

**Mechanismus der Apoptose, Genotoxizität und  
DNA-Reparatur in Herpesvirus-  
Thymidinkinase-exprimierenden Säugerzellen  
nach Behandlung mit Antiherpes-Virustatika  
vom Typ der Nukleosidanaloga**

**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  
Maja T. Tomicic  
geb. in Zagreb**

**Mainz, 2001**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**04. 12. 2001**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Herpesviren, Antiherpes-Virustatika und Therapie</i> .....	1
1.1.1. Herpesviren .....	1
1.1.2. Antiherpes-Virustatika und antivirale Therapie .....	2
1.1.3. Nukleosidanaloga und Genterapie maligner Tumoren.....	4
1.2. <i>DNA-Reparatur</i> .....	6
1.2.1. Basenexzisionsreparatur.....	6
1.3. <i>Apoptose</i> .....	9
1.3.1. Rezeptor-vermittelte Apoptose.....	11
1.3.2. Rezeptor-unabhängige Apoptose.....	13
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
2.1. <i>Material</i> .....	19
2.1.1. Spezielle Chemikalien, Kits und Bezugsquellen .....	19
2.1.2. Virustatika .....	20
2.1.3. Enzyme .....	20
2.1.4. Antikörper.....	20
2.1.5. Medienkomponenten für Bakterien- und Zellkultur .....	21
2.1.6. Geräte und Verbrauchsmittel .....	21
2.1.7. Puffer und Stammlösungen.....	22
2.1.8. Vektoren .....	23
2.1.9. Synthetische Oligonukleotide .....	24
2.1.10. Bakterienstämme .....	24
2.1.11. Zelllinien.....	24
2.2. <i>Methoden</i> .....	26
2.2.1. Zellkultur .....	26
2.2.2. Mykoplasmentest.....	26
2.2.3. Erstellung einer Wachstumskurve .....	26
2.2.4. Bestimmung der DNA-Synthese .....	27
2.2.5. Koloniebildungstest.....	28
2.2.6. Bestimmung der Chromosomenaberrationen.....	28
2.2.7. Transfektion von DNA in Säugerzellen .....	29
2.2.8. Bestimmung der Apoptosefrequenz.....	30
2.2.9. Bestimmung der Caspaseaktivität.....	31
2.2.10. Bestimmung der Thymidylatsynthetaseaktivität in Zellextrakten .....	31
2.2.11. Einzelzellgelelektrophorese.....	32
2.2.12. Herstellung von Proteinextrakten.....	33
2.2.13. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	35
2.2.14. Präparation von Nukleinsäuren .....	35
2.2.15. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	37
2.2.16. Synthese von Nukleinsäuren <i>in vitro</i> .....	37
2.2.17. Klonierung von DNA .....	38
2.2.18. Bakterienkultur .....	39
2.2.19. Herstellung und Aufarbeitung von GST-Fusionsproteinen .....	41
2.2.20. Gelretardationsexperiment (EMSA).....	42
2.2.21. Gelelektrophorese.....	42
2.2.22. Transfer von Nukleinsäuren und Proteinen .....	44
2.2.23. Northern-Blot-Analyse.....	45
2.2.24. Koloniefilterhybridisierung .....	45
2.2.25. Western-Blot-Analyse.....	46
2.2.26. DNA-Sequenzierung .....	46
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
3.1. <i>Stabile CHO-HSV-TK-Transfektanten</i> .....	47
3.1.1. Herstellung HSVtk-exprimierender CHO-Transfektanten.....	47

## Inhaltsverzeichnis

3.1.2. Charakterisierung stabiler CHO-HSV-TK-Transfektanten.....	48
3.1.3. Einfluß von Virustatika auf den Zelltod.....	51
3.1.4. Induktion von DNA-Strangbrüchen.....	54
3.1.5. Induktion von Chromosomenaberrationen.....	56
3.1.6. Molekularer Mechanismus der GCV-induzierten Apoptose.....	58
<b>3.2. Klonierung und Expression des Hamster-Bcl-2-Proteins.....</b>	<b>71</b>
3.2.1. Klonierung der <i>bcl-2</i> -cDNA des Chinesischen Hamsters.....	71
3.2.2. Expression von Bcl-2-mRNA in Säugerzellen.....	73
3.2.3. Protektive Wirkung vom Hamster Bcl-2-Protein gegenüber alkylierungsinduzierter Cytotoxizität.....	74
3.2.4. Herstellung und Thrombin-Spaltung des GST-Bcl-2-Fusionsproteins.....	75
<b>3.3. Stabile CHO-VZV-TK-Transfektanten.....</b>	<b>77</b>
3.3.1. Herstellung VZVtk-exprimierenden Transfektanten.....	77
3.3.2. Charakterisierung stabiler CHO-VZV-TK-Transfektanten.....	78
3.3.3. Einfluß von BVDU auf den Zelltod.....	80
3.3.4. Induktion von DNA-Strangbrüchen.....	82
3.3.5. Bestimmung der Aktivität der Thymidylatsynthetase.....	83
3.3.6. Bestimmung des BrdU-Einbaus mittels Durchflußzytometrie.....	84
3.3.7. Molekularer Mechanismus der BVDU-induzierten Apoptose.....	85
<b>3.4. Untersuchungen zur Reparatur von GCV.....</b>	<b>90</b>
3.4.1. Beteiligung der Polymerase $\beta$ an der Reparatur von GCV.....	90
3.4.2. Protektive Wirkung gegenüber GCV durch Expression von Polymerase $\beta$ in CHO-HSVtk-Zellen.....	91
3.4.3. Sensibilisierung von CHO-HSVtk-Zellen durch Unterdrückung der Polymerase $\beta$ -Aktivität.....	92
3.4.4. Hypersensitivität $\beta$ -pol-defizienter Zellen gegenüber cytotoxischen Effekten von GCV.....	93
3.4.5. Hypersensitivität der $\beta$ -pol-defizienten Zellen gegenüber klastogenen Effekte von GCV.....	95
3.4.6. Sensibilisierung von Pol $\beta$ -defizienten Zellen durch Methoxyamin.....	97
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>98</b>
4.1. Vergleich zwischen ACV, GCV und PCV bezüglich ihrer Cyto- und Gentoxizität.....	98
4.2. Molekularer Mechanismus der GCV-induzierten Apoptose.....	104
4.3. BVDU-Wirkung in CHO-VZV-TK-Zellen.....	110
4.4. Molekularer Mechanismus der BVDU-induzierten Apoptose.....	113
4.5. Reparatur von GCV.....	116
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>119</b>
<b>6. LITERATUR.....</b>	<b>122</b>
<b>7. ANHANG.....</b>	<b>133</b>
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	133
7.2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	136
7.3. Veröffentlichungen.....	138
7.4. Kongressteilnahme.....	139
7.4.1. Posterpräsentationen.....	139
7.4.2. Vorträge.....	139
7.5. Lebenslauf.....	140

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Herpesviren, Antiherpes-Virustatika und Therapie

### 1.1.1. Herpesviren

Herpesviren sind doppelsträngige DNA-Viren, die wesentliche Enzyme ihres Nukleinsäurestoffwechsels selbst kodieren. Zu den humanpathogenen Herpesviren gehören die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesviren. Zu den  $\alpha$ -Herpesviren gehören das Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1; Erreger z.B. des Herpes labialis, Gingivostomatitis herpetica), das Herpes-simplex-Virus Typ 2 (HSV-2; Erreger z.B. des Herpes genitalis) und das Varicella-zoster-Virus (VZV; Erreger der Windpocken und des Herpes Zoster). Zu den  $\beta$ -Herpesviren gehört das Zytomegalie-Virus (CMV), welches verantwortlich für schwere Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten ist. Zu der Gruppe von  $\gamma$ -Herpesviren gehören das Epstein-Barr-Virus (EBV; Erreger der infektiösen Mononukleose, Kofaktor des Burkitt-Lymphoms, des Nasopharyngealkarzinoms und anderer Neoplasien) und die Human-Herpesviren 6 und 7. Abgesehen von Ausnahmen wie konnatale Herpesvirus-Infektionen und Herpes-Enzephalitis sind Infektionen mit derartigen Viren nicht lebensbedrohlich. Sie werden durch das Immunsystem beherrscht und verlangen bei gesunden (immunkompetenten) Personen keine spezielle Therapie.

Die herpesvirale Primärinfektion verläuft meistens inapparent; sie führt aber zu einer lebenslangen Persistenz (Latenz) in den sensorischen Ganglien ( $\alpha$ -Herpesviren) bzw. in Zellen des lymphatischen Systems, in Epithelzellen sowie in Parotis- und Nierenzellen ( $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesviren). Dadurch kann es bei schwacher Immunität oder beim Vorliegen schwerer Grundkrankheiten sowie therapeutischen Maßnahmen, die Immunsuppression verursachen, zur Virusreaktivierung mit lebensbedrohlichen Erkrankungen kommen. Beispiele hierfür sind Herpes-zoster- und CMV-Infektionen bei Leukämien und Lymphomen, Infektionen nach antineoplastischer Chemo- und Strahlentherapie, oder medikamentöser Immunsuppression bei Transplantatempfängern sowie beim AIDS-Syndrom. CMV-Reaktivierungen sind häufige und schwere Komplikationen insbesondere bei Nieren- und Knochenmarkstransplantatempfängern, die zu einer interstitiellen Pneumonie führen können, welche schließlich für eine Transplantatabstoßung verantwortlich ist. Bei AIDS-Patienten kann die CMV-Erkrankung zu einer Retinitis mit anschließender Erblindung führen und ist bei etwa 30% aller AIDS-Fälle die unmittelbare Todesursache (Stewart *et al.*, 1995).

## Einleitung

### 1.1.2. Antiherpes-Virustatika und antivirale Therapie

Die Armut in der dritten Welt bzw. in unterentwickelten Ländern mit schlechten hygienischen und sozioökonomischen Bedingungen auf der einen und der moderne "freie" Lebensstil in den höher entwickelten Ländern auf der anderen Seite sind verantwortlich für eine relativ hohe (40 bis > 90%) Durchseuchung der Bevölkerung mit Herpesviren, die weltweit, in Abhängigkeit vom Virustyp, stark variiert.

Die Zahl an Patienten mit eingeschränkter Immunkompetenz weist weltweit eine zunehmende Tendenz auf. Deswegen gewinnen die Entwicklung und der Einsatz von Antiherpes-Virustatika immer mehr an Bedeutung. Derzeit verfügbare und für den klinischen Einsatz lizenzierte Antiherpes-Virustatika sind hauptsächlich Nukleosidanaloga. Sie werden in virusinfizierten Zellen durch Virus-kodierte Nukleosidkinasen (Thymidinkinase bei HSV-1, HSV-2 und VZV; CMV-Proteinkinase) zum entsprechenden Monophosphat phosphoryliert, die weitere Umwandlung zu Di- und Triphosphaten (TP) wird im Anschluß von zellulären Kinasen ausgeführt. Die Nukleosidalogtriphosphate kompetieren mit den natürlichen dNTPs um die Bindung an die Virus-kodierte DNA-Polymerase und führen in einer nicht vollständig verstandener Weise zur Hemmung der Virusreplikation (Coen, 1992; Darby, 1995).

Heutzutage therapeutisch verwendete Antiherpes-Virustatika vom Typ der Purinanaloga sind Aciclovir (ACV), Ganciclovir (GCV) und Penciclovir (PCV). Bei diesen drei Purinanaloga ist die Desoxyribose durch einen aliphatischen Rest ersetzt (**Abb.1**). Bei ACV-TP ist keine 3'-OH (Hydroxylgruppe) vorhanden, infolgedessen führt der "terminale" Einbau des ACV-TP in die DNA zum unmittelbaren Replikationsstopp (*obligate chain termination*). Im Gegensatz dazu verfügen GCV-TP und PCV-TP über eine freie 3'-OH Gruppe, die, zumindest theoretisch, eine "interne" Inkorporation in die Zucker-Phosphat-Kette der DNA durch das Eingehen einer Phosphodiester-Bindung ermöglicht.

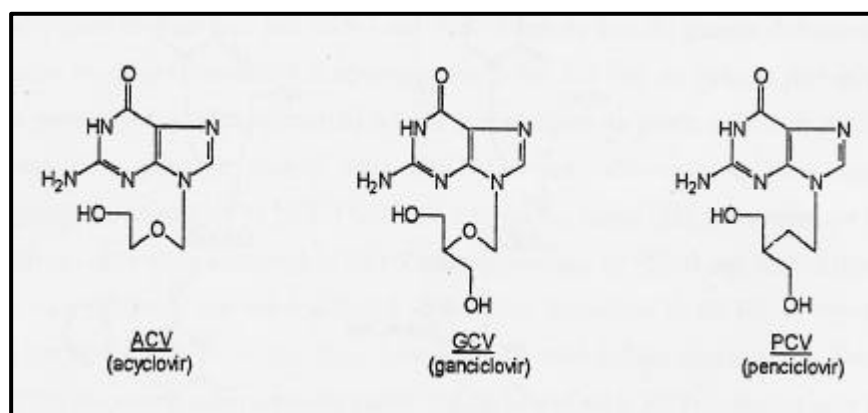


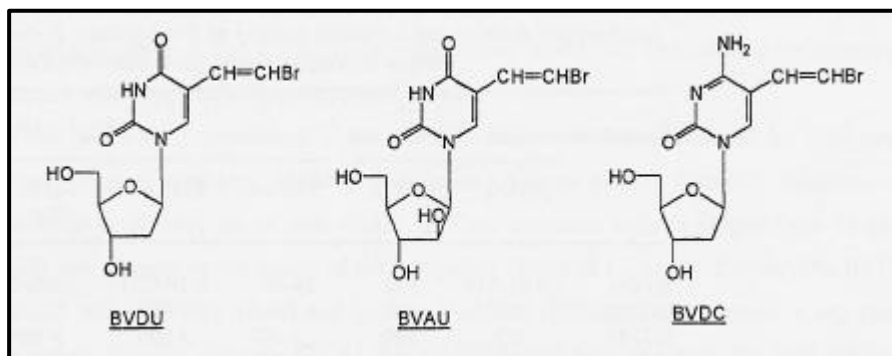
Abb.1. Chemische Struktur der Virustatika vom Typ Purinanaloga.

## Einleitung

Das therapeutische Wirkprinzip dieser Antiherpes-Virustatika beruht auf der Tatsache, daß die Herpesvirus-kodierten Nucleosidkinasen eine geringere Substratspezifität als ihre zelluläre Pendanten besitzen und folglich auch "unnatürliche" Nucleoside (wie die Virustatika) zum Monophosphat metabolisieren können. Dementsprechend können diese Nucleoside nur in virusinfizierten Zellen und nicht in gesunden Zellen zu den korrespondierenden Monophosphaten umgewandelt werden. Die weiteren Phosphorylierungsschritte zum Triphosphat sind weniger selektiv; sie werden von den zellulären Enzymen durchgeführt. Zusätzlich zu ihrer Substratspezifität weisen die Nucleosidanaloga noch eine weitere Wirkungsspezifität auf. Da sie kompetitive Hemmstoffe des dGTP-Einbaus sind, stört ihre Bindung an die virale Polymerase offenbar deren Replikationseigenschaften, wodurch es zur Störung der Virusreplikation kommt (s. Übersicht bei Darby, 1995).

Es wird intensiv an der Verbesserung der antiviralen Wirksamkeit und der Bioverfügbarkeit der Antiherpes-Virustatika gearbeitet. Durch den Einsatz von Virustatika sind resistente Virusstämme entstanden, die auf Mutationen der Virus-kodierten Nucleosidkinase bzw. Polymerase beruhen, was zeigt, wie wichtig die Entwicklung neuer Nucleosidanaloga ist. Inzwischen sind für ACV und PCV die *Prodrugs* Valaciclovir (VACV) und Famciclovir (FCV), die bessere pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen, entwickelt worden, die sich bereits in der klinischen Anwendung befinden (Pue & Benet, 1993).

Außer Antiherpes-Virustatika vom Typ der Purinanaloga existieren noch weitere Virustatika vom Typ der Pyrimidinanaloga (Balzarini *et al.*, 1985). Diese Medikamente sind 5-substituierte 2'-Desoxyuridinanaloga, wobei (*E*)-5-(2-Bromovinyl)-2'-Desoxyuridin (Brivudin, BVDU) eine Prototyp-Substanz darstellt (**Abb.2**).



**Abb.2. Chemische Struktur der Virustatika vom Typ Pyrimidinanaloga.**

## Einleitung

In virusinfizierten Zellen wird BVDU, ähnlich dem GCV, zum BVDU-Triphosphat (BVDU-TP) umgewandelt. Es hemmt die virale HSV-1- oder VZV-DNA-Polymerase und dadurch die virale Replikation. Jedoch ist das mechanistische Wirkungsprinzip der Pyrimidinanaloga (BVDU) in metabolisch kompetenten (HSVtk- oder VZVtk-transfizierten) Zellen unterschiedlich zum Mechanismus in virusinfizierten Zellen und auch zum Wirkungsmechanismus der Purinanaloga (z.B. GCV) in transfizierten Zellen. BVDU wird nämlich in den transfizierten Zellen durch die virale Thymidinkinase hauptsächlich zum Monophosphat überführt und nur weniger effizient zum Triphosphat umgewandelt (Hirota *et al.*, 1995). Das Monophosphat (z.B. BVDU-MP) inhibiert die Thymidylatsynthetase. Die Hemmung eines so essentiellen Enzyms bei der *de novo* dTMP-Synthese (katalysiert die Methylierung von dUMP in dTMP) resultiert in einer Verschiebung des Gleichgewichts im Nukleotidpool, die für die ausgelöste Cytotoxizität verantwortlich ist. Das bedeutet im Grunde genommen, daß die Cytotoxizität von GCV in metabolisch kompetenten Zellen von dem Grad der Triphosphorylierung und dem Einbau von GCV-TP in die DNA abhängig ist, während die Cytotoxizität von BVDU auf dem Monophosphorylierungsgrad und dem Inhibitionsgrad der Thymidylatsynthetase durch BVDU-MP beruht (Balzarini, 1987).

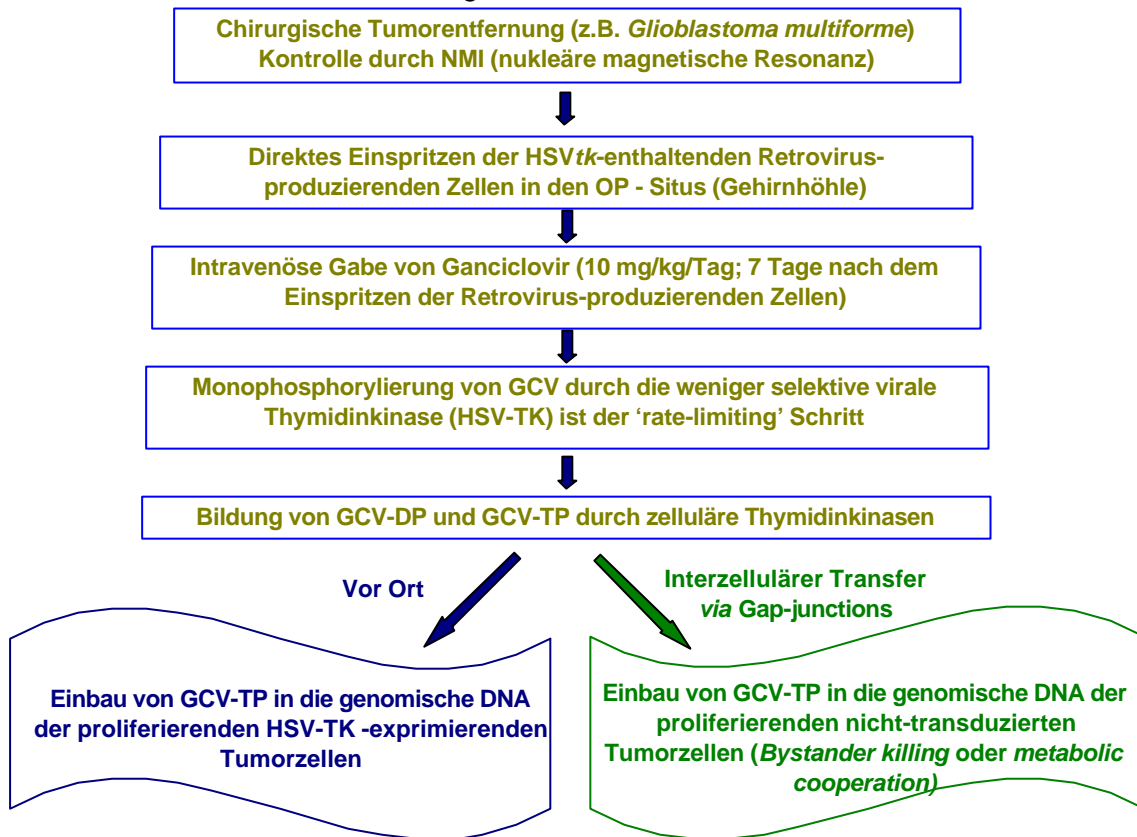
### **1.1.3. Nukleosidanaloga und Genterapie maligner Tumoren**

Ein Einsatzgebiet für Virustatika des Nukleosidtyps zeichnet sich auch in der Genterapie von malignen Tumoren ab. Das Prinzip dieser Kombinationstherapie beruht auf der Transduktion (Transfektion) und Expression des HSVtk Gens (kodiert die Thymidinkinase von HSV-1) in proliferierenden Zellen (Tumorzellen), die nach Behandlung mit bestimmten Nukleosidanaloga (z.B. GCV; Crumpacker, 1996) spezifisch in die Apoptose gehen (Oldfield *et al.*, 1993). Dieser "Suizidmechanismus" (Moolten, 1986) ist selektiv für sich teilende Zellen, da nur in diesen GCV in die DNA eingebaut wird. Bei *in vitro* Untersuchungen und bei der *in vivo* Transplantation von Tumoren in Mäusen und Ratten hat sich die HSVtk-Genterapie in Kombination mit GCV als besonders effizient erwiesen. Es wurde gezeigt, daß etwa 10% transfizierter Zellen ausreichend sind, um die Gesamtpopulation der Tumorzellen abzutöten (Culver *et al.*, 1992; Izquierdo *et al.*, 1996; Ram *et al.*, 1997). Dieser Effekt, bekannt als *bystander killing* oder *metabolic cooperation* (Freeman *et al.*, 1993; Hamel *et al.*, 1996), wird durch Connexine vermittelt (Mesnil *et al.*, 1996) und setzt einen unmittelbaren Kontakt von transfizierten und nicht-transfizierten Zellen voraus, da phosphorylierte Nukleoside nicht membrangängig sind. Sie können jedoch über interzelluläre *gap junctions* in Nachbarzellen gelangen und dort Apoptose auslösen (Dilber *et al.*, 1997).

Klinische Studien zur Genterapie menschlicher solider Tumore werden in den USA seit 1990 und in Frankreich seit 1994 durchgeführt. Leider hat sich die HSVtk/GCV-

## Einleitung

Gentherapie bei einer großen Zahl der Krebs-Patienten als uneffizient erwiesen (siehe z.B. Klatzmann *et al.*, 1996). Ein Problem liegt darin, daß die Transduktionsrate von HSVtk in Tumorzellen niedrig ist. Deswegen werden neue retrovirale / adenovirale Vektorsysteme mit verbesserten Eigenschaften gesucht. Ein zweiter Grund ist, daß in langsam wachsenden Tumoren GCV nur wenig in die DNA eingebaut wird und folglich nur gering toxisch wirkt. Wie die Behandlung maligner Tumoren mittels Gentherapie aussieht, ist am Beispiel eines Protokolls (Klatzmann *et al.*, 1996) für die bösartigste Form des Gehirntumors, *Glioblastoma multiforme*, in **Abb.3** schematisch dargestellt.



**Abb.3.** Protokoll-Schema der HSVtk/GCV-Gentherapie (Beispiel: *Glioblastoma multiforme*).

In die chirurgisch ausgeräumte Tumorkavität (OP-Situs) werden heterologe Zellen (der Maus) transplantiert, die replikationsdefiziente Retroviren beinhalten. Die HSVtk-enthaltenden Retroviren integrieren in die DNA der Tumorzellen, sind aber selbst nicht vermehrungsfähig. Von der retroviralen Sequenz wird die HSVtk-mRNA transkribiert und danach in das HSV-TK-Protein translatiert. Anschließend folgt eine intravenöse Gabe von GCV, welche die Abtötung der Tumorzellen auslöst. GCV wird in den HSV-TK-exprimierenden Tumorzellen zum Triphosphat metabolisiert, dessen Einbau in die DNA der Tumorzellen das "Suizidprogramm" auslöst. Außerdem gelangt das GCV-TP durch interzelluläre *gap junctions* in andere nicht-transduzierte Tumorzellen.

## **1.2. DNA-Reparatur**

Ein Organismus ist ständig unterschiedlichen, schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt. Hierzu gehören unter anderen UV- und ionisierende Strahlung, sowie polyzyklische Kohlenwasserstoffe (wie z.B. Benzo(a)pyren), die im Zigarettenrauch vorkommen, und alkylierende Agenzien (wie z.B. Nitrosamine), die in der Nahrung enthalten sein können sowie im Magen-Darm-Trakt gebildet werden. Mutagene Umwelteinflüsse, wie auch normale zelluläre Vorgänge (z.B. Replikation) können zu Veränderungen der DNA führen, welche, soweit sie nicht repariert werden, zur Entstehung von Gendefekten und zu Krebs führen.

Während der Evolution haben Zellen eine Vielfalt von Reparaturmechanismen entwickelt, um die DNA sowohl vor endogener Schädigung, Fehlpaarung von Nukleotid-Triphosphaten, als auch vor exogenen Einflüssen (z.B. genotoxischen Agenzien, UV-Strahlung) zu schützen. Zu den Reparaturmechanismen zählen in eukaryotischen Zellen (i) Schadensreversion durch die Alkyltransferase (MGMT) - ein schnell ablaufender Vorgang, bei dem in einer Ein-Schritt-Reaktion der Ausgangszustand der DNA wiedergestellt wird (Pegg *et al.*, 1993, 1995); (ii) Exzision von Fehlpaarungen durch die Fehlpaarungsreparatur (*Mismatch repair*); (iii) Exzision von größeren Basenschäden, die zu einer stärkeren Verzerrung der DNA-Struktur führen (z.B. Pyrimidindimere), durch die Nukleotidexzisionsreparatur; (iv) Exzision kleiner Schäden (z.B. Alkylierungen von Basen), die nur eine geringe Störung der DNA-Struktur bewirken, durch die Basenexzisionsreparatur. Der hier zuletzt genannte Exzisionsmechanismus wird in nächsten Kapitel ausführlicher beschrieben.

### **1.2.1. Basenexzisionsreparatur**

Das Überleben einer Zelle ist von ständiger Reparatur spontaner Schäden abhängig. Die Basenexzisionsreparatur (BER) ist der wichtigste Mechanismus mit der Aufgabe, die Zelle gegen spontan durch Hydrolyse, Oxidation, oder durch Wirkung kleiner reaktiver Moleküle (z.B. S-Adenosylmethionin) entstandenen Schädigungen zu schützen. Der Großteil der durch Alkylierung modifizierten Basen in der DNA (abgesehen von Schäden, die durch die Alkyltransferase repariert werden), vor allem *N*-Methylpurine und die oxidative Läsion 8-Oxyguanin, werden durch den BER-Mechanismus repariert. Auch andere Modifikationen, die keine größere Störungen der DNA-Struktur verursachen, die aber trotzdem genotoxisch sind (deaminiertes Cytosin, AP-Stellen), werden durch die BER repariert. Es gibt hauptsächlich zwei Wege der Basenexzisionsreparatur: die *single-nucleotide* BER und die *long-patch* BER. Die Komponenten der BER bzw. die entscheidenden Enzyme und Kofaktoren bei der Reparatur von AP-Stellen in Säugerzellen, die durch Aktion einer Schaden-spezifischen Glykosylase oder durch chemische Hydrolyse entstehen, sind in der Tab. I aufgeführt.

Einleitung

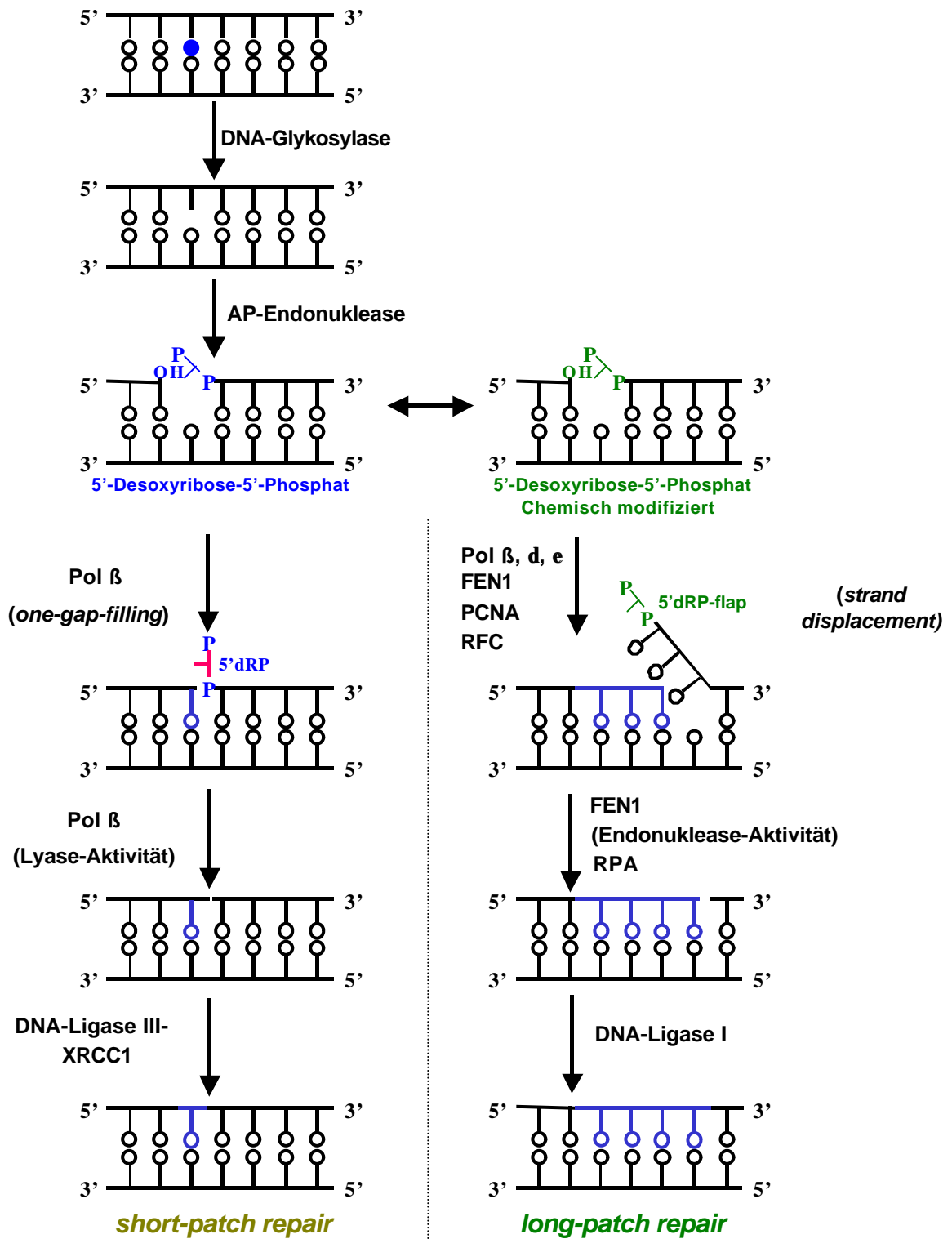
**Tab. I. Basenexzisionsreparatur einer AP-Stelle in Säugerzellen *in vitro*.**

<i>Single-nucleotide BER</i> ( <i>one nucleotide gap filling</i> )	<i>Long patch BER (2-10 Nu)</i> ( <i>multi-nucleotide gap filling</i> )	
AP-Endonuklease	AP-Endonuklease	AP-Endonuklease
Polymerase $\beta$ ( $\beta$ -pol) (dRP-Lyase und Polymerase)	FEN1 ( <i>flap endonuclease I</i> ) PCNA-Stimulation von FEN1 $\beta$ -pol	FEN1 PCNA-Stimulation von Polymerase $\delta$ / $\epsilon$
XRCC1 + Ligase III Alternative: DNA-Ligase I	DNA-Ligase I Alternative: XRCC1, Ligase III	DNA-Ligase I

Bei der *single-nucleotide* BER handelt es sich um die einfachste und häufigste Form der BER, bei der es zur Exzision und zum Ersetzen eines einzigen Nukleotids kommt. Durch die *long-patch* BER werden mehrere Nukleotide (2-12 Bp) ersetzt. Der genaue Ablauf der BER wird im folgenden genau erläutert und ist in **Abb.4** schematisch dargestellt. Die Erkennung und Entfernung der geschädigten Base erfolgt durch eine Glykosylase und führt zur Bildung einer apurinen/apyrimidinen (AP)-Stelle. Es sind eine Vielzahl von Glykosylasen bekannt, welche die unterschiedlichsten Substrate erkennen. Als Beispiel sind hierbei die 8-Oxyguanin-DNA-Glykosylase (OGG1), die 8-Oxyguanin aus der DNA entfernt (Radicella *et al.*, 1997), und die *N*-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG), die 3-Methyladenin, 7-Methylguanin, und 3-Methylguanin prozessiert (Mitra & Kaina, 1993; Demple & Harrison, 1994), zu nennen. An der AP-Stelle kommt es zu einem Einschnitt durch die AP-Endonuklease (HAP, APE, Ref1), welche zur Bildung von 5'-Desoxyribose-5-Phosphat (dRP) und 3'-OH-Resten führt. Als nächstes kommt es zum Verdrängen des dRP-Rests und gleichzeitig zum Einbau eines neuen Nukleotids durch die Polymerase-Funktion der Polymerase  $\beta$  (*strand displacement*). Direkt nach dem Einbau des Nukleotids kommt es zur Entfernung des dRP-Rests durch die Lyaseaktivität (*via*  $\beta$ -Elimination) der Polymerase  $\beta$ . Die Ligation erfolgt durch den DNA-Ligase III-XRCC1-Komplex (Cappelli *et al.*, 1997).

Bei der *long-patch* BER wurde vermutet, daß die PCNA-stimulierenden Polymerase  $\delta$  und  $\epsilon$  zusammen mit der Ligase I eine wichtige Rolle spielen. Neue Daten sprechen jedoch eher dafür, daß die Polymerase  $\beta$  auch zum großen Teil in der *long-patch* Reparatur *in vitro* beteiligt ist (Klungland & Lindahl, 1997; Dianov *et al.*, 1999; Prasad *et al.*, 2000).

Einleitung



**Abb.4. Schematische Darstellung des Mechanismus der Basenexzisionsreparatur.** Linke Seite: Reparatur eines einzigen Nukleotids (*single-nucleotide, short-patch repair*); Rechte Seite: Reparatur mehrerer Nukleotide (*long-patch repair*).

## Einleitung

Die chemische Struktur der AP-Stelle kann für die Rekrutierung des BER-Mechanismus entscheidend sein. Die AP-Stellen liegen in einem Gleichgewicht mehrerer Form vor: als offenkettige  $\alpha,\beta$  ungesättigte Aldehyde, als  $\alpha,\beta$  Hemiacetale, und als offenkettige  $\alpha,\beta$  ungesättigte Hydrate. Am häufigsten findet man die Hemiacetale, sogenannte reguläre AP-Stellen (Barzilay & Hickson, 1995), die über *short-patch* BER prozessiert werden. Offenkettige  $\alpha,\beta$  ungesättigte Aldehyde können nicht durch die Lyaseaktivität der Polymerase  $\beta$  prozessiert werden, sie werden über *long-patch* BER prozessiert. Im Fall, daß es nach der Entfernung der geschädigten Base durch eine Glykosylase und dem Einschnitt durch die AP-Endonuklease an der AP-Stelle zu einer chemischen Veränderung der freien Phosphat und Hydroxy-Resten kommt, kann die Polymerase  $\beta$  alleine das *strand displacement* nicht mehr durchführen. Es kommt hierbei durch die PCNA-stimulierte Polymerase  $\beta$  oder Polymerase  $\delta$  ( $\epsilon$ ) und durch die PCNA-stimulierte FEN1 (*flap endonuclease one*) zur Verdrängung des 5'-Desoxynukleotid-5-Phosphats, wobei ein Bereich von mehreren Nukleotiden verdrängt wird, den man als 5'-dRP*flap* bezeichnet (Matsumoto *et al.*, 1999; Gary *et al.*, 1998). Die Entfernung des 5'-dRP*flap* erfolgt durch die Endonuklease-Aktivität der FEN1 (DNase IV), wobei noch RPA (*replication protein A*) und das XPG-Protein (Nuklease der NER) beteiligt sein können (DeMott *et al.*, 1998; Bessho, 1999; Dianov *et al.*, 2000). Die Ligation der DNA erfolgt hauptsächlich durch DNA Ligase I (Srivastava *et al.*, 1998).

### **1.3. Apoptose**

Apoptose (griech. *apoptosis*, Blätterfall) ist ein „Suizidprogramm“, mittels dem eine Zelle über einem präzise ablaufenden intrazellulären Vorgang stirbt. Apoptose (programmierter Zelltod) ist ein normaler und lebenswichtiger Prozeß während der embryonalen Gewebe-Entwicklung und ist für die Aufrechterhaltung der Homöostase in Geweben adulter vielzelliger Organismen von Bedeutung (Jacobson *et al.*, 1997). Durch den apoptotischen Vorgang werden überflüssige und defekte Zellen auf Stimuli von Außen gezielt entfernt, ohne daß eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Apoptose wird auch durch viele toxische und genotoxische Fremdstoffe ausgelöst. Dies unterscheidet die Apoptose von der Nekrose. Nekrose verläuft insgesamt schneller als die Apoptose. Die Nekrose ist durch einen schnellen Funktionsverlust der Organellen, eine klare Zunahme des Zellvolumens, die Zerstörung der Zellmembran und den vollständigen relativ spät auftretenden Abbau der DNA charakterisiert. Im Gegensatz zur Nekrose läuft die Apoptose langsamer ab, wobei die Zellmembran und der Zellmetabolismus lange ungestört bleiben. Zuerst kommt es zu einer

## Einleitung

Abnahme des Zell- und Kernvolumens, danach erfolgt die Kondensierung des Chromatins und die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen. Zuletzt zerfällt die apoptotische Zelle in kleine membranumschlossene Körperchen (*apoptotic bodies*; Wyllie *et al.*, 1980). In tierischem Gewebe werden diese von Makrophagen eliminiert.

