Untersuchung mittels Plasmidrelaxierungassay zeigten, dass eine veränderte Topoisomeraseaktivität II in p53-Wildtypzellen versus p53-defizienten Mausfibroblasten nicht beobachtet wurde. Ebenso zeigten p53-Wildtypzellen und -defiziente Zellen die gleiche Proteinexpression von Topoisomerase II. Es wurden keine unterschiedlichen Topoisomeraseaktivitäten in p53-Wildtypzellen und -defizienten Zellen beobachtet. Daher stellen nicht die Ursache für die zunehmenden DNA-Strangbrüchen in den empfindlichen p53-Wildtypzellen dar. Somit werden DNA-Strangbrüche durch Etoposid in Abhängigkeit von p53 induziert. Dies erfolgt durch die Inhibierung der Ligasefunktion von Topoisomerase II (Dunkern et al., 2003). Das gleiche Phänomen wurde bei einem Topoisomerase I Inhibitor, dem Topotecan, beobachtet. Auch hier wurden in p53-Wildtypzellen eine stärkere Sensitivität gegenüber Topotecan ermittelt, als in p53-defizienten Zellen. Die abnehmende Vitalität von p53-Wildtypzellen wird durch zunehmende Apoptose verursacht. Nekrose wurde bei beiden

---

Topotecan-behandelten Zelltypen nicht beobachtet. Ebenso wurden DNA-Strangbrüche durch Topotecanbehandlung in p53-Wildtypzellen, jedoch nicht in p53-defizienten Zellen detektiert. Auch bei diesem Topoisomeraseinhibitor konnte der Effekt der DNA-Strangbruchbildung durch Pifithrin inhibiert werden. Somit spielt auch hier p53 eine Rolle bei der Topotecan-induzierten DNA-Strangbruchbildung, was zu einer zunehmenden Sensitivität und Apoptose führt. Dabei spielt auch die Transkription und Replikation eine Rolle bei der aus den Topotecan-induzierten DNA Strangbrüchen Doppelstrangbrüche entstehen, welche die apoptotische Signaltransduktion induzieren (Ryan et al., 1991; Wu and Liu, 1997).

## 5 Zusammenfassung

Alkylantien sind hoch zytotoxisch wirkende Agenzien, die in der Umwelt vorkommen und in der Tumortherapie Verwendung finden. Daher stellt sich die Frage, wie sehen die Auswirkungen von Alkylantien auf Immunzellen aus? Um dies zu untersuchen, wurden Monozyten und den aus Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen verwendet. Ebenso wurden weitere Immunzellen wie Makrophagen, Lymphozyten und hämatopoetischen Stammzellen auf die Wirkung von Alkylantien untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Monozyten sensitiver auf Alkylantien reagieren als die von ihnen abgeleiteten DCs, Makrophagen oder nichtproliferierende T-Lymphozyten. Die DNA-Läsion O<sup>6</sup>-Methylguanin, welche vom Reparaturenzym MGMT eliminiert wird, stellt nicht die Ursache der Zytotoxizität gegenüber Alkylantien dar, weil Monozyten eine hohe Proteinexpression von MGMT aufweisen. Diese nimmt mit der Differenzierung in DCs ab. Bei der Aktivitäts-, Proteinexpressions- und Genexpressionsabnahme von MGMT während der Ausreifung von Monozyten zu DCs spielen die Zytokine IL-4 und GM-CSF eine Rolle, während Promoterhypermethylierung nicht involviert ist. Alkylantien induzieren in der DNA neben O<sup>6</sup>-Alkylguanin auch N-Alkylierungen, welche durch die BER repariert werden. Untersuchungen der BER von N-Alkylierungen der DNA zeigten, dass in Monozyten ein Basenexzisionsreparaturdefekt vorliegt, da die Ligation gehemmt ist durch die fehlende Expression des Ligationskomplexes XRCC1 und Lig III $\alpha$ . Im Vergleich dazu weisen DCs, Makrophagen, Leukozyten und hämatopoetische Stammzellen die Expression von XRCC1 und Lig III $\alpha$  auf. Somit wurde erstmals gezeigt, dass in Monozyten ein Defekt in der BER vorliegt, welcher durch eine fehlende Expression von XRCC1 und Lig III $\alpha$  bedingt ist. Durch die fehlende Expression des Ligationskomplexes XRCC1 und Lig III $\alpha$  in Monozyten kommt es durch die Alkylantienbehandlung zur Bildung von DNA-Strangbrüchen, die zur Apoptose und einer erhöhten Sensitivität der Zellen führen. Alkylantien behandelte Monozyten zeigten eine Induktion des mitochondrialen Signaltransduktionsweges der Apoptose. Im Vergleich zu Monozyten zeigten DCs, Makrophagen und nichtproliferierenden T-Lymphozyten sehr geringe Apoptoseraten nach Alkylantienbehandlung. Bei all diesen Zelltypen handelt es sich um nichtproliferierende Immunzellen, welche offenbar in replikationsunabhängiger Weise Apoptose untergehen. Im Vergleich zu proliferierenden T-Lymphozyten spielt die DNA-Läsion O<sup>6</sup>-Methylguanin eine Rolle, da replikationsbedingte Doppelstrangbrüche entstehen, die zur Apoptose führt. Auch andere Wirkstoffe wie Topoisomeraseinhibitoren zeigten eine Induktion von DNA-Strangbrüchen in Abhängigkeit von p53, welches zu einer verstärkten Sensitivität und Apoptose in p53-Wildtypzellen führte.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aiba, S. (1998). Maturation of dendritic cells induced by cytokines and haptens. *Tohoku J Exp Med* 184, 159-172.
- Anderson, D., Bishop, J. B., Garner, R. C., Ostrosky-Wegman, P., and Selby, P. B. (1995). Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutat Res* 330, 115-181.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J. C. (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.
- Arends, M. J., and Wyllie, A. H. (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32, 223-254.
- Arnold, R., Brenner, D., Becker, M., Frey, C. R., and Krammer, P. H. (2006). How T lymphocytes switch between life and death. *Eur J Immunol* 36, 1654-1658.
- Atallah, E., and Flaherty, L. (2005). Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr Treat Options Oncol* 6, 185-193.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Batts, E. D., Maisel, C., Kane, D., Liu, L., Fu, P., O'Brien, T., Remick, S., Bahlis, N., and Gerson, S. L. (2007). O6-benzylguanine and BCNU in multiple myeloma: a phase II trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 60, 415-421.
- Beger, R. D., and Bolton, P. H. (1998). Structures of apurinic and apyrimidinic sites in duplex DNAs. *J Biol Chem* 273, 15565-15573.
- Bennett, S. E., Sung, J. S., and Mosbaugh, D. W. (2001). Fidelity of uracil-initiated base excision DNA repair in DNA polymerase beta-proficient and -deficient mouse embryonic fibroblast cell extracts. *J Biol Chem* 276, 42588-42600.
- Beranek, D. T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231, 11-30.
- Bhakat, K. K., and Mitra, S. (2003). CpG methylation-dependent repression of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene linked to chromatin structure alteration. *Carcinogenesis* 24, 1337-1345.
- Biswas, T., Ramana, C. V., Srinivasan, G., Boldogh, I., Hazra, T. K., Chen, Z., Tano, K., Thompson, E. B., and Mitra, S. (1999). Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone. *Oncogene* 18, 525-532.
- Boldogh, I., Ramana, C. V., Chen, Z., Biswas, T., Hazra, T. K., Grosch, S., Grombacher, T., Mitra, S., and Kaina, B. (1998). Regulation of expression of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling. *Cancer Res* 58, 3950-3956.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brennand, J., and Margison, G. P. (1986). Expression of the E. coli O6-methylguanine-methylphosphotriester methyltransferase gene in mammalian cells. *Carcinogenesis* 7, 185-188.
- Briegert, M., Enk, A. H., and Kaina, B. (2007). Change in expression of MGMT during maturation of human monocytes into dendritic cells. *DNA Repair (Amst)* 6, 1255-1263.
- Briegert, M., and Kaina, B. (2007). Human monocytes, but not dendritic cells derived from them, are defective in base excision repair and hypersensitive to methylating agents. *Cancer Res* 67, 26-31.
- Brozovic, A., Fritz, G., Christmann, M., Zisowsky, J., Jaehde, U., Osmak, M., and Kaina, B. (2004). Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *Int J Cancer* 112, 974-985.
- Caldecott, K. W., McKeown, C. K., Tucker, J. D., Ljungquist, S., and Thompson, L. H. (1994). An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Mol Cell Biol* 14, 68-76.
- Celluzzi, C. M., Mayordomo, J. I., Storkus, W. J., Lotze, M. T., and Falo, L. D., Jr. (1996). Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 183, 283-287.
- Chan, C. L., Wu, Z., Eastman, A., and Bresnick, E. (1992). Irradiation-induced expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells. *Cancer Res* 52, 1804-1809.
- Chang, D. W., Xing, Z., Capacio, V. L., Peter, M. E., and Yang, X. (2003). Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *Embo J* 22, 4132-4142.
- Chang, T. C., Tsai, L. C., Hung, M. W., Chu, L. L., Chu, J. T., and Chen, Y. C. (1997). Effects of transcription and translation inhibitors on a human gastric carcinoma cell line. Potential role of Bcl-X(S) in apoptosis triggered by these inhibitors. *Biochem Pharmacol* 53, 969-977.
- Chen, F. Y., Harris, L. C., Remack, J. S., and Brent, T. P. (1997). Cytoplasmic sequestration of an O6-methylguanine-DNA methyltransferase enhancer binding protein in DNA repair-deficient human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4348-4353.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.
- Chow, J., and Tron, V. A. (2005). Molecular aspects of ultraviolet radiation-induced apoptosis in the skin. *J Cutan Med Surg* 9, 289-295.
- Christmann, M., Pick, M., Lage, H., Schadendorf, D., and Kaina, B. (2001). Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT. *Int J Cancer* 92, 123-129.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., and Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193, 3-34.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 ( Pt 1), 1-16.

- Coquerelle, T., Dosch, J., and Kaina, B. (1995). Overexpression of N-methylpurine-DNA glycosylase in Chinese hamster ovary cells renders them more sensitive to the production of chromosomal aberrations by methylating agents--a case of imbalanced DNA repair. *Mutat Res* 336, 9-17.
- Cowell, I. G., Okorokov, A. L., Cutts, S. A., Padget, K., Bell, M., Milner, J., and Austin, C. A. (2000). Human topoisomerase IIalpha and IIbeta interact with the C-terminal region of p53. *Exp Cell Res* 255, 86-94.
- Cummings, J., and Smyth, J. F. (1993). DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs. *Ann Oncol* 4, 533-543.
- Demple, B., and Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 63, 915-948.
- Deng, G., Chen, A., Hong, J., Chae, H. S., and Kim, Y. S. (1999). Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 59, 2029-2033.
- Dianova, I., Bohr, V. A., and Dianov, G. L. (2001). Interaction of human AP endonuclease 1 with flap endonuclease 1 and proliferating cell nuclear antigen involved in long-patch base excision repair. *Biochemistry* 40, 12639-12644.
- Dianova, I., Sleeth, K. M., Allinson, S. L., Parsons, J. L., Breslin, C., Caldecott, K. W., and Dianov, G. L. (2004). XRCC1-DNA polymerase beta interaction is required for efficient base excision repair. *Nucleic Acids Res* 32, 2550-2555.
- DiJulio, J. (1991). Hematopoiesis: an overview. *Oncol Nurs Forum* 18, 3-6.
- Dingemans, A. M., Pinedo, H. M., and Giaccone, G. (1998). Clinical resistance to topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1400, 275-288.
- Dudley, A. C., Shih, S. C., Cliffe, A. R., Hida, K., and Klagsbrun, M. (2008). Attenuated p53 activation in tumour-associated stromal cells accompanies decreased sensitivity to etoposide and vincristine. *Br J Cancer* 99, 118-125.
- Dunkern, T. R., Wedemeyer, I., Baumgartner, M., Fritz, G., and Kaina, B. (2003). Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA Repair (Amst)* 2, 49-60.
- Eadie, J. S., Conrad, M., Toorchen, D., and Topal, M. D. (1984). Mechanism of mutagenesis by O6-methylguanine. *Nature* 308, 201-203.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
- El-Zein, R. A., Abdel-Rahman, S. Z., Hay, M. J., Lopez, M. S., Bondy, M. L., Morris, D. L., and Legator, M. S. (2005). Cytogenetic effects in children treated with methylphenidate. *Cancer Lett* 230, 284-291.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

- Enk, A. H., Jonuleit, H., Saloga, J., and Knop, J. (1997). Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73, 309-316.
- Esteller, M., Gaidano, G., Goodman, S. N., Zagonel, V., Capello, D., Botto, B., Rossi, D., Gloghini, A., Vitolo, U., Carbone, A., *et al.* (2002). Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 94, 26-32.
- Fahrbach, K. M., Barry, S. M., Ayehunie, S., Lamore, S., Klausner, M., and Hope, T. J. (2007). Activated CD34-derived Langerhans cells mediate transinfection with human immunodeficiency virus. *J Virol* 81, 6858-6868.
- Fan, J., Otterlei, M., Wong, H. K., Tomkinson, A. E., and Wilson, D. M., 3rd (2004). XRCC1 co-localizes and physically interacts with PCNA. *Nucleic Acids Res* 32, 2193-2201.
- Felzmann, T., Gadner, H., and Holter, W. (2002). Dendritic cells as adjuvants in antitumor immune therapy. *Onkologie* 25, 456-464.
- Figdor, C. G., de Vries, I. J., Lesterhuis, W. J., and Melief, C. J. (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 10, 475-480.
- Fortini, P., and Dogliotti, E. (2007). Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)* 6, 398-409.
- Franchi, L., Condo, I., Tomassini, B., Nicolo, C., and Testi, R. (2003). A caspase-like activity is triggered by LPS and is required for survival of human dendritic cells. *Blood* 102, 2910-2915.
- Frassanito, M. A., Cusmai, A., Iodice, G., and Dammacco, F. (2001). Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* 97, 483-489.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W. D., Schultz, R. A., and Ellenberger, T. (2006). *DNA Repair and Mutagenesis*. Second Edition. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
- Fritz, G., Tano, K., Mitra, S., and Kaina, B. (1991). Inducibility of the DNA repair gene encoding O6-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments. *Mol Cell Biol* 11, 4660-4668.
- Fulda, S., and Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798-4811.
- Gong, J., Nikrui, N., Chen, D., Koido, S., Wu, Z., Tanaka, Y., Cannistra, S., Avigan, D., and Kufe, D. (2000). Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. *J Immunol* 165, 1705-1711.
- Grombacher, T., Eichhorn, U., and Kaina, B. (1998). p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. *Oncogene* 17, 845-851.
- Grombacher, T., and Kaina, B. (1995). Constitutive expression and inducibility of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in rat liver cells exhibiting different status of differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1270, 63-72.