Apoptose kann in drei zeitlich abgetrennte Ablaufphasen unterteilt werden: (i) Initiationsphase, (ii) Effektorphase und (iii) Degradationsphase (Allen *et al.*, 1998). Eine gestörte oder unvollständige Apoptose kann zu bestimmten Erkrankungen wie Autoimmunitäts-Krankheit, Krebs und AIDS führen (Thompson, 1995). In der Initiationsphase kommt es durch interne und externe Stimuli zum Auslösen der Apoptose. Die Programmierung zum Sterben in einer koordinierten Weise erfolgt dabei ungeachtet des Stimulus (Kerr, 1971; Wyllie *et al.*, 1980), durch welchen die Apoptose ausgelöst wird. Dies bedeutet, daß verschiedene Stimuli verschiedene apoptotische Wege aktivieren, die in ein gemeinsames "Sterbensprogramm" münden (White, 1996; Chinnaiyan & Dixit, 1996; Vaux & Strasser, 1996). In der Effektorphase kommt es zur Exekution des apoptotischen Weges. Diese Phase wird durch Cystein-Aspartat Proteasen, sogenannte Caspasen, charakterisiert (Alnemri *et al.*, 1996; Srinivasula *et al.*, 1996). In normalen, ungeschädigten Zellen liegen diese Enzyme in ihrer inaktiven Form als Procaspasen (Zymogene) vor, während sie in apoptotischen Zellen durch Auto-Proteolyse oder durch heterologe Caspasen aktiviert werden können. In ihrer aktivierten Form spalten die Caspasen ihre zellulären *downstream* - Substrate nach dem Aspartat in einer bestimmten Sequenz (Martin & Green, 1995). Die gemeinsame Effektorphase wird durch Caspase-3 (CPP32/apopain/Yama) und Caspase-3-ähnliche Caspasen (-6, -7, -10) vermittelt (Nicholson *et al.*, 1995; Kumar & Lavin, 1996). In der Degradationsphase kommt es zum Abbau der Zellbestandteile. Etliche Caspase-3-ähnliche Substrate sind derzeit bekannt. Das bekannteste ist das Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), das in der Basenexzisionreparatur eine Rolle spielt (Lazebnik *et al.*, 1994). In vielen Zelltypen kann man eine späte Apoptose durch DNasen-vermittelte internucleosomale Fragmentierung der chromosomalen DNA erkennen. Dieser Prozess wird durch die Aktivierung der Caspase-3 vermittelt, denn diese schneidet das DFF-Protein, das der Inhibitor einer Desoxyribonuklease (CAD, *caspase-activated DNase*) ist, welche ihrerseits für die DNA-Fragmentierung verantwortlich ist (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998).

Wie fängt die Apoptose überhaupt an? Was ist der erste Auslöser? Wie wird das primäre Signal weitervermittelt? Das sind nur einige Fragen, die zu einem außerordentlich komplizierten Bild verschiedener apoptotischen Wege beitragen. Um unterschiedliche Wege einfacher abzuleiten, kann die Apoptose grob in zwei Hauptwege eingeteilt werden. Hierbei handelt es sich um die Rezeptor-vermittelte und die Rezeptor-unabhängige Apoptose (Srinivasula *et al.*, 1996; Zamzami *et al.*, 1996). Dies ist allerdings nur eine ungenaue

## Einleitung

Einteilung weit entfernt vom wirklichen Bild, da viele apoptotische Wege interferieren, und es deswegen einfach nicht möglich ist, eine scharfe Grenze zu ziehen.

### **1.3.1. Rezeptor-vermittelte Apoptose**

Es gibt zwei Rezeptorfamilien, Fas und TNF-R, bei denen die Vermittlung der Apoptose beschrieben wurde. Die Rezeptor-abhängige Vermittlung der Apoptose setzt eine Bindung zwischen dem Rezeptor und dem entsprechenden Liganden, der zu den Cytokinen (z.B. CD95L, TNF) gehört, voraus. Der grobe schematische Verlauf des Mechanismus der Rezeptor-abhängigen Apoptose ist in **Abb.5** dargestellt. Sowohl die Expression des Rezeptors als auch des Liganden kann durch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren gesteigert werden, die ihrerseits durch genotoxische Stimuli induziert und aktiviert werden (a). So ist z.B. bekannt, daß die Expression des FasL durch AP-1 (Faris *et al.*, 1998) und die Expression von Fas durch p53 reguliert wird (Muller *et al.*, 1998). Wie die anderen Mitglieder der TNF-Familie ist CD95L (FasL) ein homotrimerisches Molekül, welches mit drei CD95-Rezeptor-Molekülen interagiert und hierdurch die Oligomerisierung des Fas-Rezeptors (b) induziert. Der durch die Oligomerisierung aktivierte Fas-Rezeptor bindet daraufhin ein Adaptormolekül, welches als FADD (*Fas-associated death domain*) bezeichnet wird (c) und das eine *death effector domain* besitzt (Boldin *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1995). Diese "Todeseffektor-Domäne" ist eine spezifische Form der mehr allgemeinen homophilen Interaktionsdomäne, die als CARD (*caspase recruitment domain*) bezeichnet wird. Diese ist in einigen Caspasen mit großen Domänen (Caspase-2, -8, -9 und -10) zu finden. Die "Todeseffektor-Domäne" von FADD bindet an ein entsprechendes Peptidmotif in der Prodomäne-Sequenz der Procaspase-8, was bewirkt, daß die Procaspase-8 zusammen mit FADD einen Komplex bildet, der DISC (*death-inducing signaling complex*) genannt wird (d) (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996; Medema *et al.*, 1997). Die inaktive Form von Caspase-8 (*single-chain zymogen*) wird durch autoproteolytische Spaltung aktiviert (Muzio *et al.*, 1998). Die apicale Caspase-8 initiiert direkt die proteolytische Aktivierung von *downstream* Caspasen (-3, -6, -7) (e), und dadurch die Apoptose (Srinivasula *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1997). Caspase-8 kann auch indirekt, über den Einfluß auf mitochondriale pro-apoptotische Faktoren (z.B. Cytochrom C-Freisetzung) (f), die Aktivierung von Caspase-9 bewirken (g), die eine Initialcaspase des mitochondrialen apoptotischen Wegs darstellt (siehe "Rezeptor-unabhängige Apoptose"). Die aktive Caspase-9 ist ihrerseits in der Lage, Caspase-3 proteolytisch zu spalten und zu aktivieren (h) (Duan *et al.*, 1996). Caspase-3 spaltet unterschiedliche Proteine wie das CAD-inhibierende Protein DFF (ICAD); dadurch wird CAD aktiviert, welche für die Fragmentierung der DNA verantwortlich ist (i) (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998).

Einleitung

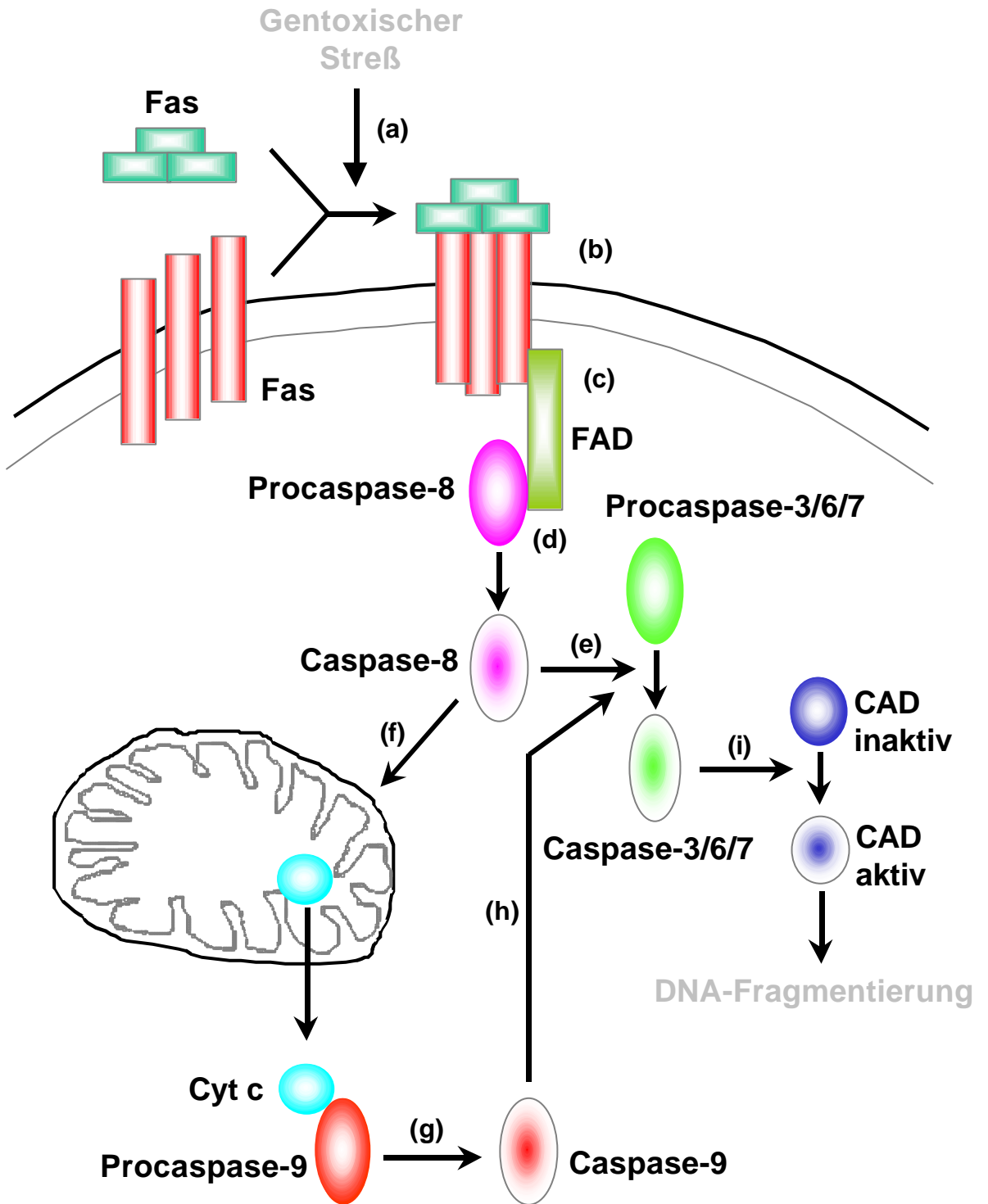


Abb.5. Mechanismus der Rezeptor-vermittelten Apoptose

### 1.3.2. Rezeptor-unabhängige Apoptose

Die genaue Signalkette, die zum Auslösen der Rezeptor-unabhängigen Apoptose führt, ist weit weniger gut charakterisiert als bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose; sie wird in **Abb.6** schematisch dargestellt. Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, kann es nach der Aktivierung der Caspase-8 zu einer Aktivierung des mitochondrialen Wegs kommen. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung des Proteins Bid, das durch Caspase-8 gespalten wird (a) (Chou *et al.*, 1999). Gespaltenes, aktiviertes Bid (tBID, *truncated* BID) führt zu einer konformationalen Änderung und damit zu Translokation vom Protein Bax aus dem Cytoplasma in die äußere mitochondriale Membran (b) (Gross *et al.*, 1998). Bax kann allerdings auch direkt aufgrund genotoxischer Schäden und unabhängig von Caspase-8 aktiviert werden (c); der genaue Mechanismus dieser Aktivierung ist jedoch nicht bekannt. Aufgrund der Konformationsänderung kommt es zur Oligomerisierung der Bax-Proteine und zur Einlagerung in die mitochondriale Membran (d). Es wird angenommen, daß die Bax-Oligomere in der Membran Poren bilden, die zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren führen (e). Hierzu gehört vor allem Cytochrom c, welches im Cytoplasma zusammen mit der Procaspase-9 und Apaf-1 das sogenannte "Apoptosom" bildet (f). In diesem Komplex kommt es nun zur autokatalytischen Spaltung der Procaspase-9 und damit zur Bildung der aktiven Caspase-9 (g). Caspase-9 kann nun einerseits das Enzym PARP spalten und inaktivieren (h); sie kann andererseits auch die Caspase-3 aktivieren (i), welche in Analogie zu den Abläufen in der Rezeptor-vermittelten Apoptose PARP spaltet und zur CAD-Aktivierung führt (j). Ein weiterer aus dem Mitochondrium freigesetzter Faktor ist das Protein Smac/DIABLO (Du *et al.*, 2000; Chai *et al.*, 2000). Bei diesem Protein handelt es sich ebenfalls um einen pro-apoptotischen Faktor, welcher verschiedene Caspaseinhibitoren, die als IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) (Deveraux *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1997) bezeichnet werden, inaktivieren kann (k). Ein zusätzlicher aus den Mitochondrien freigesetzter pro-apoptotischer Faktor ist AIF, *apoptosis-inducing factor* (Susin *et al.*, 1999), der in den Kern transloziert wird, wo er DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensierung induziert.

Eine entscheidende Rolle für den Ablauf der Rezeptor-unabhängigen Apoptose besitzt das Protein Bcl-2. Hierbei handelt es sich um ein intrazelluläres Membranprotein, das eine zentrale Rolle bei der Verhinderung der Apoptose spielt. Da sein hydrophober C-Terminus in die äußere mitochondriale Membran, das endoplasmatische Reticulum und die Kernmembran integriert ist (Krajewski *et al.*, 1993), kann Bcl-2 *in vitro* einen Kation-selektiven Ionenkanal bilden. Es wird vermutet, daß Bcl-2 und andere Proteine der Bcl-2-Familie auf dieser Weise an der Regulation des mitochondrialen Permeabilitätspotentials und der Verhinderung der Apoptose teilnehmen (Minn *et al.*, 1997; Shendel *et al.*, 1997).

Einleitung

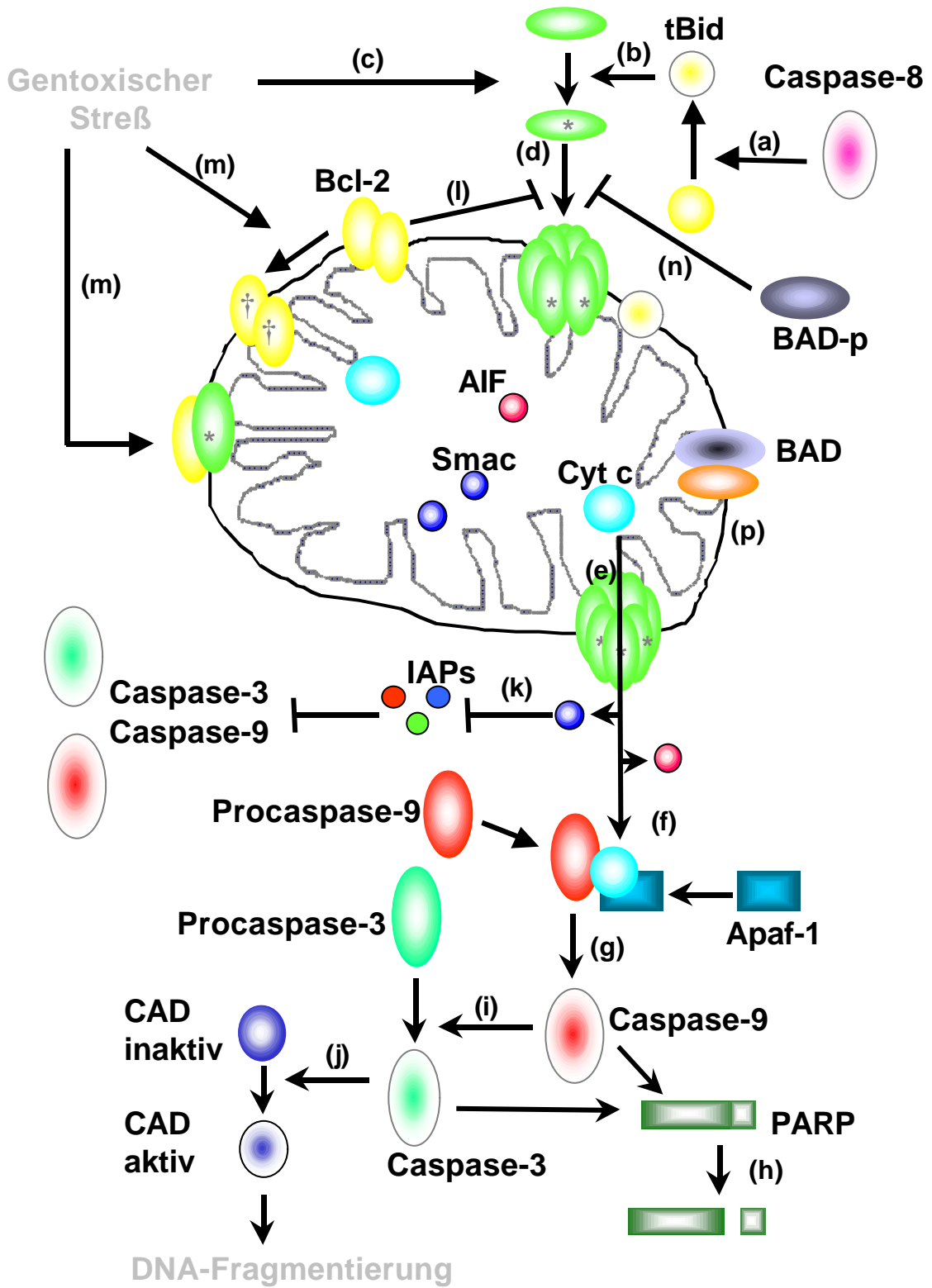


Abb.6. Mechanismus der Rezeptor-unabhängigen (mitochondrialen) Apoptose.

## Einleitung

Überexpression von Bcl-2 blockiert die Bax-Translokation (Nomura *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2000) (l). Bcl-2 kann als Folge von genotoxischem Streß durch die Assoziation mit Bcl-2-homologen Proteinen (Bax, BAD), durch Spaltung, und durch proteosomale Degradation (Ubiquitinierung) inaktiviert werden (m) (Übersicht bei Kroemer, 1997; Cheng *et al.*, 1997; Dimmeler *et al.*, 1999; Tomicic & Kaina, 2001), wodurch es seine anti-apoptotische Wirkung verliert. Es ist bekannt, daß phosphoryliertes BAD die Bax-Translokation hemmt (n); nicht-phosphoryliertes BAD transloziert vom Cytoplasma in die Mitochondrienmembran und bindet an Bcl-x<sub>L</sub> (p) (Tafari *et al.*, 2001). In Abwesenheit von aktiven Bcl-2 gewinnen die pro-apoptotischen Faktoren die Überhand und es kommt zum Zusammenbruch des Mitochondriums und zur Auslösung der Apoptose.

## Einleitung

### **1.4. Ziele der Arbeit**

Als Grundlage für alle Versuche sollen zunächst Zelllinien hergestellt werden, die stabil unterschiedliche virale Enzyme exprimieren, welche Virustatika vom Typ der Nukleosidanaloga metabolisieren. Im einzelnen sollen Transfektanten hergestellt werden, welche die Thymidinkinase von Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) und von Varicella-zoster-Virus (VZV) exprimieren. Die Transfektion soll in der Hamsterzelllinie CHO-9 erfolgen, um in einem gut charakterisierten zellulären System molekulargenetische, biochemische und zytogenetische Versuche parallel durchführen zu können.

Im einzelnen wurden folgende Fragestellungen verfolgt:

#### **1. Charakterisierung des etablierten Zellsystems**

Die stabile Transfektanten sollen auf RNA- (Northern-Analyse) und Protein-Ebene (Western-Analyse) auf Expression der Thymidinkinasen überprüft werden. Die funktionelle Aktivität der exprimierten viralen Genprodukte soll mittels Koloniebildung bestimmt werden. Um das Zellsystem weiter zu charakterisieren, soll für alle Transfektanten eine Wachstumskurve erstellt werden, um festzustellen, ob durch die Expression der viralen Thymidinkinasen das Wachstum der CHO-9-Zellen beeinträchtigt wird. Da der überwiegende Teil der geplanten weiteren Versuche bei einer Virustatika-Behandlung während eines Zellcyclus durchgeführt werden soll, um eine klare Aussage über die Kapazität (Potenz) und Zellcyclusabhängigkeit dieser Virustatika hinsichtlich Cytotoxizität und Genotoxizität zu treffen, soll bei der Charakterisierung der Zelllinien auch die Verdopplungszeit bestimmt werden.

#### **2. Wie verhalten sich GCV, PCV und ACV hinsichtlich Cyto- und Genotoxizität?**

Um festzustellen, welches der drei Virustatika vom Typ der Purinanaloga in den generierten HSV-TK- exprimierenden Transfektanten am besten metabolisiert wird, i.e. welches Virustatikum in der transfizierten Zelllinie am stärksten toxisch wirkt, soll eine Reihe verschiedener Versuche durchgeführt werden. Zuerst ist beabsichtigt, Einbauversuche (Inkorporation der Virustatika in die genomische DNA) durchzuführen. Weiterhin ist geplant, die Transfektanten hinsichtlich reproduktivem Zelltod und Apoptose/Nekrose-Frequenz zu vergleichen sowie die Proliferation während der Virustatika-Behandlung und im Cyclus nach der Behandlung mittels BrdU-Einbaus zu bestimmen, um Schlußfolgerungen über einen möglichen DNA-Replikationsblock zu ziehen. Desweiteren soll die Induktion von DNA-Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen nach der Virustatika-Behandlung bestimmt werden.

## Einleitung

Die Ergebnisse sollen im Kontext der genomischen Instabilität (Chromosomenaberrationen und SCEs) mit Schlußfolgerungen auf die Gentherapie maligner Tumoren diskutiert werden<sup>^</sup>.

### **3. Welches sind die molekularen Mechanismen der durch GCV induzierten Apoptose?**

Da die derzeit am häufigstens angewandte Virustatikum-vermittelte Gentherapie eine HSVtk/GCV Kombinationstherapie ist, ist geplant, die apoptotischen Vorgänge mittels apoptotischer Proteinmarker nach der Behandlung der HSV-TK-Transfektanten mit GCV zu untersuchen. Weiterhin ist beabsichtigt, die Zellcyclusverteilung zu analysieren, um festzustellen, ob es zu einem Replikationsblock (S-/G2/M-Arrest) nach der Behandlung mit GCV kommt.

### **4. Falls es zur Reparatur von GCV kommt, welcher Mechanismus ist daran beteiligt?**

Um festzustellen, ob in die DNA inkorporiertes GCV repariert werden kann und ob ein bestimmter Reparaturmechanismus beteiligt ist, ist geplant, Überlebensversuche (reproduktiver Zelltod) in verschiedenen Paaren von Säugerzelllinien, welche Defekte in unterschiedlichen DNA-Reparaturmechanismen aufweisen (CHO-9 vs. CHO-43-3B, CHO-9 vs. CHO-27-1, CHO-9 vs. CHO-Tk22-Tol, HeLa S3 vs. DLD1,  $\beta$ -pol+/+ vs.  $\beta$ -pol/-), nach Behandlung mit GCV durchzuführen. Falls sich innerhalb eines Paares nach Behandlung mit GCV signifikante Unterschiede zeigen, soll die Koloniebildung, Apoptose-Frequenz, Induktion der DNA-Strangbrüchen und Frequenz der Chromosomenaberrationen gemessen werden.

### **5. Welches sind die molekularen Mechanismen der BVDU-induzierten Apoptose?**

Es ist geplant, in den VZV-TK- und HSV-TK-exprimierenden CHO-Zellen die apoptotischen Vorgänge anhand apoptotischer Marker, wie Proteine aus der Bcl-2-Familie, Caspasen, PARP, u.s.w. zu untersuchen. Weiterhin ist beabsichtigt, die Zellcyclusverteilung nach dem BrdU-Einbau zu analysieren, um festzustellen, ob die Zellen nach einer Behandlung mit BVDU im S-Phase-Block des Zellcyclus akkumulieren. Dadurch könnte man indirekt mechanistische Unterschiede sowie unterschiedliche Zielmoleküle zwischen BVDU und GCV nachweisen. Außerdem sind BVDU-Inkorporationsversuche geplant, um festzustellen, ob der BVDU-TP-Einbau die Proliferation der CHO-VZVtk und CHO-HSVtk-Zellen hemmt. Zusätzlich soll die mögliche Inhibition der Thymidylatsynthetase (TS) durch BVDU-MP in Zellextrakten der CHO-VZVtk, CHO-HSVtk und CHO-9-Zellen bestimmt werden. Hierbei soll der

---

<sup>^</sup> Die zytogenetischen Versuche wurden teilweise von Dr. R. Thust (Institut für Antivirale Chemotherapie, Jena) als Kooperation mit Prof. Kaina innerhalb des DFG-Projekts (KA 724/7-1 und 7-3; TH-670/1-2) durchgeführt.

## Einleitung

Signaltransduktionsweg, welcher durch TS-Inhibition verursacht wird, und dessen mögliche Verbindung zur BVDU-induzierten Apoptose geklärt werden.

### **6. Klonierung und funktionelle Charakterisierung des Hamster-Bcl-2-Proteins**

Da das Bcl-2-Protein einer der wichtigsten apoptotischen Marker ist und in unseren Versuchen Zellen der Linie CHO verwendet werden sollen, ist geplant, die *bcl-2*-cDNA vom Hamster mit Hilfe der RT-PCR-Methode zu klonieren und anschließend zu sequenzieren. Danach soll die funktionelle Analyse erfolgen, indem untersucht werden soll, ob das Hamster-Bcl-2-Protein humane HeLa MR-Zellen vor der Alkylantien-induzierten Apoptose schützen kann. Desweiteren soll die *bcl-2*-cDNA in einen für die Herstellung von Fusionsproteinen geeigneten Vektor umkloniert werden, um rekombinantes Bcl-2-Protein herzustellen. Das rekombinante Bcl-2-Protein soll dazu verwendet werden, die Frage zu beantworten, durch welche Caspasen das Hamster-Bcl-2-Protein gespalten wird.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Spezielle Chemikalien, Kits und Bezugsquellen

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Anisomycin	Sigma-Aldrich, München
Annexin V-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
APS	Merck, Darmstadt
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Caspaseinhibitoren	R&D Systems, Wiesbaden;
	Enzyme Systems, Livermore, CA
Caspase Activity Assay, Colorimetric	R&D Systems, Wiesbaden
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric kit)	Boehringer, Mannheim
Comassie Blue G-250	Bio-Rad, München
Colcemid	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
DMSO	Fluka, Neu Ulm
ECL- und ECL-Plus-Kit	Pharmacia/Amersham, Braunschweig
Effectene Transfection Kit	Qiagen, Hilden
Folin-Reagenz	Sigma-Aldrich, München
G-25 und G-50 Sepharose	Pharmacia/Amersham, Freiburg
Geneticin (G418 Sulphat)	Sigma-Aldrich, München
Gentamycin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Giemsa	Merck, Darmstadt
GST Sepharose 4B	Pharmacia/Amersham, Freiburg
Hygromycin B	Calbiochem, Bad Soden
High Pure RNA Isolation Kit	Boehringer, Mannheim
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Lipofectin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
LMP-Agarose	Appligene, Heidelberg
Magermilchpulver	Reformhaus, Mainz
Metoxyamin	Sigma-Aldrich, München
Mycoplasma Detection Kit	Boehringer, Mannheim
Nonidet P40	Fluka, Neu Ulm
Ponceau's	Sigma-Aldrich, München
Prime It Kit	Stratagene, Heidelberg
Propidiumjodid	Serva, Heidelberg
Protein A/G Sepharose	Sigma-Aldrich, München
Proteinmarker Dalton VII, 14-70 kDa	Sigma-Aldrich, München
Proteinmarker High Molec. Weight, 29-205 kDa	Sigma-Aldrich, München
Prunasin (D-Mandelonitril- $\beta$ -D-Glukosid)	Sigma-Aldrich, München
Plasmocin	InvivoGen, San Diego, CA
QIAamp Blood Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Radioaktive Nukleotide ( $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP)	NEN Dupont, Zaventem, Belgien
Szintillationslösung	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Titan™ One Tube RT-PCR System	Boehringer, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München

## Material und Methoden

Tween-20

Sigma-Aldrich, München

### 2.1.2. Virustatika

Aciclovir (ACV), **Zovirax**

9-[2-hydroxyethoxy]-Guanine

Ganciclovir (GCV), **Cymeven**

9-[1,3-Dihydroxy-2-Propoxymethyl]-Guanine

Penciclovir (PCV)/Famciclovir (FCV), **Famvir**

9-[4-Hydroxy-3-Hydroxybut-1-yl]-Guanine

Brivudin (BVDU), **Helpin**

(E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-Desoxyuridin

Wellcome Foundation, London, UK

Synthex Arzneimittel GmbH, Aachen

SmithKline Beecham, Hamburg

Berlin-Chemie AG, Berlin

5-(Bromovinyl)-2'-Desoxyuridin, [2'-<sup>3</sup>H]

Ganciclovir, [8-<sup>3</sup>H]

Penciclovir, [8-<sup>3</sup>H]

Moravek Biochemicals, Brea, CA

### 2.1.3. Enzyme

Alkalische Phosphatase (shrimp; SAP)

Humane aktive Caspase-3 und Caspase-9

Proteinase K

Restriktionsendonukleasen

RNase A

T4 DNA Ligase

Trypsin

Boehringer, Mannheim

Chemicon International, Hofheim

Boehringer, Mannheim

Boehringer, Mannheim

Sigma-Aldrich, München

Gibco Life Technologies, Karlsruhe

Gibco Life Technologies, Karlsruhe

### 2.1.4. Antikörper

anti-AU1 mAb	(1:1000)	BabCo, Richmond, CA
anti-AIF pAb	(1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-jun/AP-1 pAb	(1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Bcl-2 mAb	(1:500)	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
anti-Bid pAb	(1:500)	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
anti-Bcl-2 pAb	(1:700)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Bcl-x <sub>L</sub> pAb	(1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Bax pAb	(1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-BAD mAb	(1:300)	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
anti-cytochrome C pAb	(1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-caspase-9 pAb	(1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Fas pAb	(1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-FasL mAb	(1:500)	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
anti-FasL pAb	(1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-FLAG mAb	(1:1000)	Stratagene, Heidelberg
anti-ERK2 pAb	(1:5000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-myc mAb	(1:500)	Calbiochem, Bad Soden
anti-PARP pAb	(1:1000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-PARP mAb	(1:500)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-p21 (Waf-1)	(1:500)	Calbiochem, Bad Soden
anti-HSV-TK-Antiserum	(1:5000)	Dr. Black, Darwin Molec.Corp.,Bothell
anti-VZV-TK-Antiserum	(1:2000)	Dr. Piette, Liège, Belgien
IgG Kaninchen (HRP konjugiert)	(1:3000)	Amersham, Braunschweig
IgG Maus (HRP konjugiert)	(1:3000)	Amersham, Braunschweig

### 2.1.5. Medienkomponenten für Bakterien- und Zellkultur

Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit
Dulbecco`s MEM mit GlutaMAX	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Dulbecco`s MEM / Ham`s F12	Gibco Life Technologies, Eggenstein
FBS	Gibco Life Technologies, Eggenstein; Greiner, Nürtingen

### 2.1.6. Geräte und Verbrauchsmittel

Bakterien-Brutschrank	Heraeus, München
Bakterienplatten	Greiner, Nürtingen
Blot-Kammer, Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank NUAIRE (NU-4500E)	Zapf, Sarstedt
Brutschrank (B5060 EK/CO2)	Heraeus, München
Durchflußzytometer FACSort	Becton Dickinson, Heidelberg
ECL-Filme	Amersham, Braunschweig
Elektrophoreseapparaturen	Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät	Bio-Rad, München
Feinwaage	Satorius, Göttingen
Fluorezenzeinrichtung BX-FLA	Olympus, Hamburg
Geltrockner	Bio-Rad, München
HPLC	Bio-Rad, München
Hybridisierungsöfen	Appligen, Heidelberg
Mikroskop BX 50	Olympus, Hamburg
Nitrocellulosemembran (Protan)	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonmembran (Hybond N <sup>+</sup> )	Amersham, Braunschweig
Rotationsverdampfer (speed vac)	Christ, Osterode
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	Kodak, USA
Schüttelinkubator	B. Braun Biotech. Int., Melsungen
Spannungsquelle 200/2.0	Bio-Rad, München
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad, München
Spektralphotometer Titertek Multiscan Plus	Labsystems, Finnland
Sterilbank CLASSII A/B3, NUAIR	Zapf, Sarstedt
Szintillationsmeßgerät	Kontron, Gosheim
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Transilluminator	Bachhofer, Reutlingen
Turboblotter™ Downward Transfer Systems	Schleicher & Schuell, Dassel
Ultraschallstab 250	Branson, Danbury, USA
Vakuumpumpe	Brandt, Wertheim
Whatman 3 MM Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen
Zentrifuge Megafuge 1.0, Rotor 3360	Heraeus, München

## Material und Methoden

### 2.1.7. Puffer und Stammlösungen

Agar-Platten	15 g Agar-Agar ad 1000 ml LB-Medium
Amp-Platten	+ Ampicillin (50 µg/ml)
X-Gal-Platten	+ IPTG (0.2 mM) + X-Gal (0.05%)
DNA-Stop-Puffer (5x)	4 M Harnstoff 50% Saccharose 0.1 M Na <sub>2</sub> EDTA 0.1% Bromphenolblau
Hybridisierungsmedium	0,5 m Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Puffer (pH 7.2) 1 mM EDTA 7% SDS
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml A. bidest
RNA-Denaturierungspuffer	500 µl Formamid 100 µl 10x MOPS 150 µl Formaldehyd (filtriert)
RNA-Stop-Puffer (10x)	50% Glycerin 1 mM EDTA (pH8.0) 0.25% Bromphenolblau 0.25% Xylen-Cyanol FF
PBS (pH 7.4)	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.7 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.6 mM MgCl <sub>2</sub>
10 x RNA-Laufpuffer (pH 6.7) 3(n-morpholin)Propan Sulfonsäure	0.2% MOPS (pH 7.0) 80 mM Na-Acetat (pH 5.3) 10 mM EDTA (pH 8.0) ad 1000 ml A. bidest.
10 x SSC (pH 7.0)	1.5 M NaCl 150 mM Na-Citrat
10 x TBE (pH 8.2)	900 mM Tris 900 mM Borsäure 12.5 mM Na <sub>2</sub> EDTA
TELT (pH 8.0)	62.8 mM Na <sub>2</sub> EDTA, 4% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 2.5 M LiCl
TE (pH 8.0)	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
Protein-Transfer-Puffer	25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM Glycin, 25% Methanol
SDS-Laufpuffer	57.6 g Glycin 12 g Tris 10 ml 20% SDS ad 2000 ml A. bidest

### 2.1.8. Vektoren

**pSV2neo:** Der Plasmidvektor pSV2neo (Southern & Berg, 1982) trägt ein Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgen. Neomycinresistenz dient als Selektionsmarker der Expression klonierter cDNAs (unter der Kontrolle des SV40-Promotors) in eukaryotischen Zellen.

**pMC-tk:** Der Plasmidvektor (Dr. Blessing, Mainz) trägt das Gen für die Thymidinkinase von HSV-1 unter der Kontrolle des CMV-Promotors und das Ampicillin-Resistenzgen. Er wurde zusammen mit pSV2neo bei der Kotransfektion der CHO-Zellen verwendet.

**pRc-VZV-TK:** Der Plasmidvektor (Dr. Suzutani, Asahikawa, Japan; siehe Koyano *et al.*, 1996) trägt das Gen für die Thymidinkinase von VZV unter der Kontrolle des CMV-Promotors und das Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgen.

**pCR-TOPO4:** Der Plasmidvektor (*TOPO TA Cloning Kit*, Invitrogen) ist für die Klonierung und Sequenzierung von *Taq*-Polymerase-generierten PCR-Fragmenten geeignet. Er trägt das Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli*.

**pCR-TOPO-bcl-2-771:** Der Plasmidvektor trägt die *bcl-2* cDNA, die als PCR-Fragment von 771 Bp mit Hilfe des *TOPO TA Cloning Systems* direkt in pCR-TOPO4 kloniert wurde (Tomicic *et al.*, 2000).

**pCR-TOPO-bcl-2-860:** Der Plasmidvektor trägt die *bcl-2* cDNA, die als PCR-Fragment von ca. 860 Bp mit Hilfe des *TOPO TA Cloning Systems* in pCR-TOPO4 kloniert wurde (Tomicic *et al.*, 2000).

**pcDNA3:** Der Plasmidvektor (Invitrogen) enthält den SV40-Promotor zur Expression klonierter cDNAs in Säugerzellen und das Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgen zur Selektion transformierter Bakterien und transfizierter Zelllinien.

**pcDNA3-bcl-2:** Der Plasmidvektor trägt die *bcl-2*-cDNA von 771 Bp unter der Kontrolle des SV40-Promotors, die über EcoRI aus dem Plasmid pCR-TOPO-bcl-2-771 ausgeschnitten und in *sense*-Orientierung in pcDNA3 kloniert wurde (Tomicic *et al.*, 2000).

**pcDNA3.1(+)*hygro*:** Der Plasmidvektor wurde von pcDNA3 (Invitrogen) abgeleitet; trägt eine größere MCS und das Ampicillin- und Hygromycin-Resistenzgen.

**pcDNA3.1- $\beta$ -*pol*:** Der Plasmidvektor trägt die  *$\beta$ -pol*-cDNA unter der Kontrolle des SV40 Promotors, sowie das Ampicillin- und Hygromycin-Resistenzgen.  *$\beta$ -pol* wurde über BamHI / Not I in *sense*-Orientierung in pcDNA3.1(+)*hygro* kloniert.

**pGEX-4T-1:** Der Plasmidvektor (Amersham/Pharmacia) ist geeignet für die Herstellung von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*. Der Vektor enthält alle drei ORF-Raster und das Ampicillin-Resistenzgen.

**pGEX-4T-1-Bcl-2-S:** Der Plasmidvektor trägt die *bcl-2* cDNA, die über EcoRI in pGEX-4T-1 in den entsprechenden ORF kloniert wurde, um das GST-Bcl-2-Fusionsprotein in *E. coli* exprimieren zu können (Tomicic & Kaina, 2001).

**pGEX-4T-1-Bcl-2-AS:** Der Plasmidvektor trägt die *bcl-2*-cDNA in der *antisense*-Orientierung und dient als negative Kontrolle zur Expression von GST-Bcl-2-Fusionsprotein (Tomicic & Kaina, 2001).

## Material und Methoden

**pcDNA3-Bcl-2-D34A:** Der Plasmidvektor trägt die Myc-His-gekoppelte *bcl-2*-cDNA mit der Punktmutation D→A in Position 34 (Dimmeler *et al.*, 1999).