- Grombacher, T., Mitra, S., and Kaina, B. (1996). Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes. *Carcinogenesis* *17*, 2329-2336.
- Guo, Z., Zhang, M., An, H., Chen, W., Liu, S., Guo, J., Yu, Y., and Cao, X. (2003). Fas ligation induces IL-1beta-dependent maturation and IL-1beta-independent survival of dendritic cells: different roles of ERK and NF-kappaB signaling pathways. *Blood* *102*, 4441-4447.
- Hanada, M., Aime-Sempe, C., Sato, T., and Reed, J. C. (1995). Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J Biol Chem* *270*, 11962-11969.
- Harris, L. C., Potter, P. M., Tano, K., Shiota, S., Mitra, S., and Brent, T. P. (1991). Characterization of the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res* *19*, 6163-6167.
- Harris, L. C., Remack, J. S., Houghton, P. J., and Brent, T. P. (1996). Wild-type p53 suppresses transcription of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res* *56*, 2029-2032.
- Hart, D. N., and Fabre, J. W. (1981). Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* *154*, 347-361.
- Hengstler, J. G., Tanner, B., Moller, L., Meinert, R., and Kaina, B. (1999). Activity of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in relation to p53 status and therapeutic response in ovarian cancer. *Int J Cancer* *84*, 388-395.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., and Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 9821-9826.
- Hernando, J. J., Park, T. W., and Kuhn, W. C. (2003). Dendritic cell-based vaccines in breast and gynaecologic cancer. *Anticancer Res* *23*, 4293-4303.
- Hochhauser, D., Valkov, N. I., Gump, J. L., Wei, I., O'Hare, C., Hartley, J., Fan, J., Bertino, J. R., Banerjee, D., and Sullivan, D. M. (1999). Effects of wild-type p53 expression on the quantity and activity of topoisomerase IIalpha and beta in various human cancer cell lines. *J Cell Biochem* *75*, 245-257.
- Holti, L., Ramoner, R., Zelle-Rieser, C., Gander, H., Putz, T., Papesh, C., Nussbaumer, W., Falkensammer, C., Bartsch, G., and Thurnher, M. (2005). Allogeneic dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma with or without cyclophosphamide. *Cancer Immunol Immunother* *54*, 663-670.
- Hou, W. S., and Van Parijs, L. (2004). A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol* *5*, 583-589.
- House, M. G., Guo, M., Efron, D. T., Lillemoe, K. D., Cameron, J. L., Syphard, J. E., Hooker, C. M., Abraham, S. C., Montgomery, E. A., Herman, J. G., and Brock, M. V. (2003). Tumor suppressor gene hypermethylation as a predictor of gastric stromal tumor behavior. *J Gastrointest Surg* *7*, 1004-1014; discussion 1014.

- Hsu, F. J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T. M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E. G., and Levy, R. (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2, 52-58.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., and Fesik, S. W. (1996). NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 384, 638-641.
- Huschtscha, L. I., Jeitner, T. M., Andersson, C. E., Bartier, W. A., and Tattersall, M. H. (1994). Identification of apoptotic and necrotic human leukemic cells by flow cytometry. *Exp Cell Res* 212, 161-165.
- Ide, H., and Kotera, M. (2004). Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol Pharm Bull* 27, 480-485.
- Jansen, J. H., Wientjens, G. J., Fibbe, W. E., Willemze, R., and Kluin-Nelemans, H. C. (1989). Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. *J Exp Med* 170, 577-582.
- Janssen, K., Eichhorn-Grombacher, U., Schlink, K., Nitzsche, S., Oesch, F., and Kaina, B. (2001). Long-time expression of DNA repair enzymes MGMT and APE in human peripheral blood mononuclear cells. *Arch Toxicol* 75, 306-312.
- Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., and Enk, A. H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27, 3135-3142.
- Jonuleit, H., and Schmitt, E. (2005). Regulatory T-cells in antitumor therapy: isolation and functional testing of CD4+CD25+ regulatory T-cells. *Methods Mol Med* 109, 285-296.
- Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J. C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4997-5002.
- Kaina, B., and Christmann, M. (2002). DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther* 40, 354-367.
- Kaina, B., Fritz, G., and Coquerelle, T. (1993). Contribution of O6-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations: new insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines. *Environ Mol Mutagen* 22, 283-292.
- Kaina, B., Fritz, G., Mitra, S., and Coquerelle, T. (1991). Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* 12, 1857-1867.
- Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K., and Coquerelle, T. (1997). Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat Res* 381, 227-241.
- Kamath, A. T., Henri, S., Battye, F., Tough, D. F., and Shortman, K. (2002). Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100, 1734-1741.

- Karran, P., and Bignami, M. (1994). DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bioessays* 16, 833-839.
- Kashimura, S., Terashima, M., Soeta, N., Otani, S., Hoshino, M., Kanzaki, N., Matsuyama, S., Hoshino, Y., Kogure, M., Gotoh, M., *et al.* (2004). [Experimental study for a combination chemo-immunotherapy using dendritic cells]. *Gan To Kagaku Ryoho* 31, 1631-1633.
- Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., and Poirier, G. G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53, 3976-3985.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., and Ahnstrom, G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 363, 89-96.
- Klungland, A., and Lindahl, T. (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *Embo J* 16, 3341-3348.
- Komarov, P. G., Komarova, E. A., Kondratov, R. V., Christov-Tselkov, K., Coon, J. S., Chernov, M. V., and Gudkov, A. V. (1999). A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 285, 1733-1737.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W., and Reed, J. C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53, 4701-4714.
- Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3, 614-620.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99-163.
- Kubota, Y., Nash, R. A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D. E., and Lindahl, T. (1996). Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *Embo J* 15, 6662-6670.
- Lackinger, D., Eichhorn, U., and Kaina, B. (2001). Effect of ultraviolet light, methyl methanesulfonate and ionizing radiation on the genotoxic response and apoptosis of mouse fibroblasts lacking c-Fos, p53 or both. *Mutagenesis* 16, 233-241.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lefebvre, P., and Laval, F. (1986). Enhancement of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase activity induced by various treatments in mammalian cells. *Cancer Res* 46, 5701-5705.
- Lefebvre, P., Zak, P., and Laval, F. (1993). Induction of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase and N3-methyladenine-DNA-glycosylase in human cells exposed to DNA-damaging agents. *DNA Cell Biol* 12, 233-241.

- Leverkus, M., Walczak, H., McLellan, A., Fries, H. W., Terbeck, G., Brocker, E. B., and Kampgen, E. (2000). Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis. *Blood* *96*, 2628-2631.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* *88*, 323-331.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* *94*, 491-501.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479-489.
- Li, X., Hunt, L., and Vesely, S. K. (2005). Drug-induced thrombocytopenia: an updated systematic review. *Ann Intern Med* *142*, 474-475.
- Lim, I. K., Park, T. J., and Paik, W. K. (2000). Phosphorylation of methylated-DNA-protein-cysteine S-methyltransferase at serine-204 significantly increases its resistance to proteolytic digestion. *Biochem J* *352 Pt 3*, 801-808.
- Liu, D., Huang, C. L., Kameyama, K., Hayashi, E., Yamauchi, A., Sumitomo, S., and Yokomise, H. (2002). Topoisomerase IIalpha gene expression is regulated by the p53 tumor suppressor gene in nonsmall cell lung carcinoma patients. *Cancer* *94*, 2239-2247.
- Liu, M. L., Lee, Y. P., Wang, Y. F., Lei, H. Y., Liu, C. C., Wang, S. M., Su, I. J., Wang, J. R., Yeh, T. M., Chen, S. H., and Yu, C. K. (2005). Type I interferons protect mice against enterovirus 71 infection. *J Gen Virol* *86*, 3263-3269.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* *193*, 265-275.
- Lundqvist, A., Nagata, T., Kiessling, R., and Pisa, P. (2002). Mature dendritic cells are protected from Fas/CD95-mediated apoptosis by upregulation of Bcl-X(L). *Cancer Immunol Immunother* *51*, 139-144.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* *94*, 481-490.
- Macdonald, D. R., Kiebert, G., Prados, M., Yung, A., and Olson, J. (2005). Benefit of temozolomide compared to procarbazine in treatment of glioblastoma multiforme at first relapse: effect on neurological functioning, performance status, and health related quality of life. *Cancer Invest* *23*, 138-144.
- Margison, G. P., Povey, A. C., Kaina, B., and Santibanez Koref, M. F. (2003). Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* *24*, 625-635.
- Mathieu, J., Richard, S., Ballester, B., Chancerelle, Y., and Multon, E. (1999). [Apoptosis and gamma rays]. *Ann Pharm Fr* *57*, 314-323.
- Matsumoto, Y. (2001). Molecular mechanism of PCNA-dependent base excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* *68*, 129-138.

- Matsumoto, Y., Kim, K., and Bogenhagen, D. F. (1994). Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Mol Cell Biol* *14*, 6187-6197.
- Meikrantz, W., Bergom, M. A., Memisoglu, A., and Samson, L. (1998). O6-alkylguanine DNA lesions trigger apoptosis. *Carcinogenesis* *19*, 369-372.
- Morisaki, T., Matsumoto, K., Kuroki, H., Kubo, M., Baba, E., Onishi, H., Tasaki, A., Nakamura, M., Inaba, S., and Katano, M. (2003). Combined immunotherapy with intracavitary injection of activated lymphocytes, monocyte-derived dendritic cells and low-dose OK-432 in patients with malignant effusion. *Anticancer Res* *23*, 4459-4465.
- Moser, M. (2004). Balancing life and death. *Nat Immunol* *5*, 559-560.
- Mullapudi, S. R., Ali-Osman, F., Shou, J., and Srivenugopal, K. S. (2000). DNA repair protein O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase is phosphorylated by two distinct and novel protein kinases in human brain tumour cells. *Biochem J* *351 Pt 2*, 393-402.
- Murphy, K. M., Streips, U. N., and Lock, R. B. (2000). Bcl-2 inhibits a Fas-induced conformational change in the Bax N terminus and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* *275*, 17225-17228.
- Newell, D., Gescher, A., Harland, S., Ross, D., and Ruttly, C. (1987). N-methyl antitumour agents. A distinct class of anticancer drugs? *Cancer Chemother Pharmacol* *19*, 91-102.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* *139*, 271-279.
- Niknahad, H., and O'Brien, P. J. (1995). Cytotoxicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine may involve S-nitrosyl glutathione and nitric oxide. *Xenobiotica* *25*, 91-101.
- O'Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Caminschi, I., Miller, J. L., Anders, E. M., Wu, L., Lahoud, M. H., Henri, S., Scott, B., *et al.* (2002). Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J Exp Med* *196*, 1307-1319.
- Ochs, K., and Kaina, B. (2000). Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res* *60*, 5815-5824.
- Olive, P. L., Wlodek, D., and Banath, J. P. (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res* *51*, 4671-4676.
- Oltvai, Z. N., Millman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* *74*, 609-619.
- Osheroff, N. (1989). Effect of antineoplastic agents on the DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: inhibition of DNA religation by etoposide. *Biochemistry* *28*, 6157-6160.
- Patel, S. A., Graunke, D. M., and Pieper, R. O. (1997). Aberrant silencing of the CpG island-containing human O6-methylguanine DNA methyltransferase gene is associated with the loss of nucleosome-like positioning. *Mol Cell Biol* *17*, 5813-5822.
- Pegg, A. E. (2000). Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* *462*, 83-100.

- Petermann, E., Keil, C., and Oei, S. L. (2006). Roles of DNA ligase III and XRCC1 in regulating the switch between short patch and long patch BER. *DNA Repair (Amst)* 5, 544-555.
- Povirk, L. F., Wubter, W., Kohnlein, W., and Hutchinson, F. (1977). DNA double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by bleomycin. *Nucleic Acids Res* 4, 3573-3580.
- Qian, X. C., and Brent, T. P. (1997). Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res* 57, 3672-3677.
- Quaresima, B., Faniello, M. C., Baudi, F., Cuda, G., Grandinetti, C., Tassone, P., Costanzo, F., and Venuta, S. (2001). Transcriptional regulation of the mismatch repair gene hMLH1. *Gene* 275, 261-265.
- Rafferty, J. A., Clarke, A. R., Sellappan, D., Koref, M. S., Frayling, I. M., and Margison, G. P. (1996). Induction of murine O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase in response to ionising radiation is p53 gene dose dependent. *Oncogene* 12, 693-697.
- Ramanathapuram, L. V., Hahn, T., Dial, S. M., and Akporiaye, E. T. (2005). Chemo-immunotherapy of breast cancer using vesiculated alpha-tocopheryl succinate in combination with dendritic cell vaccination. *Nutr Cancer* 53, 177-193.
- Reed, J. C. (2006). Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* 13, 1378-1386.
- Rescigno, M., Piguet, V., Valzasina, B., Lens, S., Zubler, R., French, L., Kindler, V., Tschopp, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2000). Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med* 192, 1661-1668.
- 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, 359-367.
- Roos, W. P., and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12, 440-450.
- Ryan, A. J., Squires, S., Strutt, H. L., and Johnson, R. T. (1991). Camptothecin cytotoxicity in mammalian cells is associated with the induction of persistent double strand breaks in replicating DNA. *Nucleic Acids Res* 19, 3295-3300.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.
- Sassanfar, M., Dosanjh, M. K., Essigmann, J. M., and Samson, L. (1991). Relative efficiencies of the bacterial, yeast, and human DNA methyltransferases for the repair of O6-methylguanine and O4-methylthymine. Suggestive evidence for O4-methylthymine repair by eukaryotic methyltransferases. *J Biol Chem* 266, 2767-2771.
- Schwarzberg, A. B., Stover, E. H., Sengupta, T., Michelini, A., Vincitore, M., Baden, L. R., and Kulke, M. H. (2007). Selective lymphopenia and opportunistic infections in neuroendocrine tumor patients receiving temozolomide. *Cancer Invest* 25, 249-255.

- Schwerk, C., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol* 66, 1453-1458.
- Seo, Y. R., Fishel, M. L., Amundson, S., Kelley, M. R., and Smith, M. L. (2002). Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence. *Oncogene* 21, 731-737.
- Shin, J. Y., Lee, S. K., Kang, C. D., Chung, J. S., Lee, E. Y., Seo, S. Y., Lee, S. Y., Baek, S. Y., Kim, B. S., Kim, J. B., and Yoon, S. (2003). Antitumor effect of intratumoral administration of dendritic cell combination with vincristine chemotherapy in a murine fibrosarcoma model. *Histol Histopathol* 18, 435-447.
- Shortman, K., and Naik, S. H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7, 19-30.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., *et al.* (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144, 281-292.
- Sobol, R. W., Horton, J. K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R. K., Prasad, R., Rajewsky, K., and Wilson, S. H. (1996). Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature* 379, 183-186.
- Sobol, R. W., Prasad, R., Evenski, A., Baker, A., Yang, X. P., Horton, J. K., and Wilson, S. H. (2000). The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature* 405, 807-810.
- Soe, K., Hartmann, H., Schlott, B., Stevnsner, T., and Grosse, F. (2002). The tumor suppressor protein p53 stimulates the formation of the human topoisomerase I double cleavage complex in vitro. *Oncogene* 21, 6614-6623.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E. S. (1996). Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14486-14491.
- Srivenugopal, K. S., Mullapudi, S. R., Shou, J., Hazra, T. K., and Ali-Osman, F. (2000). Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cells. *Cancer Res* 60, 282-287.
- Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162.
- Steinman, R. M., and Witmer, M. D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5132-5136.
- Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S. H., Hubscher, U., and Dogliotti, E. (1998). Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene* 17, 835-843.
- Stupp, R., van den Bent, M. J., and Hegi, M. E. (2005). Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5, 198-206.