**ICE-LAP6-Flag (casp9-wt):** Der Plasmidvektor trägt Flag-gekoppelte aktive Wildtyp-Caspase-9-cDNA (Duan *et al.*, 1996).

**ICE-LAP6mt-Flag (casp-9-DN):** Der Plasmidvektor trägt Flag-gekoppelte dominant-negative Caspase-9-cDNA (Duan *et al.*, 1996).

**AU1-Yama-mt (casp-3-DN):** Der Plasmidvektor trägt AU1-gekoppelte dominant-negative Caspase-3-cDNA (Duan *et al.*, 1996).

**FADD-DN:** Der Plasmidvektor trägt T7-gekoppelte dominant-negative FADD-cDNA (Chinnaiyan *et al.*, 1995).

### 2.1.9. Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden käuflich von MWG-Biotech erworben.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Verwendung
5'-CHO-Bcl-2	5'-GGAAGGATGGCGCAAGCCGGGAG-3'	RT-PCR
3'-CHO-Bcl-2	5'-CCCAGCCTCCGTTATCCTGGATC-3'	RT-PCR
5'-CHO-Bcl-2-nT	5'-CACCCCTTCATCCAAGAATGC-3'	RT-PCR
3'-CHO-Bcl-2-nSTOP	5'-CTACTGCTTTAGTGAACC-3'	RT-PCR
5'-Col-AP-1	5'-AGTGGTGACTCATCACT	EMSA
3'-Col-AP-1	5'-AGTGATGAGTCACCACT	EMSA

### 2.1.10. Bakterienstämme

#### *E. coli* RRI ΔM15:

Δ(gpt-pro)62 / *leuB6* / *tho-1* / *lacY1* / *hsdS<sub>B</sub>20* / *rpsL20* / (Str<sup>r</sup>) / *ara-14* / *galk2* / *xyl-5* / *mtl-1* / *supE44* / *mcrB<sub>B</sub>*

#### *E. coli* DH5α:

F- / *endA1* / *hsdR17* (rk<sup>-</sup>; mk<sup>+</sup>) / *supE44* / *thi-1* / *recA1* / *gyrA96* / *relA1* / β(*argF-lacZya*) / U169 / 80dLacZβM15

#### *E. coli* C600:

F- / [e14<sup>-</sup> (McrA) or e14<sup>+</sup> (McrA<sup>+</sup>)] *thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 glnV44 rfbD1 fhuA21*; r<sup>+</sup>m<sup>+</sup> McrBC<sup>+</sup>

### 2.1.11. Zelllinien

#### a) Parentale Zelllinien

HeLa MR	humane Zelllinie eines Zervixkarzinoms (mex-)
HeLa S3	humane Zelllinie eines Zervixkarzinoms (mex+)
DLD1 <sup>1</sup>	humane HNPCC-Zelllinie ( <i>msh6</i> -defizient)

<sup>1</sup> Die Zelllinie DLD1 wurde von Dr. Kleinert (Mainz) zur Verfügung gestellt.

## Material und Methoden

CHO-9	Ovarzellen des Chinesischen Hamsters
CHO-43-3B	CHO-Zellen mit mutiertem <i>ERCC1</i> -Gen (Defekt in Helicase-Funktion)
CHO-27-1	CHO-Zellen mit der Punktmutation im <i>ERCC3</i> -Gen (Defekt in Endonuclease-Funktion)
BK4	p53-profiziente fibroblastoide Zellen der Maus
H5	p53-defiziente Hepatomzellen der Ratte
$\beta$ -pol +/+ <sup>2</sup>	Polymerase $\beta$ -profiziente Fibroblasten der Maus
$\beta$ -pol -/- <sup>2</sup>	Polymerase $\beta$ Null- ( <i>Knock-out</i> )-Fibroblasten der Maus

### **b) Transfizierte Zelllinien**

$\beta$ -pol(E5) <sup>2</sup>	Polymerase $\beta$ -komplementierte Fibroblasten der Maus (Komplementation von $\beta$ -pol -/- Zellen mit pRSV- <i><math>\beta</math>-pol</i> )
CHO-HSV-TK	HSV-1-Thymidinkinase-exprimierende CHO-Zellen (Kotransfektion mit pMC-tk und pSV2neo)
CHO-neo	entsprechende CHO-Kontrolle zu CHO-HSVtk-Zellen
CHO-HSVtk- $\beta$ -pol	HSVtk- und $\beta$ -pol-exprimierende CHO-Doppeltransfektanten (CHO-HSVtk-Zellen transfiziert mit pcDNA3.1- $\beta$ -pol)
CHO-HSVtk-hygro	entsprechende CHO-Kontrolle zu CHO-HSVtk- $\beta$ -pol-Zellen, mit Neomycin- und Hygromycin-Resistenz
CHO-VZV-TK-C1E	} VZV-Thymidinkinase-exprimierende CHO-Zellen (CHO-9-Zellen transfiziert mit pRc-VZV-TK)
CHO-VZV-TK-C1-9	
CHO-Tk22-Tol	CHO-Zellen, die den "Toleranz-Phänotyp" gegenüber alkylierenden Agentien aufweisen (Dosch <i>et al.</i> , 1998)

---

<sup>2</sup> Die  $\beta$ -pol-Zelllinien wurden von Dr. Wilson (USA) zur Verfügung gestellt.

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Zellkultur**

Die Zellen wurden in Plastikkulturflaschen bei 37°C oder 34°C ( $\beta$ -pol-Zelllinien) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 7% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die humanen DLD1 sowie die murinen BK4 und  $\beta$ -pol Zellen, wie auch die Rattenhepatomzellen H5 wurden in Dulbecco's Medium mit GlutaMAX und 10% FBS kultiviert. CHO-9, CHO-HSVtk, CHO-VZVtk und HeLa-Zellen wurden mit Dulbecco's MEM:F12 Medium mit 5% FBS kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Hierzu wurde zunächst das auf den Zellen befindliche Medium abgenommen und die Zellen mit Trypsin (0.25%) für ca. 5 min bei RT inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem, 37°C warmen Medium aufgenommen, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und entsprechend verdünnt ausgesät. Zum Einfrieren wurden exponentiell wachsende Zellen einer Plastikkulturschale geerntet, in Medium aufgenommen und bei 1000 U/min abzentrifugiert. Das Medium wurde entfernt, das verbleibende Zellpellet wurde in Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nach einer Verweildauer von 5 min bei 4°C wurden die Röhrchen in Zellstoff verpackt und in einer Styroporbox bei -80° C eingefroren. Nach 2-3 Tage wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Die tiefgefrorenen Zellen wurden bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut und anschliessend mit Kulturmedium gewaschen, um das verbleibende DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt.

### **2.2.2. Mykoplasmentest**

Alle etablierten Zelllinien wurden mit Hilfe des Mykoplasma-Detektions-Kits (Boehringer, Mannheim) regelmäßig auf Mykoplasmenkontamination untersucht. Routinemäßig wurden die Zellen preventiv mit M-Plasmocin<sup>TM</sup> (InvivoGen, San Diego, CA) behandelt.

### **2.2.3. Erstellung einer Wachstumskurve**

Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro 10-cm Schale ausgesät. Der Verlauf des Wachstums wurde in einem Zeitraum von 24-96 h gemessen, wobei zu den entsprechenden Zeitpunkten die Zellen mit Trypsin abgelöst wurden. Nach Inaktivierung des Trypsins durch Medium mit FCS wurde die Zellsuspension bei 1000 U/min abzentrifugiert, in 0.5-2 ml PBS aufgenommen und in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

## **2.2.4. Bestimmung der DNA-Synthese**

### **2.2.4.1. BrdU-ELISA**

Für die Quantifizierung der Zellproliferation wurde ein immunologisch-colorimetrischer Test, *Cell Proliferation ELISA, BrdU* (Boehringer, Mannheim), verwendet. Dieser Test basiert auf der Messung der BrdU-Inkorporation während der DNA-Synthese und repräsentiert eine nicht-radioaktive Alternative zum  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau. Der Zellkultur wurde das Thymidinanalogon Bromodesoxyuridin (BrdU) ins Medium zugegeben. Es wurden  $2-5 \times 10^3$  Zellen pro 96-well-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 h mit dem Virustatikum behandelt. Die BrdU-Lösung wurde gleichzeitig mit dem Virustatikum (für 14 h) zu den Zellen gegeben, oder sie wurde erst nach dem Inkorporationszyklus des Virustatikums (nach 14 h) während der ersten Nachbehandlungscyclus mit den Zellen für die nächste 14 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei RT fixiert und mit anti-BrdU-POD Antikörper für 90 min inkubiert. Nach wiederholtem (3 x 10 min bei RT) Waschen erfolgte die eigentliche Detektion mit Hilfe eines entsprechenden kolorimetrischen Substrats, der eigentlich ein Caspasen-spezifischer Tetrapeptid ist, der mit dem Farbstoff (pNa) gekoppelt ist (z.B DEVD-pNA für Caspase-3). Die Absorption wurde nach 5-30 min bei 492 nm gemessen.

### **2.2.4.2. Markierung durch BrdU für Durchflußzytometrie**

Zur Bestimmung der DNA-Synthese (S-Phase-Blocks) wurde sogenannte *pulse-chase* Experiment durchgeführt. Exponentiell wachsende Zellen wurden für 20 min mit 10 µM BrdU pulsmarkiert. Direkt danach wurde das Medium mit BrdU entnommen und die Zellen wurden mit dem Virustatikum (BVDU) für bestimmte Zeit behandelt. Danach wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gespült und trypsinisiert. Es folgten zwei Waschschriffe, zunächst mit Medium, zur Inaktivierung des Trypsins, dann mit PBS. Die Zentrifugationsschritte erfolgten jeweils bei 1000 U/min für 6 min. Das Sediment wurde in 200 µl PBS gut resuspendiert und die Zellen mit eiskaltem 70%-igem Ethanol ÜN bei -20°C fixiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und das Sediment zum Denaturieren der DNA in 5 ml 2M HCl resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 1500 U/min für 5 min und ein Waschschriff mit PBS. Die Zellen wurden anschließend zum Permeabilisieren der Membran und zur Blockierung inspezifischer Antikörperbindung mit 1% Triton X-100, 1% BSA in PBS resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen erfolgte eine Inkubation mit einem FITC-konjugierten Anti-BrdU Antikörpern (1:5 verdünnt in 0.5% BSA, 0.5% Triton in PBS) für 45 min im Dunkeln bei RT. Der Antikörper wurde abzentrifugiert und das Sediment einmal mit 200 µl 0.5% Triton, 0.5% BSA in PBS gewaschen. Als nächstes erfolgte die Zugabe von RNase A

## Material und Methoden

(0.2 mg/ml in PBS) und Propidiumjodid (20 µg/ml in PBS) mit einem FACSort Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) bei 488 nm Anregung durch einen Argonlaser. Pro Probe wurden 10000 Zellen gezählt und mit einem Software (CellQuest, Becton Dickinson) analysiert.

### **2.2.5. Koloniebildungstest**

Es wurden 500-1000 Zellen (abhängig von der Plattierungseffizienz des Zelltyps) pro 6-cm Schale ausgesät und 6-12 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Refraktärzeit wurden die Zellen mit dem Virustatikum für ein Zellcyclus oder chronisch behandelt. Nach 7-10 Tagen waren die Zellkolonien makroskopisch sichtbar. Das Medium wurde abgenommen und die Zellkolonien mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Kolonien für 5 min mit Methanol inkubiert und anschliessend getrocknet. Die Kolonien wurden 5 min mit 1.25% Giemsa, 0.125% Kristallviolett angefärbt und danach mit Leitungswasser abgespült. Nach dem Trocknen der Platten wurden die Kolonien auf den Platten ausgezählt. Die Anzahl der Kolonien in den behandelten Ansätzen wird als prozentualer Anteil der unbehandelten Kontrolle angegeben und graphisch in einer Überlebenskurve nach der halblogarithmischen Funktion  $N = N_0 \times D^{ek}$  dargestellt.

### **2.2.6. Bestimmung der Chromosomenaberrationen**

Exponentiell wachsende Zellen wurden mit dem entsprechenden Virustatikum behandelt und den Zellen nach der gewünschten Erholungszeit für 2 h der Mitosehemmstoff Colcemid (Endkonzentration 50 ng/ml) zugegeben. Der Zellkulturüberstand wurde gesammelt, die adhären Zellen durch Trypsin 0.25% und EDTA 0.2% abgelöst und zusammen mit dem Zellkulturüberstand bei 1000 U/min für 6 min bei RT zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml 0.075 M KCl-Lösung aufgenommen und für 7 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000 U/min für 6 min wurde der Überstand bis auf 2 ml abgenommen und die Zellen darin gut resuspendiert, so daß eine Einzelzellsuspension vorlag. Daraufhin erfolgte eine langsame Fixierung durch tropfenweise Zugabe (ca. 10 ml) von kaltem Methanol/Eisessig (3:1). Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (6 min, 1000 U/min), die Abnahme des Überstandes und erneute Zugabe von 10 ml Methanol/Eisessig mit anschließender Inkubation für 15 min bei 4°C. Danach wurden die Zellen noch zweimal mit Methanol/Eisessig (1:1) aufgenommen und mittels Pasteurpipette auf einen fettfreien, eiskalten, gewässerten Objektträger aufgetropft und mehrmals kurz durch eine Gasflamme gezogen. Die Präparate wurden an der Luft getrocknet, mit 5% Giemsalösung (angesetzt in Sörensenpuffer) für 5 min gefärbt und in

## Material und Methoden

Sörenseppuffer (18.3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 48.4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH7.2) und destilliertem Wasser entfärbt. Die Objektträger wurden vor ihrer Verwendung für 24 h in HCl:Ethanol (1:1) gelegt, anschließend mit Seifenlösung gewaschen und mit destilliertem Wasser gut abgespült. Die Aufbewahrung erfolgte in Wasser bei 4°C. Pro Präparat wurden in der Regel 100 Metaphasen an einem BX-50 Mikroskop, Olympus, auf aberrante Chromosomen untersucht.

### **2.2.7. Transfektion von DNA in Säugerzellen**

#### **2.2.7.1. Calcium-Phosphat Präzipitation**

Diese Methode wurde gewählt, um stabile Transfektanten zu erzeugen. Es wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro 10-cm Schale eingesät und für 24 h bei 37°C inkubiert. 10 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA wurden in 500 µl Puffer A (1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM HEPES, 280 mM NaCl pH 7.15) für 15 min vermischt. Anschließend wurden zu der DNA 500 µl Puffer B (10 mM HEPES, 250 mM  $\text{CaCl}_2$  pH 7.1) tropfenweise zugegeben und die Lösung für 5 min bei RT inkubiert, wobei sich feine Kristallpräzipitate bildeten. Das Ca-Phosphat-DNA-Präzipitat wurde anschließend in das Medium tropfenweise zugegeben. Nach einer ÜN-Inkubation (16 h) bei 37°C, wurden 5 ml DMSO (30% in eiskaltem Kulturmedium) zu den Zellen gegeben, und die Zellen für 15-30 min bei 37°C inkubiert („DMSO-Schock“). Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und frisches Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden 48 h bei 37°C kultiviert. Zur Selektion stabiler Transfektanten, wurden die Zellen 1:5 verdünnt, und in G418-haltiges (1.5 mg/ml für CHO Zellen) Medium umgesetzt und weiter kultiviert, bis Neomycin-resistente Einzelkolonien sichtbar wurden. Diese wurden in 24-well-Kulturplatten überführt, mit G418 kultiviert und bei entsprechender Dichte in 6-cm Schalen umgesetzt.

#### **2.2.7.2. Effectene-vermittelte Transfektion**

Es wurden  $3-4 \times 10^5$  CHO-Zellen pro 6-cm Schale ausgesät und nach 24 h (bei einer Konfluenz von 40-80%) transfiziert. Hierzu wurde 1 µg Plasmid-DNA mit *EC-Puffer* auf 150 µl aufgefüllt und 8 µl *Enhancer* hinzugegeben. Nach der 5-minütigen Inkubation bei RT wurde 25 µl *Effectene* zugesetzt und 15 min bei RT inkubiert. Zu den Zellen wurden 4 ml frisches Medium gegeben und 1 ml des *Effectene-mix* wurde auf die Zellen getropft. Nach 16 h wurde das Medium gewechselt. Bei stabiler Transfektion wurden die Zellen nach 48 h etwa 1:10 verdünnt und mit Antibiotikum selektioniert (1.5 mg/ml G418; 400 µg/ml Hygromycin B). Bei transienter Transfektion wurden die Zellen 24 h mit dem Inhibitor und/oder GCV behandelt; 48-60 h später wurde entweder die Apoptosefrequenz bestimmt oder es wurden Zellextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt.

### **2.2.7.3. Elektroporation von DNA in Säugerzellen**

CHO-Zellen wuchsen bis 50-70% Konfluenz im DMEM/Ham's F12 Medium mit 5% FBS. Die Zellen wurden trypsinisiert, zweimal mit kaltem Elektroporationsmedium (272 mM Saccharose, 7 mM Na-Phosphat pH 7.4, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen, und bei einer Konzentration von 0.5-1.0 x 10<sup>7</sup> Zellen / ml resuspendiert. Es wurden 10 µg des linearisierten Plasmidvektors (pRc-VZVtk) und 0.8 ml Zellsuspension gemischt und in eine 0.4-cm *Gene Pulser* Cuvette überführt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte Elektroporation (1 x Impuls bei 25 µF, 400 Ω, 2.5 kV). Die Cuvette wurde anschließend für 10 min auf Eis inkubiert und die Zellen in 10-cm Schalen eingesät. Nach 48 h erfolgte die Zugabe von 480 µg/ml G418 zur Selektion transfizierter Zellen. Das Selektionsmedium wurde nach 48-72 h gewechselt. Die makroskopisch-sichtbare Klone wurden in eine *24-well*-Platte überführt und weiter selektioniert.

## **2.2.8. Bestimmung der Apoptosefrequenz**

### **2.2.8.1. Sub-G1 DNA-Gehalt**

Die Apoptosefrequenz wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt. Die Messung des Sub-G1 DNA-Gehalts basiert auf der Tatsache, daß der hypodiploide DNA-Gehalt apoptotischer Zellen, unterhalb des DNA-Gehalts einer Zelle in der G1-Phase liegt (Nicoletti *et al.*, 1991; Fraker *et al.*, 1995). Es wurden 1 x 10<sup>5</sup> Zellen pro 6-cm Schale ausgesät und die Zellen nach 36 h mit dem entsprechenden Virustatikum für ein Zellcyclus behandelt. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Behandlung wurden die Zellen durch Trypsin mit EDTA (0.2%) abgelöst, mit den nicht adhären Zellen im Zellkulturüberstand vereinigt und nach einem Zentrifugationsschritt (1000 U/min, 4°C) einmal mit PBS gewaschen und in kaltem 70%-igem Ethanol mindestens 30 min bei 4°C (oder ÜN bei -20°C) fixiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellsediment an der Luft getrocknet und in 150 µl RNase A (0.1 mg/ml in PBS) und 0.5 ml Propidiumjodid (PI; 20 µg/ml in PBS) aufgenommen. Die quantitative Analyse erfolgte mittels der CellQuest Software (Becton Dickinson).

### **2.2.8.2. Annexin-V-Färbung**

Diese Methode von Vermes *et al.* (1995) basiert auf der Bindung von Annexin-V-FITC an Phosphatidylserin-Reste, die während der frühen Apoptose von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite umgelagert werden. Die Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen, und nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1000 U/pm und 4°C auf Eis gestellt und in 50 µl Bindungspuffer (10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA) aufgenommen. Es wurden 2.5 µl Annexin V-FITC zugegeben und die Zellen 15 min auf Eis im

## Material und Methoden

Dunkeln inkubiert. Danach wurden pro Ansatz etwa 440 µl Bindungspuffer und 10 µl PI zugegeben. Nach spätestens einer Stunde wurden die Proben am Durchflußzytometer gemessen und mittels der CellQuest Software (Becton Dickinson) quantifiziert.

### **2.2.8.3. Fragmentierung der DNA**

Die Methode wurde nach Ioannou & Chen (1996) modifiziert. Es wurden  $5-8 \times 10^6$  Zellen abzentrifugiert und in 200 µl PBS aufgenommen. Danach erfolgte die Lyse in 0.8 ml Lysispuffer (5 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 0.1% Triton X-100) unter Zugabe von 2.5% PEG 8000 und 1 M NaCl. Die Proben wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 min zentrifugiert (13000 U/min, RT). Der Überstand (mit der DNA) wurde mit Phenol:Chloroform (1:1) vermischt und die Proben zentrifugiert. Die wässrige Fraktion (DNA) wurde mit 2 Vol absolutem Ethanol für 30 min bei  $-80^\circ\text{C}$  gefällt und anschließend für 20 min zentrifugiert (14000 U/min,  $4^\circ\text{C}$ ). Das Sediment wurde mit RNase A (0.1 µg/ml im TE) für 30 min bei RT behandelt. Die DNA-Proben wurden auf ein 1.5%-iges Agarosegel aufgetragen und ÜN bei 20 V elektrophoretisch aufgetrennt.

### **2.2.9. Bestimmung der Caspaseaktivität**

Die Bestimmung der Caspasenaktivität erfolgte mit Hilfe des *Colorimetric Caspase Activity Assays* von R&D System: Nach der Induktion der Apoptose durch die entsprechenden Virustatika wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen pro Probe ausgezählt und für 10 min zentrifugiert (1500 U/min,  $4^\circ\text{C}$ ). Das Zellsediment einer Probe wurde in 50 µl *Cell Lysis Buffer* resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension für 5 min zentrifugiert (14000 U/min,  $4^\circ\text{C}$ ), der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Die Proben (jeweils 50 µl) wurden auf einer Mikrotiterplatte auspipettiert und jeweils 50 µl  $2 \times$  *Reaction Buffer* (mit frisch zugegebenem 10 mM DTT) zugegeben. Anschließend wurde 5 µl entsprechendes Caspasensubstrats mit dem Lysat gemischt und für 1-2 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Messung erfolgte bei 405 nm am Spektralphotometer.

### **2.2.10. Bestimmung der Thymidylatsynthetaseaktivität in Zellextrakten**

Die Bestimmung der TS-Aktivität erfolgte nach dem Protokoll von Kawai *et al.* (1993). Es wurden  $2 \times 10^5$  CHO-VZV-TK / CHO-HSV-TK / CHO-9-Zellen pro 3-cm (*6-well cluster*) ausgesät und nach 24 h mit BVDU für 3 h behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit Medium gewaschen, abtrypsinisiert, mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Zellsediment wurde in 0.5 ml Sonifizierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM DTT, 0.1% Triton X-100)

## Material und Methoden

resuspendiert und 3 x 10 sec auf Eis (*Duty cycle*: 40%, *Output control*: 5) sonifiziert. Nach dem Zentrifugationsschritt (30 min, 14000 U/min, 4°C) wurde der Überstand für die Aktivitätsmessung eingesetzt. Es wurden 50 µl Extrakt mit 30 µl Reaktionsmix (0.15 M Tris-HCl pH 7.5, 0.8% BSA, 0.1 mM Tetrahydrofolat, 0.05% Formaldehyd, 50 mM NaF, 5 mM DTT, 0.06 mM Desoxyuridin-5'-Monophosphat, 1 µCi Desoxy[5-<sup>3</sup>H]uridin-5'-Monophosphat) zusammen gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde zu jeder Probe 0.5 ml 2%-iger aktiver Holzkohle zugegeben, Vortex-vermischt und 30 min bei 4°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Danach wurden Proben zentrifugiert (10 min, 14000 U/min, 4°C), und im Überstand wurde die Radioaktivität (das freigesetzte Tritium) im Szintillationsgerät vermessen. Die relative Inhibition der TS-Aktivität (%) wurde als Verhältnis zwischen den BVDU-behandelten und unbehandelten Zellen berechnet.

### **2.2.11. Einzelzellgelelektrophorese**

#### **2.2.11.1. Alkalische Einzelzellgelelektrophorese**

Zur Detektion von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie von alkali-labilen Stellen wurde die modifizierte Methode von Singh *et al.* (1988) und Klaude *et al.* (1996) verwendet. Hierzu wurden Objektträger mit 1.5%-iger Agarose (im PBS) beschichtet und ÜN bei 4°C getrocknet. 10 µl Zellsuspension (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml) wurde mit 120 µl LMP-Agarose (im Wasser) gemischt und auf dem vorbeschichteten Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas (24 x 60 mm) abgedeckt. Zum Gelieren wurden die Objektträger bei 4°C gelagert. Das Deckglas wurde nach 5 min abgezogen. Die Zellyse erfolgte unter alkalischen Bedingungen in Kühlschrank bei 4°C für eine konstante Zeit. Hierbei wurden die Objektträger in einem geeigneten Gefäß mit 100 ml der alkalischen Lyselösung (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Na-Laurylsarcosinat, pH 10) überschichtet. Zu der Lyselösung wurde mindestens 1 h vor Gebrauch 1 ml Triton X-100 und 10 ml DMSO hinzugegeben und bei 4°C vorgekühlt. Nach der Lyse erfolgte die Alkalidenaturierung für 25 min in Elektrophoresenpuffer (300 mM NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH>13). Die Elektrophorese erfolgte in dem selben Puffer für 15 min bei 300 mA (25 V). Zum Abschluß erfolgte die Neutralisation der Proben mittels 3 x Spülen der Objektträger für 5 min in Neutralisationslösung (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5). Die Objektträger wurden mit destilliertem Wasser abgespült und mit 100%-igem Ethanol fixiert. Vor der Auswertung wurde 50 µl EtBr auf den Objektträger hinzugegeben, um die DNA anzufärben. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe einer CCD-Kamera und der Software „Komet Version 4.0“ von Kinetic Imaging Limited (1998). Pro Objektträger wurden 50 "Kometen" ausgewertet und die relative Kometlänge (*Olive Tail Moment*, OTM) als das Produkt der DNA-Menge (%) im

## Material und Methoden

Komet-Schwanz und der Distanz zwischen den Zentren der Masse vom Komet-Kopf und Komet-Schwanz definiert (Olive *et al.*, 1991).

### **2.2.11.2. Neutrale Einzelzellgelelektrophorese**

Zur Detektion der Doppelstrangbrüche wurde die Methode wie unter 2.2.10.1. verwendet. Die Zellyse erfolgte in der gleichen Lyselösung nur unter neutralen Bedingungen (pH 7.5) bei 4°C. Die anschließende Elektrophorese dauerte 15 min (90 mM Tris-HCl, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 7.5). Die Objektträger wurden wie im Kapitel 2.2.10.1 beschrieben fertiggestellt und ausgewertet.

## **2.2.12. Herstellung von Proteinextrakten**

### **2.2.12.1. Gesamtextrakt für Western-Blot-Analyse**

Exponentiell wachsende Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit einem Gummischaber in 1 ml PBS überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 200-400 µl Ultraschallpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoethanol, 5% Glycerin, 1 mM PMSF) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellmembranen durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen (*Duty cycle*: 40%, *Output control*: 5, 3x10 sec auf Eis). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (14000 U/min, 4°C) für 20 min abgetrennt. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren, und bei -20°C gelagert.

### **2.2.12.2. Kern- und Cytoplasmaextrakt für Western-Blot-Analyse**

Die Zellen wurden wie bereits beschrieben geerntet, in 1 ml Lysepuffer I (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DDT, 2 mM PMSF) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl NP40 (0.5%) wurden die Zellmembranen durch Inkubation für 5 min auf Eis aufgebrochen. Nach einer Zentrifugation (3200 U/min, 4°C) für 5 min wurde die Behandlung der Zellen mit dem NP40-Lysepuffer ohne NP40 wiederholt, um Reste des Cytoplasmas zu entfernen. Durch eine weitere Zentrifugation (3200 U/min, 4°C) für 5 min wurden die Zellkerne sedimentiert und anschließend in 100 µl MAP-Kinase-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 40 mM Na-Pyrophosphat, 50 mM NaF, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% SDS, 1 mM PMSF) resuspendiert. Die Kernmembran wurde durch Ultraschall (3x10 sec auf Eis) aufgebrochen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10000 U/min, 4°C) für 30 min abgetrennt. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren, und bei -20°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der Kernproteine erfolgte nach der Methode von Lowry *et al.* (1951). Zur Isolation von Cytoplasmaextrakten wurden die Zellen in 500 µl Lysepuffer I resuspendiert und 10 min auf

## Material und Methoden

Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 25 µl NP40 wurden die Cytoplasmamembranen durch eine Inkubation für 2 min auf Eis aufgebrochen. Nach der Zentrifugation (10000 U/min, 4°C) für 2 min wurde der Überstand entnommen und ein zweites mal zentrifugiert, um die restlichen Kerne zu entfernen. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefrohren, und bei -20°C gelagert. Die Konzentration der Proteine wurde nach Lowry *et al.* (1951) bestimmt.

### **2.2.12.3. Mitochondrien- und Cytosolextrakte für Western-Blot-Analyse**

Isolation von Mitochondrien- und Cytosolextrakten erfolgte nach dem Protokoll von Wang & Studzinski (1997). Exponentiell wachsende Zellen von 3-4 10-cm Schalen wurden abtrypsinisiert und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde in kaltem Lysepuffer (20 mM HEPES-KCl pH 7.5, 0.25 M Saccharose, 20 mM KCl, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde für 15 min zentrifugiert (14000 U/min, 4°C). Der Überstand (Cytosolextrakt) wurde abgehoben und das Sediment (mitochondrienhaltige Fraktion) im Lysepuffer aufgenommen, sonifiziert (3 x 10 sec auf Eis) und für 30 min zentrifugiert (14000 U/min, 4°C). Der Überstand (Mitochondrienextrakt) wurde abpipettiert und die Konzentration bestimmt. Der Cytosolextrakt wurde für 1 h in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (100000g, 4°C) und der Überstand (Cytosolextrakt ohne Mitochondrien) abpipettiert und die Proteinkonzentration nach Bradford (1976) bestimmt.

### **2.2.12.4. Kernextrakte für EMSA**

Die Zellen wurden in 1 ml Lysepuffer I (10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DDT, 2 mM PMSF, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl 10%-igem NP40 wurden Zellmembranen durch eine 5-minütige Inkubation aufgebrochen. Nach einer Zentrifugation für 5 min (3200 Upm, 4°C) wurden Zellkerne in 1 ml Lysepuffer I resuspendiert, um Reste des Cytoplasmas zu entfernen. Durch erneute Zentrifugation für 5 min (3200 Upm, 4°C) wurden die Zellkerne sedimentiert, anschließend in 2 Vol hypotonem Kernlysepuffer (0.2 mM EDTA, 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 1 mM DDT, 2 mM PMSF) mit 600 mM KCl resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 14000 Upm. Der Überstand, welcher die gelösten Kernproteine enthält, wurde abgenommen, mit 1 Vol Kernextraktionspuffer ohne KCl verdünnt, auf 20% Glycerin eingestellt und bei -80°C eingefrohren. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford.

## **2.2.13. Bestimmung der Proteinkonzentration**

### **2.2.13.1. Bestimmung 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  $\text{Cu}^{2+}$ - zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduzieren. Die  $\text{Cu}^+$ -Ionen wiederum reagieren mit Na-K-Tartrat zu einem blau gefärbten Komplex, dessen Absorption bei 600 nm bestimmt werden kann. Zuerst wurde eine Eichkurve aus Verdünnungen einer BSA-Lösung bekannter Konzentration (1 mg/ml) mit 5  $\mu\text{l}$  MAP-Kinase Puffer hergestellt. Anschliessend wurden die Proben mit Lowry I (2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.1 M NaOH) auf Endvolumen von 150  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Zur Proteinbestimmung wurden je 10  $\mu\text{l}$  Kernextrakt oder 20  $\mu\text{l}$  Cytoplasmaextrakt mit 145  $\mu\text{l}$  Lowry I gemischt. Zu allen Proben wurden 250  $\mu\text{l}$  Lowry IV (2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.1 M NaOH, 0.02% Na-K-Tartrat, 0.01%  $\text{CuSO}_4$ ) und danach 30  $\mu\text{l}$  50% Folin-Reagenz gegeben. Nach 30 min-Inkubation in Dunkelheit bei RT, wurden je 100  $\mu\text{l}$  pro Probe (in Doppelwerten) in eine Mikrotiterplatte pipettiert und bei 600 nm vermessen. Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde anhand der Eichkurve bestimmt.

### **2.2.13.2 Bestimmung nach Bradford**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der Bindung des Farbstoffs Comassie Blue G-250 an die Aminogruppe der Proteine (Bradford, 1976). Hierbei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs in phosphosaurer Lösung von 465 nm nach 595 nm. Zuerst wurde auch hier eine Eichkurve mittels BSA erstellt und auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200  $\mu\text{l}$  Bradfordlösung (8.5% Phosphorsäure, 4.75% Ethanol, 1% Comassie Blue G-250) pro Probe versetzt. Für die Proteinbestimmung der Versuchsproben wurden je 2-5  $\mu\text{l}$  der Proteinextrakte mit 200  $\mu\text{l}$  Bradfordlösung versetzt. Nach 15 min Inkubation im Dunkeln erfolgte die Messung bei 600 nm. Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde anhand der Eichkurve bestimmt.

## **2.2.14. Präparation von Nukleinsäuren**

### **2.2.14.1. Isolierung genomischer DNA aus Säugerzellen**

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mit Hilfe *Blood & Body Fluid Protocol Kits* (Qiagen). Exponentiell wachsende Zellen wurden wie beschrieben geerntet, in 200  $\mu\text{l}$  PBS gelöst und mit 40  $\mu\text{l}$  RNase A (Stocklösung: 20 mg/ml) behandelt. Danach wurden 25  $\mu\text{l}$  Proteinase K-Stocklösung (Qiagen) und 200  $\mu\text{l}$  AL-Puffer zugegeben und für 15 sec am Vortex gemischt. Anschließend wurden die Proben bei 70°C für 10 min inkubiert. Es wurden 210  $\mu\text{l}$  absolutes Ethanol mit den Proben vermischt, und die Proben auf QIAamp-Säulchen aufgetragen. Durch

## Material und Methoden

eine Zentrifugation der Säulchen (8000 U/min, RT) für 1 min wurden die Proben durch die Membran dieser Ionenaustauschersäulen gefiltert, wobei die DNA gebunden blieb. Die Säulchen wurden nun zweimal mit 500 µl AW-Puffer gewaschen um Proteinreste zu entfernen und die DNA wurde mit 200 µl vorgewärmten (70°C) AE-Puffers eluiert.

### **2.2.14.2. Präparative Isolierung von Plasmiden aus Bakterien**

#### ***Präparation kleiner Mengen (Minipräparation)***

Zur schnellen Überprüfung von Bakterienkolonien nach einer Transformation wurde die Plasmid-DNA nach der TELT-Methode (He *et al.*, 1990) isoliert. Zuerst wurden 4 ml LB-Medium und 40 µl Ampicillin (10 mg/ml) mit einer Glycerinstammkultur beimpft und bei 37°C ÜN inkubiert. Aus 1.5 ml der Übernachtskultur wurden die Bakterien durch 10-minütige Zentrifugation bei 14000 Upm und 4°C sedimentiert und in 100 µl TELT-Puffer resuspendiert. Der TELT-Puffer enthält unter anderem EDTA, welches  $\text{Ca}^{2+}$  chelatisiert, und das nicht ionische Detergenz Triton-X-100, welches die Cytoplasmamembran aufbricht und die Proteine denaturiert. Bei der anschließenden Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) sammelten sich die Zelltrümmer von *E.coli* in der Interphase und konnten somit von der Plasmid-DNA in der oberen Phase abgetrennt werden. Da es sich bei dieser Methode um eine milde Lyse handelt, blieb die *E.coli*-DNA an die Zelltrümmer gebunden und konnte somit aus dem Ansatz entfernt werden. Die Plasmid-DNA wurde zum Abschluß mit 3 Vol abs. Ethanol aus dem Überstand gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in A.bidest. gelöst.

#### ***Präparation großer Mengen (Maxipräparation)***

Eine zur Sequenzierung und Transfektion geeignete DNA wurde mittels des *Qiagen Plasmid Maxi Kits* nach Angaben der Herstellerfirma isoliert. Die Bakterien aus einem Kulturvolumen von 500 ml wurden durch Zentrifugation (5000 U/min, 4°C) für 10 min sedimentiert und in 10 ml P1-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen. Zur alkalischen Lyse wurde die Zellsuspension mit 10 ml P2-Puffer (200 mM NaOH, 1% SDS) versetzt, vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer P3 (2.55 M KOAc pH 4.8) wurde die Lösung neutralisiert. Die Plasmid-DNA kann nun als löslicher Bestandteil von der unlöslichen, an Zelltrümmer gebundene denaturierten chromosomalen DNA durch Zentrifugation (4300 U/min, 4°C) für 45 min abgetrennt werden. Der Überstand wurde auf eine Ionenaustauschersäule geladen. Nach zweimaligem Waschen und anschließender Elution wurde die Plasmid-DNA mit 0.7 Vol Isopropanol präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in TE-Puffer (pH 8.0) aufgenommen.

### **2.2.14.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen**

Eine für Northern-Blot-Analyse geeignete Gesamt-RNA wurde mittels *High Pure RNA Isolation Kit* von Boehringer (Mannheim) nach Angaben der Herstellerfirma isoliert.

### **2.2.15. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung oder in TE wurde die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 320 nm bestimmt. Einer  $OD_{260}$  von 1 entspricht 50  $\mu\text{g/ml}$  DNA, 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA bzw. 20  $\mu\text{g/ml}$  Oligonukleotide. Das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt Aufschluß über die Verunreinigung durch Proteine. Sie beträgt bei reiner DNA 1.8 und bei RNA 2.0. Nicht gelöste Nukleinsäuren können bei einer Wellenlänge von 320 nm detektiert werden. Die Meßwerte sollten hierbei einen Wert von 0.005 nicht übersteigen.

### **2.2.16. Synthese von Nukleinsäuren *in vitro***

#### **2.2.16.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986) besteht in einer mehrfachen Replikation eines DNA-Fragments, welche durch eine Denaturierung der neu entstandenen Doppelstränge beliebig oft wiederholt werden kann. Bei der PCR verwendet man Oligonukleotide (*Primer*), die auf verschiedenen Strängen der DNA binden und mit ihren 3'-Enden aufeinanderzuweisen. Diese werden durch die thermostabile Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* verlängert, wodurch die dazwischenliegenden Sequenzen vervielfältigt werden. Die neu synthetisierten Stränge dienen im nächsten Cyclus wieder als Vorlage (*Template*), an welche die *Primer* hybridisieren können. Dadurch wächst die Anzahl an DNA-Fragmenten exponentiell an. Ein Zyklus zur Amplifikation aus Plasmid-DNA lief folgendermaßen ab: Denaturierung: 1 min 94°C; Annealing: 90 sec 57°C, Elongation: 2 min 72°C / 25 Zyklen. Für die PCR wurden 100 ng Template-DNA mit 1x Taq-Puffer, je 500 ng Primer, 0.2 mM dNTP und 2.5 U Taq-Polymerase in einem 50  $\mu\text{l}$  Ansatz amplifiziert. Nach der Amplifikation wurde 1/5 Vol der Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Effektivität und Spezifität der PCR zu überprüfen. Bei erfolgreicher Amplifikation wurden die restlichen 4/5 Vol zur Klonierung verwendet.