- Su, Y. B., Sohn, S., Krown, S. E., Livingston, P. O., Wolchok, J. D., Quinn, C., Williams, L., Foster, T., Sepkowitz, K. A., and Chapman, P. B. (2004). Selective CD4<sup>+</sup> lymphopenia in melanoma patients treated with temozolomide: a toxicity with therapeutic implications. *J Clin Oncol* 22, 610-616.
- Suh, K. S., and Yuspa, S. H. (2005). Intracellular chloride channels: critical mediators of cell viability and potential targets for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 11, 2753-2764.
- Sung, J. S., DeMott, M. S., and Demple, B. (2005). Long-patch base excision DNA repair of 2-deoxyribonolactone prevents the formation of DNA-protein cross-links with DNA polymerase beta. *J Biol Chem* 280, 39095-39103.
- Takahara, P. M., Rosenzweig, A. C., Frederick, C. A., and Lippard, S. J. (1995). Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* 377, 649-652.
- Tanaka, F., Yamaguchi, H., Ohta, M., Mashino, K., Sonoda, H., Sadanaga, N., Inoue, H., and Mori, M. (2002). Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor-specific antitumor effect in vivo. *Int J Cancer* 101, 265-269.
- 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, 889-896.
- Tomkinson, A. E., Chen, L., Dong, Z., Leppard, J. B., Levin, D. S., Mackey, Z. B., and Motycka, T. A. (2001). Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68, 151-164.
- Tomkinson, A. E., and Mackey, Z. B. (1998). Structure and function of mammalian DNA ligases. *Mutat Res* 407, 1-9.
- Tong, Y., Song, W., and Crystal, R. G. (2001). Combined intratumoral injection of bone marrow-derived dendritic cells and systemic chemotherapy to treat pre-existing murine tumors. *Cancer Res* 61, 7530-7535.
- Topcu, Z. (2001). DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. *J Clin Pharm Ther* 26, 405-416.
- Ueda, Y., Sonoda, Y., Fujiki, H., Harada, S., Kimura, T., Itoh, T., Imura, K., Naito, K., Nomura, K., Taniwaki, M., and Yamagishi, H. (2004). Mobilization of peripheral blood stem cells (PBSCs) after etoposide, adriamycin and cisplatin therapy, and a multimodal cell therapy approach with PBSCs in advanced gastric cancer. *Oncol Rep* 12, 323-332.
- van Dam, H., and Castellazzi, M. (2001). Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 20, 2453-2464.
- Vaux, D. L., and Korsmeyer, S. J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.
- Vidal, A. E., Boiteux, S., Hickson, I. D., and Radicella, J. P. (2001). XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *Embo J* 20, 6530-6539.
- Watt, W., Koeplinger, K. A., Mildner, A. M., Heinrikson, R. L., Tomasselli, A. G., and Watenpaugh, K. D. (1999). The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure* 7, 1135-1143.

- Watts, G. S., Pieper, R. O., Costello, J. F., Peng, Y. M., Dalton, W. S., and Futscher, B. W. (1997). Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol* 17, 5612-5619.
- Wittke, F., Hoffmann, R., Buer, J., Dallmann, I., Oevermann, K., Sel, S., Wandert, T., Ganser, A., and Atzpodien, J. (1999). Interleukin 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 79, 1182-1184.
- Wu, J., and Liu, L. F. (1997). Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription. *Nucleic Acids Res* 25, 4181-4186.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Xiang, S. D., Scholzen, A., Minigo, G., David, C., Apostolopoulos, V., Mottram, P. L., and Plebanski, M. (2006). Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? *Methods* 40, 1-9.
- Yrlid, U., Jenkins, C. D., and MacPherson, G. G. (2006). Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *J Immunol* 176, 4155-4162.
- Yu, Z., Chen, J., Ford, B. N., Brackley, M. E., and Glickman, B. W. (1999). Human DNA repair systems: an overview. *Environ Mol Mutagen* 33, 3-20.
- Zekri, J. M., Mouncey, P., and Hancock, B. W. (2004). Trials in advanced Hodgkin's disease: more than 30 years experience of the British National Lymphoma Investigation. *Clin Lymphoma* 5, 174-183.
- Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D. A., O'Connor, P. M., and Fornace, A. J., Jr. (1994). Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 9, 3743-3751.
- Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S. H., and Prives, C. (2001). A role for p53 in base excision repair. *Embo J* 20, 914-923.
- Zimmerman, S. E., Smith, F. P., and Schein, P. S. (1981). Chemotherapy of pancreatic carcinoma. *Cancer* 47, 1724-1728.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Hämatopoese. Aus einer hämatopoetischen Stammzelle (HSZ) können lymphoide (LSZ) oder myeloide (MSZ) Stammzellen hervorgehen, aus denen wiederum weitere Vorläuferzellen (CFU, colony forming unit) entstehen, In der myeloiden Zellentwicklung können aus der entsprechenden Progenitorzelle Erythrozyten, Megakaryozyten, Thrombozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Monozyten und neutrophile, basophile, eosinophile Granulozyten hervorgehen. In der lymphoiden Zellentwicklung können sich B-, NK- und T- Zellen bilden, die wie die HSZ, MSZ und LSZ die Fähigkeit zur Zellteilung besitzen. .... 2
- Abb. 1.2: *In vitro* DC Generierung. Aus CD34<sup>+</sup> Stammzellen gehen Monozyten hervor, welche entweder in unreife DC mittels GM-CSF und IL-4 oder in Makrophagen durch GM-CSF differenzieren können. Ausreifung der DC erfolgt durch IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE und TNF- $\alpha$ . Langerhans-Zellen können direkt aus CD34<sup>+</sup>Stammzellen generiert werden. .... 4
- Abb. 1.3: Funktion von DCs im Immunsystem. Ausgereifte, antigenbeladene DCs können über MHC II CD4 T-Helferzellen oder über MHC I CD8 T-Zellen aktivieren. Dabei können CD4 T-Zellen zu T<sub>h1</sub> oder T<sub>h2</sub> differenzieren welche wiederum die zelluläre oder humorale Immunantwort einleiten. CD8 T-Zellen reifen zu reaktiven zytotoxischen T-Zellen, welche gezielt die Apoptose der Zielzelle oder Tumorzelle induzieren. .... 5
- Abb. 1.4: Bildung eines reaktiven Carbenium-Ions durch das Alkylanz MNNG (nach Friedberg et al., 2006). .... 7
- Abb. 1.5: Schematische Darstellung der MGMT Aktivität an methyliertem Guanin der DNA. .... 9
- Abb. 1.6: Mechanismus der Basenexzisionsreparatur. Links: Exzission eines einzigen Nukleotides („short-patch repair“); Rechts: Exzission mehrerer Nukleotide („long-patch repair“); Abbildung aus Christmann *et al.* (2003). .... 12
- Abb. 1.7: Mechanismus der Rezeptor-vermittelten und mitochondrialen Apoptose ..... 15
- Abb. 2.1: Bisulfit-Modifikation von Cytosin zu Uracil durch hydrolytische Desaminierung. 1: Sulfonierung; 2: Hydrolytische Desaminierung; 3: Alkalische Desulfonierung..... 35
- Abb. 3.1: Differenzierung von Monozyten zu unausgereiften (i) und ausgereiften (m) DC. Lichtmikroskopische Aufnahmen (400fach) verdeutlichen die morphologische Veränderung von Monozyten zu DC mittels Zytokine. Monozyten wurden mittels Plastikadhärenz angereichert, stimuliert über 7 Tage mit GM-CSF und IL-4 zu unausgereiften DC (iDC) und zu reifen DC (mDC) durch weitere Zugabe proinflammatorischer Zytokine über 2 Tage. .... 43
- Abb. 3.2: Phänotypisierung von Monozyten, iDC und mDC mittels Durchflusszytometrie. Je 5x10<sup>5</sup> Monozyten oder DC wurden mit Erstantikörper, gerichtet gegen die entsprechende Oberflächenproteine, inkubiert, gewaschen und mit FITC oder PE konjugierte Zweitantikörper versetzt und per FACS die Expression der Oberflächenmarker einer Zellpopulation analysiert. A) Darstellung einer repräsentativen Doppelfärbung von Oberflächenmarkern im Dichtediagramm einer Zellpopulation.B) Zusammenfassung der Daten von 5 unabhängigen Experimenten. .... 44
- Abb. 3.3: MGMT Aktivität in Monozyten, iDC und mDC, und weiteren Immunzellen. A) MGMT Aktivität in Monozyten, iDC und mDC von 5 Spendern. B) Relative MGMT Aktivität in Monozyten, iDC und mDC. MGMT Aktivität in Monozyten wird 100% gesetzt. C) MGMT Aktivitätsvergleich mit Lymphozyten und Stammzellen. .... 45