#### **2.2.16.2. Reverse Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

Die RT-PCR Reaktion wurde als Ein-Schritt RT-PCR mit Hilfe des *Titan<sup>TM</sup> One Tube RT-PCR System Kits* nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. cDNA Synthese und PCR werden mit einem optimierten Puffer und einem entsprechenden Enzym zwar

## Material und Methoden

nacheinander, aber ohne erneute Zugabe von Reagenzien durchgeführt. Für die Reaktion wurde bis zum 1 µg hoch purifizierter Gesamt-RNA (s. Kapitel 2.2.13.2.) eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte für 40 min bei 50°C. Der PCR-Teil der Reaktion wurde in folgenden Cyclen durchgeführt: 1 x 2 min bei 94°C; 10 x (30 sec bei 94°C-Denaturierung, 30 sec bei 57°C-Annealing, 45 sec bei 68°C-Verlängerung); 25 x (30 sec bei 94°C, 30 sec bei 57°C, 45 sec + 5 sec/Cyclus bei 68°C); 1 x 7 min bei 68°C. Die Auftrennung der gewünschten PCR-Produkten erfolgte wie unter 2.2.19.1. beschrieben.

### **2.2.17. Klonierung von DNA**

Bei der Klonierung wurden Fragmente mit kompatiblen Enden, die durch einen Restriktionsverdau entstanden sind, in eine entsprechende Restriktionsschnittstelle der MCS (*Multi Cloning Site*) des Vektors ligiert. Nicht kompatible Enden von Restriktionsfragmenten wurden mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I zu glatten Enden aufgefüllt (*Endfilling*) und in die entsprechende Restriktionsschnittstelle des Vektors ligiert. Mit diesen Ligationsansätzen wurden kompetente Bakterien transformiert und die entstandenen Kolonien mittels der TELT-Plasmidisolation überprüft. Für die Klonierung der *Taq*-Polymerase-amplifizierten PCR-Fragmenten wurde der *TOPO TA Cloning Kit* (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

#### **2.2.17.1. Restriktionsverdau der DNA**

Standardmäßig wurde der Restriktionsverdau in einem Reaktionsansatz von 20 µl durchgeführt. Die DNA sollte möglichst frei von Salzen oder Alkohol sein, da sonst die enzymatische Reaktion gehemmt wird. Für die Restriktion wurden ca. 0.5 µg DNA eingesetzt, die mit 2 µl 10 x Restriktionspuffer und 5-10 U des entsprechenden Enzyms gemischt und mit A. bidest auf 20 µl aufgefüllt wurde. Die Puffer für die jeweiligen Restriktionsenzyme wurden nach den Angaben des Herstellers ausgewählt. Bei Restriktionsverdaus von durch die QIAGEN-Methode gewonnener DNA konnte von der Verwendung von RNase A abgesehen werden. Bei durch andere Verfahren gewonnener DNA wurde jeweils 1/20 Vol RNase A zugesetzt. Die Restriktion dauerte, abhängig von der DNA-Menge, 2-3 h oder ÜN bei 37°C.

#### **2.2.17.2. Gewinnung von DNA aus Agarosegelen**

Die Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels des *Gel Extraction Kits* von Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Das Gel-Fragment (mit der DNA) wurde mit entsprechendem Volumen QG-Puffers vermischt und für 10 min bei 50°C inkubiert. Ein Gel-Volumen von Isopropanol wurde zugegeben, Vortex-gemischt und durch die Säulchen

## Material und Methoden

zentrifugiert. Nach dem Waschen der Säulchen mit dem PE-Puffer, wurden die Säulchen an der Luft getrocknet und die DNA mit 10 mM Tris-HCl pH 8.5 eluiert.

### **2.2.17.3. Auffüllreaktion**

Die *Taq*-Polymerase hat die Eigenschaft, am 3'-Ende der synthetisierten Stränge zusätzliche Nukleotide anzuhängen (zumeist ein A), die nicht von der Matrize kodiert werden. Diese Überhänge müssen für die Klonierung der PCR-Produkte zu einer glatten Vektorschchnittstelle aufgefüllt werden. Dasselbe trifft für verdaute DNA mit nicht kompatiblen Enden zu. Bei diesem als *Endfilling* bezeichneten Verfahren werden durch das Klenow-Fragment 5'-überhängende Enden aufgefüllt und 3'-überhängende Enden abgebaut. Hierzu werden 4/5 der amplifizierten DNA mit absolutem Ethanol gefällt, gewaschen und in 13.5 µl A.bidest gelöst. Nach der Zugabe von 1.5 µl Klenow-Puffer, 1 µl dNTPs (0.2 mM) und 1 µl Klenow-Enzym wird der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert.

### **2.2.17.4. Ligation**

Unter einer Ligation versteht man die Verknüpfung zwischen dem 3'-OH und dem 5'-Phosphatende freier DNA-Moleküle. Hierbei kann es sich entweder um überhängende oder um glatte, nicht überhängende Enden handeln. Die T4-DNA-Ligase schließt die entstehenden Lücken im Phosphat-Rückgrat bei überhängenden Enden und ligiert auch glatte Enden in der zu ligierenden DNA. Das molare Verhältnis zwischen *Insert* und Vektor-DNA sollte zwischen 2:1 und 5:1 betragen. Als Beispiel, die zu ligierende DNA (250 ng/µl) wird mit 4 µl 5 x Ligasepuffer, 1 µl Vektor-DNA (50-100 ng/µl) und 2U T4-DNA-Ligase gemischt und mit A. bidest. bis 20 µl aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde anschließend ÜN bei RT oder 16°C inkubiert.

## **2.2.18. Bakterienkultur**

### **2.2.18.1. Kultivierung der Bakterien**

Flüssige Bakterienkulturen wurden in LB-Medium ohne oder mit Selektionsdruck (100 µg/ml Ampicillin) vermehrt, und die Bakterien auf der Agarplatten (LB + 1.5% Agar) wurden mit 50 µg/ml Ampicillin selektioniert. Dauerbakterienkulturen wurden im 25%-igem Glycerol in flüssigem Stickstoff Schock-gefrohren und bei -80°C aufbewahrt.

### **2.2.18.2. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien**

Die Herstellung erfolgte nach der Methode von Mandel & Higa (1970). Hierzu wurde eine Übernachtskultur der zu transformierenden *E.coli*-Bakterien angesetzt. Aus dieser Kultur

## Material und Methoden

wurde 0.4 ml entnommen, mit 40 ml LM-Medium gemischt und für 120 min bei 37°C inkubiert (OD<sub>660</sub>=0.3). Danach wurde die Kultur für 5 min zentrifugiert (5000 U/min, 4°C). Die Bakterien wurden nun in 20 ml eiskalter 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien erneut zentrifugiert und in 4 ml eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

### **2.2.18.3. Herstellung Glycerol-kompetenter Bakterien**

Die Herstellung erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (1986). 500 ml LB-Medium wurde mit 5 ml der *E. coli* RR1-ÜN-Kultur angeimpft. Die Bakterien wurden solange bei 200 U/min und 37°C geschüttelt, bis sie eine Dichte von OD<sub>550</sub>=0.6-0.75 erreicht haben. Danach wurde die Bakteriensuspension auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation (4000 U/min, 4°C) für 15 min wurde das Bakteriensediment in 500 ml eiskaltem 10%-tigen Glycerol resuspendiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt und die sedimentierten Bakterien in 2 ml 10% Glycerol resuspendiert. Die elektrokompenten Bakterien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### **2.2.18.4. Transformation chemisch-kompetenter Bakterien**

Zur Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen mit 10 µl Ligationsansatz gemischt und 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitze-Schock (*heat shock*), d.h. eine Inkubation für 1.5-2 min bei 42°C und die Zugabe von 1 ml LB-Medium. Nach einer Inkubation für 60 min bei 37°C unter Schütteln (in dieser Zeit kommt es zur Expression des Ampicillin-Resistenzgens, *bla*) wurden 150 µl transformierter Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin, und für Blau/Weiß-Selektion auf X-Gal / IPTG-haltigen Platten ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert.

### **2.2.18.5. Transformation Glycerol-kompetenter Bakterien**

Die Transformation Glycerol-kompetenter Bakterien erfolgte durch Elektroporation. Hierzu wurden 100 µl Bakteriensuspension mit 2-4 µl Ligationsansatz auf Eis gemischt und in eine Cuvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2.5 kV und 200 Ω (Impulsdauer: 4-4.5 sec). Nach dem Impuls wurde zu den Bakterien 1 ml LB-Medium gegeben und die Suspension für 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen.

## **2.2.19. Herstellung und Aufarbeitung von GST-Fusionsproteinen**

### **2.2.19.1. Herstellung von GST-Fusionsproteinen**

Zur Expression des GST-Bcl-2-Fusionsproteins wurde der Plasmidvektor pGEX-4T-1 (GST Gene Fusion System, Pharmacia) verwendet. 500 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) wurde mit 5 ml der ÜN-Kultur inokuliert. Nach 3 h-igen Schütteln (220 U/min), befand sich die Bakterienkultur (*E. coli* RR1) in der exponentiellen Phase (OD 0.5-0.8). Gleich danach wurde der Induktor IPTG (0.5 mM Endkonzentration) für 3 h zu den Bakterien gegeben und die Kultur bei 37°C weiter inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min zentrifugiert (5000 U/min, 4°C) und das Sediment in 10 ml PBS resuspendiert und auf Eis sonifiziert (3 x 20 Impulse; *duty cycle*: 50%; *output control*: 5). Die Bakteriensuspension wurde portioniert, 10 min zentrifugiert (14000 U/min, 4°C), der Überstand gesammelt und auf Eis gelagert. Während der Zentrifugation wurde 500 µl Glutathion-Sepharose 4B (*beads*) vorbereitet. Hierzu wurde ein äquivalentes PBS-Volumen zu den *beads* gegeben, mittels Vortex gemischt, und die *beads* für 1 min zentrifugiert (1500 U/min, 4°C). Der Überstand wurde entnommen und verworfen. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Danach wurden die *beads* mit 500 µl PBS resuspendiert, mit dem gesamten Bakterienüberstand vermischt und ÜN bei 4°C über Kopf geschüttelt. Die mit GST-Bcl-2 gekoppelten *beads* wurden abzentrifugiert (1500 U/min, 4°C, 1 min), zweimal mit PBS gewaschen, mit SDS-Geladepuffer gemischt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Nach einer Kurzzentrifugation wurden 10-20 µl Überstand (GST-Bcl-2) mittels 12% SDS-PAGE getrennt.

### **2.2.19.2. Elution und Spaltung von GST-Fusionsproteinen**

Das GST-Bcl-2-Fusionsprotein wurde für 10 min bei RT auf dem Überkopfschüttler mit einem Elutionspuffer, welcher Gluthation (GSH) enthält (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM GSH) inkubiert. Durch GSH kommt es zur Abtrennung des Fusionsproteins von der GSH-Sepharose 4B. Nach einer Zentrifugation (5 min, 2200 U/min, 4°C), wurde der Überstand gesammelt. Der Elutionsschrift wurde viermal wiederholt, und die Menge des GST-Bcl-2-Proteins in den Überstand-Fractionen an Hand einer bekannten BSA-Menge im gefärbten Gel bestimmt. Eine Portion von 100 µg Fusionsprotein wurde zur Spaltung durch Thrombin-Protease (1U/100 µg Protein) für 18 h bei RT angesetzt. Um das nach der Thrombin-Spaltung akkumulierte GST zu entfernen, wurde das Eluat gegen 2 L von PBS dialysiert, mit GSH-Sepharose 4B gemischt, und ÜN bei 4°C über Kopf geschüttelt. Das von Bcl-2 abgespaltene GST wurde anschließend durch eine weitere Zentrifugation (5 min, 2200 U/min, 4°C) aus der Probe entfernt. Da Bcl-2 ein Membranprotein ist, erfolgte ein effizienter Transfer

## Material und Methoden

von intaktem Bcl-2-Protein in den Überstand nur in Anwesenheit von einem nicht-denaturierenden Detergenz, 0.1-0.5% CHAPS in PBS (5 min, 2200 U/min, 4°C).

### **2.2.20. Gelretardationsexperiment (EMSA)**

#### **2.2.20.1. Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden**

Um eine molekulare DNA-Sonde (stets hybridisiertes AP-1 doppelsträngiges Oligonukleotid) radioaktiv zu markieren, wurden 1.4 µl (3.5 pmol) des Oligonukleotids mit 1 µl 10 x Polynukleotidkinase (PNK)-Puffer und 3 µl  $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP, und 1 µl PNK gemischt und der Reaktionsansatz mit A. bidest. auf 10 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 60 min erfolgte die Zugabe von 90 µl A. bidest. Anschließend wurde die DNA durch die Zugabe von 250 µl abs. Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die DNA wurde für 30 min bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, in 100 µl A. bidest gelöst und erneut mit 2.5 Vol abs. Ethanol gefällt. Nach einer Inkubation bei -20°C über Nacht wurde die DNA für 30 min (14000 Upm, 4°C) abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl A. bidest gelöst.

#### **2.2.20.2. EMSA-Reaktion**

Die Bestimmung der Bindungsaktivität von Proteinen beruht auf einer Bindung des zu detektierenden Proteins an ein definiertes, radioaktiv markiertes Oligonukleotid (hier AP-1-Oligo; für die AP-1-Oligo-Sequenz siehe Kapitel 2.1.9.). Hierzu wurden Kernextrakte isoliert (Kapitel 2.2.11.4.), von denen 3-6 µg in einem 1 ml Reaktionsgefäß mit 15 ml Reaktionsmix [10% Glycerin, 10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 50 mM KCl, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, 0.005% BSA, 0.005% poly(dI-dC)] gemischt wurden. Anschließend wurden 25 fmol des radioaktiv markierten AP-1-Oligonukleotids zugegeben, der Ansatz mit A. bidest. 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 natives Polyacrylamidgel aufgetragen und die Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.20.3) durchgeführt.

### **2.2.21. Gelelektrophorese**

#### **2.2.21.1. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

Um DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge aufzutrennen und zu analysieren, wurden Agarosegele verwendet. Die DNA wandert hierbei mit einer Geschwindigkeit durch die Agarose-Matrix, die proportional zum negativen Logarithmus der Länge des DNA-Fragments ist. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte auf 0.8 - 1.0%-igen Agarosegelen. Die Agarosegele wurden mit TBE-Puffer angesetzt, wobei dieser Puffer auch

## Material und Methoden

als Laufpuffer verwendet wurde. Vor dem Auftragen der Proben auf das Agarosegel wurden die Proben mit 6 x Stop-Puffer (0.25% BPB, 0.25% XC, 40% Saccharose) versetzt. Als Molekulargewichtsstandard wurde *EcoRI/HindIII* geschnittene  $\lambda$ -Phagen-DNA verwendet. Die Elektrophorese der RNA erfolgte nach demselben Prinzip wie die der DNA. Es mußten jedoch andere Lösungen eingesetzt werden, um eine Degradierung der RNA zu verhindern. Bei den Gelen handelte es sich um denaturierende Gele. Es wurden 1.4%-tige Agarosegele mit 1 x MOPS-Puffer angesetzt, der auch als elektrophoretisches Puffer diente. Die RNA-Proben wurden mit 4-fachem Volumen Denaturierungspuffer (1 ml 10 x MOPS, 3.5 ml 37% Formaldehyd, 10 ml deionisiertes Formamid) vermischt und 15 min bei 56°C denaturiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurde 1/10 Vol RNA-Stop-Puffer (6 x Konzentrat: 50% Glycerol, 1 mM EDTA, 0.4% BPB) zu den Proben zugegeben und die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V. Die elektrophoretisch aufzutrennende DNA und RNA wurden mit Ethidiumbromid (5 µg/ml) gemischt und unter UV visualisiert.

### **2.2.21.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte wie beschrieben (Laemmli, 1970). Bei den verwendeten Polyacrylamidgelen handelte es sich um denaturierende Gele, die aus einem 7–15%-igen Trenngel und einem 5%-igen Sammelgel bestehen. Die Trenngellösung (7-15% Polyacrylamid/Bisacrylamid, 30:1, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.005% TEMED) wurde zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit A. bidest. überschichtet, da Sauerstoff die Polymerisation des Gels hemmt. Die Polymerisation war nach ca. 30 min abgeschlossen. Nach Entfernen des A. bidest. wurde das Sammelgel (5% Polyacrylamid/Bisacrylamid, 30:1, 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. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit A. bidest. nachgespült. Die aufzutragenden Proben wurden wie folgt behandelt. Pro Spur wurden 20-30 µg Protein mit 1/4 Volumen Ladebuffer (Sigma) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert, und auf Eis abgekühlt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0.1% SDS) bei 30-40 mA. Die Proteine werden anschließend mittels Wester-Blot-Transfer aus dem Gel auf einen Nitrozellulosefilter übertragen (s. Kapitel 2.2.21.2.).

### **2.2.21.3. EMSA-Gelelektrophorese**

Bei den verwendeten Polyacrylamidgelen handelte es sich im Gegensatz zu den SDS-Gelen um native (SDS-freie) Gele. Die Gelkammer wurde nach dem Zusammenbau mit 1% LMP-

## Material und Methoden

Agarose abgedichtet, ein 4%-iges Polyacrylamidgel zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm zu Aussparung von Taschen eingesteckt. Nach der Polymerisierung des Gels wurde es in eine spezielle Kammer eingespannt und erneut mit Agarose abgedichtet. Das Gel wurde durch einen einstündigen Vorlauf bei 100 mV äquilibriert, als Laufpuffer diente hierbei 0.25 % TBE-Puffer. Die fertigen Proben wurden auf das Gel aufgetragen; der Gellauf erfolgte bei 100 mV, bis die Lauffront eines separat aufgetragenen BPB-Marker ca. 1-2 cm vor dem Auslaufen war. Danach wurde das Gel abgebaut, und mittels eines Gel-Trockner-Geräts (Unterdruck bei 80°C) für 2 h getrocknet. Danach wurde das getrocknete Gel auf ein Röntgenfilm über Nacht bei -80°C exponiert.

### **2.2.22. Transfer von Nukleinsäuren und Proteinen**

#### **2.2.22.1. Northern-Blot-Transfer**

Die Übertragung von RNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulose erfolgte durch ein spezielles Verfahren, das in Analogie zu dem von Southern entwickelten Verfahren als Northern-Blot-Hybridisierung bezeichnet wird. Hierbei wurde das RNA-Gel für 30 min in 10xSSC inkubiert. Anschließend wurde ebenfalls eine Transfereinrichtung aufgebaut, wobei als Laufpuffer 10x SSC verwendet wurde. Alternativ wurde das *Turboblotter<sup>TM</sup> Rapid Downward Transfer System* (Schleicher & Schuell) nach dem Protokoll des Herstellers angewendet. Die RNA wurde zum Schluß durch einstündige Inkubation bei 80°C oder alternativ durch UV-Cross-linking auf der Nytran<sup>®</sup> Nylon-Membran fixiert. Die anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Probe erfolgte wie im Kapitel 2.2.22.2. beschrieben.

#### **2.2.22.2. Western-Blot-Transfer**

Nach der Auftrennung der Proteine durch eine SDS-PAGE wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Polyacrylamidgel wurde zuerst in Blotting-Puffer überführt und auf eine Nitrozellulosemembran gelegt, welche dann zwischen je eine Doppellage in Puffer getränktes 3 MM-Papier gelegt wurde. Anschließend wurde das Gel in einem mit zwei angefeuchteten Schwämmen versehenen Gelhalter fixiert und vertikal in eine mit Blottingpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt, so daß der Nitrozellulosefilter zur Anode (+Pol) hinorientiert war. Die Überführung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 180 mA über Nacht oder bei 400 mA für 3-4 h. Nach Beendigung des Transfers erfolgte eine Überprüfung der Beladung und der Proteinübertragung durch Färbung des Filters mit Ponceau's-Lösung. Anschliessend wurde der Filter mit PBS gespült, um die Färbelösung abzuwaschen. Der Filter wurde mit Antikörpern inkubiert (siehe Kapitel 2.2.24.1).

## **2.2.23. Northern-Blot-Analyse**

### **2.2.23.1. Radioaktive Markierung der DNA-Sonde**

Die Markierung von DNA-Sonden, die für die radioaktive Hybridisierung verwendet wurden, erfolgte durch *Random-primed oligo labeling* (Feinberg und Vogelstein, 1983). Dabei wurde an die denaturierte DNA ein Gemisch von statistischen Hexanukleotidprimern hybridisiert, die dem Klenow-Fragment als Startpunkte für die Synthese eines zur Matrize komplementären Stranges dienten. Die Markierung wurde in einem Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 30 µl durchgeführt. Hierbei wurden 0.1-1 µg DNA eingesetzt, welche durch Erhitzen auf 95°C für 10 min denaturiert und sofort auf Eis gekühlt wurde, um eine Renaturierung zu verhindern. Zu der DNA wurden 6 µl dNTP und 6 µl 5 x Puffer aus dem *Random Primer Plus Extension Labeling System* (NEN Dupoint) hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3-5 µCi des markierten Nukleotids  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (>3000 Ci / mMol) und 1U Klenow Enzym. Nach 2 h-iger Inkubation bei RT wurde die radioaktiv markierte DNA mit A. bidest. auf 200 µl aufgefüllt und mit 3 Vol absolut Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 200 µl TE gelöst.

### **2.2.23.2. Hybridisierung mit der radioaktiven Sonde**

Die mittels Northern-Blot-Transfer (2.2.21.1.) hergestellten Nitrozellulosefilter wurden bei 60°C für 6h in 30 ml Vorhybridisierungslösung präinkubiert, um unspezifische Bindung an den Nitrozellulosefilter zu verhindern. Vor der Hybridisierung wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 95°C denaturiert und in 7 ml Hybridisierungslösung überführt und bei 60°C ÜN inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Nitrozellulosefilter 3 x 15 min bei 60°C mit 2 x SSC, 0.1% SDS gewaschen. Nach erneutem Waschen in 2 x SSC wurde der Filter in einen Gefrierbeutel eingeschweißt, ein Röntgenfilm (Kodak XAR) und Verstärkerfolie wurden auf den Filter gelegt und bei -80°C für unterschiedliche Zeiten exponiert. Zur Rehybridisierung mit einer zweiten Sonde wurde der Filter für 15 min bei 80°C in 2 x SSC inkubiert und anschließend erneut prähybridisiert.

## **2.2.24. Koloniefilterhybridisierung**

Diese Methode von Grunstein & Hogness (1975) diente zur Identifizierung positiver Klone nach der Transformation (z.B. bei der Ligation von pGEX-4T-1 und *bcl-2*-cDNA). Hierbei wurden Bakterienklonen parallel und in identischer Anordnung auf zwei gerasterte Nylonfilter (Hybond N<sup>+</sup>) ausgestrichen, die auf einer Amp-haltigen Platte lagen, und für 24 h bei 37°C inkubiert. Einer der beiden Nylonfilter wurde entnommen und einem Verfahren unterworfen, bei dem die Zellen aufgebrochen, die DNA freigesetzt und an den Nylonfilter gebunden wurde. Bei diesem Verfahren wurden die Filter zunächst zum Aufbrechen der Bakterien und zur

## Material und Methoden

Denaturierung der DNA für 7 min auf mit 0.5 M NaOH getränktes Filterpapier gelegt. Nach 5-minütigem Trocknen wurden die Filter zur Neutralisierung nacheinander für je 5 min auf ein mit 1.5 M Tris-HCl (pH 7.5) und auf ein mit 0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl (pH 7.4) getränktes Filterpapier gelegt. Danach wurden durch Inkubation mit Proteinase K (1 mg/ml SSC) für 30 min bei RT die Bakterienproteine zerstört. Der Filter wurde nun kurz durch abs. Ethanol gezogen und für 5 min in 0.3 M NaCl inkubiert. Zum Schluß wurde die DNA für 2 h bei 80°C auf dem Filter angebacken. Die anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Probe erfolgte wie im Kapitel 2.2.22.2. bereits für die Northern-Blot-Analyse beschrieben.

### **2.2.25. Western-Blot-Analyse**

Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindung wurden der Nitrozellulosefilter für 3 h in Blockierungslösung (5% Magermilchpulver in PBS, 0.1% Tween-20) inkubiert. Der Nitrozellulosefilter wurde nun mit dem primären Antikörper in Blockierungslösung für 2 h bei RT inkubiert und 3 x 10 min mit PBS, 0.1% Tween-20 gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:3000 in Blockierungslösung) für 1 h inkubiert und erneut gewaschen. Die gebundene Antikörper-Antigen Komplexe wurden mittels des ECL-Kits und *High performance chemiluminescence film* (Amersham) detektiert. Für eine weitere Inkubation des selben Filters wurden die Antikörper von dem Filter mit der 100 mM Glycin-Lösung (pH 2.8) gewaschen (*membrane stripping*) und danach zweimal für 10 min in PBS gewaschen.

### **2.2.26. DNA-Sequenzierung**

Die enzymatische Sequenzierung beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierungen wurden von der Firma *GENterprise* (Institut für Molekulargenetik, gentechnische Sicherheitsforschung und Beratung, Universität Mainz) durchgeführt.

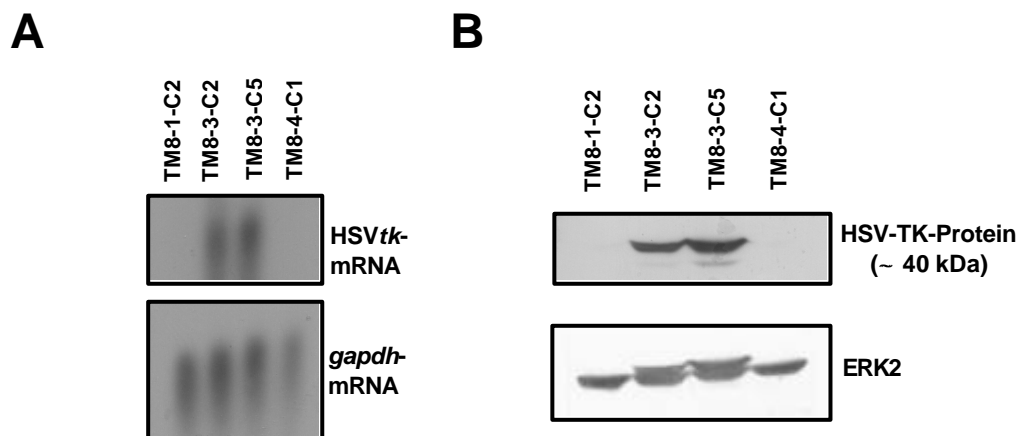
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Stabile CHO-HSV-TK-Transfektanten

##### 3.1.1. Herstellung HSVtk-exprimierender CHO-Transfektanten

Um HSV-TK-exprimierenden Zellklone zu erzeugen, wurden CHO-Zellen mit den Plasmidvektoren pMC-*tk* und pSV2*neo* kotransfiziert, welche die Thymidinkinase des Herpes simplex-Virus unter der Kontrolle des CMV-Promotors besitzen. Stabile Transfektanten wurden mit dem Antibiotikum Geneticin-Sulfat (G418, 1.5 mg/ml) auf Neomycin-Resistenz selektioniert. Einzelne Klone wurden in 24-*well*-Platten im Doppelansatz ausplattiert und eine der beiden Platten wurde mit dem Virustatikum GCV behandelt.

Die Sensitivität der Klone gegenüber den Antiherpes-Virustatika vom Typ der Purinanaloga (ACV, GCV, PCV) basiert auf der Expression der viralen HSV-1-Thymidinkinase, die das Virustatikum auf Grund geringer Substrat-Selektivität effektiv zum Monophosphat umwandeln kann. Zwei Transfektanten, die gegenüber GCV hypersensitiv reagierten, wurden ausgewählt, und die Expression der HSV-TK wurde auf RNA- und Protein-Ebene überprüft. Wie in **Abb.7** mittels Northern-Blot- und Western-Blot-Analyse gezeigt ist, exprimieren beide Klone sowohl die HSVtk-mRNA als auch das HSV-TK-Protein. Der Klon TM8-3-C2 wurde für alle weitere Versuche verwendet und als CHO-HSV-TK bezeichnet.

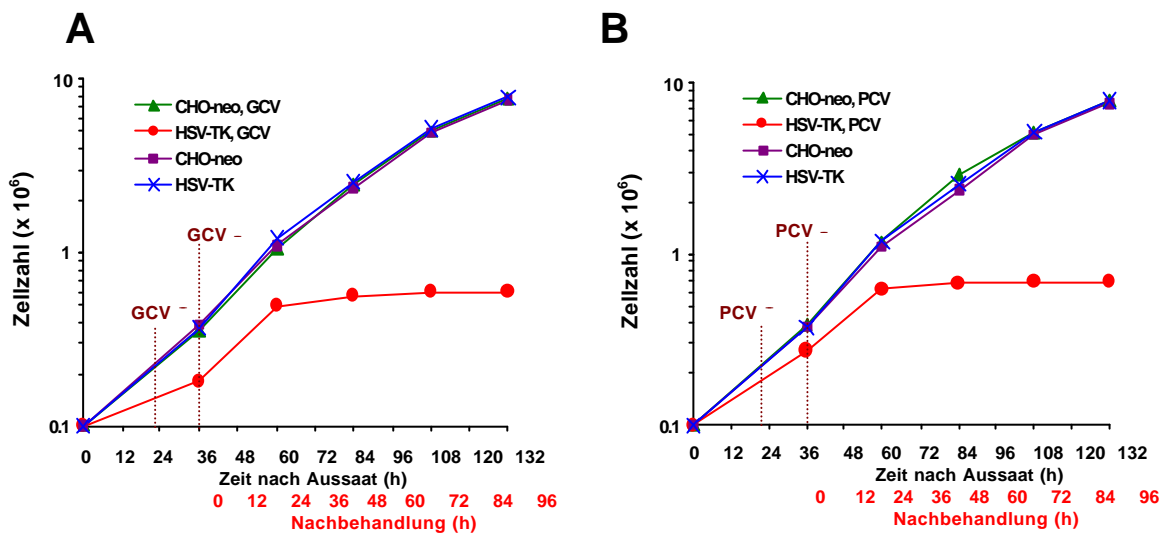


**Abb.7. Northern- und Western-Blot-Analyse HSVtk-exprimierender Transfektanten.** (A) Aus vier transfizierten Klone wurde Gesamt-RNA isoliert und zur Northern-Blot-Analyse mit einer radioaktiv markierten HSVtk-Sonde hybridisiert. Rehybridisierung mit der *gapdh*-Sonde diente als Beladungskontrolle. (B) Aus den unten (A) verwendeten Klonen wurden Gesamtproteinextrakte hergestellt und zur Western-Blot-Analyse mit dem anti-HSV-TK-Antiserum inkubiert. Inkubation mit dem anti-ERK2 Antikörper diente als Beladungskontrolle.

### 3.1.2. Charakterisierung stabiler CHO-HSV-TK-Transfektanten

#### 3.1.2.1. Zellwachstum

Um zu überprüfen, ob die HSV-TK-Transfektanten ein verändertes Wachstum im Vergleich zu der CHO-neo-Kontrolle aufweisen und ob sie nach Behandlung mit GCV bzw. PCV im Wachstum verlangsamt sind, wurden Wachstumskurven erstellt. Hierzu wurden die CHO-HSV-TK-Zellen und die CHO-neo-Kontrolle für einen Zellzyklus (14 h) ohne oder mit Virustatikum (1µM GCV / 5µM PCV) behandelt. Das Virustatikum wurde zusammen mit dem Medium von den Zellen entfernt und gegen frisches, Virustatika-freies Medium ausgetauscht. Anschließend wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten, die im folgenden als Nachbehandlungszeiten bezeichnet werden, weiterkultiviert. Nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten erfolgte die Zellernte und die Bestimmung der Zellzahl (**Abb.8**).



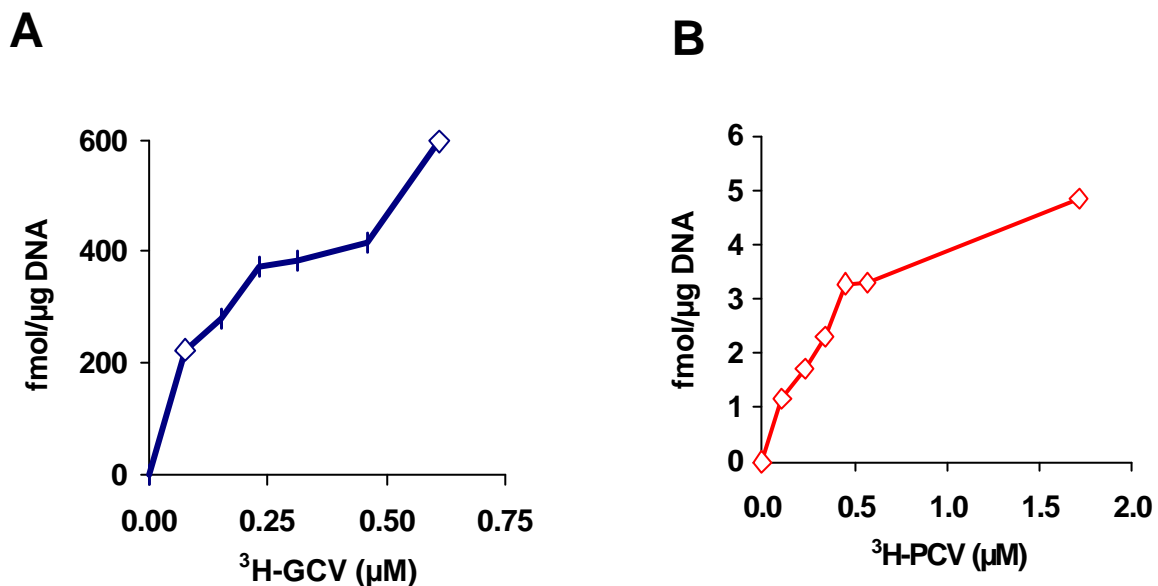
**Abb.8. Einfluß der Virustatika-Behandlung auf das Wachstum der CHO-HSV-TK-Transfektanten.** (A) 1 µM GCV, (B) 5 µM PCV. Zur Bestimmung der Wachstumskurven wurden  $10^5$  Zellen (CHO-neo oder CHO-HSV-TK) auf 10-cm-Schalen ausgesät und nach 24 h mit 1 µM GCV, bzw. 5 µM PCV für 14 h behandelt. Die Zellzahl wurde sofort nach der Behandlung (0 h-Wert in rot) und nach 24, 48, 72 und 96 h bestimmt (in rot). Die Zellzahl (Ordinate) ist logarithmisch dargestellt.

Hierzu wurden  $10^5$  Zellen auf 10-cm-Schalen ausgesät und am nächsten Tag mit 1 µM GCV, bzw. 5 µM PCV für 14 h behandelt. Die Zellzahl wurde sofort nach der Behandlung (0 h-Wert) und 24, 48, 72 und 96 h danach bestimmt. Anhand der Wachstumskurve sieht man, daß das Wachstum der CHO-neo Zellen nach Behandlung mit GCV und PCV nicht eingeschränkt ist, wogegen in den CHO-HSV-TK Zellen nach einer Behandlung mit diesen Virustatika eine signifikante Verlangsamung des Zellwachstums zu beobachten ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die HSV-TK-exprimierenden Zellen nach Virustatika-Behandlung im Zellcyclus verzögert sind bzw. cytotoxische Effekte auftreten.

## Ergebnisse

### **3.1.2.2. Einbau von GCV und PCV in die zelluläre DNA**

Um festzustellen, ob die CHO-HSV-TK Zellen das GCV und das PCV in die zelluläre DNA einbauen, wurden die Zellen für einen Zellcyclus (14 h) mit verschiedenen Konzentrationen von radioaktiv markiertem  $^3\text{H}$ -GCV bzw.  $^3\text{H}$ -PCV behandelt. Aus den behandelten Zellen wurde anschließend die genomische DNA isoliert, die Radioaktivität in cpm/ $\mu\text{g}$  DNA gemessen und in fmol/ $\mu\text{g}$  DNA umgerechnet. Die Abhängigkeit zwischen Einbau und Virustatika-Konzentration ist in **Abb.9** graphisch dargestellt. Die Graphik zeigt, daß GCV im Vergleich mit PCV viel effizienter in die zelluläre DNA eingebaut wird. Bei PCV war der Einbau äußerst schwach, an der Grenze der Nachweisbarkeit. Bei einer Konzentration von 0.6  $\mu\text{M}$  GCV wurden ca. 600 fmol/ $\mu\text{g}$  DNA gemessen, während bei gleicher PCV-Konzentration nur etwa 3 fmol/ $\mu\text{g}$  DNA eingebaut wurden.



**Abb.9. Einbau von radioaktiv markierten  $^3\text{H}$ -GCV (A) und  $^3\text{H}$ -PCV (B) in die DNA der CHO-HSV-TK-Zellen.** Zur Bestimmung des Virustatikaeinbaus wurden  $2 \times 10^5$  Zellen ausgesät und 24 h danach für einen Zellcyclus (14 h) mit verschiedenen Konzentrationen von radioaktiv markiertem  $^3\text{H}$ -GCV bzw.  $^3\text{H}$ -PCV behandelt. Aus den behandelten Zellen wurde die genomische DNA isoliert und der Einbau von radioaktivem Virustatika im Szintilations-Meßgerät gemessen. Die gemessene Radioaktivität wurde in fmol/ $\mu\text{g}$  DNA umgerechnet und als Funktion der Virustatika-Konzentration graphisch dargestellt.

## Ergebnisse

### **3.1.2.3. Bestimmung der Proliferation**

Für die Untersuchung des Mechanismus der GCV-vermittelten Zytotoxizität ist es von großem Interesse zu sehen, ob es zur Hemmung der DNA-Replikation (DNA-Synthese) während des GCV- und PCV-Einbaucyclus oder während des ersten Nachbehandlungszellcyclus kommt. Da schon bei der Bestimmung der Wachstumskurve der CHO-HSV-TK-Transfektanten zu beobachten war, daß die Zellen im zweiten Zellcyclus nach der Behandlung mit GCV und PCV deutlich langsamer proliferieren, wurde die Zellproliferation mit Hilfe des Einbaus eines Thymidin-Analogs, Bromdesoxyuridin (BrdU), untersucht. Hierbei handelt es sich um einen Assay, bei dem die Effektivität der Replikation bestimmt wird. Die Ergebnisse sind in der Tab. II dargestellt.