- Abb. 3.4: MGMT Protein und Genexpression. A) MGMT Proteinexpression in Monozyten (Spur 3), iDC (Spur 4) und mDC (Spur 5) in einem repräsentativen Western-Blot dargestellt. HeLa S3 (Spur 2) und MR (Spur 1) Zellen dienen als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Vergleich von nichthungernden (Spur 6) und hungernden (Spur 7) (für 48 h in 1,5% autologes Serum) Monozyten. Zur Beladungskontrolle wurden die Immunoblots mit anti GAPDH-Antikörper hybridisiert. B) Quantifizierung der MGMT Proteinexpression von 3 unabhängigen Experimenten. C) Expression der *mgmt* mRNA wurde mittels RT-PCR ermittelt. Eine repräsentative semiquantitative RT-PCR ist hier mit der Quantifizierung von 3 unabhängigen Experimenten durch real-time PCR dargestellt. Die *gapdh* RT-PCR dient zum Abgleich der eingesetzten RNA Menge. .46
- Abb. 3.5: MGMT Promotormethylierung. A) MGMT Promotorstatus von Monozyten und DC ermittelt durch MSP. MeWo Zellen dienen als Positivkontrolle für methylierten MGMT Promotor. B) Promotormethylierung in Lymphozyten aus Buffy coats und CD34<sup>+</sup>Stammzellen aus Nabelschnurblut mit der Positivkontrolle MeWo und der Negativkontrolle iDC. .... 47
- Abb. 3.6: AP-1 Bindungsaktivität in Monozyten und iDC. EMSA wurde mit <sup>32</sup>P-markierten Oligonukleotid mit einer AP-1 Bindungsstelle und 4 µg Kernextrakt durchgeführt, auf 4% Polyacrylamidgel separiert und per Autoradiographie ausgewertet. .... 48
- Abb. 3.7: MGMT Proteinexpression in Monozyten behandelt mit Zytokine und der Vergleich der Anreicherung per Plastikadhärenz versus MACS. Repräsentativer Western Blot der MGMT Proteinexpression von Monozyten (1) und behandelten Monozyten mit GM-CSF (2), IL-4 (3) oder GM-CSF mit IL-4 (4) über 7 d. Auswirkung der Monozytenanreicherung durch Plastikadhärenz (5) versus MACS (6). Zur Beladungskontrolle wurden die Immunoblots mit anti GAPDH-Antikörper inkubiert..... 49
- Abb. 3.8: MLH1, FEN1 und ERCC1 Proteinexpression in Monozyten, iDC und mDC. Untersuchung der Proteinexpression in Monozyten, iDC und mDC mittels Western Blot. Darstellung eines repräsentativen Western Blots mit densitometrischer Quantifikation von 3 Blots verschiedener Spender. Zur Beladungskontrolle wurden die Immunoblots mit anti GAPDH-Antikörper inkubiert..... 50
- Abb. 3.9: *mlh1*, *ercc1* und *fen1* Genexpression in Monozyten, iDC und mDC. RT-PCR-Analyse der *mlh1*, *ercc1* und *fen1* mRNA in Monozyten und DC, Darstellung einer repräsentativen RT-PCR im Agarosegel und deren Densitometrischer Quantifikation von 3 Blots verschiedener Spendern. Die *gapdh* RT-PCR diente zum Abgleich der eingesetzten RNA Menge. .... 51
- Abb. 3.10: Sensitivität von Monozyten und iDC gegenüber Alkylantien. Dosiswirkungskurven folgender Behandlungen: A) Trypanblaufärbung MNNG behandelte Monozyten und iDC. B) Trypanblaufärbung MMS behandelte Monozyten und iDC. C) Trypanblaufärbung Temozolomid behandelte Monozyten und iDC. D) Trypanblaufärbung Fotemustin behandelte Monozyten und iDC. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten und unterschiedlichen Spendern. .... 52
- Abb. 3.11: Sensitivität von Monozyten und iDC gegenüber Cross-Linker und oxidativem Stress. Dosiswirkungskurven folgender Behandlungen: A) Trypanblaufärbung Mafosfamid behandelte Monozyten und iDC. B) Trypanblaufärbung Cisplatin behandelte Monozyten und iDC. C) Trypanblaufärbung H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte Monozyten und iDC. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten. .... 53
- Abb. 3.12: Sensitivität gegenüber MNNG, Fotemustin und MGMT Depletion. A) Trypanblaufärbung (72 h) nach 1 h Vorbehandlung mit 10 µM O<sup>6</sup>-BzG und zunehmender Dosis MNNG in Monozyten. B) Trypanblaufärbung (72 h) nach 1 h Vorbehandlung mit 10 µM O<sup>6</sup>-BzG und zunehmender Dosis Fotemustin in Monozyten und iDC. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten..... 54
- Abb. 3.13: MNNG-induzierte Apoptose in Monozyten und iDC. Eine repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen SubG1-Messung von Monozyten und iDC 72h nach 5 µM und 20 µM MNNG Behandlung. .... 55
- Abb. 3.14: Dosis- und Zeitabhängigkeit der Apoptosefrequenz in Monozyten und iDC nach Alkylantienbehandlung. A) Quantifizierung apoptotischer SubG1-Zellen 72 h nach 5 µM und 20 µM MNNG