**Tab. II. BrdU-Einbau während der GCV-Behandlung und im ersten Nachbehandlungszellcyclus**

<b>a) während des Einbaus</b>		<b>b) während des ersten Nachbehandlungszellcyclus</b>	
<b>GCV-Konz.</b>	<b>% Einbau ± SD</b>	<b>GCV-Konz.</b>	<b>% Einbau ± SD</b>
0.5 µM	90.5 ± 7.3	0.5 µM	94.3 ± 4.1
1.0 µM	91.4 ± 9.2	1.0 µM	88.9 ± 3.2
1.5 µM	86.0 ± 7.6	1.5 µM	89.1 ± 13.3
5.0 µM	86.3 ± 8.3	5.0 µM	83.6 ± 15.4
<b>a) während des Einbaus</b>		<b>b) während des ersten Nachbehandlungszellcyclus</b>	
<b>PCV-Konz.</b>	<b>% Einbau ± SD</b>	<b>PCV-Konz.</b>	<b>% Einbau ± SD</b>
0.5 µM	96.8 ± 3.2	0.5 µM	93.4 ± 3.4
1.0 µM	95.7 ± 2.2	1.0 µM	88.2 ± 4.8
1.5 µM	91.2 ± 5.6	1.5 µM	86.9 ± 5.3
5.0 µM	86.6 ± 4.5	5.0 µM	81.2 ± 10.1

Wie anhand der Tabelle ersichtlich ist, kam es während des GCV- und PCV-Einbaus sowie während des ersten Nachbehandlungszellcyclus in den CHO-HSV-TK-Zellen nur zu einer Hemmung der DNA-Replikation um 15-20% bei der höchsten verwendeten Konzentration der Virustatika (5 µM). Dies deutet darauf hin, daß sowohl GCV als auch PCV zu diesem Zeitpunkt der Messung keine drastische Hemmung der DNA-Replikation verursachten.

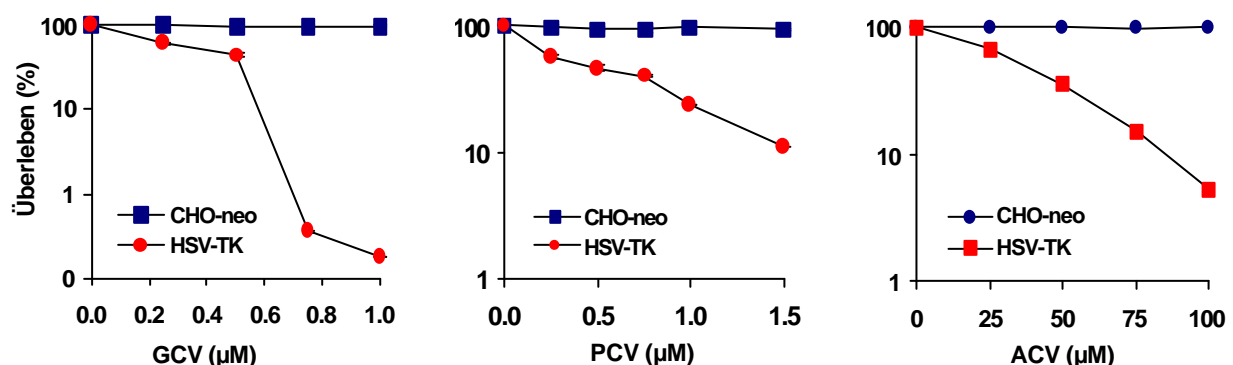
### 3.1.3. Einfluß von Virustatika auf den Zelltod

Die cytotoxische Wirkung der Purinanaloga GCV, PCV und ACV in den HSVtk-exprimierenden Transfektanten wurde im Überlebensversuch durch Bestimmung der Koloniebildung (*clonogenic cell survival*) und durch Bestimmung der Apoptose/Nekrose-Frequenz untersucht. Die Zellen wurden hierbei für einen Zellcyclus (14 h) mit dem Virustatikum behandelt, um eine klare Aussage darüber zu treffen, in welchem Zellcyclus nach der Virustatika-Behandlung sich die Cytotoxizität äußert.

#### 3.1.3.1. Reproduktiver Zelltod

Um festzustellen, ob die Fähigkeit der CHO-HSV-TK-Zellen Klone zu bilden, nach einer Behandlung mit dem entsprechenden Virustatikum beeinträchtigt war, wurden die Zellen in Massenkultur mit dem entsprechenden Virustatikum für einen Zellcyclus (14 h) behandelt. Anschließend wurde jede Probe abtrypsinisiert und 800 Zellen pro Konzentration ausgesät.

Nach 10 Tagen wurde die Zahl der angewachsenen Klone mit der Zahl der Klone der unbehandelten CHO-HSV-TK-Kontrolle ins Verhältnis gesetzt und mit der Zahl der behandelten CHO-neo-Kontrolle verglichen. Der Vergleich der Wirkung von GCV, PCV und ACV ist in der **Abb.10** dargestellt. Die Plattierungseffizienz der Transfektanten lag bei etwa 75%. Die CHO-HSV-TK-Zellen reagierten am sensitivsten gegenüber GCV; bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  GCV lag das Überleben der Zellen unter 1%. Im Vergleich mit GCV war die äquimolare Dosis von PCV gegenüber HSVtk-exprimierenden Zellen weniger toxisch. Um das Überleben der Zellen deutlicher zu reduzieren, mußten Konzentrationen im Bereich von 5-10  $\mu\text{M}$  PCV eingesetzt werden (nicht gezeigt). Um durch Behandlung mit ACV einen vergleichbaren toxischen Effekt im Koloniebildungsversuch zu erreichen, mußten 100-fach höhere ACV-Konzentrationen eingesetzt werden als bei GCV oder PCV.



**Abb.10. Reproduktiver Zelltod nach Behandlung der CHO-HSV-TK- und CHO-neo-Zellen mit Virustatika vom Typ der Purinanaloga.** Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 0-1  $\mu\text{M}$  GCV (A), 0-1.5  $\mu\text{M}$  PCV (B), und 0-100  $\mu\text{M}$  ACV (C) für einen Zellcyclus (14 h) behandelt. Die Zellen wurden abtrypsinisiert und jeweils 800 Zellen wurden erneut ausplattiert. Nach 10 Tagen wurden die herangewachsenen Zellklone fixiert, gefärbt und ausgezählt.

## Ergebnisse

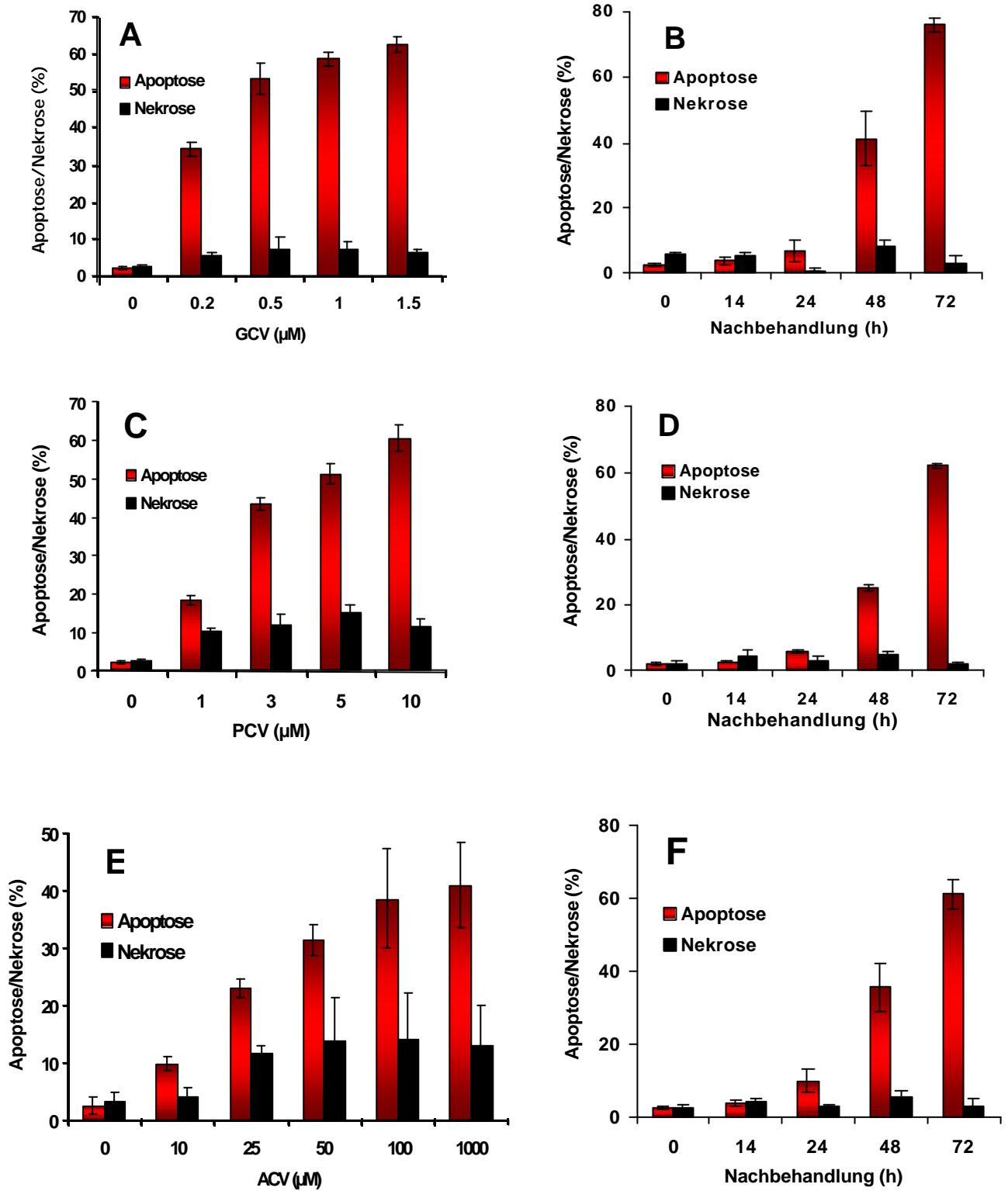
Die Virustatika-Behandlung hatte keine Auswirkungen auf das Überleben der CHO-neo-Kontrolle. Dies ist darauf zurückzuführen, daß CHO-neo-Zellen völlig ineffizient die Virustatika metabolisieren, da sie keine virale Thymidinkinase exprimieren; sie sind metabolisch inkompetent.

### **3.1.3.2. Bestimmung der Apoptose / Nekrose – Frequenz**

Es ist aus der Literatur bekannt, daß Zellen, welche die virale HSV-1-Thymidinkinase exprimieren, nach Behandlung mit GCV spezifisch durch Apoptose sterben (Rubsam *et al.*, 1998). Um festzustellen, ob die generierten CHO-HSV-TK-Transfektanten tatsächlich den apoptotischen Weg einschlagen, wurde die Frequenz der Apoptose und Nekrose nach Virustatika-Behandlung der CHO-HSV-TK-Zellen für einen Zellcyclus (14 h) mit Annexin V und Propidiumjodid (s. Methoden) bestimmt. In der **Abb.11** ist die Größe der apoptotischen und nekrotischen Zellpopulation nach Behandlung der CHO-HSV-TK-Zellen mit dem entsprechenden Virustatikum in Abhängigkeit von der Konzentration und der Nachbehandlungszeit dargestellt. Die Frequenz der Apoptose bzw. Nekrose wurde dabei als Funktion der Konzentration der Virustatika 72 h nach der Behandlung mit dem entsprechenden Virustatikum gemessen, oder als Funktion der Nachbehandlungszeit nach einer 14-stündigen Behandlung mit 1 µM GCV, 5 µM PCV und 100 µM ACV bestimmt.

Aufgrund unserer Untersuchungen kann man erkennen, daß die Nekrose, auch bei höheren Virustatika-Konzentrationen und längeren Nachbehandlungszeiten, nur eine untergeordnete Rolle spielt, während die Apoptose nach der Erhöhung der Konzentration und der Verlängerung der Nachbehandlungszeit im Fall aller drei Virustatika deutlich ansteigt. Die Virustatika-induzierte Apoptose ist ein spätes Ereignis, das nicht früher als 24 h nach der Behandlung mit dem Virustatikum auftritt. Die hier (in Massenkultur) eingesetzten Virustatika-Konzentrationen und die verursachte Cytotoxizität stimmten gut mit den Konzentrationen und toxischen Effekten im Koloniebildungsversuch überein (s. Abb.10). Die in den Überlebensversuchen (reproduktiver Zelltod, Koloniebildung) verwendeten Konzentrationen von Virustatika (1 µM GCV, 5 µM PCV und 100 µM ACV) zeigten auch in der durch Annexin V bestimmten Apoptose-Messung ähnliche toxische Effekte.

## Ergebnisse

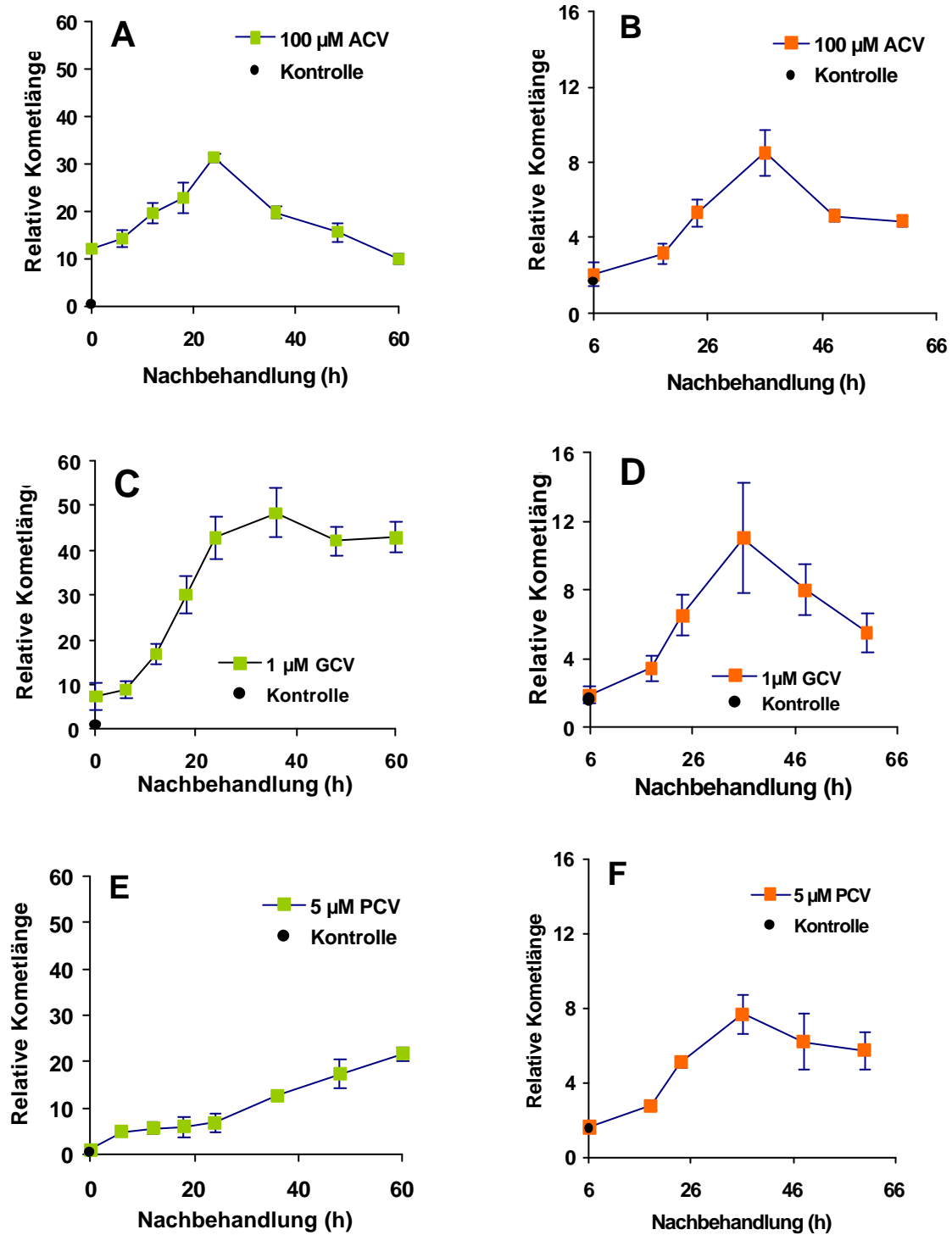


**Abb.11. Induktion der Apoptose und Nekrose in CHO-HSV-TK-Zellen als Funktion der Dosis und der Nachbehandlungszeit.** A, B: GCV-Dosis- und Zeitabhängigkeit mit 1 µM GCV; C, D: PCV-Dosis- und Zeitabhängigkeit mit 5 µM PCV; E, F: ACV-Dosis- und Zeitabhängigkeit mit 100 µM ACV. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD sind dargestellt.

### **3.1.4. Induktion von DNA-Strangbrüchen**

Eine Möglichkeit wie der Einbau von Virustatika in die DNA zur Apoptose führt, wäre, daß der Einbau Brüche in der DNA erzeugt, deren Akumulation die Apoptose auslöst. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die DNA-Migration aus den Zellen hinaus mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) bestimmt. Der Vergleich zwischen GCV, PCV und ACV-Behandlung ist in der **Abb.12** dargestellt. Die CHO-HSV-TK-Zellen wurden mit den Virustatika für 14 h behandelt. Die Rate von Einzel- und Doppelstrangbrüchen ist als relative Kometlänge (*Olive tail moment*, OTM) dargestellt. Man kann sehen, daß alle drei Virustatika sehr effizient DNA-Strangbrüche induzieren, vor allem Einzelstrangbrüche und alkali-labile Stellen. ACV induziert am frühestens DNA-Einzelstrangbrüche; schon direkt nach der Behandlung liegt die relative Kometlänge bei ca. 12. Dies deckt sich mit der Tatsache, daß dieses Virustatikum ein *obligate chain terminator* ist, d.h. nach dem Einbau von ACV-TP wird kein zusätzliches Nukleotid mehr eingebaut, wodurch es zur Entstehung von DNA-Einzelstrangbrüchen kommt. Das Maximum der Strangbruchfrequenz unter alkalischen Bedingungen war 24 h nach der Behandlung mit 100 µM ACV zu beobachten. Im Vergleich dazu erreichte die Induktion von Doppelstrangbrüchen (gemessen unter neutralen Bedingungen) ca. ein Zellcyclus später das Maximum, d.h. 36 h nach der Behandlung. Nach späteren Zeitpunkten reduzierte sich die Rate der Strangbrüche, möglicherweise auch deshalb weil ein Teil der Zellen schon durch Apoptose abgestorben ist. Die Inkorporationsversuche zeigten bereits, daß PCV-TP nur ganz marginal in die DNA eingebaut wird (s. Abb.7). Dennoch ist die Induktion der Apoptose nach Behandlung mit 5 µM PCV signifikant. Es ist anzunehmen, daß das marginal eingebaute PCV-MP lange in der DNA persistiert, weswegen die Brüche erst viel später (48-60 h nach der Behandlung) entstehen, und mit niedrigerer Frequenz und in einem absolut niedrigerem Bereich (OTM max. ~20) im Vergleich zu ACV und GCV entstehen. GCV wurde am effizientesten in die DNA inkorporiert (s. Abb.7), und die DNA-Brüche entstehen schon im ersten Nachbehandlungszellcyclus, mit einem Maximum 24-36 h (alkalisch, OTM~50) und 36 h (neutral, OTM~12) nach der Behandlung. Nach 36 h fällt die Frequenz der DNA-Doppelstrangbrüche ab.

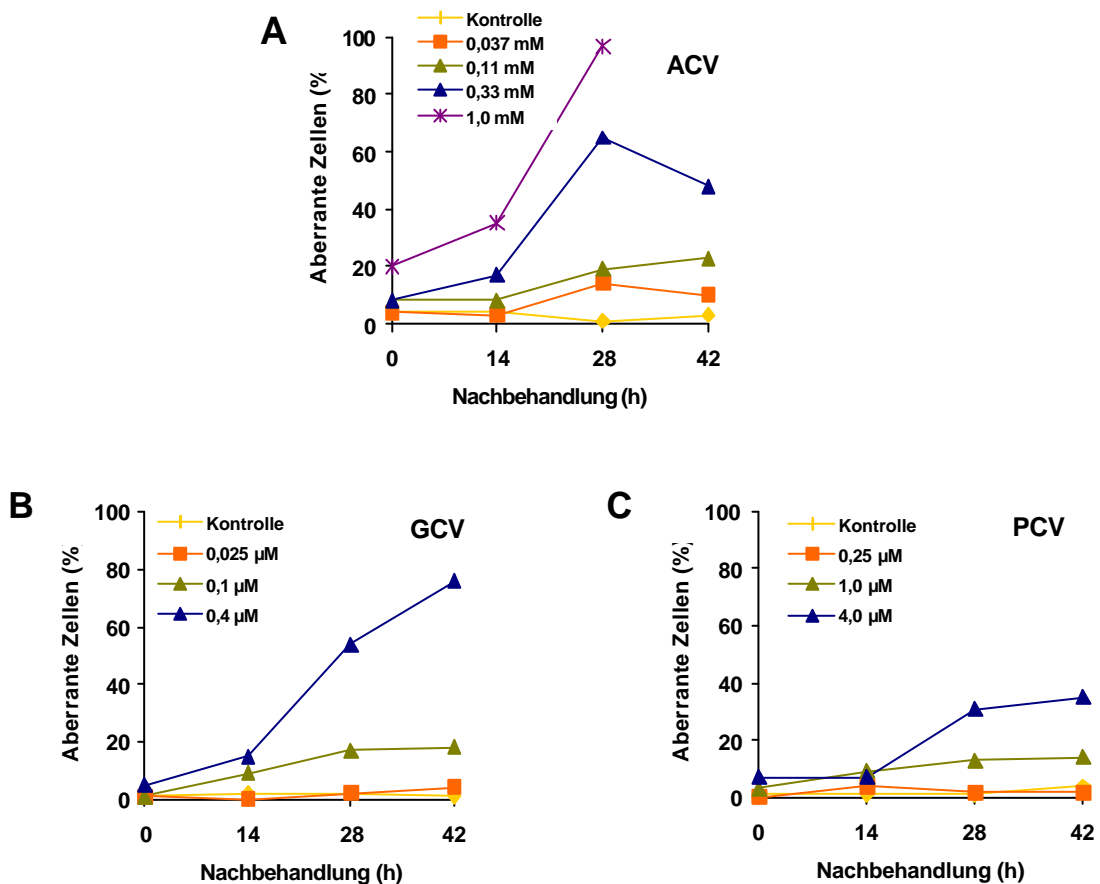
## Ergebnisse



**Abb.12. Induktion von Einzel- und Doppelstrangbrüchen nach Behandlung mit Virustatika vom Typ der Purinnukleosidanaloga.** CHO-HSV-TK-Zellen wurden für 14 h mit dem entsprechenden Virustatikum behandelt und nach verschiedenen Nachbehandlungszeiten für den Comet-Assay geerntet und unter alkalischen oder neutralen Bedingungen lysiert. Es wurden dabei Konzentrationen von 100 μM ACV (A-alkalisch, B-neutral), 1 μM GCV (C-alkalisch, D-neutral) und 5 μM PCV (E-alkalisch, F-neutral) verwendet.

### 3.1.5. Induktion von Chromosomenaberrationen

Um festzustellen, ob die Induktion der DNA-Strangbrüche mit der Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen korreliert, wurde die Frequenz der geschädigten Mitosen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Virustatika und nach verschiedenen Nachbehandlungszeiten bestimmt (**Abb.13**). ACV-induzierte Klastogenität war konzentrationsabhängig; das Maximum von ~ 100% aberrante Zellen wurde nach einer Nachbehandlungszeit von 28 h und bei der höchsten Konzentration von 1 mM ACV erreicht. Bei dieser Konzentration fing die Klastogenität bereits im ersten Nachbehandlungszyclus an zu steigen. Die beobachteten Aberrationstypen waren hauptsächlich Chromatid-Brüche und Translokationen (nicht gezeigt). Nach späteren Nachbehandlungszeiten prädominierten extrem aberrante Metaphasen (mit >10 Aberrationen pro Zelle). Die verwendeten ACV-Konzentrationen lagen im millimolaren Bereich (0.04-1.0 mM). Damit waren die Konzentrationen von ACV 1000-fach höher als die GCV-Konzentrationen und 100-fach höher als die von PCV, die ähnliche Gentoxizität auslösten.

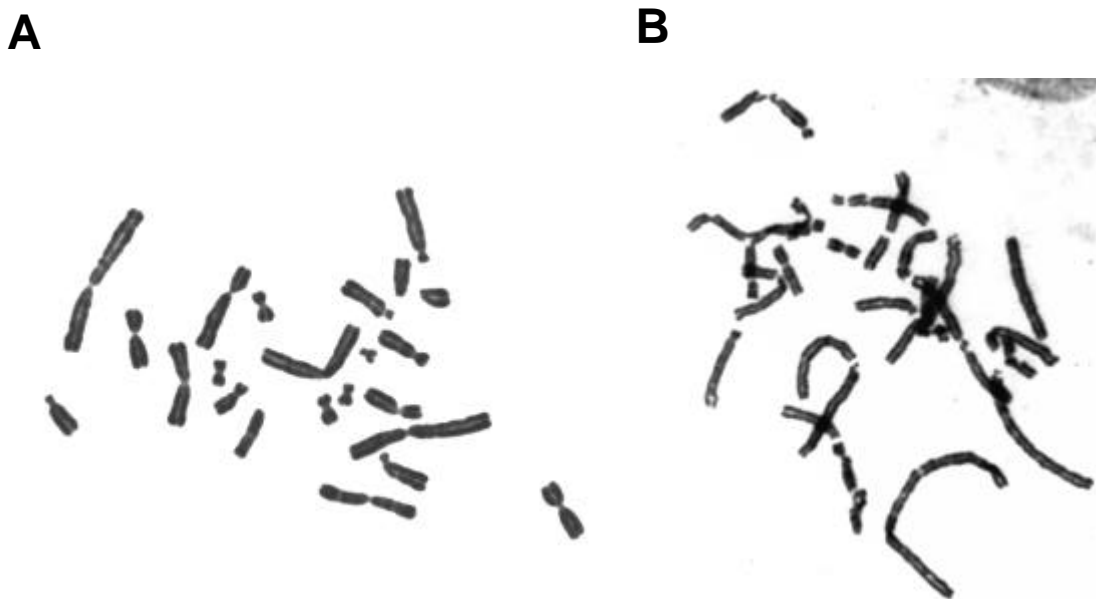


**Abb.13. Induktion Chromosomenaberrationen in CHO-HSV-TK-Zellen nach Virustatika-Behandlung.** CHO-HSV-TK Zellen wurden für 14 h mit steigenden Konzentrationen von (A) ACV, (B) GCV, oder (C) PCV behandelt. Nach verschiedenen Nachbehandlungszeiten wurden Chromosomen-Präparate vorbereitet. Pro Präparat wurden 100 Metaphasen ausgewertet und als Frequenz der aberranten Zellen dargestellt. Bei einer Konzentration von 1.0 mM ACV und 42 h Nachbehandlungszeit waren die Mitosen sehr selten und extrem aberrant oder polyploid, und konnten deswegen nicht ausgewertet werden.

## Ergebnisse

GCV ist ein sehr starkes Klastogen, das ähnliche Aberrationstypen wie ACV induzierte. So waren Chromatid- und Isochromatid-Brüche und Chromatid-Austausche (Translokationen) häufig zu beobachten (s. **Abb.14**). Innerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs fing die Klastogenität 14 h (ein Zellcyclus) nach der Behandlung (für 14 h) an, und nahm mit längeren Nachbehandlungszeiten und höheren Konzentrationen zu. Das Maximum lag bei 75% aberranter Zellen nach 42 h (dritter Nachbehandlungscyclus) bei einer Konzentration von 0.4  $\mu\text{M}$  GCV.

Im Gegensatz zu GCV war PCV bei 10-fach höheren Konzentrationen ein relativ schwaches Klastogen. Bei einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  und einer Nachbehandlungszeit von 42 h erreichte die Frequenz der aberranten Zellen etwa 35%. Im Vergleich zu GCV sind dies zweimal weniger aberrante Zellen und zwar bei 10-fach höherer Konzentration. PCV induzierte keine "typische" Chromosomenaberrationen. Der prädominierende Typ der Aberrationen waren irreguläre Chromosomen-Kondensierungen (*premature chromosome condensations*, PCCs) (s. Diskussion). Auch eine Zunahme der polyploiden Metaphasen wurde nach längeren Nachbehandlungszeiten beobachtet (nicht gezeigt).

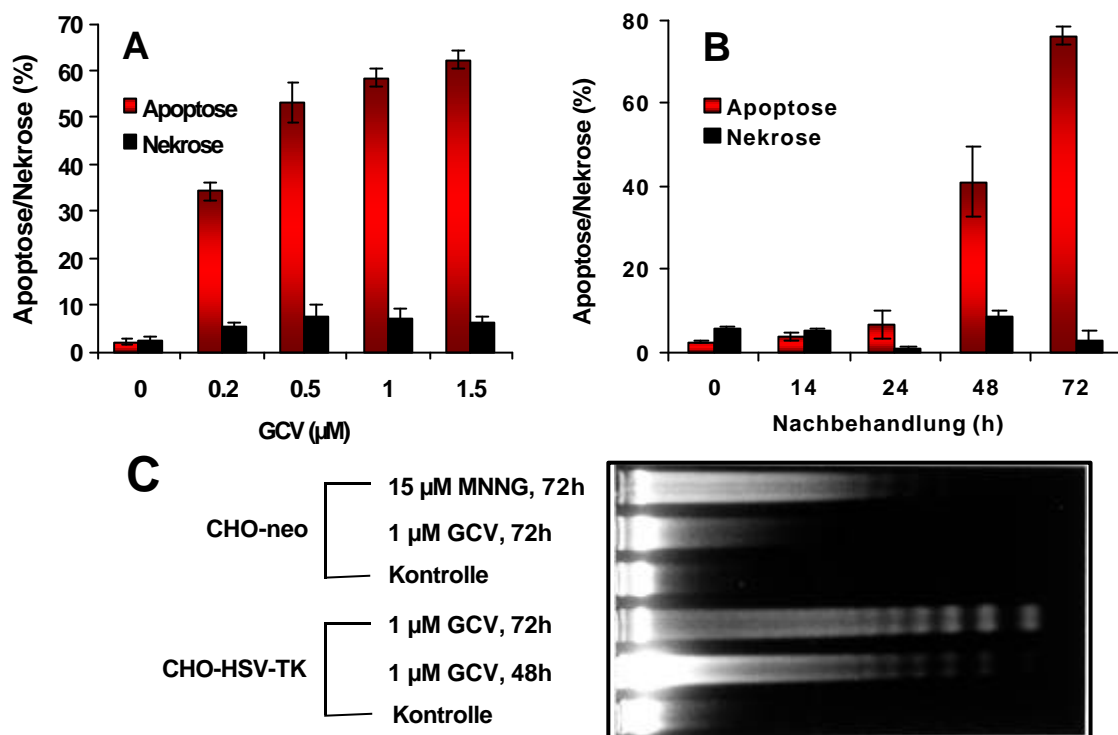


**Abb.14. Cytogenetische Präparationen aus CHO-HSV-TK-Zellen.** (A) Unbehandelte Kontrolle mit dem ungeschädigten pseudodiploiden Chromosomensatz ( $2n=23$ ). (B) GCV-behandelte Zellen. CHO-HSV-TK-Zellen wurden für 14 h mit 0.4  $\mu\text{M}$  GCV behandelt, nach 28 h präpariert und mit Giemsa-Farbstoff gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Olympus BX50-Mikroskop bei einer 100 x 10-fachen Vergrößerung. Die Chromosomen in behandelten Zellen sind im Vergleich zu den ungeschädigten Chromosomen der unbehandelten Kontrolle schwächer kondensiert, was durch die Behandlung bedingt ist.

### 3.1.6. Molekularer Mechanismus der GCV-induzierten Apoptose

#### 3.1.6.1. Quantitativer und qualitativer Nachweis der Apoptose

Da GCV die stärkste toxische Wirkung der drei Virustatika vom Typ der Nucleosidanaloga aufweist und in der „Suizidgentherapie“ das am häufigsten eingesetzte Virustatikum ist, stellte sich die Frage, wie GCV in den HSVtk-transfizierten Zellen die Apoptose auslöst, und welches die Merkmale der induzierten Apoptose sind. Um auf diese Fragen näher einzugehen, wurde als erstens die mittels Annexin V bestimmte Apoptoserate im Vergleich zu der internucleosomalen Fragmentierung der zellulären DNA untersucht (**Abb.15**).



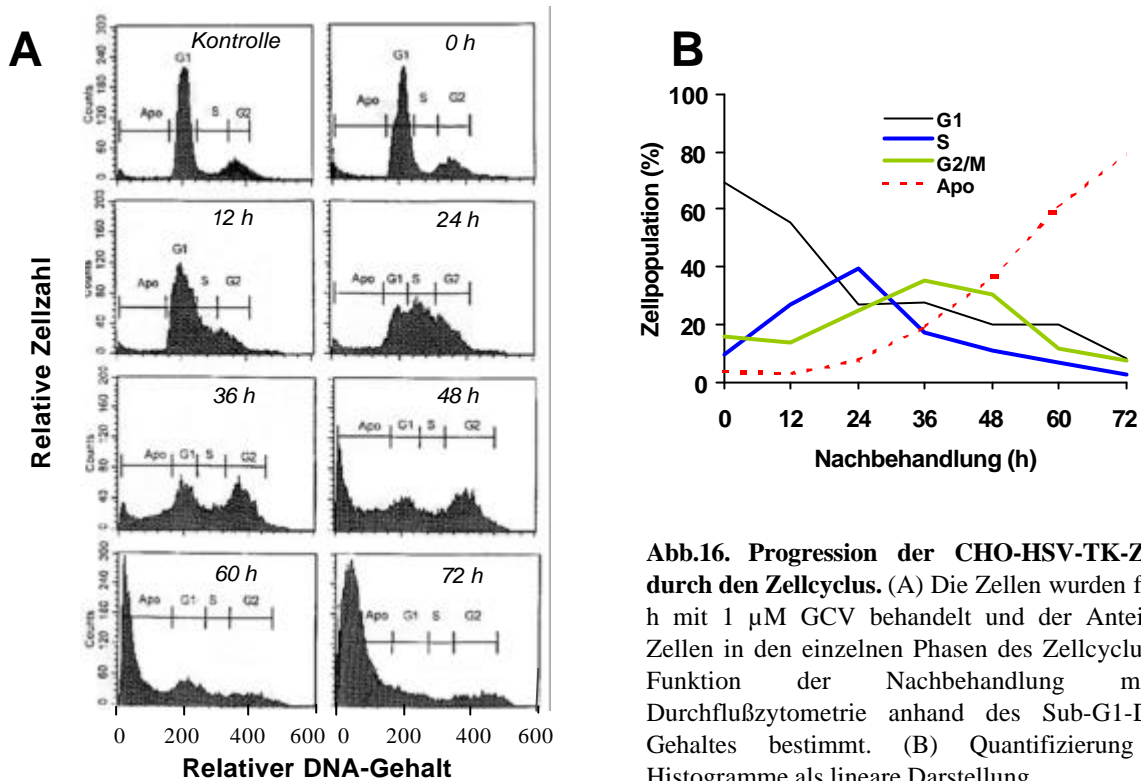
**Abb.15. Quantitative und qualitative Bestimmung der Apoptose in CHO-HSV-TK-Zellen nach Behandlung mit GCV.** CHO-neo und CHO-HSV-TK-Zellen wurden mit verschiedenen Dosen GCV (A, 0-1,5 μM) für 72h oder für unterschiedliche Nachbehandlungszeiten (B, 0-72h) mit 1 μM GCV behandelt und für die Annexin V-Messung geerntet. (C) CHO-neo und CHO-HSV-TK-Zellen wurden für 14 h mit 1 μM GCV behandelt, und als positive Kontrolle wurden CHO-neo-Zellen mit 15 μM MNNG behandelt. Nach weiteren 48 und 72 h wurde die internucleosomale Fragmentierung der genomischen DNA bestimmt.

Hierbei zeigte sich, daß die GCV-induzierte Apoptose sowohl mittels der Annexin V-Messung, als auch der internucleosomalen Fragmentierung der genomischen DNA nachgewiesen werden konnte. Die GCV-induzierte Apoptose erfolgte sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig; sie war bereits nach einer Behandlung mit 0.2 μM GCV oder einer Nachbehandlungszeit von 48 h zu beobachten und erreichte ihr Maximum nach einer Behandlung mit 1.5 μM und nach einer Nachbehandlungszeit von 72 h.

## Ergebnisse

### 3.1.6.2. Zellcyclusverteilung

Exponentiell wachsende CHO-HSV-TK-Zellen wurden für 14 h mit 1  $\mu$ M GCV behandelt und nach entsprechenden Nachbehandlungszeiten (0-72 h) geerntet. Mittels des Sub-G1 DNA-Gehaltes wurde die Progression der Zellen durch den Zellcyclus verfolgt. Die Histogramme und die entsprechende Quantifizierung sind in der **Abb.16** dargestellt.



**Abb.16. Progression der CHO-HSV-TK-Zellen durch den Zellcyclus.** (A) Die Zellen wurden für 14 h mit 1  $\mu$ M GCV behandelt und der Anteil der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellcyclus als Funktion der Nachbehandlung mittels Durchflußzytometrie anhand des Sub-G1-DNA-Gehaltes bestimmt. (B) Quantifizierung der Histogramme als lineare Darstellung.

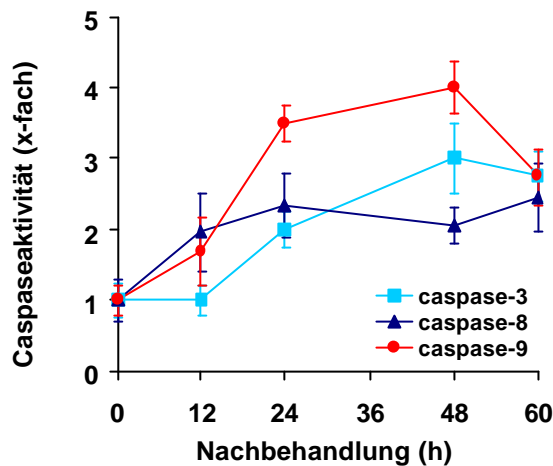
Das Ergebnis zeigt, daß die Zellen nicht in der Progression durch den ersten Zellcyclus (0 h) gehemmt sind, sondern erst im zweiten Zellcyclus (12-24 h nach der Behandlung) in den S- und G2/M-Phase-Block einlaufen. Ungefähr 40% der Zellen waren zu diesem Zeitpunkt (24 h) in der S-Phase arretiert, und ca. 25% haben sich in einem G2/M-Block befunden. Im Vergleich dazu befanden sich die unbehandelten sub-konfluenten Zellen (Kontrolle) nur zu ca. 10% und 16% in der S-Phase bzw. in der G2/M-Phase des Cyclus. Im ersten Nachbehandlungscyclus proliferierten die CHO-HSV-TK Zellen zwar langsamer, replizierten sich dennoch (siehe auch Kap. 3.1.2.3). Ein weiterer Zellcyclus danach (24 h nach der Behandlung) proliferierten die Zellen deutlich langsamer; anstatt zweimal, haben sie sich während 24 Stunden nur einmal geteilt (verdoppelt), was in guter Übereinstimmung mit dem gehemmten Wachstum nach GCV-Behandlung ist (s. Abb.8). Ebenfalls 24 h nach der Behandlung fingen die Zellen an, den apoptotischen Weg (als "Apo" bezeichnet) einzuschlagen, was durch die Zunahme des Sub-G1 (Sub-2n)-Gehalts zu sehen ist. Nach späteren Zeiten (36 und 48h nach der Behandlung) akkumulierten die Zellen immer mehr im G2/M-Block und teilten sich nicht mehr; nach 72 h lagen 80% der Zellen apoptotisch vor. Die Progression der CHO-neo Zellen durch die

## Ergebnisse

einzelnen Phasen des Zellcyclus wurde nach der GCV-Behandlung nicht beeinflusst, und die Zellen zeigten keine Änderungen im Sub-G1-Gehalt, bzw. keine Apoptose (nicht gezeigt).

### **3.1.6.3. Aktivierung von Caspasen**

Nach Behandlung der CHO-HSV-TK-Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  GCV für 14 h wurden die Zellen nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet und die Aktivität der einzelnen Caspasen bestimmt (**Abb.17**).



**Abb.17. Zeitlicher Ablauf der Caspaseaktivierung nach Behandlung mit GCV.** CHO-HSV-TK Zellen wurden für 14 h mit 1  $\mu\text{M}$  GCV behandelt und nach verschiedenen Nachbehandlungszeiten für den Caspasentest geerntet.

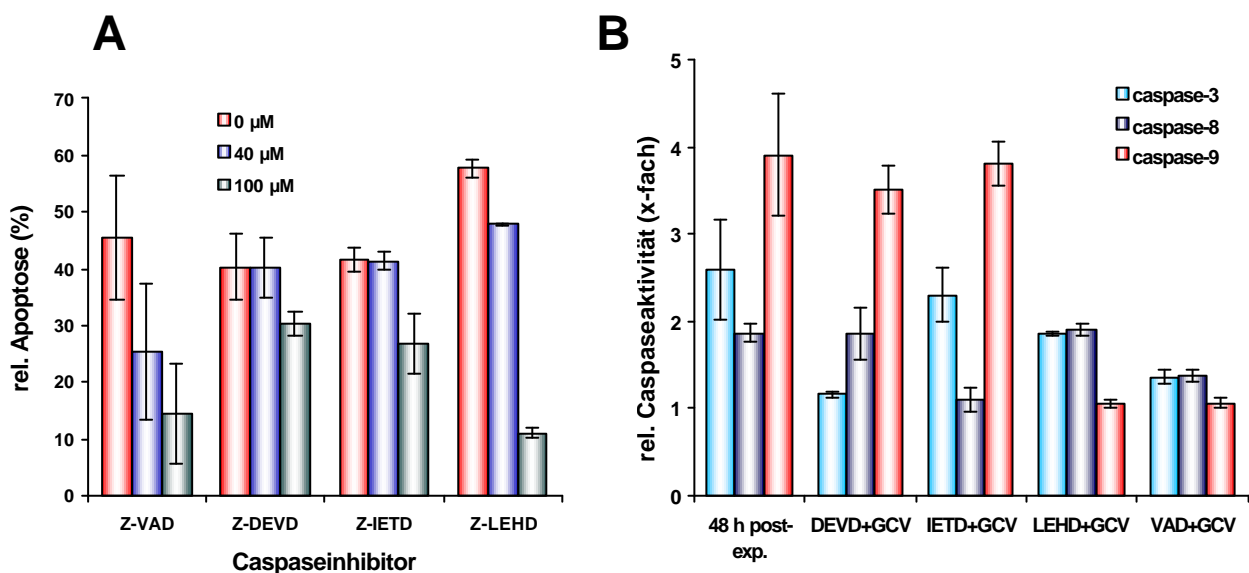
Die Aktivitätsbestimmungen zeigten, daß die Initialcaspasen Caspase-8 und Caspase-9 schon 14 h nach der Behandlung aktiviert wurden, während die Aktivierung der exekutiven Caspase-3 erst nach 24 h zu beobachten war. Die maximale Aktivierung der Caspase-8 (~2-fach) war schon nach 24 h zu beobachten und veränderte sich während den späteren Nachbehandlungszeiten nicht mehr. Im Gegensatz dazu wurde die maximale Aktivierung der Caspase-9 (4.5-fach) und der Caspase-3 (3-fach) erst 48 h nach der Behandlung erreicht und fiel zu späteren Zeiten wieder ab.

### **3.1.6.4. Inhibition der Apoptose durch den Einsatz von Caspaseinhibitoren**

Um festzustellen, ob und welche Caspasen an der GCV-angestörten Apoptose beteiligt sind, wurden CHO-HSV-TK-Zellen für 10 h mit unterschiedlichen Caspaseinhibitoren vorbehandelt und danach mit 1  $\mu\text{M}$  GCV für weitere 60 h inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der einzelnen Caspasen bestimmt (**Abb.18A**). Es wurden hierbei vier Caspaseinhibitoren eingesetzt, die sich hinsichtlich ihrer Substrat-Spezifität unterscheiden. Der allgemeine Caspaseinhibitor zVAD hemmt sowohl die Caspase-3, -8 und -9, während der Inhibitor zLEHD nur die Caspase-9, der Inhibitor zIETD nur die Caspase-8 und der Inhibitor zDEVD

## Ergebnisse

hauptsächlich die Caspasen 3 und 7 inhibiert. Die Apoptose wurde durch beide verwendeten zVAD-Konzentrationen (40 und 100  $\mu\text{M}$ ) inhibiert, wobei 100  $\mu\text{M}$  zVAD die Apoptose um 75% hemmte. Unter den gleichen Bedingungen wurden die Inhibitoren zLEHD, zIETD und zDEVD verwendet, wobei keiner dieser Inhibitoren bei einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  die Apoptose hemmte. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  inhibierte zLEHD die Apoptose um ~80%, was darauf hindeutete, daß diese Caspase bei der Initiation der Apoptose die Hauptrolle spielt. zIETD hemmte die Apoptose um 30%, was zeigte, daß es wahrscheinlich einen parallelen (Caspase-8-vermittelten) apoptotischen Weg gibt. zDEVD inhibierte die Apoptose nur um 20%, was darauf hindeutete, daß die Caspase-3 nicht die entscheidende Caspase bei der GCV-induzierten Apoptose in CHO-HSV-TK-Zellen ist. Die verwendeten Inhibitoren waren wirksam und spezifisch, denn sie zeigten Hemmung der betroffenen Caspase und wiesen keine Kreuzhemmung der anderen Caspasen auf, zumindest nicht bei der benutzten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (**Abb.18B**).



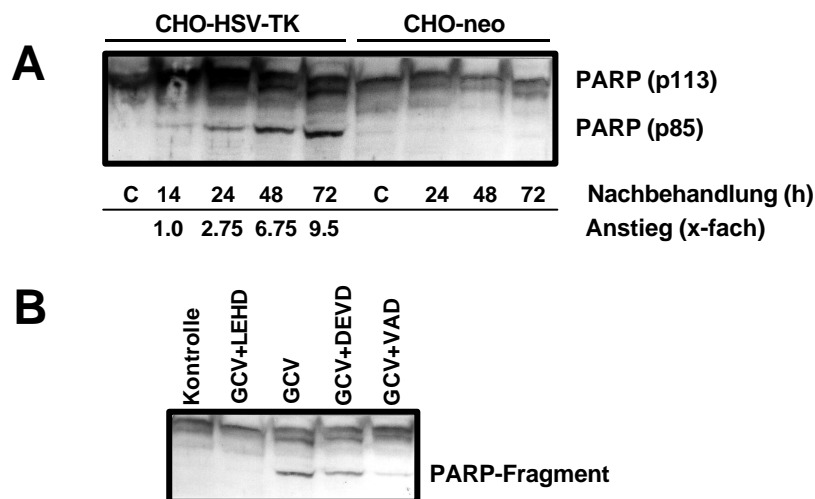
**Abb.18. Hemmung der Apoptose durch Caspaseinhibitoren.** (A) CHO-HSV-TK-Zellen wurden mit dem entsprechenden Inhibitor für 10 h vorbehandelt und anschließend 60 h mit 1  $\mu\text{M}$  GCV zusammen inkubiert. Danach wurden sie für die Apoptose-Messung mittels Annexin V geerntet. (B) Untersuchung der Spezifität der Inhibition durch Caspaseinhibitoren an Hand der Bestimmung der Caspasenaktivität nach der Co-Behandlung der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  GCV und dem entsprechenden Caspaseinhibitor.

### 3.1.6.5. Spaltung von PARP

Die Spaltung von intaktem PARP-Enzym (113 kDa) in zwei Fragmente von 85 kDa und 28 kDa wurde als Marker der eingeleiteten Apoptose in vielen Zelltypen nachgewiesen (Nicholson *et al.*, 1995). In den CHO-HSV-TK-Zellen wurde PARP relativ früh, schon 14 h nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  GCV, gespalten, was in der **Abb.19A** dargestellt ist. Das Spaltungsprodukt von 85 kDa konnte in der Western-Blott-Analyse mittels eines polyklonalen

## Ergebnisse

Antikörpers nachgewiesen werden, und akkumulierte nach späteren Nachbehandlungszeiten (24-72h nach der Behandlung) bis zum 9.5-fachen der Ausgangsmenge. In den CHO-neo-Zellen, die keine Apoptose zeigen, konnte hingegen keine PARP-Spaltung nachgewiesen werden. Die Hauptcaspase, durch die PARP gespalten wird, ist die Caspase-3. Sie ist aber nicht die einzige Caspase, die PARP spalten kann, auch für die Caspase-9 wurde gezeigt, daß sie PARP spalten kann (Duan *et al.*, 1996). Um festzustellen, durch welche Caspase in CHO-HSV-TK-Zellen nach der GCV-Behandlung PARP gespalten wird, wurden unterschiedliche Experimente mit Caspaseinhibitoren durchgeführt (**Abb.19B**). Es zeigte sich, daß der spezifische Caspase-9-Inhibitor (zLEHD), im Vergleich mit dem Caspase-3-ähnlichen Inhibitor (zDEVD), die PARP-Spaltung sehr effizient hemmte, weshalb man schlußfolgern kann, daß PARP in unserem System bevorzugt durch die Caspase-9 gespalten wird. Die Hemmung der PARP-Spaltung *via* den allgemeinen Caspaseinhibitor (zVAD) war signifikant und unterstützt unsere Ergebnisse, da zVAD ein besserer Hemmer der Caspase-9 (und Caspase-8), als der Caspase-3 /-7 (Slee *et al.*, 1996) ist.



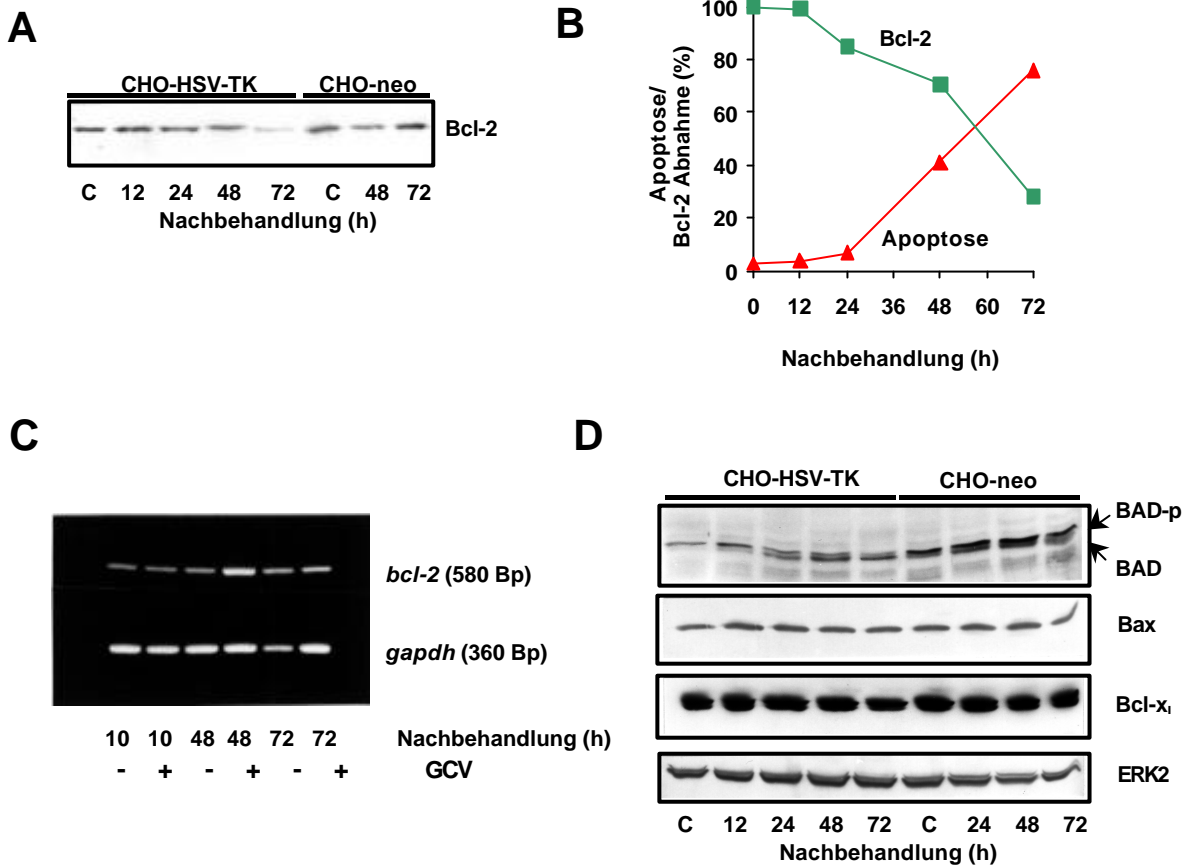
**Abb.19. Hemmung der GCV-induzierten PARP-Spaltung durch Caspaseinhibitoren.** (A) CHO-HSV-TK-Zellen wurden für 14 h mit 1  $\mu$ M GCV inkubiert und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. (B) CHO-HSV-TK-Zellen wurden 10 h mit Caspaseinhibitoren vorbehandelt, 60 h mit 1  $\mu$ M GCV inkubiert und anschließend geerntet. Aus den Zellen (A und B) wurden Gesamtproteinextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels eines polyklonalen anti-PARP-Antikörpers.

### **3.1.6.6. Charakterisierung der Expression der Proteine aus der Bcl-2-Familie**

Um festzustellen, welche apoptotische Funktionen neben der Aktivierung der Caspasen eine Rolle bei der GCV-induzierten Apoptose spielen, wurde die Expression von Proteinen aus der Bcl-2-Familie untersucht (**Abb.20**). Zuerst wurde die Expression von Bcl-2 nach der Behandlung mit 1  $\mu$ M GCV mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Es zeigte sich, daß im Zeitraum von 24-72 h nach der Behandlung, die Bcl-2-Expression stark abgenommen hat, was in der CHO-neo-Kontrolle nicht zu beobachten war (**Abb.20A**). Die Zeit der Bcl-2-

## Ergebnisse

Abnahme korrelierte dabei mit der Zeit der Apoptose-Induktion (**Abb.20B**). Die Menge der *bcl-2*-mRNA veränderte sich in den behandelten und unbehandelten Zellen nicht, was mittels RT-PCR-Analyse untersucht wurde (**Abb.20C**). Dies stimmt mit aus der Literatur bekannten Daten überein, die zeigten, daß Bcl-2 hauptsächlich post-translational reguliert wird (Haldar *et al.*, 1995; Dimmeler *et al.*, 1999).



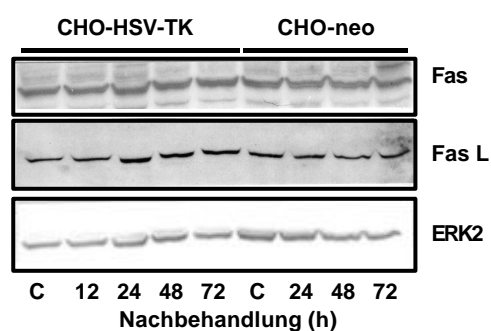
**Abb.20. Expression von Proteinen aus der Bcl-2-Familie.** (A) CHO-neo und CHO-HSV-TK-Zellen wurden für 14 h mit 1  $\mu$ M GCV inkubiert und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtproteinextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels eines polyklonalen anti-Bcl-2 Antikörpers. (B) Die Abnahme der Bcl-2 Proteinmenge wurde graphisch im Vergleich zur Induktion der Apoptose (Daten aus Abb.14) dargestellt. (C) CHO-HSV-TK-Zellen wurden für 14 h mit 1  $\mu$ M GCV inkubiert und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamt-RNA-Extrakte isoliert und zur RT-PCR eingesetzt. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte mittels DNA-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung. (D) CHO-neo und CHO-HSV-TK-Zellen wurden für 14 h mit 1  $\mu$ M GCV inkubiert und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtproteinextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Antikörper gegen BAD, Bax und Bcl-x<sub>L</sub>. Die Inkubation mit einem anti-ERK2-Antikörper diente als interne Beladungskontrolle.

## Ergebnisse

Zusätzlich wurde auch die Expression weiterer apoptotischer Proteine aus der Bcl-2-Familie, wie des anti-apoptotischen Bcl-x<sub>L</sub>-Proteins und des pro-apoptotischen Bax- und BAD-Proteins, untersucht (**Abb.20D**). Die Western-Blot-Analyse zeigte, daß sich die Expression von Bcl-x<sub>L</sub> und Bax nicht verändert hat, während das BAD-Protein in zwei Formen detektiert werden konnte. Die hyperphosphorylierte Form von BAD war stärker in den nicht-apoptotischen CHO-neo-Zellen als in den apoptotischen CHO-HSV-TK-Zellen zu detektieren. In den CHO-HSV-TK-Zellen wurde das BAD-Protein teilweise dephosphoryliert, bzw. die hypophosphorylierte Form von BAD nahm im Lauf der Apoptose (48-72 h nach der GCV-Behandlung) immer mehr zu.

### **3.1.6.7. Aktivierung von Fas/FasL**

Da es sich in unseren Versuchen zeigte, daß auch die Caspase-8 durch die GCV-Behandlung in den CHO-HSV-TK-Zellen aktiviert wird (s. Abb.16), wurde untersucht, ob sich auch die Expression des CD95-Rezeptors (Fas) und des CD95-Ligandes (FasL), über welche der Aktivierungsweg der Caspase-8 erfolgt, verändert. Hierzu wurden CHO-neo und CHO-HSV-TK-Zellen für 14 h mit 1 µM GCV inkubiert und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten mittels Western-Blot-Analyse die Expression der Proteine Fas und FasL bestimmt (**Abb.21**). Es zeigte sich, daß die Fas-Expression unverändert blieb, während sich die Expression des Liganden 12–24 h nach Behandlung mit GCV um ~ das 2-fache erhöhte und danach (bis zu 72 h) konstant blieb.

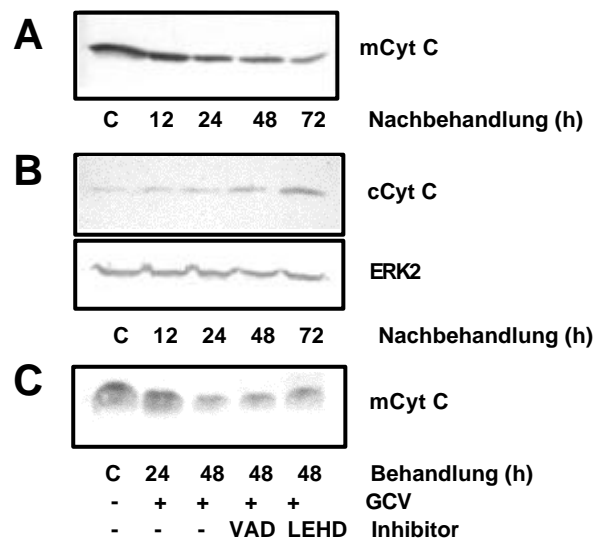


**Abb.21. Expression des Fas-Rezeptors und des Fas-Liganden.** CHO-neo und CHO-HSV-TK-Zellen wurden für 14 h mit 1 µM GCV inkubiert und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Es wurden Gesamtproteinextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Antikörper gegen Fas und FasL. Die Inkubation mit einem anti-ERK2-Antikörper diente als interne Beladungskontrolle.

## Ergebnisse

### 3.1.6.8. Freisetzung von Cytochrom C

Eines der wichtigsten apoptotischen Merkmale, welche die Integrität der Mitochondrien betreffen, ist die Freisetzung von Cytochrom C (Cyt C) aus den Mitochondrien in das Cytosol (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998). Die Freisetzung ist normalerweise ein frühes Ereignis, das vor der Abnahme des mitochondrialen Potentials auftritt. Zur Untersuchung der Freisetzung von Cytochrom C wurden CHO-HSV-TK-Zellen für 14 h mit 1  $\mu$ M GCV behandelt und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten parallel mitochondriale und cytosolische Extrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt (**Abb.22**). In den CHO-HSV-TK-Zellen konnte schon bei einer Nachbehandlungszeit von 12 h eine Cyt C-Freisetzung beobachtet werden, was in guter Korrelation mit der Aktivierung der Caspase-9 steht. Es ist bekannt, daß Caspase-9 durch die Bildung eines Komplexes, der aus Procaspase-9, Apaf-1, Cyt C und ATP besteht, aktiviert wird (Li *et al.*, 1997). Parallel zur Abnahme der Cytochrom C-Menge in den mitochondrialen Extrakten sieht man, daß sich das freigesetzte Cyt C in der cytosolische Fraktion anreichert. Interessanterweise wurde die Freisetzung von Cyt C durch die Inhibition der Caspasen (*via* zVAD oder zLEHD) nicht gehemmt, was darauf hin deutet, daß die initiale Freisetzung von Cyt C unabhängig von Caspasen abläuft.

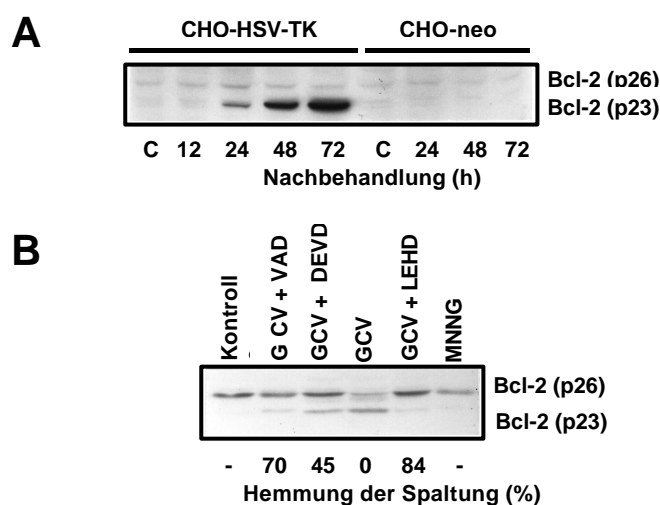


**Abb.22. Intrazelluläre Lokalisation des Cytochrom C.** CHO-HSV-TK-Zellen wurden für 14 h mit 1  $\mu$ M GCV inkubiert und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. Es wurden mitochondriale Extrakte (A) und cytosolische Extrakte (B) isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Antikörper gegen Cytochrom C. Die Inkubation mit einem anti-ERK2-Antikörper diente als interne Beladungskontrolle. (C) CHO-HSV-TK-Zellen wurden für 10 mit unterschiedlichen Caspaseinhibitoren inkubiert, anschließend für 14 h mit 1  $\mu$ M GCV inkubiert und für unterschiedliche Zeiten ohne Mediumwechsel weiterkultiviert. Es wurden mitochondriale Extrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Antikörper gegen Cytochrom C.

## Ergebnisse

### 3.1.6.9. Caspase-vermittelte Spaltung von Bcl-2

Wie bereits angedeutet, wird die Abnahme des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins wahrscheinlich post-translational reguliert (s. Kap. 3.1.6.6.). Mittels eines polyklonalen anti-Bcl-2-Antikörpers konnte festgestellt werden, daß 24 h nach GCV-Behandlung das Auftreten eines Bcl-2-Spaltungsproduktes von 23 kDa zu beobachten ist (**Abb.23A**). Der monoklonale Antikörper war hingegen nur in der Lage, intaktes Bcl-2-Protein (26 kDa) zu detektieren (s. Abb.19), während der polyklonale Antikörper nur ein schwaches Signal für das intakte Protein gab. Das 23 kDa-Spaltungsfragment nahm allmählich zu und akkumulierte stark in den CHO-HSV-TK-Zellen nach einer Nachbehandlungszeit von 72 h. Die CHO-neo-Kontrolle wies hingegen keine Spaltung des Bcl-2-Proteins nach GCV-Behandlung auf.

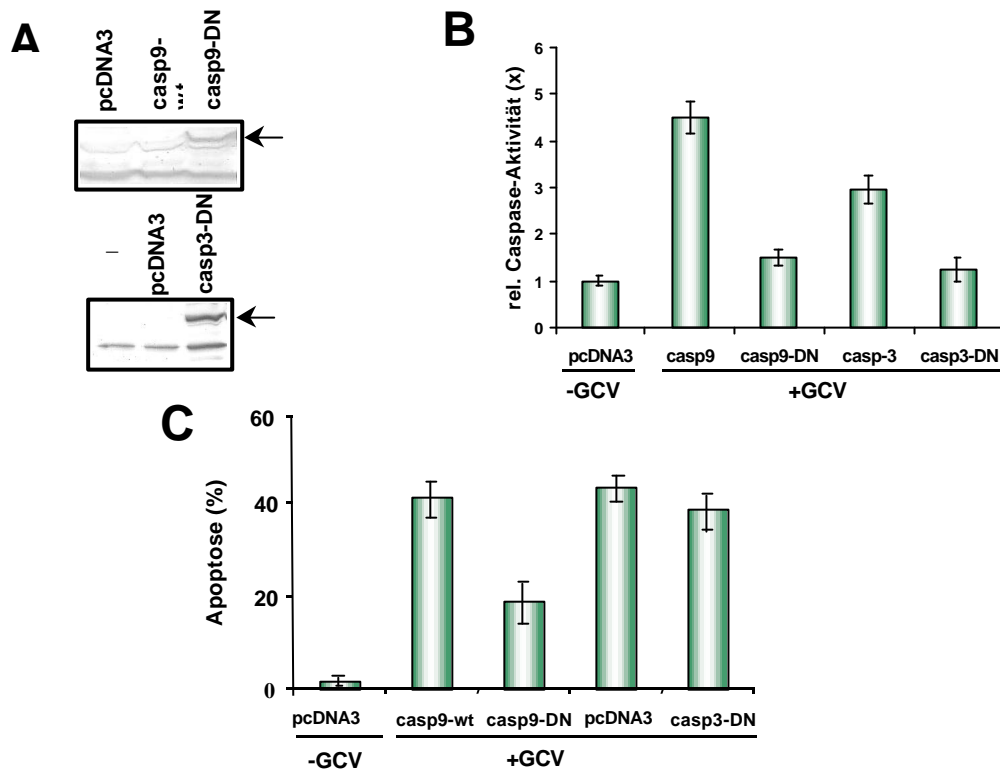


**Abb.23. Caspasen-vermittelte Spaltung des Bcl-2 Proteins.** (A) CHO-HSV-TK-Zellen wurden für 14 h mit 1  $\mu$ M GCV inkubiert und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten geerntet. (B) CHO-HSV-TK-Zellen wurden für 10h mit unterschiedlichen Caspaseinhibitoren inkubiert und anschließend für 60 h mit 1  $\mu$ M GCV inkubiert. Aus den Zellen aus A und B wurden Gesamtextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen Bcl-2.

Da bekannt ist, daß Caspase-3 das Bcl-2-Protein spalten kann (Cheng *et al.*, 1997), wurden Experimente mit Caspaseinhibitoren durchgeführt, um unsere Annahme über die Beteiligung der einzelnen Caspasen bei der Spaltung von Bcl-2 zu bestätigen. Die in **Abb.23B** dargestellte Ergebnisse zeigten, daß die Spaltung von Bcl-2 viel effizienter durch die Inhibition der Caspase-9 (zLEHD; Inhibition von 84%) als der Caspase-3 (zDEVD; Inhibition von 45%) hemmbar war. Der allgemeine Caspaseinhibitor (zVAD) konnte die Spaltung zu 70% hemmen. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß das Bcl-2-Protein durch die Caspase-9 direkt gespalten wurde. Dieser in der Literatur bisher noch nicht beschriebene Befund, daß die Caspase-9 eine ähnliche Rolle wie Caspase-3 bei der Spaltung von Bcl-2 einnimmt, veranlaßte uns, in den folgenden Experimenten ausführlicher die Rolle der Caspase-9 während der GCV-induzierten Apoptose zu untersuchen.

**3.1.6.10. Trans-dominante Hemmung der Caspase-9 inhibiert die Apoptoseinduktion nach Behandlung mit GCV**

Um weiterhin die Rolle der Caspase-9 in der GCV-induzierten Apoptose aufzuklären, wurde die Caspase-9-Aktivität durch transiente Transfektion der Wildtyp-Caspase-9 (Casp9-wt), einer dominant-negativen Caspase-9 (Casp9-DN) und einer dominant-negativen Caspase-3 (Casp3-DN) moduliert (s. Kapitel 2.1.8.). In den **Abb.24A** und **B** sind die Expression der transient transfizierten Caspasen mit den entsprechenden anti-Flag oder anti-AU1-Antikörpern, sowie die Aktivität im Caspaseaktivitätstest dargestellt.



**Abb.24. Expression und Aktivität von unterschiedlichen Caspase-Varianten.** CHO-HSV-TK-Zellen wurden mit Flag-tag-Wildtyp-Caspase-9 (Casp9-wt), Flag-tag-dominant-negativer Caspase-9 (Casp9-DN) und AU1-tag dominant-negativer Caspase-3 (Casp3-DN) transient transfiziert. (A) Gesamtextrakte wurden isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels monoklonaler Antikörper gegen Flag und AU1. Die exprimierten Proteine sind mit einem Pfeil markiert. (B) Die transient transfizierten Zellen wurden für 60 h mit 1  $\mu$ M GCV inkubiert, es wurden Gesamtextrakte isoliert und die Aktivität der Caspasen 3 und 9 bestimmt. (C) Die transient transfizierten Zellen wurden für 60 h mit 1  $\mu$ M GCV inkubiert und die Apoptoserate bestimmt.

In einem weiteren Versuch wurden die transient transfizierten Zellen für 60 h mit 1 $\mu$ M GCV behandelt und die Induktion der Apoptose mittels Annexin V-Assays bestimmt (**Abb.24C**). Die Expression der Casp9-wt war relativ schwach (s. Abb.24A) und führte deswegen nicht zu einer signifikanten Steigerung der GCV-induzierten Apoptose. Die Expression der Casp9-DN reduzierte die GCV-induzierte Apoptose um ca. 50%. Im Gegenteil dazu, wurde die Apoptose durch die Expression der Casp3-DN nur marginal reduziert. Dieses Ereignis stimmt mit den

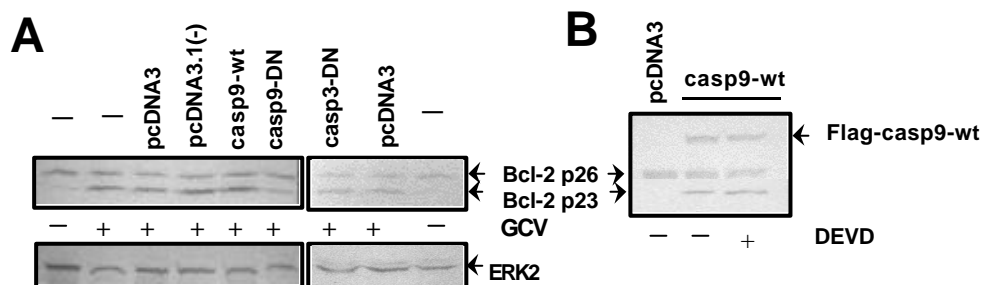
## Ergebnisse

Ergebnissen überein, die mit dem Caspase-3-Inhibitor (zDEVD) erhalten wurden, durch welchen die GCV-induzierte Apoptose um nur 20% reduziert wurde (s. Abb.18A).

### 3.1.6.11. Trans-dominante Hemmung der Caspase-9 inhibiert die Bcl-2-Spaltung

Zur weiteren Bestätigung der Rolle von Caspase-9 bei der Spaltung von Bcl-2, wurden CHO-HSV-TK-Zellen erneut transient mit Wildtyp-Caspase-9 (Casp9-wt), dominant-negativer Caspase-9 (Casp9-DN) und dominant-negativer Caspase-3 (Casp3-DN) transfiziert<sup>^</sup> und für 60 h mit 1  $\mu$ M GCV inkubiert. Zellextrakte wurden isoliert und die Spaltung des Bcl-2-Proteins mittels Western-Blot-Analyse untersucht (**Abb.25A**). Es zeigte sich hierbei, daß nur die Transfektion mit dominant-negativer Caspase-9 die GCV-induzierte Bcl-2-Spaltung signifikant reduzieren kann.

In weiteren Experimenten wurde versucht, die in CHO-HSV-TK-Zellen durch GCV induzierten Prozesse zu imitieren. Hierzu wurde die aktive Form der Caspase-9 (Casp9-wt) in den Zellen überexprimiert und die GCV-induzierte Spaltung von Bcl-2 in Anwesenheit und Abwesenheit vom Caspase-3-Inhibitor (zDEVD) getestet. Das Ergebnis ist in der **Abb.25B** dargestellt worden. Die Western-Blot-Analyse zeigte, daß das Bcl-2-Protein in beiden Fällen gespalten wurde, was darauf hindeutet, daß Bcl-2 durch die Caspase-9 ohne Mitwirkung der aktiven Caspase-3 gespalten werden kann.



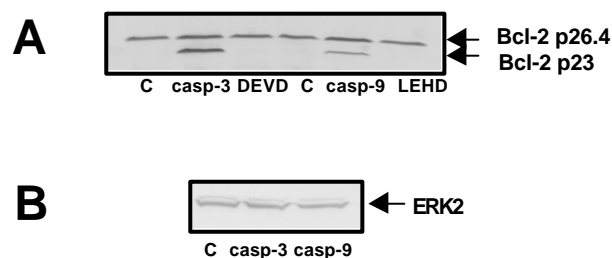
**Abb.25. Auswirkung der Expression von Caspase-Varianten auf die Bcl-2-Spaltung.** (A) CHO-HSV-TK-Zellen wurden mit Wildtyp-Caspase-9 (Casp9-wt), dominant-negativer Caspase-9 (Casp9-DN) und dominant-negativer Caspase-3 (Casp3-DN) transient transfiziert. Die Zellen wurden für 60h mit 1 $\mu$ M GCV behandelt, Gesamtextrakte wurden isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels polyklonaler Antikörper gegen Bcl-2. (B) CHO-HSV-TK-Zellen wurden mit Wildtyp-Caspase-9 (Casp9-wt) transient transfiziert. Die Zellen wurden 60 h mit 1 $\mu$ M GCV mit oder ohne Caspase-3-Inhibitor (DEVD) behandelt. Danach wurden Gesamtextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels polyklonaler anti-Bcl-2-Antikörper. Die Inkubation mit einem anti-ERK2-Antikörper diente als interne Beladungskontrolle.

<sup>^</sup> Die Vektoren Casp9-wt, Casp9-DN und Casp3-DN wurden freundlicherweise von Dr. Vincenz (Michigan, USA) zur Verfügung gestellt.

## Ergebnisse

### **3.1.6.12. *In vitro* Spaltung von Bcl-2**

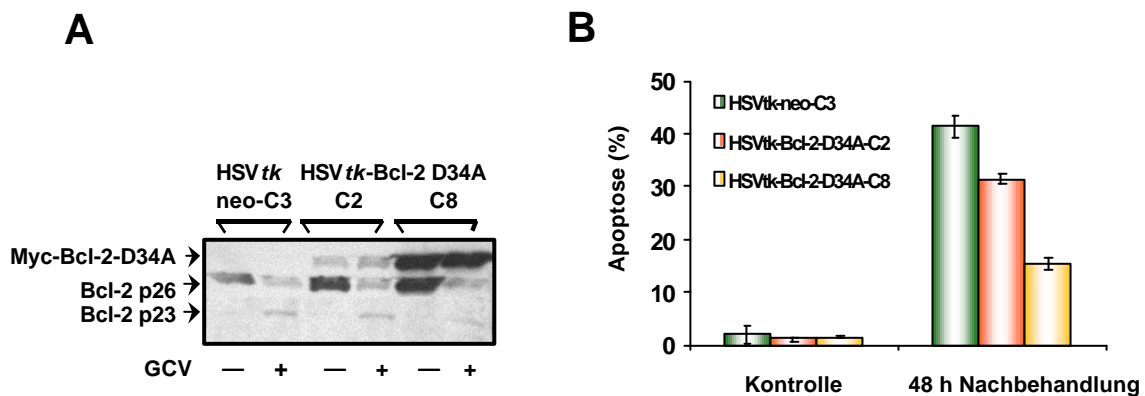
Um den in den Zellen (*in vivo*) beobachteten Einfluß der Caspase-9 auf die Bcl-2-Spaltung zu unterstützen, wurde die Spaltung von rekombinatem Hamster-Bcl-2-Protein (s. Kap. 3.2.) in einem *in vitro* Versuch mit rekombinanten, aktiven Caspasen 3 und 9 detektiert (**Abb.26**). Es zeigte sich, daß das Bcl-2-Protein durch beide Caspasen gespalten wird (Tomicic & Kaina, 2001). Die Spaltung durch Caspase-3 war jedoch unter den gleichen Versuchsbedingungen effektiver, was zu erwarten war, da das Bcl-2-Protein des Hamsters eine konservierte Caspase-3-Schnittstelle besitzt, an dem die Spaltung erfolgt (siehe Kapitel 3.2.1.). Die etwas schwächere Spaltung des Bcl-2-Proteins durch die Caspase-9 erfolgt wahrscheinlich an gleicher Stelle in der Bcl-2-Sequenz, weswegen sowohl bei der Spaltung durch die Caspase-3 als auch bei der Spaltung durch die Caspase-9 Bcl-2-Fragmente von gleichem Molekulargewicht (23 kDa) zu sehen sind. Die Caspase-vermittelte Spaltung wurde durch den Einsatz spezifischer Caspaseinhibitoren (zDEVD und zLEHD) bestätigt. Als Kontrolle der spezifischen Caspase-vermittelten Spaltung wurde das rekombinante ERK2-Protein unter den gleichen Bedingungen eingesetzt, welches durch keine der beiden Caspasen gespalten wurde (**Abb.26B**).