- in Monozyten und iDC. B) Zeitabhängige Quantifizierung der Apoptose in Monozyten und iDC mit 20  $\mu$ M MNNG. C) Dosisabhängige Quantifizierung der Apoptose in Monozyten und iDC nach 72 h. D) Relative Quantifizierung apoptotischer SubG1-Zellen 72 h nach 5  $\mu$ M und 20  $\mu$ M MNNG in Monozyten und Lymphozyten. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten. .... 56
- Abb. 3.15: Bildung von DNA Einzelstrangbrüchen in Monozyten, iDC und PBLC. Die Zellen wurden mit 20  $\mu$ M MNNG behandelt. DNA Einzelstrangbruchbildung mittels alkalischen Comet Assay gemessen. A) SSBs Frequenz über 60 min mit 20  $\mu$ M MNNG. B) Frequenz der SSBs zeitabhängig nach 1h Behandlung mit 20  $\mu$ M MNNG. C) Frequenz der SSBs in Monozyten, iDC und PBLC exponiert mit 1 mM Temozolomid für 1h. Die Messung erfolgte 4 h nach Behandlung. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten. .... 58
- Abb. 3.16: BER Proteinexpression in Monozyten, iDC und mDC. A) Proteinexpression von MPG, APE-1, POL $\beta$ , PCNA und FEN1 von Gesamtextrakten. Zur Beladungskontrolle wurden die Immunoblots mit anti GAPDH-Antikörper inkubiert. B) Proteinexpression von XRCC1, Lig III $\alpha$  und p53 von Kernextrakten. Als Ladekontrolle diente Ponceaufärbung. .... 59
- Abb. 3.17: BER Genexpression in Monozyten, iDC und mDC. Semiquantitative RT-PCR Analyse von *mpg*, *ape1*, *pol $\beta$* , *pcna*, *fen1*, *xrcc1* und *lig III $\alpha$*  in Monozyten, iDC und mDC. *Gapdh* RT-PCR diente zum Abgleich der eingesetzten RNA Menge. .... 60
- Abb. 3.18: Aktivität der Apurinen Endonuklease (APE-1) in HeLa S3, Monozyten und iDC. A) Gesamtzellextrakt von HeLa, Monozyten und iDC wurden auf APE-1 Aktivität untersucht. Nach unterschiedlicher Zeitinkubation wurden Aliquots entnommen und auf ein 20% Sequenziergel separiert. Als Kontrolle (Con #0) wurde BSA inkubiert. Die obere Bande stellt das 35 bp große Substrat und die untere Bande das geschnittene 15 bp Produkt dar. B) Densitometrische Quantifizierung der kinetischen Spaltung des radioaktiv-markierten Substrates. .... 61
- Abb. 3.19: XRCC1 und Lig III $\alpha$  Expression von unbehandelten versus Zytokin-behandelten Monozyten, sowie Expressionsvergleich von PBLC mit Monozyten. A) Unbehandelte Monozyten (Kontrolle), IL-4, GM-CSF und IL4 mit GM-CSF behandelte (7 d) Monozyten Expressionsanalyse von XRCC1 und Lig III $\alpha$  per Western Blot. B) Vergleich PBLC mit deren Monozyten auf XRCC1 und Lig III $\alpha$  Expression per Western Blot. Als Ladekontrolle diente Ponceaufärbung. .... 62
- Abb. 3.20: Sensitivität und Apoptosefrequenz von XRCC1 pro- und defizienten CHO Zellen gegenüber MMS. A) Koloniebildungstest MMS behandelte CHO-9 (wt) Zellen und EM-C11 (XRCC1 mutiert) Zellen. B) Konfluente CHO-9 und EM-C11 Zellen wurden mit MMS behandelt, nach 72 h die Apoptose durch SubG1 Messung ermittelt. .... 63
- Abb. 3.21: Ermittlung aktiver Caspase-3, -8 und -9 in MNNG behandelten Monozyten und iDC per Western Blot. Untersuchung aktiver Caspasen im Gesamtextrakt von Monozyten und iDC nach 72 h Behandlung mit 20  $\mu$ M MNNG. Als Beladungskontrolle wurden die Immunoblots mit anti p38-Antikörper inkubiert. .... 64
- Abb. 3.22: Bcl-2 und Bax Expression in MNNG behandelten Monozyten und iDC, sowie mRNA Expression von *fasR* und *fasL*. A) Bcl-2 und Bax Proteinexpression in mit 20  $\mu$ M MNNG (72 h) behandelten Monozyten und iDC. B) Zeitabhängigkeit der Proteinexpression von Bcl-2 und Bax in mit 20  $\mu$ M MNNG behandelten Monozyten. Als Beladungskontrolle wurden die Immunoblots mit anti GAPDH-Antikörper inkubiert. C) Zeitabhängige *fasR* und *fasL* mRNA-Expression in 20  $\mu$ M MNNG behandelte Monozyten. *gapdh* RT-PCR diente zum Abgleich der eingesetzten RNA Menge. .... 65
- Abb. 3.23: Sensitivität von Monozyten, PBLC und iDC gegenüber Ritalin. Dosiswirkungskurve von Ritalin behandelten Monozyten, PBLC und iDC vom selben Spender. Auswertung erfolgte durch Trypanblaufärbung. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten und unterschiedlichen Spendern. .... 67

- Abb. 3.24: Generierung von iLHC und mLHC aus expandierte CD34<sup>+</sup>Stammzellen. Die aus Nabelschnurblut angereicherten CD34<sup>+</sup>Stammzellen wurden expandiert und zu iLHC und mLHC ausdifferenziert. Lichtmikroskopische Aufnahmen (400fach) verdeutlichen die morphologische Veränderung von CD34<sup>+</sup>Stammzellen zu LHC mittels Zytokine. .... 68
- Abb. 3.25: Phänotypisierung von Stammzellen und CBMC mittels Durchflusszytometrie. Je 5x10<sup>5</sup> Stammzellen oder CBMC wurden mit Erstantikörper CD45-FITC inkubiert, gewaschen und mit CD133-PE konjugierten Zweitantikörper versetzt und per FACS die Expression der Oberflächenmarkers CD133 und CD45 von einer aufgereinigten Zellpopulation versus CBMC analysiert. .... 69
- Abb. 3.26: BER Genexpression in expandierten CD34<sup>+</sup>Stammzellen und iLHC. Semiquantitative RT-PCR Analyse von *mpg*, *ape1*, *polβ*, *pcna*, *xrcc1* und *lig IIIα* in expandierte CD34<sup>+</sup>Stammzellen und iLHC. *gapdh* RT-PCR diente zum Abgleich der eingesetzten RNA Menge. .... 70
- Abb. 3.27: Vitalität expandierter CD34<sup>+</sup>Stammzellen und iDC gegenüber MNNG, Fotemustin, Cisplatin. Dosiswirkungskurven folgender Behandlungen: A) WST Assay MNNG behandelter CD34 Zellen und iDC. B) WST Assay Fotemustin behandelter CD34 Zellen und iDC. C) WST Assay Cisplatin behandelter CD34 Zellen und iDC. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten und unterschiedlichen Spendern. .... 71
- Abb. 3.28: Vergleich SSBs Reparatur in Monozyten, iDC und CD34<sup>+</sup>Stammzellen und XRCC1, Lig IIIα Expression in CD34<sup>+</sup>Stammzellen. A) Zeitabhängige SSB Reparatur von 20 μM MNNG (1 h) behandelten CD34<sup>+</sup>angereicherten Stammzellen aus Leukopherese eines Patienten mittels SCGE. B) Proteinexpression von XRCC1 und Lig IIIα durch Western Blot Analyse von Kernextrakten aus CD34<sup>+</sup>Stammzellen. Als Ladekontrolle diente Ponceaufärbung. .... 72
- Abb. 3.29: DNA DSBs Bildung ermittelt durch neutrale Einzelzellgelelektrophorese in expandierten und nichtexpandierten PBL. A) Zeitabhängige DSB Bildung nach 10 μM MNNG Behandlung. B) DSB Bildung nach 25 μM MNNG Behandlung. Expansion wurde über 24 h mit CD3 und CD28 Antikörpern stimuliert. ... 73
- Abb. 3.30: Makrophagen und deren Expression von XRCC1 und Lig IIIα. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Makrophagen (A, 200fach) und GM-CSF stimulierten Makrophagen (B, 200 und 400fach) über 5 d. C) Proteinexpression von XRCC1 und Lig IIIα aus Kernextrakte von Makrophagen und GM-CSF stimulierten Makrophagen. Als Ladekontrolle diente Ponceaufärbung. .... 74
- Abb. 3.31: Dosisabhängigkeit der Apoptosefrequenz in Makrophagen und GM-CSF stimulierten Makrophagen nach Alkylantienbehandlung. A) Quantifizierung apoptotischer SubG1-Zellen 72 h nach zunehmender Temozolomidosis in Makrophagen versus GM-CSF stimulierte Makrophagen. B) Dosisabhängige Quantifizierung der Apoptose in Makrophagen und GM-CSF stimulierten Makrophagen nach MNNG Behandlung. Zusammenfassung der Daten von 3 unabhängigen Experimenten. .... 75
- Abb. 3.32: Etoposid-induzierte DNA-Strangbrüche in p53 wt und knockout Zellen. A) Zeitabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen in p53 wt und knockout Zellen nach 1 h Etoposidbehandlung mit 5μg/ml. B) Dosisabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen in p53 wt und knockout Zellen nach 2 h Etoposidbehandlung. C) Einfluss von Pifithrin (1 h Vorbehandlung mit 0,25 μg/ml) auf Dosisabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen in p53 wt und knockout Zellen nach 2 h Etoposidbehandlung mit 5 und 10 μg/ml. .... 76
- Abb. 3.33: Vitalität, Apoptose/Nekroseinduktion durch Topotecan und Topotecan-induzierte DNA-Strangbrüche in p53 wt und knockout Zellen. A) Vitalität von Topotecan behandelten p53 wt und knockout Zellen durch WST-Assay ermittelt. B) Dosisabhängige Apoptose-/Nekroseinduktion von Topotecan behandelter p53 wt und knockout Zellen nach 72 h. C) Einfluss von Pifithrin (1 h Vorbehandlung mit 0,25 μg/ml) auf Zeitabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen in p53 wt und knockout Zellen mit 1 μg/ml Topotecan, gemessen durch SCGE. .... 78