**Abb.26. *In vitro* Spaltung von Bcl-2 durch Caspasen.** (A) Rekombinantes Hamster-Bcl-2-Protein (p26.4) wurde mit rekombinanter Caspase-3 (casp-3) und Caspase-9 (casp-9) in Gegenwart oder Abwesenheit von spezifischen Caspaseinhibitoren (DEVD, Caspase-3-Inhibitor; LEHD, Caspase-9-Inhibitor) inkubiert. Die *in vitro* Spaltung von Bcl-2 liefert ein kleineres Fragment, welches als Bcl-2 p23 gekennzeichnet ist. (B) Rekombinantes ERK2-Protein wurde im selben Versuch als negative Kontrolle der Spaltung eingesetzt.

**3.1.6.13. Hemmung der GCV-induzierten Apoptose durch Überexpression von punkt-mutiertem humanen Bcl-2-Protein**

Um zu bestätigen, daß Bcl-2 an der Caspase-3-Schnittstelle gespalten wird und das Bcl-2-Fragment (Bcl-2 p23) pro-apoptotisch wirkt, wurde in CHO-HSV-TK Zellen humanes Bcl-2-Protein überexprimiert, dessen Sequenz eine Punktmutation in der Caspase-3-Schnittstelle (Bcl-2-D34A; D→A; Dimmeler *et al*, 1999) trägt<sup>^</sup>. Es wurden stabilen Transfektanten hergestellt und die Expression des Myc-tag-Bcl-2-D34-Proteins mittels Western-Blot-Analyse überprüft. Die überexprimierte Form von ca. 30 kDa war leicht von der endogenen Form des Bcl-2-Proteins von ca. 26 kDa (Bcl-2 p26) unterscheidbar. Zwei Klone wurden ausgewählt und mit GCV behandelt. Anschließend wurden Gesamtextrakte isoliert und die Expression der exogenen, endogenen und gespaltenen Form des Bcl-2-Proteins mittels Western-Blot-Analyse bestimmt (**Abb.27A**). Es zeigte sich dabei, daß mutiertes Myc-tag-Bcl-2-D34A-Protein, in dem die intakte Caspase-3-Schnittstelle nicht mehr vorhanden ist, nach der Behandlung mit GCV ungespalten vorliegt. Das weist daraufhin, daß diese Caspase-3-Schnittstelle in der Bcl-2-Sequenz tatsächlich nach einer GCV-Behandlung von den Caspasen verwendet wird. Zusätzlich wurde die Apoptose-Frequenz in den Transfektanten mittels Annexin V-Assays 48 h nach der GCV-Behandlung bestimmt (**Abb.27B**). Die Transfektion von nicht inaktivierbarem, punkt-mutiertem Myc-tag-Bcl-2-D34A-Protein führte zu einer signifikanten Reduktion der GCV-induzierten Apoptose. Dies unterstützt erneut, daß die Spaltung und damit die Inaktivierung von Bcl-2 zum Auslösen der Apoptose führt.



**Abb.27. Auswirkung der Expression des punkt-mutierten Bcl-2-Proteins auf die Bcl-2-Spaltung und die Induktion der Apoptose.** (A) Die stabil transfizierten Zellen wurden mit 1 µM GCV für 14 h behandelt. 48 h danach wurden Gesamtextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Bcl-2 eingesetzt. (B) Unter den gleichen Bedingungen der Behandlung wurde die Apoptose induziert und mittels Annexin V-Färbung 48 h nach der Behandlung bestimmt.

<sup>^</sup> Der Myc-His-tag-Bcl-2-D34A-Vektor wurde uns freundlicherweise von Dr. S. Dimmeler (Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

## 3.2. Klonierung und Expression des Hamster-Bcl-2-Proteins

### 3.2.1. Klonierung der *bcl-2*-cDNA des Chinesischen Hamsters

Die Klonierung der *bcl-2*-cDNA des Chinesischen Hamsters (*Cricetulus longicaudatus*) erfolgte über RT-PCR-Amplifikation der aus CHO-9-Zellen isolierten Gesamt-RNA. Die Primer wurden anhand eines Vergleichs der bereits bekannten Bcl-2-Sequenzen von Mensch, Maus und Ratte ausgesucht und sind in Kapitel 2.1.9. dargestellt. Es wurden drei PCR-Produkte isoliert: ein PCR-Produkt von 583 Bp (-6 bis 577; Primerpaar 5'-CHO-Bcl-2 / 3'-CHO-Bcl-2), das eine verkürzte cDNA kodiert, und zwei PCR-Produkte von 771 Bp (-6 bis 765; Primerpaar 5'-CHO-Bcl-2 / 3'-CHO-Bcl-2-nSTOP) und 860 Bp (-95 bis 765; Primerpaar 5'-CHO-Bcl-2-nT / 3'-CHO-Bcl-2-nSTOP), die eine vollständige cDNA kodieren. Die zwei PCR-Produkten mit der vollständigen *bcl-2*-cDNA wurden in den pCR4-TOPO-Vektor (Invitrogene) kloniert. Die PCR-Produkte an sich und die rekombinanten Konstrukte pCR4-TOPO-Bcl-2 wurden sequenziert, um zu verifizieren, daß die klonierte cDNA für das Bcl-2-Protein des Chinesischen Hamsters kodiert. Die Nukleotidsequenz und die abgeleitete Proteinsequenz des positiven Klons, der das größte PCR-Produkt (860 Bp) enthält, ist in **Abb.28** dargestellt. Der kodierende *bcl-2*-Bereich enthält 711 Bp, die in das Hamster-Bcl-2-Protein von 236 As mit einem Molekulargewicht von 26.4 kDa translatiert werden.

```

caccocctcatccaagaatgcaaaagcacatccaataaaaagactggatt          -90
ataactatattttttttttttttggggctgtggggcgggagtcaggacgagaagtgtgtgatatacctgcagcttttttttcggggaagg    0

ATGGCTCAAGCTGGGAGAACAGGGTATGATAACCGAGAGATCGTGATGAAGTACATCCATTATAAGCTGTCACAGAGGGGCTACGAGTGG  90
M A Q A G R T G Y D N R E I V M K Y I H Y K L S Q R G Y E W

GATGTGGGAGATGTGGACGCGCGCCCTGGGCGCCGCCACCCTGGCATCTTCTCCTCCAGCCTGAGAGCAACCCAAACGCCCGCT 180
D V G D V D A A P L G A A P T P G I F S F Q P E S N P T P A

GTGCACCGGGACATGGCTGCCAGGACATCGCCACTAAGGCCATAGTCGCCACCACTGGGCGCTACCCCTTAGCCCGTGCCACCTGTGGTC 270
V H R D M A A R T S P L R P I V A T T G P T L S P V P P V V

CACCTGACCCCTCCGCGGGCTGGGGATGACTTCTCCGCTCGCTACCGTCGCGACTTCGCGGAGATGTCCAGTCAGCTGCACCTGACGCCCC 360
H L T L R R A G D D F S R R Y R R D F A E M S S Q L H L T P

TTCACCGCGAGGGGACGCTTTTGCTACGGTGGTGGAGAACTCTTCAGGGATGGGGTGAAGTGGGGGAGGATTTGGCCCTTCTTTGAGTTC 450
F T A R G R F A T V V E E L F R D G V N W G R I V A F F E F

GGTGGGGTCATGTGTGTGGAGAGCGTCAACAGGGAGATGTCACCCCTGGTGACACATCGCCCTGTGGATGACCGAGTACCTGAACCGG 540
G G V M C V E S V N R E M S P L V D N I A L W M T E Y L N R

CATCTGCACACCTGGATCCAGGATAACGGAGGCTGGGACGCATTTGTGGAAGTGTACGGCCCCAGTGTGAGGCCTCTGTTTGATTCTCT 630
H L H T W I Q D N G G W D A F V E L Y G P S V R P L F D F S

TGGCTGTCTCTGAAGACCCCTGCTCAGCCTGGCCCTGGTGGGCGCTGCATCACTCTGGGTACCTACCTGGGCCACAAGTGAaggtccacag 720
W L S L K T L L S L A L V G A C I T L G T Y L G H K

acctgctccccaaaatgcaaaaggttcactaaagcagtag                    765

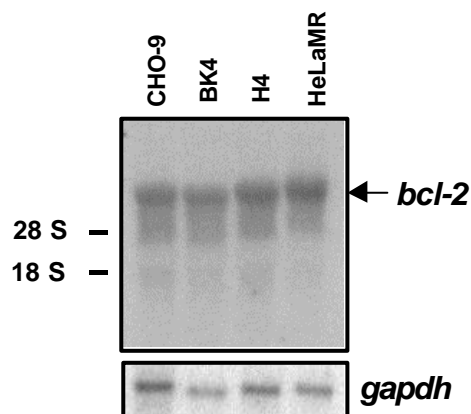
```

**Abb.28. Nukleotidsequenz der *bcl-2*-cDNA und die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hamster Bcl-2-Proteins (EMBL Acc. Nos. AJ271720/CLO271720).** Großbuchstaben in der Nukleotidsequenz repräsentieren den kodierenden Bereich von 711 Bp; Kleinbuchstaben in blau repräsentieren den nicht-kodierenden Bereich. Die kodierende Sequenz, Start- und Stop-Kodon (in rot) sind durch einen Vergleich der Hamster- Nukleotidsequenz mit den bekannten *bcl-2*-Sequenzen von Maus, Ratte und Mensch identifiziert worden. Großbuchstaben in kursiv zeigen die abgeleitete Bcl-2-Proteinsequenz.



### 3.2.2. Expression von Bcl-2-mRNA in Säugerzellen

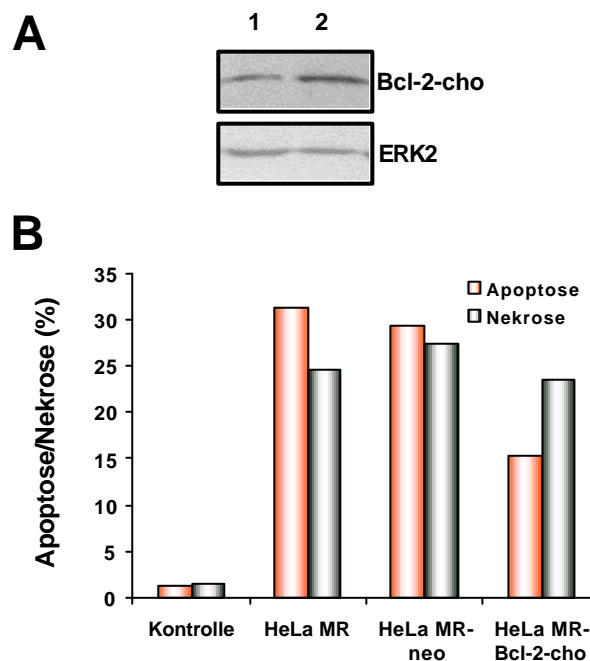
Zum Vergleich der Größe der *bcl-2*-mRNA-Transkripte wurde die Gesamt-RNA aus verschiedenen Säugerzelllinien (CHO-9, BK4, H5 und HeLa MR) isoliert und in einer Northern-Blot-Analyse eingesetzt. Der Filter mit der geblotteten RNA wurde mit den <sup>32</sup>P-radioaktiv markierten *bcl-2*-Fragmenten von 583 und 771 Bp (s. Kapitel 3.2.1) hybridisiert. Die Kreuz-Hybridisierung zeigte bei allen Zelllinien eine einzige Bande, die dem *bcl-2*-Transkript entsprach (**Abb.30**). Die *bcl-2*-Transkripte in Zelllinien des Hamsters (CHO-9), der Maus (BK4) und der Ratte (H5) besaßen ein Molekulargewicht von ~7.5 kBp, das in HeLa MR-Zellen detektierte humane *bcl-2*-Transkript war geringfügig größer und besaß ein Molekulargewicht von ~8.5 kBp. Die für die *bcl-2*-mRNA von Maus, Ratte und Mensch bestimmte Größe stimmt mit den veröffentlichten Daten überein (Negrini *et al.*, 1986; Tsujimoto & Croce, 1986; Cleary *et al.*, 1986; Sato *et al.*, 1994). Da in der Northern-Blot-Analyse bei allen untersuchten Zelllinien nur ein Transkript sichtbar war, bzw. nur das große *bcl-2*-Transkript synthetisiert wurde, kann angenommen werden, daß nur eine Form des Bcl-2-Proteins (Bcl-2 $\alpha$ ) translatiert wurde. Das kürzere Transkript, das für das Bcl-2-Protein von 22 kDa kodiert (Bcl-2 $\beta$ ), konnte nicht detektiert werden.



**Abb.30. Northern-Blot-Analyse von *bcl-2*-mRNA aus vier Säugerzelllinien.** Ein Aliquot von 10  $\mu$ g der Gesamt-RNA von Hamster (CHO-9), Maus (BK4), Ratte (H5) und Mensch (HeLa MR)-Zelllinien wurden mit <sup>32</sup>P-radioaktiv markierten PCR-amplifizierten (583 und 771 Bp) *bcl-2*-Fragmenten des Hamsters hybridisiert. *Bcl-2*-Transkripte von ~ 7.5 kBp (CHO-9, BK4, H5) und ~8.5 kBp (HeLa MR) sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die 28S rRNA entspricht einer Größe von 5.3 kBp und die 18S rRNA einer Größe von 2.0 kBp. Der Filter wurde mit der *gapdh*-cDNA rehybridisiert, welches als Beladungskontrolle diente.

### 3.2.3. Protektive Wirkung vom Hamster Bcl-2-Protein gegenüber alkylierungsinduzierter Cytotoxizität

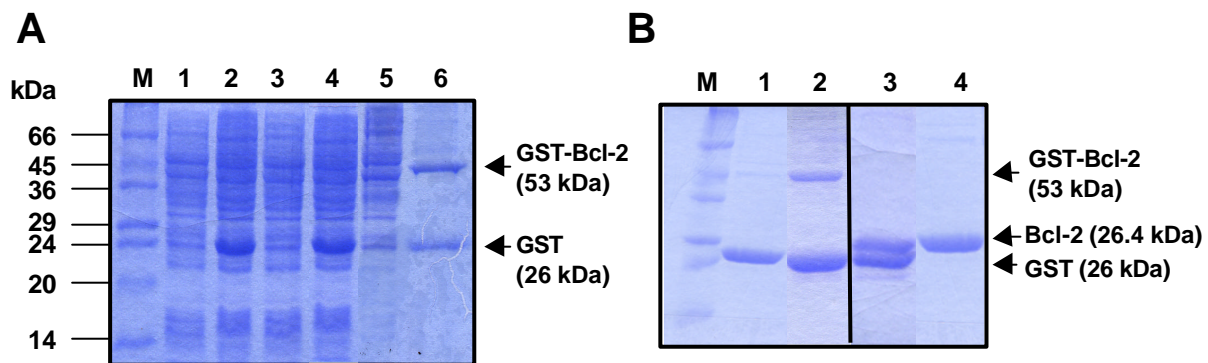
Um zu bestimmen, ob das klonierte Bcl-2-Protein vom Hamster seine biologische Funktion ausübt, bzw. die Zellen vor der Apoptose schützt, wurde die komplette *bcl-2*-cDNA (771 Bp) über die *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle in einen Expressionsvektor für Säugerzellen (pcDNA3) umklontiert und der rekombinante Vektor in HeLa MR-Zellen transient exprimiert (**Abb.31A**). Die Bcl-2-transfizierten HeLa MR-Zellen zeigten eine vier-fache Bcl-2- Expression im Vergleich zu pcDNA3-transfizierten HeLa MR-Zellen (neo-Kontrolle). Die neo-Kontrolle und die Bcl-2-transfizierten HeLa MR-Zellen wurden mit 2  $\mu$ M MNNG behandelt und nach 60 h für die Bestimmung der Apoptose und Nekrose (Annexin V/PI - Färbung) eingesetzt (**Abb.31B**). Die Frequenz der Apoptose wurde in HeLa MR-Zellen, welche das Hamster-Bcl-2-Protein exprimieren, um etwa 50% reduziert, was zeigt, daß das exprimierte Bcl-2-Protein biologisch aktiv ist. Zusätzlich ist der Versuch ein Beweis dafür, daß Hamster-Bcl-2-Protein auch in humanen Zellen funktionell aktiv ist, indem es Alkyltransferase (MGMT)-defiziente HeLa MR-Zellen vor der O<sup>6</sup>-MeG-induzierten Apoptose schützt.



**Abb.31. Auswirkungen der Expression des Hamster-Bcl-2-Proteins auf die alkylierungsinduzierte Cytotoxizität in HeLa MR-Zellen.** (A) Aus transient transfizierten HeLa MR-Zellen wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. 1, HeLa MR-neo (pcDNA3 transfiziert); 2, HeLa MR-Bcl-2-cho (pcDNA-Bcl-2-cho transfiziert). Die densitometrische Analyse erfolgte mittels des Software-Programms Bioimage, und zeigte eine vierfache Zunahme der Bcl-2-Protein-Expression im Vergleich zur neo-Kontrolle. Die Inkubation des Filters mit dem anti-ERK2-Antikörper diente als interne Beladungskontrolle. (B) Die transient transfizierten HeLa MR-Zellen wurden mit 2  $\mu$ M MNNG behandelt und 60 h später wurde in den geernteten Zellen die Apoptose mittels Annexin V-Färbung bestimmt. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

### 3.2.4. Herstellung und Thrombin-Spaltung des GST-Bcl-2-Fusionsproteins

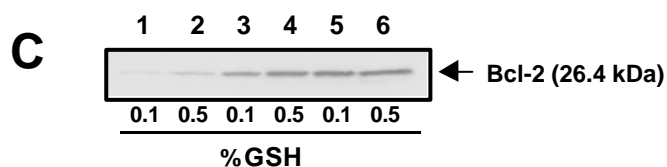
Um das Bcl-2-Protein des Hamsters herzustellen, wurde die *bcl-2*-cDNA von 771 Bp (-6 bis +765) durch EcoRI-Verdau aus dem rekombinanten pCR4-TOPO-Bcl-2-771-Vektor (s. Kapitel 2.1.8. und 3.2.1.) ausgeschnitten und anschließend in einen GST-Genfusionsvektor (pGEX-4T-1), der sich für die Herstellung der GST-Fusionsproteine eignet, kloniert. Bakterielle Klone wurden mittels Kolonie-Hybridisierung mit der radioaktiv markierten *bcl-2*-cDNA-Sonde auf erfolgreiche Klonierung getestet. Positive Klone wurden mit KpnI/NotI verdaut, um *sense*-Klone zu identifizieren. Ein Klon (bezeichnet pGEX-4T-Bcl-2-S29), ein mit dem Kontrollvektor (pGEX-4T-1) transformierter Klon, und ein antisense Klon (bezeichnet pGEX-4T-Bcl-2-AS) wurden auf die Produktion des GST-Bcl-2-Fusionsprotein in Abwesenheit und Anwesenheit des IPTG-Induktors getestet. Einige Konzentrationen des Induktors wurden ausgetestet, aber die Induktion mit 0.5 mM IPTG für 2-3 h lieferte das beste Ergebnis. In **Abb.32A** ist ein repräsentatives Experiment gezeigt.



**Abb.32. Herstellung des GST-Bcl-2-Fusionsproteins und Spaltung des GST-Anteil mit der Thrombin-Protease.** (A) Herstellung des GST-Bcl-2-Fusionsproteins. Proteine wurden mittels einer 12 %-iger SDS-Gelelektrophorese getrennt, und das Gel mit Brilliant Blue R gefärbt. M, Molekulargewichtsmarker (Sigma); Geltaschen 1-5, Fraktionen von 10 µl der nicht-sonifizierten Bakterienextrakten (aus 3-ml-Präparation): pGEX-4T-1-Kontrolle ohne IPTG (Geltasche 1), pGEX-4T-1 mit 0.5 mM IPTG (Geltasche 2), pGEX-4T-Bcl-2-AS ohne IPTG (Geltasche 3), pGEX-4T-Bcl-2-AS mit 0.5 mM IPTG (Geltasche 4), pGEX-4T-Bcl-2-S29 ohne IPTG (Geltasche 5); Sonikat des pGEX-4T-Bcl-2-S29-Klons (10 µl) mit 0.5 mM IPTG nach der Inkubation mit GSH Sepharose 4B (Geltasche 6). (B) Spaltung des GST-Bcl-2-Fusionsproteins mit einer Thrombin-Protease. Proteine wurden mittels einer 10%-igen SDS-Gelelektrophorese getrennt, und das Gel mit Brilliant Blue R gefärbt. M, Molekulargewichtsmarker; partiell gereinigtes GST-Protein (Geltasche 1); Eluat von GSH Sepharose 4B mit dem GST-Bcl-2-Fusionsprotein (Geltasche 2); Thrombin-Verdau des GST-Bcl-2-haltigen Eluats (Geltasche 3); partiell gereinigtes Bcl-2-Protein (0.1 % CHAPS, PBS) nach zentrifugaler Trennung vom GST-Protein (Geltasche 4).

## Ergebnisse

Die IPTG-Induktion war erfolgreich, denn die Herstellung des GST-Proteins *per se* in beiden Kontrollklonen (pGEX-4T-1 und pGEX-4T-Bcl-2-AS) wurde stark induziert (**Abb.32A**, Geltaschen 2 und 4). Es wurden hierbei die gesamten bakterielle Proteinextrakte aus einer kleinen Präparation (3-ml-Kultur) verwendet, die vor der Elektrophorese auf einem 12 %-igem SDS-Gel nicht sonifiziert wurden (**Abb.32A**, Geltaschen 1-5). Eine Ausnahme bildete der Extrakt, welcher das GST-Bcl-2-Fusionsprotein zeigte. Er wurde aus einer größeren Präparation (500-ml Kultur) des pGEX-4T-Bcl-2-29S-Klons isoliert. Die sonifizierte Suspension wurde mit GSH Sepharose 4B (*beads*) vermischt, um das Fusionsprotein zu isolieren (**Abb.32A**, Geltasche 6). An dieser Stelle muß man erwähnen, daß die Expression des GST-Bcl-2-Fusionsproteins nach der kleinen Präparation der Bakterienkultur und ohne Sonifizieren nicht determiniert werden konnte, denn die Expression wurde durch andere Proteine von ähnlicher Größe maskiert. Im Gegensatz dazu resultierte eine größere Präparation und partielle Purifikation mit Hilfe der GSH Sepharose 4B in einer eindeutigen Expression des GST-Bcl-2-Fusionsproteins, dessen Elution in Anwesenheit von 10 mM GSH erfolgte. Mit diesem Elutionsschritt wurde das GST-Portion noch weiter angereichert (**Abb.32B**, Geltasche 2). Das GST-Bcl-2-Fusionsprotein im Eluat wurde mit Thrombin-Protease (*site-specific*, geeignet für pGEX-4T-1) von dem GST-Anteil befreit, um ein intaktes und aktives Bcl-2-Protein zu erhalten (**Abb.32B**, Geltasche 3). Die effiziente proteolytische Spaltung des Fusionsproteins resultierte in zwei spezifischen Protein-Banden mit einer ähnlichen Größe von 26 und 26.4 kDa. Das 26 kDa-große Protein repräsentiert den GST-Anteil des Fusionsproteins, und das 26.4 kDa-große Protein besitzt die für das Hamster-Bcl-2-Protein erwartete Größe (Tomicic *et al.*, 2000). Der Transfer von Bcl-2 in die Überstand-Fraktion wurde mittels nicht-denaturierendem Detergenz CHAPS erleichtert (**Abb.32B**, Geltasche 4). Um zu bestätigen, daß es sich tatsächlich um das Hamster-Bcl-2-Protein handelt, wurde die Western-Blot-Analyse mit dem anti-Bcl-2-Antikörper durchgeführt (**Abb.32C**).

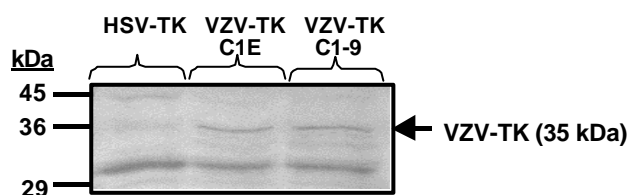


**Abb.32. (C) Verifikation des Hamster-Bcl-2-Proteins mittels Western-Blot-Analyse.** Rekombinantes Bcl-2-Protein wurde mit Hilfe von Gluthation (GSH) von dem durch Thrombin-Protease gespaltenen GST-Anteil des Fusionsproteins getrennt. Fraktionen von 1  $\mu$ l (Geltaschen 1-2), 2  $\mu$ l (Geltaschen 3-4) und 4  $\mu$ l Bcl-2-Protein (Geltasche 5-6) wurden mittels einer 10%-igen SDS-Gelelektrophorese getrennt, auf die Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem monoklonalen anti-Bcl-2-Antikörper (1:5000) inkubiert. Die Protein-Anreicherung war von der GSH-Konzentration abhängig.

### 3.3. Stabile CHO-VZV-TK-Transfektanten

#### 3.3.1. Herstellung VZVtk-exprimierenden Transfektanten

Für die Herstellung stabiler Transfektanten, die das *tk*-Gen des Varicella zoster-Virus (VZV) exprimieren, wurde eine Transfektion von CHO9-neo Zellen mittels Elektroporation durchgeführt. Das rekombinante Plasmid, welches das VZVtk-Gen trägt (pRc-VZVtk; Koyama *et al.*, 1996), wurde linearisiert (PstI-Verdau im Gen für die Ampicillin-Resistenz), um die Transfektionseffizienz zu erhöhen. Das linearisierte Konstrukt von ca. 6.0 kBp wurde durch eine Qiagen-Säule gereinigt und in CHO-9-Zellen elektroporiert (s. Methoden). Nach 48 h wurden die elektroporierten CHO-Zellen 1:7 verdünnt in 10-cm Platten ausgesät und mit 480 µg/ml G418 selektioniert. Nach einer Woche wurden mehrere angewachsene Klone mit dem Virustatikum BVDU chronisch behandelt und im 24-well-Platten auf Sensitivität ausgetestet. Von ca. 100 Klone reagierten nur zwei Klone hypersensitiv gegenüber steigenden Konzentrationen von BVDU (1-500 µM). Um zu überprüfen, ob die BVDU-sensitiven Klone tatsächlich die VZV-Thymidinkinase exprimieren, wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Inkubation mit einem Antiserum gegen VZV-TK<sup>^</sup> detektierte in beiden hypersensitiven Klonen (VZV-TK-C1E und VZV-TK-C1-9) eine distinkte Bande auf der Höhe von ca. 35 kDa, die der VZV-Thymidinkinase entsprach (**Abb.33**). Die bei ca. 30 kDa verlaufende Bande ist unspezifisch und wurde als Kontrolle der Protein-Beladung verwendet. Das Anti-VZV-TK-Antiserum konnte die HSV-1-Thymidinkinase in CHO-HSV-TK-Zellen nicht detektieren, was für die Spezifität des Antiserums und für die unterschiedlichen Proteinsequenzen beider Thymidinkinasen spricht. Als zusätzliche negative Kontrolle der VZV-TK-Expression wurden nicht transfizierte CHO-9-Zellen verwendet, welche kein VZV-TK-Protein exprimierten (nicht gezeigt).

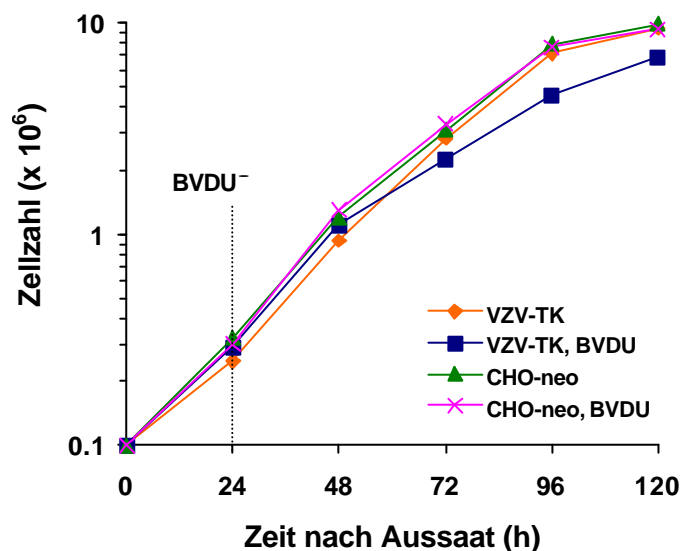


**Abb.33. Expression der Thymidinkinase des Varicella zoster-Virus.** Gesamtzellextrakte aus den VZV-TK-transfizierten CHO-Zellen (VZV-TK-C1E und VZV-TK-C1-9) und aus HSV-TK-transfizierten CHO-Zellen wurden isoliert und Fraktionen von je 30 µg wurden zur Western-Blot-Analyse mit anti-VZV-TK-Antiserum (1:2000) eingesetzt. Die untere unspezifische Bande diente als interne Beladungskontrolle.

<sup>^</sup> Das Anti-VZV-TK-Antiserum wurde uns freundlicherweise von Dr. Piette (Liège) zur Verfügung gestellt.

### 3.3.2. Charakterisierung stabiler CHO-VZV-TK-Transfektanten

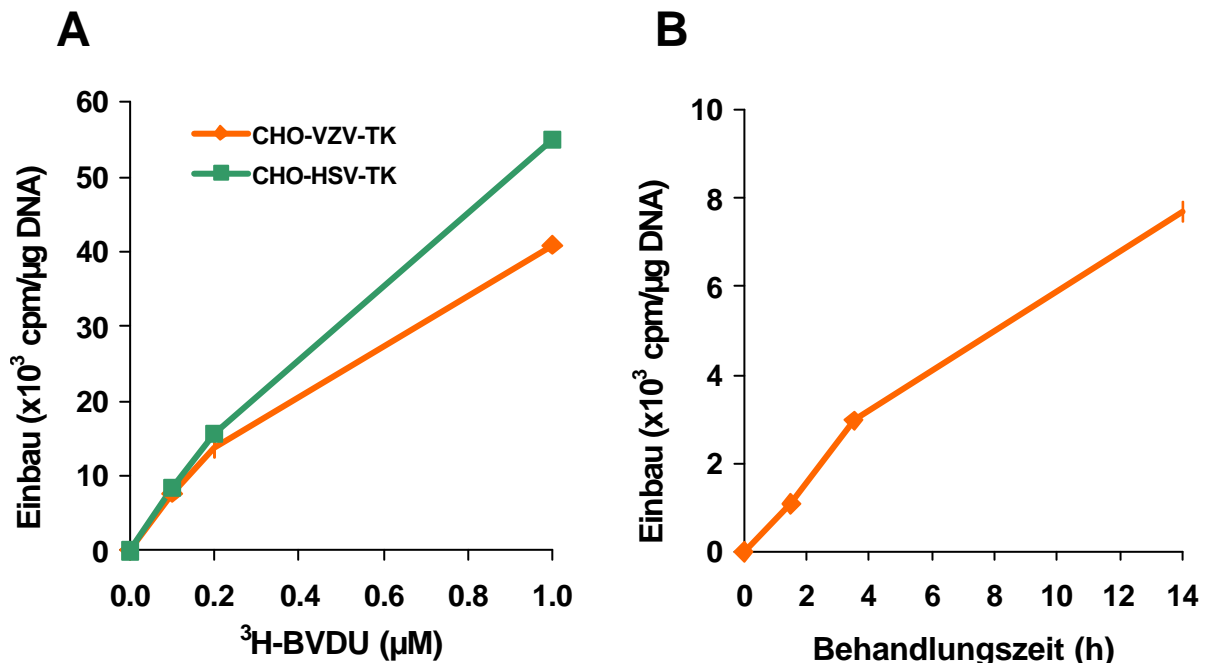
Um zu überprüfen, ob die CHO-VZV-TK-Transfektanten ein verändertes Wachstum im Vergleich zur CHO-neo-Kontrolle aufweisen und ob sie nach einer Behandlung mit BVDU im Wachstum verlangsamt sind, wurden Wachstumskurven erstellt (**Abb.34**). Hierzu wurden die CHO-VZV-TK-Zellen und die CHO-neo-Kontrolle 24 h nach Aussaat mit 5  $\mu$ M BVDU behandelt. Das Virustatikum wurde dauerhaft in Kontakt mit den Zellen belassen. Das Wachstum der CHO-VZV-TK-Zellen wurde durch die chronische BVDU-Behandlung nicht signifikant beeinträchtigt; die Zellen proliferierten nach BVDU-Gabe über mehrere Zellcyclen; ab 72 h der dauerhaften BVDU-Behandlung wurden cytotoxische Effekte sichtbar. Bei der CHO-neo-Kontrolle wurden keine Wachstumsveränderungen in Anwesenheit von BVDU festgestellt.



**Abb.34. Einfluß der BVDU-Behandlung auf das Wachstum der CHO-VZV-TK-Transfektanten.** Zur Bestimmung der Wachstumskurven wurden  $10^5$  Zellen (CHO-neo oder CHO-VZV-TK) auf 10-cm-Schalen ausgesät und nach 24 h mit 5  $\mu$ M BVDU dauerhaft behandelt. Die Zellzahl wurde in der Zeit der BVDU-Behandlung (24 h nach Aussaat) wie auch nach 48, 72, 96 und 120 h nach Aussaat bestimmt. Die Zellzahl (Ordinate) ist logarithmisch dargestellt.

## Ergebnisse

Um sicher zu gehen, daß die relativ ungestörte Proliferation von BVDU-exponierten VZV-TK-Transfektanten nicht das Ergebnis einer ineffizienten Metabolisierung des BVDU ist, (d.h. daß in den Zellen das *per se* inaktive Virustatikum auch zum BVDU-Triphosphat phosphoryliert wird), wurden Einbau-Versuche durchgeführt. Hierzu wurden die CHO-HSV-TK und CHO-VZV-TK-Zellen für einen Zellcyclus (14 h) mit verschiedenen Konzentrationen von radioaktiv markiertem  $^3\text{H}$ -BVDU behandelt. Zusätzlich wurde die Kinetik des Einbaus nach Behandlung der Zellen mit  $0.1 \mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -BVDU bestimmt (**Abb.35A** und **B**). Zum Vergleich wurden auch Einbau-Versuche mit den CHO-HSV-TK-Zellen durchgeführt, da bekannt ist, daß HSV-TK-exprimierenden Zellen auch BVDU zum Triphosphat metabolisieren können; welches in die DNA eingebaut wird (**Abb.35A**). Aus den behandelten Zellen wurde hierzu die genomische DNA isoliert und die Radioaktivität in cpm/ $\mu\text{g}$  DNA gemessen. Das Ergebnis zeigt, daß BVDU effizient in die zelluläre DNA eingebaut wird. In zwei unabhängigen Versuchen war der Einbau von  $^3\text{H}$ -BVDU hoch reproduzierbar. Der Einbau von  $^3\text{H}$ -BVDU in die genomische DNA von CHO-HSV-TK- und CHO-VZV-TK-Zellen war nahezu vergleichbar und betrug nach 14h-Behandlung mit  $1 \mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -BVDU ca. 55000 (CHO-HSV-TK) und 45000 (CHO-VZV-TK) cpm/ $\mu\text{g}$  DNA.

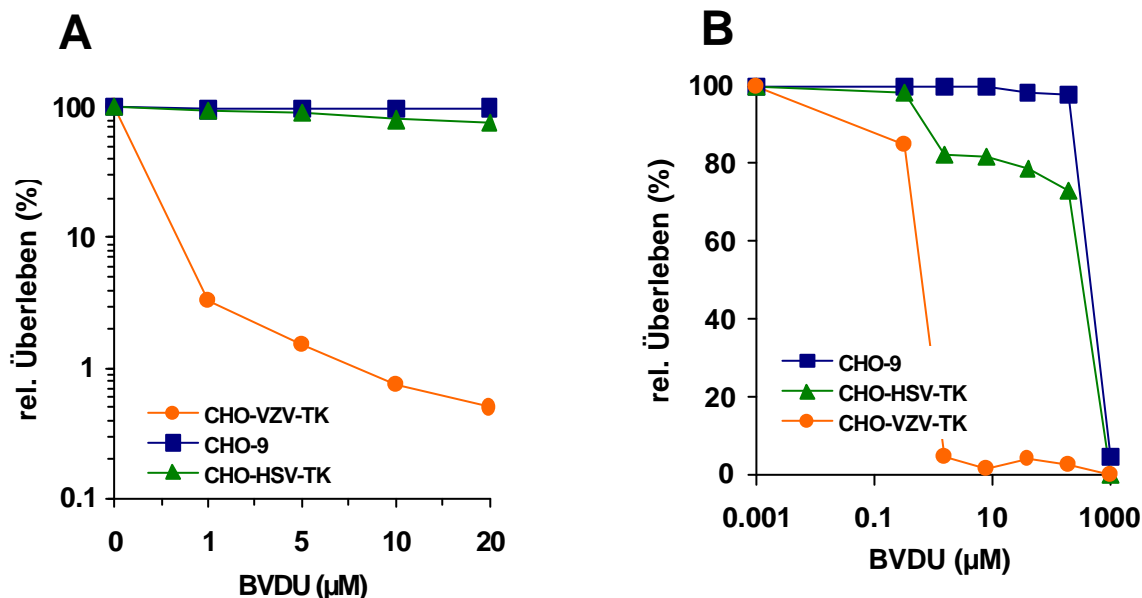


**Abb.35. Einbau von radioaktiv markiertem  $^3\text{H}$ -BVDU in VZVtk und HSVtk-exprimierenden CHO-Zellen.** (A) In Abhängigkeit von der  $^3\text{H}$ -BVDU-Konzentration nach einer 14 h-Behandlung. (B) In Abhängigkeit von der Behandlungszeit mit  $0.1 \mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -BVDU.