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Chemikalien- und Mutagenliste.....	17
Tab. 2.2: Geräteliste .....	18
Tab. 2.3: ‚Kitliste .....	19
Tab. 2.4: Verbrauchsmaterialienliste.....	20
Tab. 2.5: Primäre Antikörper .....	20
Tab. 2.6: Sekundäre Detektionsantikörper.....	21
Tab. 2.7: Oligonukleotidliste.....	21
Tab. 2.8: Medienliste.....	22
Tab. 2.9: Zytokinenliste.....	23
Tab. 2.10: Phänotypisierung von DC und Monozyten.....	29

### 7.3 Publikationen

Stadler, M., **Baumgartner, M.**, Grothe, T., Mühlbauer, A., Seip, S. & Wollweber, H.: Concentricol, a taxonomically significant triterpenoid from *Daldinia concentrica*. *Phytochemistry* 56, 787-793(2001).

Stadler, M., **Baumgartner, M.**, Wollweber, H., Ju Y.-M. & Rogers J.D.: *Daldinia decipiens* sp. nov. and notes on some other european *Daldinia* spp. inhabiting *betulaceae*. *Mycotaxon* 80, 167-177 (2001).

Stadler, M., **Baumgartner, M.**, & Wollweber, H.: Three new *Daldinia* species with yellowish stromatal pigments. *Mycotaxon* 80: 179-196 (2001).

Stadler, M., **Baumgartner, M.**, Ide, K., Popp, A., Wollweber, H.: Importance of ascospore ornamentation in the taxonomy of *Daldinia*. *Mycological Progress* 1(1): 31-42 (2002).

Quang, D.N., Hashimoto, T., Tanaka, M., **Baumgartner, M.**, Stadler, M., Asakawa, Y.: Chemical constituents of the ascomycete *Daldinia concentrica*. *J. Natural Prod.* 65(12), 1869-1874 (2002).

Quang, D.N., Hashimoto, T., Tanaka, M., **Baumgartner, M.**, Stadler, M., Asakawa, Y.: Concentriols B, C and D, three squalene-type triterpenoids from the ascomycete *Daldinia concentrica*. *Phytochemistry* 61, 345-353 (2002).

Dunkern, T.R., Wedemeyer, I., **Baumgartner, M.**, Fritz, G., Kaina, B.: Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA Repair (Amst)* 2003 Jan 2; 2(1): 49-60.

Roos, W.P., **Baumgartner, M.**, Kaina, B.: Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* 2004 Jan 15; 23(2): 359-67.

Stadler, M., Wollweber, H., Jäger, W., **Briegert, M.**, Venturella, G., Castro, J.M., Tichy, H.V.: Cryptic species related to *Daldinia concentrica* and *D. eschscholzii*, with notes on *D. bakeri*. *Mycological Research* 108(0): 1-17 (2004).

Mühlhausen, U., Schirmacher, R., Piel, M., Lecher, B., **Briegert, M.**, Piee-Staffa, A., Kaina, B., Rösch, F.: Synthesis of <sup>131</sup>I-Labeled Glucose-Conjugated Inhibitors of O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) and Comparison with Nonconjugated Inhibitors as Potential Tools for in Vivo MGMT Imaging. *J. Med. Chem.* 2006 Jan 12;49(1):263-72.

**Briegert, M.**, Kaina, B.: Human monocytes, but not dendritic cells derived from them, are defective in base excision repair and hypersensitive to methylating agents. *Cancer Res* 2007 Jan 67: 26-31.

**Briegert, M.**, Enk, A. H., Kaina, B.: Change in expression of MGMT during maturation of human monocytes into dendritic cells. *DNA Repair (Amst.)*, 2007 Sep 1;6(9):1255-63.

## 7.4 Tagungsbeiträge

### Posterpräsentation

**Briegert, M.**, H. Kakirman, A. Enk and B. Kaina, Cytokine- induced differentiation of human monocytes into DCs: Impact on DNA repair and sensitivity to alkylating drugs, 46. Frühjahrstagung der DGPT, März 2005, Mainz. In: Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (Hg.), *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, Berlin, Heidelberg: Springer, 2005.

**Briegert, M.**, A. Enk and B. Kaina, Cytokine- induced differentiation of human monocytes into DCs: Impact on DNA repair and sensitivity to alkylating drugs, 42<sup>nd</sup> Congress of European Societies of Toxicology, Krakow, Polen, 2005.

Kaina, B., Tomicic, M., Debiak, M., **Baumgartner, M.**, Fritz, and Roos, W. Apoptosis induced by DNA damaging anticancer drugs: role of DNA repair, cell proliferation and receptor activation. 7<sup>th</sup> International Symposium on Predictive Oncology & Intervention Strategies, Nice, France, 2004.

**Briegert, M.**, H. Kakirman, A. Enk and B. Kaina, Cytokines as modulator of DNA repair and apoptosis in monocytes-derived dendritic cells, Proceedings of the 8<sup>th</sup> Meeting of the German Society of DNA Repair , Ulm 2004.

**Briegert, M.**, H. Kakirman, A. Enk and B. Kaina, Cytokines as modulator of DNA repair and apoptosis in monocytes-derived dendritic cells, 45. Frühjahrstagung der DGPT, 9.-11. März 2004, Mainz. In: Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (Hg.), *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, Berlin, Heidelberg: Springer, 2004.

Roos, W.P., **Baumgartner, M.**, and Kaina, B., Apoptosis in human lymphocytes induced by O<sup>6</sup>-methylguanine is dependent on p53 and requires DNA replication, *Naunyn-Schmiedb. Arch. Pharmacol.*, Joint Meeting of the Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (44th Spring Meeting) and the Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschungs (20th Meeting), Mainz, March 17-20, 2003.

Kaina, B., Dunkern, T., Tomicic, M., Debiak, M., **Baumgartner, M.**, Fritz, G., and Roos, W., DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DSBs, replication and signaling, 4<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, Florianapolis, 2003, Brasilien.

Roos, W., **Baumgartner, M.**, and Kaina, B., O<sup>6</sup>-Methylguanine induced apoptosis in human lymphocytes is dependent on p53, fas, DNA double-strand breaks and requires DNA replication, Gordon Conference on Genetic Toxicology, 2003, Oxford, UK.

**Baumgartner, M.**, Dunkern, T.R., Wedemeyer, I., Fritz, G. and Kaina, B., Role of p53 in doxorubicin- and etoposide- induced cell death, 44. Frühjahrstagung der DGPT, 2003, Mainz. In: Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (Hg.), *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, Berlin, Heidelberg: Springer, 2003.

## Vortrag

**Briegert, M.**, Bauer, M. and Kaina, B., Humane Monozyten sind hypersensitiv gegenüber Genotoxinen aufgrund eines Defektes in der DNA-Reparatur, 49. Frühjahrstagung der DGPT, 12. März 2008, Mainz. In: Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (Hg.), *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, Berlin, Heidelberg: Springer, 2008.