### 3.3.3. Einfluß von BVDU auf den Zelltod

#### 3.3.3.1. Reproduktiver Zelltod

Um die Cytotoxizität von BVDU in VZV $tk$ -exprimierenden Zellen zu bestimmen, wurde das Überleben der Zellen in einem Koloniebildungstest bestimmt. Hierzu wurden 500 Zellen eingesät und 6 h nach der Einsaat mit steigenden Konzentrationen von BVDU (1-1000  $\mu$ M) chronisch behandelt und bei 37°C inkubiert. Ungefähr 8 Tage später wurden die angewachsenen Zellklone gefärbt und ausgezählt. Das relative Überleben ist als Prozent Koloniebildung der unbehandelten Kontrolle in zwei unterschiedlichen semi-logarithmischen Diagrammen (**Abb.36A** und **B**) dargestellt. Die alternative Darstellung in der Abb.38B wurde deshalb ausgewählt, um die kleinen Unterschiede in der Cytotoxizität zwischen VZV-TK- und HSV-TK-exprimierenden Zellen besser zu differenzieren. Nach einer Behandlung mit 1  $\mu$ M BVDU lag die Überlebensrate der CHO-VZV-TK-Zellen bei etwa 3%, mit weiter steigenden Konzentrationen des Virustatikums (bis zu 20  $\mu$ M BVDU) kam es zu einer Reduktion des Zellüberlebens auf bis zu unter 1%. Die BVDU-Behandlung hatte hingegen keine Auswirkungen auf nicht-transfizierte CHO-9-Zellen. Interessanterweise zeigten sich auch die CHO-HSV-TK-Zellen unter den gleichen Behandlungsbedingungen kaum durch BVDU beeinflusst. Bei einer BVDU-Konzentration von 20  $\mu$ M waren ca. 80% der CHO-HSV-TK-Zellen noch immer fähig, Kolonien zu bilden.

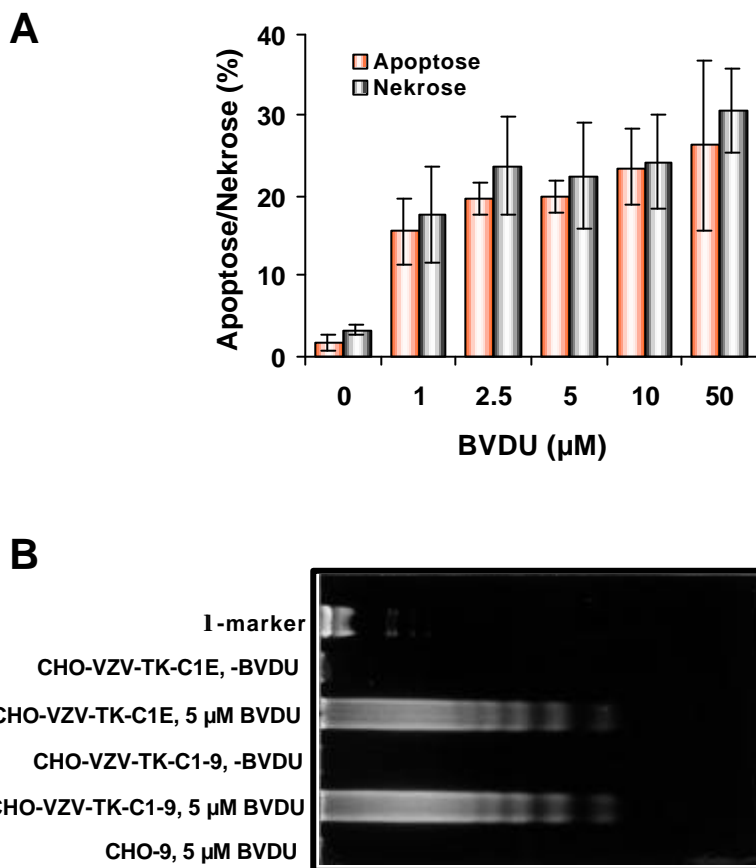


**Abb.36. Reproduktiver Zelltod nach Behandlung von Zellen mit BVDU.** CHO-9-Zellen, CHO-HSV-TK und CHO-VZV-TK-Zellen wurden 6 h nach der Aussaat mit steigenden Konzentrationen von BVDU chronisch behandelt. Relatives Überleben wurde als Prozent Koloniebildung der unbehandelten Kontrolle in einem dreifachen Ansatz bestimmt. Die Mittelwerte sind jeweils in einem semi-logarithmischen Diagramm dargestellt, wobei zwei unterschiedliche Darstellungen gezeigt sind: (A) Die Werte für das relative Überleben auf der Ordinate sind logarithmisch skaliert; (B) Die BVDU-Konzentrationen auf der Abszisse sind logarithmisch skaliert, während das relative Überleben eine dezimale Skalierung hat.

## Ergebnisse

### 3.3.3.2. Quantitativer und qualitativer Nachweis der Apoptose

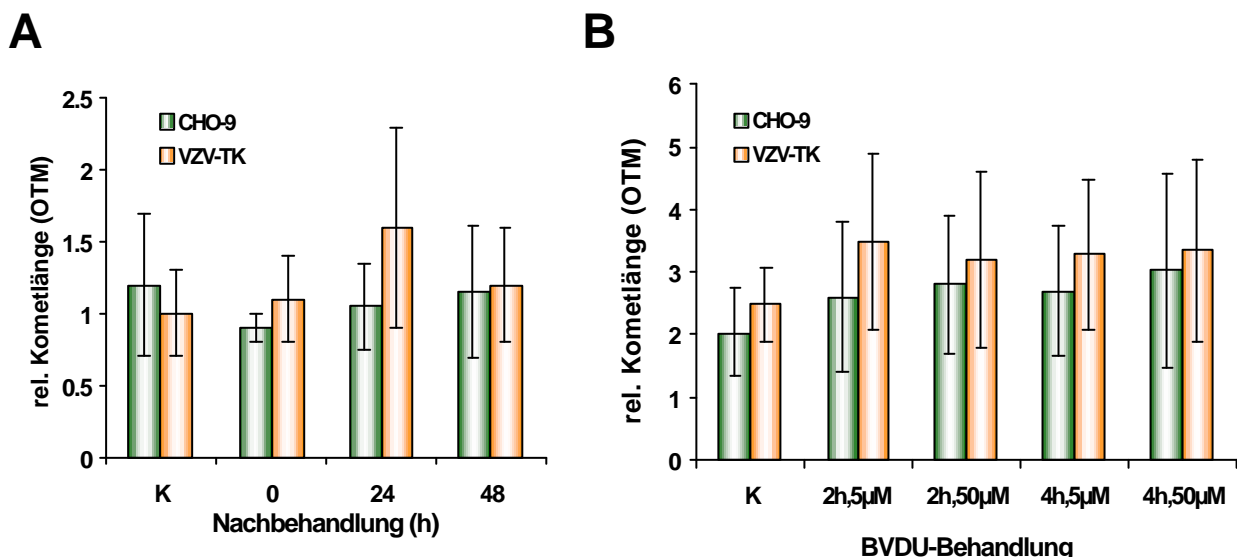
Um festzustellen, ob die VZVtk-exprimierenden Zellen nach der Behandlung mit BVDU apoptotisch absterben, wurde gleichzeitig die Frequenz der Apoptose und Nekrose mit Annexin V / Propidium Jodid bestimmt. In **Abb.37A** ist die Zunahme der apoptotischen und nekrotischen CHO-VZV-TK-C1E-Zellpopulation nach 72 h chronischer Behandlung mit steigenden BVDU-Konzentration (1-50  $\mu\text{M}$ ) dargestellt. Es zeigte sich, daß in BVDU-behandelten CHO-VZV-TK-Zellen die apoptotische und die nekrotische Population ungefähr gleich groß sind. Um sicher zu stellen, daß die Zellen nach Behandlung mit BVDU tatsächlich den apoptotischen Weg bestreiten, wurde die internucleosomale Fragmentierung der genomischen DNA im Gel nachgewiesen (**Abb.37B**). Es zeigte sich, daß die VZVtk-exprimierenden CHO-Zellen (C1E und C1-9) das typische "DNA-Leiter"-Muster zeigen. Die unbehandelten VZVtk-exprimierende Zellen sowie die behandelten CHO-9-Zellen wiesen keine DNA-Fragmentierung auf.



**Abb.37. Bestimmung der Apoptose/Nekrose-Frequenz.** (A) CHO-VZV-TK-C1E-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von BVDU für 72 h dauerhaft behandelt. Danach wurden die Zellen für die Messung der Apoptose bzw. Nekrose mittels Annexin V / PI vorbereitet. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD dargestellt. (B) Internucleosomale Fragmentierung (*DNA laddering*) nach chronischer Behandlung der Zellen für 72 h mit 5  $\mu\text{M}$  BVDU.

### 3.3.4. Induktion von DNA-Strangbrüchen

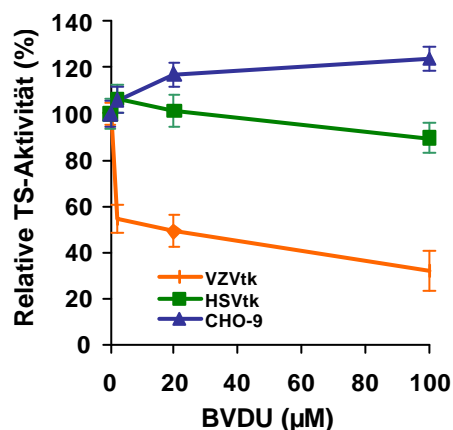
In Analogie zur GCV-TP-Inkorporation, wurde die Induktion von potentiellen Strangbrüchen nach Behandlung von CHO-VZV-TK-Zellen mit BVDU untersucht. Um unsere Hypothese zu überprüfen, daß der Einbau von BVDU-TP Brüche in der DNA induziert (die in mehreren Veröffentlichungen diskutiert aber nie überprüft wurde), wurde die DNA-Migration (Induktion der DNA-Strangbrüchen) mittels Einzelzellgelelektrophorese bestimmt (**Abb.38**). Hierzu wurden CHO-VZV-TK-Zellen mit dem Virustatikum (5 und 50  $\mu\text{M}$ ) für 14 h behandelt und die Rate von Einzel- und Doppelstrangbrüchen (relative Kometlänge) nach entsprechenden Nachbehandlungszeiten unter alkalischen Bedingungen bestimmt. Das Überraschende dabei war, daß die CHO-VZV-TK-Zellen keine Brüche aufwiesen und kein Unterschied zu behandelten CHO-9-Zellen zu sehen war. Um auszuschließen, daß in diesem Fall die Brüche schon während der BVDU-Behandlung entstanden und repariert wurden, wurde der Versuch nach 2 und 4h-Behandlung mit 5 und 50  $\mu\text{M}$  BVDU wiederholt. Auch in diesem Fall, kam es nicht zur Induktion von Brüchen und es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den CHO-VZV-TK und CHO-9-Zellen. Die Bestimmung der DNA-Migration wurde auch unter neutralen Bedingungen durchgeführt, wobei sich keine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen zeigte (nicht gezeigt). Obwohl BVDU-TP stark in die DNA eingebaut wird, provoziert es offenbar keine signifikante Induktion von DNA-Strangbrüchen. Für die verursachte Cytotoxizität in CHO-VZV-TK-Zellen müssen demnach andere Prozesse verantwortlich sein.



**Abb.38. Induktion von DNA-Strangbrüchen.** (A) CHO-9 und CHO-VZV-TK-Zellen wurden für 14 h mit 5  $\mu\text{M}$  BVDU behandelt und nach den angegebenen Nachbehandlungszeiten für die alkalische Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) zur Bestimmung der Frequenz von DNA-Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen vorbereitet. (B) CHO-9-Zellen und CHO-VZV-TK-Zellen wurden nach einer Behandlung für 2 h oder 5 h mit 5 oder 50  $\mu\text{M}$  BVDU für den alkalischen Comet-Assay präpariert. Die Ergebnisse sind als relative Kometlänge (*Olive tail moment*) dargestellt.

### 3.3.5. Bestimmung der Aktivität der Thymidylatsynthetase

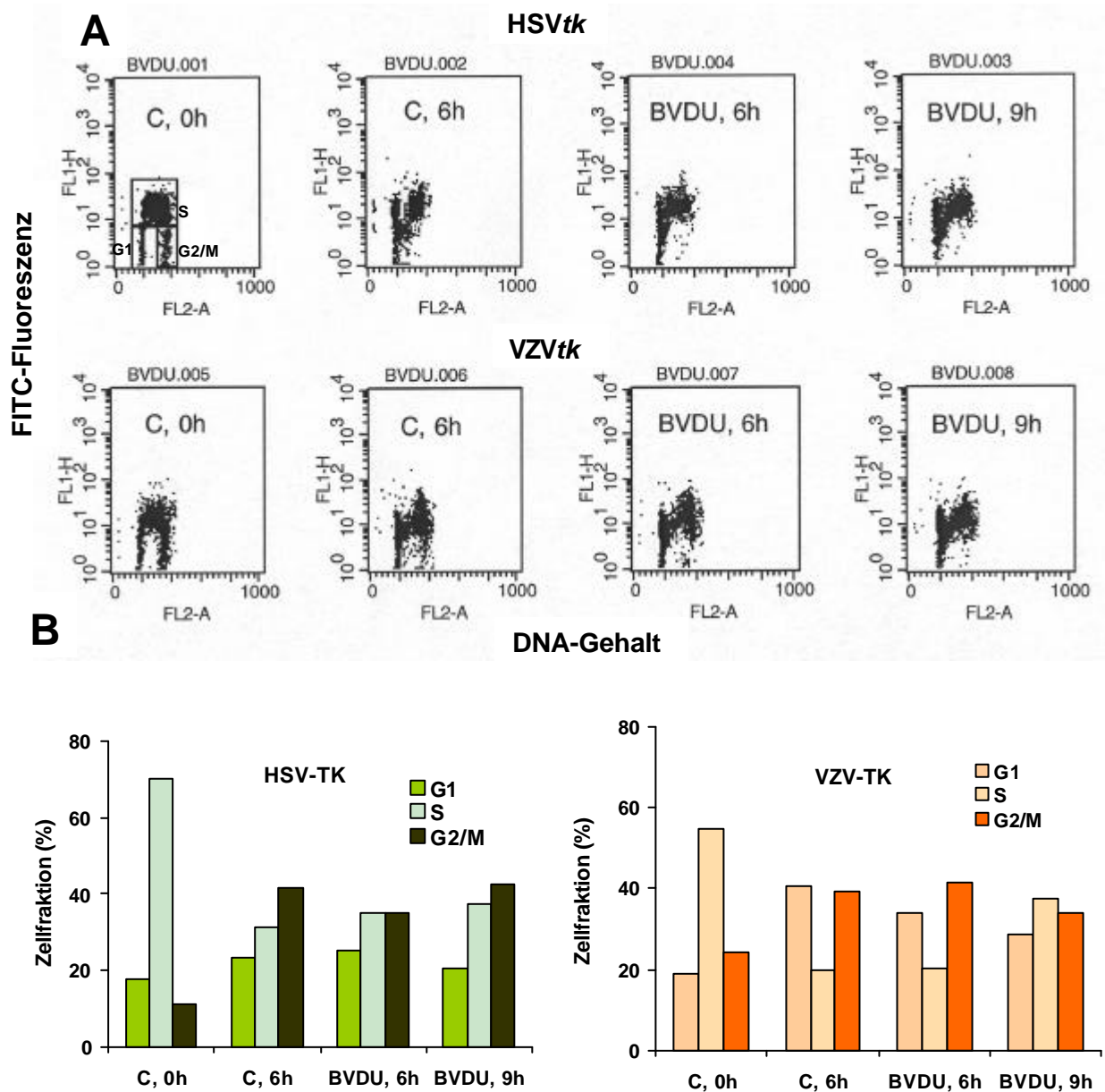
Wie vorhergehend gezeigt wurde, ist in CHO-VZV-TK-Zellen die Inkorporation von BVDU-TP in die zelluläre DNA *per se* nicht verantwortlich für die ausgelöste Cytotoxizität (s. Kap. 3.3.2. und 3.3.3.). Aus der Literatur ist bekannt, daß BVDU-Monophosphat (BVDU-MP), das durch die virale Thymidinkinase produziert wird, die Thymidylatsynthetase (TS) hemmt, die für die Entstehung von Thymidin-Monophosphat (Thymidylat) zuständig ist (Balzarini *et al.*, 1987). Dabei kommt es zur Verschiebung des Gleichgewichts im Nukleotidpool, was für die verursachte Cytotoxizität verantwortlich sein könnte. Um dies in unserem System zu überprüfen, wurde ein *in vitro* Test zur Bestimmung der TS-Aktivität etabliert (s. Methoden). Die Bestimmung der TS-Aktivität erfolgte in drei Zelllinien: CHO-VZV-TK, CHO-HSV-TK und CHO-9-Zellen und die Ergebnisse sind in der **Abb.39** dargestellt. Es zeigte sich, daß die TS-Aktivität in den Extrakten aus VZVtk-exprimierenden Zellen nach BVDU-Behandlung stark abnimmt, was durch die BVDU-MP-vermittelte Inhibition des Enzyms erklärbar ist. Schon bei einer Konzentration von 2 µM BVDU war nur noch die Hälfte der Enzymaktivität nachweisbar, und bei höheren Konzentrationen von 20 oder 100 µM BVDU wurde der Sättigungsbereich der Enzymhemmung erreicht. In Extrakten aus HSVtk-exprimierenden Zellen wurde die Enzymaktivität bei einer Konzentration von 100 µM BVDU nur leicht gehemmt, während es in den CHO-9-Extrakten, die keine virale Thymidinkinase besitzen, zu keiner Hemmung der TS-Aktivität kam. Dieses Ergebnis kann eine plausible Erklärung für die Toxizität von BVDU in CHO-VZV-TK-Zellen liefern: das in die DNA eingebaute BVDU können die Zellen offenbar tolerieren, während nicht eingebautes BVDU-MP in CHO-VZV-TK-Zellen jedoch zur Hemmung der TS und auf dieser Weise zur Cytotoxizität führt.



**Abb.39. Bestimmung der Thymidylatsynthetase (TS) - Aktivität.** CHO-9-Zellen, CHO-HSV-TK und CHO-VZV-TK-Zellen wurden für 3 h mit entsprechenden Konzentrationen von BVDU behandelt und Zellextrakte für die Bestimmung der TS-Aktivität isoliert. Die relative TS-Aktivität wurde als Prozent der behandelten Zellen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle gesetzt.

### 3.3.6. Bestimmung des BrdU-Einbaus mittels Durchflußzytometrie

Um festzustellen, ob CHO-HSVtk und CHO-VZVtk-Zellen nach Behandlung mit BVDU in der Replikation gehemmt sind (S-Phase-Block) oder es zu einer Blockierung in der späten G1-Phase kommt, wurden die Zellen mit BrdU pulsmarkiert, anschließend mit BVDU behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten für die durchflußzytometrische Analyse präpariert. Die Ergebnisse dieses *pulse-chase*-Experiments sind in **Abb.40A** und **B** dargestellt.



**Abb.40. Progression markierter S-Phase Zellen durch den Zellcyclus nach Behandlung mit BVDU in Abhängigkeit von der Zeit.** (A) Exponentiell wachsende CHO-HSV-TK und CHO-VZV-TK-Zellen wurden für 20 min mit 10  $\mu$ M BrdU pulsmarkiert, und anschließend mit 50  $\mu$ M BVDU behandelt (*pulse-chase* Experiment). C, 0h: unbehandelte Kontrolle, die direkt nach der Pulsbehandlung präpariert wurde; C, 6h: unbehandelte Kontrolle, die 6h nach dem BrdU-Puls präpariert wurde; BVDU, 6h / BVDU, 9h: die Zellen wurden pulsmarkiert und 6h / 9h mit BVDU behandelt. (B) Quantifizierung der *Dot-plot*-Darstellung unter (A) und Darstellung der Größe der Zellfraktionen in den einzelnen Zellzyklusphasen.

## Ergebnisse

Um Aufschluß über die Wanderung markierter S-Phase-Zellen durch den Zellzyklus nach BVDU-Behandlung zu bekommen, wurde eine Zweiparameter-Darstellung gewählt, welche die FITC-Fluoreszenz in Abhängigkeit vom DNA-Gehalt (Propidiumjodid-Färbung) zeigt. Die *dot plot*-Darstellung (**Abb.40A**) wurde zur Präsentation quantifiziert (**Abb.40B**). Zum Erhalt des 0h-Wertes wurden die Zellen sofort nach dem BrdU-Einbau fixiert und analysiert. Man sieht deutlich die BrdU-positiven S-Phase-Zellen mit einer FITC-Fluoreszenz von ca.  $10^2$  zwischen den negativen G1-Phase-Zellen (DNA-Gehalt bei Kanal 200) und G2/M-Phase-Zellen (DNA-Gehalt bei Kanal 400). 6h nach der BrdU-Markierung zeigt die unbehandelte Kontrolle (C, 6h), daß die ehemaligen S-Phase-Zellen in die G2-Phase eingetreten sind und BrdU-negative Zellen der ehemaligen G1-Phase nun die S-Phase-Fraktion bestimmen. 6h nach Behandlung mit BVDU sind die BrdU-markierten CHO-HSVtk-Zellen ebenso weit wie die Kontrolle in der Progression durch den Zellzyklus gekommen und drei zusätzliche Stunden danach (9h BVDU-Behandlung) sind noch mehr von den ursprünglichen S-Phase-Zellen in die G2-Phase eingetreten. Das deutete darauf hin, daß sich die CHO-HSVtk-Zellen nach der BVDU-Behandlung nicht in einem Replikationsblock befanden. Bei den CHO-VZVtk-Zellen waren im Vergleich mit CHO-HSVtk-Zellen schon bei der unbehandelten Kontrolle (C, 0h) eine geringere Zahl der BrdU-positiven Zellen in der S-Phase und eine größere Zahl von Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus zu beobachten. Die unbehandelten CHO-VZVtk-Zellen waren 6h nach der BrdU-Pulsmarkierung (C, 6h) weiter in der Progression durch den Zellzyklus gewandert und sind in die G2-Phase eingetreten. Das selbe Bild ergab sich für die behandelten CHO-VZVtk-Zellen nach der 6h-igen BVDU-Behandlung. Eine leichte Blockierung der Zellen in der S-Phase war bei den VZVtk-exprimierenden Zellen 9h nach BVDU-Behandlung zu beobachten.

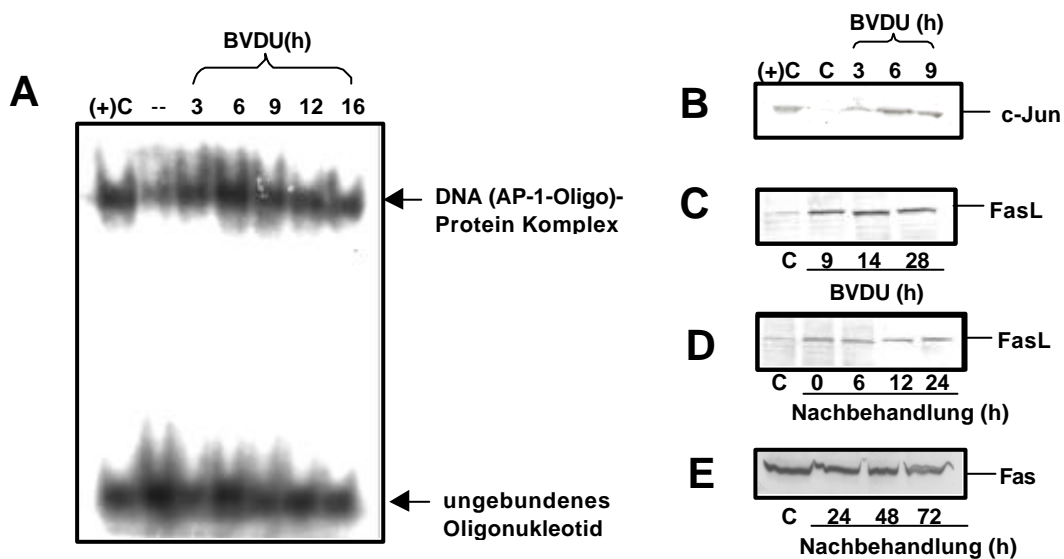
### **3.3.7. Molekularer Mechanismus der BVDU-induzierten Apoptose**

#### **3.3.7.1. Zusammenhang zwischen der Inhibition der TS-Aktivität, den frühen Apoptose-signalisierenden Faktoren (AP-1) und der Induktion des Fas Liganden**

Es ist bekannt, daß der Fas-Ligand nach bestimmten Apoptose-Stimuli durch den Transkriptionsfaktor AP-1 (*activator protein 1*) regulierbar ist (Faris *et al.*, 1998). Um zu untersuchen, ob es eine Verbindung zwischen der frühen Inhibition der TS-Aktivität (innerhalb des ersten 3 h nach BVDU-Zugabe) und des früh aktivierbaren Transkriptionsfaktors AP-1 gibt, das möglicherweise den später in CHO-VZV-TK-Zellen eingeleiteten apoptotischen Vorgang initiiert (durch FasL-Induktion), wurde die AP-1-Induktion mittels eines Gelretardationsexperiments ("Bandshift-Analyse", EMSA) und Oligonukleotiden, die eine AP-1-Bindungsstelle enthalten, überprüft. Der zeitliche Ablauf der Induktion ist in **Abb.41.A**

## Ergebnisse

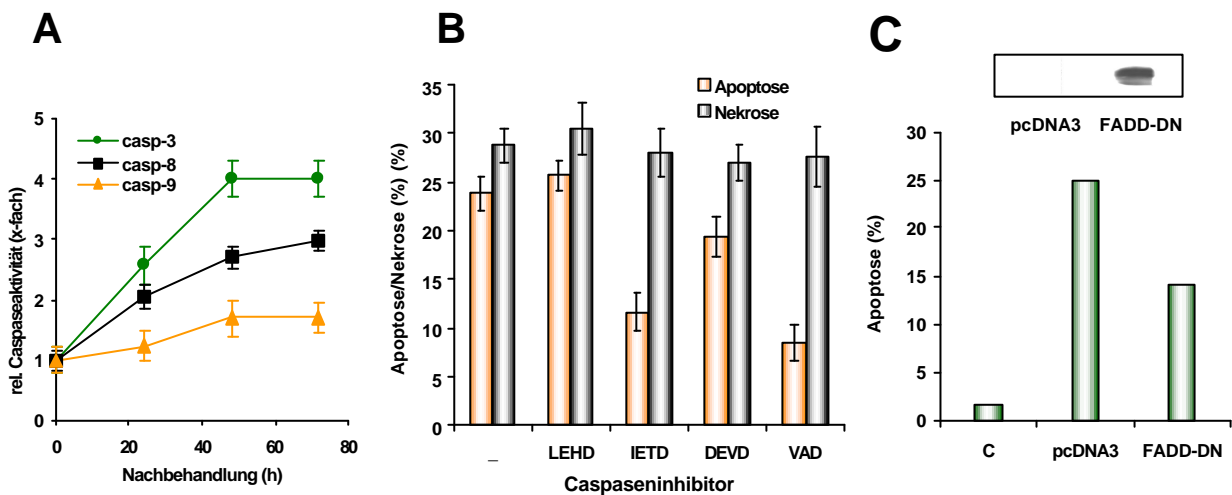
dargestellt. CHO-VZV-TK-Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten (3-16 h) nach Zugabe von BVDU (1  $\mu$ M) geerntet, und aus den Zellen wurden Kernextrakte für ein EMSA-Experiment isoliert. Als positive Kontrolle [(+)C] für den spezifischen Komplex zwischen AP-1 und dem Oligonukleotid dienten Mausfibroblasten (BK4), die 1 h mit 2 mM MMS behandelt worden waren und 6 h danach für den Test geerntet wurden. Eine Induktion von AP-1 war bereits 3 h nach BVDU-Zugabe zu sehen. Nach längeren Behandlungszeiten kam es zu einer langsamen Abnahme der Induktion. Die AP-1-Induktion stimmte mit der Induktion vom c-Jun-Protein nach BVDU-Exposition überein (**Abb.41B**). Dies deutet darauf hin, daß die BVDU-MP-vermittelte Inhibition der Thymidylatsynthetase zeitlich mit der Induktion des AP-1-Faktors korreliert bzw. das auslösende Signal für die Induktion von diesen Genen sein könnte, deren Genprodukte den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden (u.a. c-Fos und c-Jun). Da bekannt ist, daß im Promotor des FasL-Gens eine AP-1-Bindestelle existiert (Faris *et al.*, 1998, Kasibhatla *et al.*, 1998), wurde untersucht, ob es zu einer Induktion von FasL kommt, und ob diese Induktion zeitlich mit der AP-1-Induktion korreliert. Mittels Western-Blot-Analyse wurde eine deutliche Induktion des FasL schon 9 h nach Beginn der BVDU-Behandlung beobachtet, was zeigt, daß die Induktion des FasL kurz nach der AP-1-Induktion erfolgte (**Abb.41C** und **D**). Das Expressionsniveau des Fas-Rezeptors blieb hingegen unverändert (**Abb.41E**).



**Abb.41. Induktion von c-Jun, AP-1 und FasL nach BVDU-Behandlung.** (A) CHO-VZV-TK-Zellen wurden mit 1  $\mu$ M BVDU behandelt. Es wurden Kernextrakte für die Bandshift-Analyse isoliert und mit AP-1-Oligonukleotid vermischt. Die Proben wurden auf ein 4%-iges PAA-Gel aufgetragen. Als positive Kontrolle, (+)C, wurde Zellextrakt mit 2 mM MMS behandelten Mausfibroblasten (BK4) verwendet. (B) CHO-VZV-TK-Zellen wurden mit 1  $\mu$ M BVDU behandelt, Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse mit dem anti-c-Jun-Antikörper eingesetzt. Positive Kontrolle (+)C wurde wie unter (A) beschrieben gewonnen. (C) CHO-VZV-TK-Zellen wurden mit 5  $\mu$ M BVDU chronisch oder (D) für 14 h behandelt. Nach verschiedenen Behandlungs- oder Nachbehandlungszeiten wurden Cytosolextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse mit dem anti-FasL-Antikörper eingesetzt. (E) CHO-VZV-TK-Zellen wurden mit 5  $\mu$ M BVDU für 14 h behandelt. Nach angegebenen Nachbehandlungszeiten wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Analyse mit dem anti-Fas-Antikörper eingesetzt. Die gleiche Proteinbeladung der Filter wurde durch Ponceau's-Färbung gezeigt.

### 3.3.7.2. Aktivierung von Caspasen und PARP-Spaltung

Wie in Kap. 3.3.3.2. gezeigt wurde, wird in den CHO-VZVtk-Zellen nach Behandlung mit BVDU parallel zur Nekrose auch das apoptotische Programm eingeleitet, was mittels Annexin V-Färbung und über die internucleosomale DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden konnte (s. Abb.37). Da bekannt ist, daß bei der Apoptose die Caspasen eine entscheidende Rolle spielen, wurde zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der BVDU-induzierten Apoptose zuerst die Aktivierung der Caspasen 3, 8 und 9 in VZVtk-exprimierenden Zellen bestimmt (Abb.42A). Für die chromosomale Fragmentierung ist indirekt die Caspase-3 verantwortlich, welche CAD (*caspase-activated DNase*) reaktiviert. CAD ist seinerseits an der Fragmentierung der DNA beteiligt (Liu *et al.*, 1997). Es zeigte sich, daß die Caspase-3 24h nach Behandlung mit 5 µM BVDU (~2.5-fach) aktiviert war und die maximale (4-fache) Aktivierung 48-72h nach einer 14h-igen BVDU-Behandlung erreicht wurde. Weiterhin wurde untersucht, welche der am Anfang der Caspasekaskade beteiligten Caspasen in der BVDU-induzierten Apoptose eine Rolle spielen. Hierzu wurde die Aktivität der Initiator-Caspasen 8 und 9 gemessen, für welche bekannt ist, daß sie Pro-Caspase-3 aktivieren können. Die Messung der Aktivität zeigte, daß die Caspase-8 parallel zur Caspase-3 aktiviert wird und 72h nach der BVDU-Behandlung eine ~3-fache Aktivitätssteigerung erreichte.



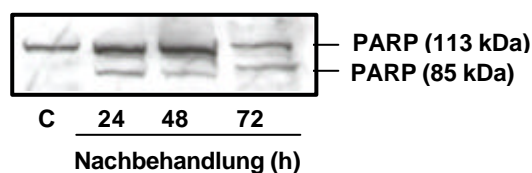
**Abb.42. Aktivierung von Caspasen und Einfluß von Caspaseinhibitoren auf die Apoptose.** (A) Bestimmung der Caspasenaktivität. Die CHO-VZV-TK-Zellen wurden mit 5 µM BVDU für 14 h behandelt und nach den angegebenen Nachbehandlungszeiten für den Caspase-Aktivitätstest präpariert (B) Einfluß der Caspaseinhibitoren auf die Apoptose. Die Zellen wurden mit spezifischen Caspaseinhibitoren (80 µM) für 10 h vorbehandelt und danach mit 5 µM BVDU für zusätzliche 60 h co-behandelt. Danach wurden die Zellen für die Bestimmung der Apoptose mittels Annexin V-Färbung präpariert. Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen sind gezeigt. (C) Reduktion der BVDU-induzierten Apoptose durch transiente Transfektion von FADD-DN. Obere Teil der Abbildung: Expression des dominant-negativen FADD-Proteins, FADD-DN (Western-Blot-Analyse); Diagramm: CHO-VZV-TK-Zellen wurden mit dem pcDNA3- oder FADD-DN-Vektor transient transfiziert, und anschließend mit 5 µM BVDU wurde zugegeben. 60 h danach wurde die Apoptose mittels Annexin V gemessen. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

## Ergebnisse

Im Gegensatz zur Caspase 8 wurde die Caspase-9 nicht signifikant aktiviert, was gut mit der Tatsache korrelierte, daß die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ebenfalls nur sehr schwach war (s. Abb.44). An dieser Stelle sei daran erinnert, daß der Hauptweg der Caspase-9-Aktivierung über die Cytochrom C-Freisetzung verläuft (s. Seite 17).

Um zu bestätigen, daß die Aktivierung der Caspasen 3 und 8 mit der Induktion der Apoptose zusammenhängt, wurden Versuche mit Caspaseinhibitoren durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abb.42B** dargestellt. Der allgemeine Caspaseinhibitor (zVAD-fmk) reduzierte die Apoptosefrequenz hierbei um ~70%, die Nekrose wurde hingegen nicht beeinflusst. Der spezifische Caspase-8-Inhibitor (zIETD-fmk) reduzierte die Apoptose um ~60%, was zeigte, daß Caspase-8 tatsächlich eine wichtige Rolle während der BVDU-induzierten Apoptose spielt. Die initiale Rolle der Caspase-8 in der BVDU-induzierten Apoptose wurde durch eine transiente Transfektion vom dominant-negativen FADD-Protein<sup>^</sup> (FADD-DN; Chinnaiyan *et al.*, 1995) unterstützt, welches die BVDU-induzierte Apoptose um ca. 50% reduzierte (**Abb.42C**). Der Caspase-9-Inhibitor hatte keinen Einfluß auf die Apoptose. Die Hemmung der Caspase-3 (und -7) durch den Einsatz des zDEVD-fmk-Inhibitors resultierte in einer 30%-igen Reduktion der Apoptose, was darauf hindeutete, daß Caspase-3 auf dem apoptotischen Weg eine *downstream* Caspase ist, dessen Aktivierung durch Caspase-8 erfolgt.

Ein weiteres Merkmal der BVDU-induzierten Apoptose war die Spaltung von PARP. Das intakte PARP-Enzym (113 kDa) wurde in Fragmente von 85 und 28 kDa gespalten, wobei nur das PARP-Fragment von 85 kDa von dem anti-PARP-Antikörper erkannt wurde (**Abb.43**). Das Fragment war schon 24 h nach Behandlung mit 5 µM BVDU zu sehen, zu einer Zeit in der die Caspase-3 aktiviert wurde, welche an der Spaltung direkt beteiligt ist. Die Spaltung konnte bis zu 72 h nach Behandlung mit BVDU nachgewiesen werden.

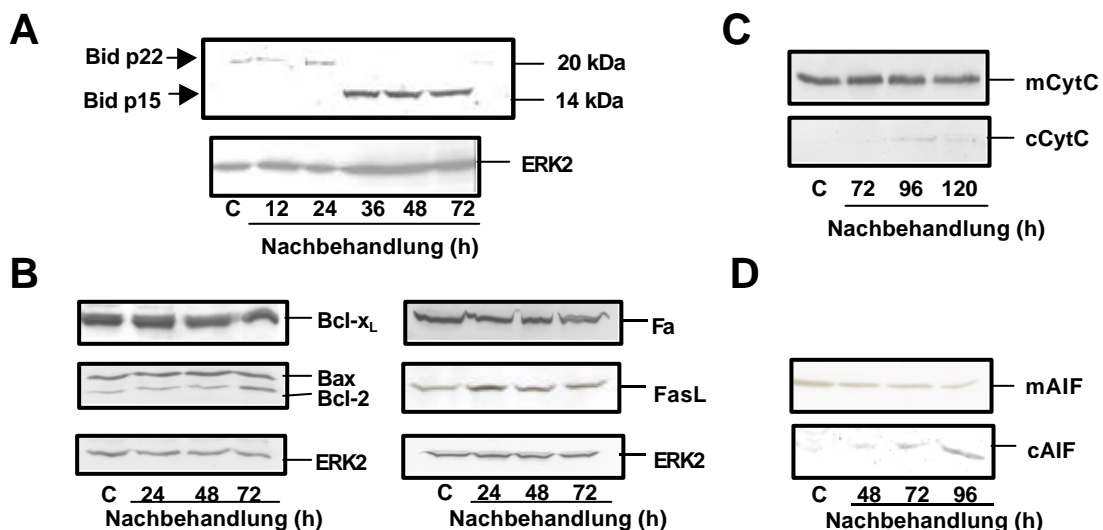


**Abb.43. Spaltung von PARP.** CHO-VZV-TK Zellen wurden mit 5 µM BVDU für 14h behandelt. Nach verschiedenen Nachbehandlungszeiten wurden Gesamtzellextrakte präpariert und zur Western-Blot-Analyse mit dem polyklonalen anti-PARP-Antikörper eingesetzt.

<sup>^</sup> Der FADD-DN-Vektor wurde uns freundlicherweise von Dr. Vincenz (Michigan, USA) zur Verfügung gestellt.

**3.3.7.3. Expression anderer apoptotischer Proteine**

Um festzustellen, welche anderen Proteine möglicherweise an der BVDU-induzierten Apoptose in CHO-VZV-TK-Zellen beteiligt sind, wurde die Expression einiger pro-apoptotischer (Bid, Bax, Cyt C, AIF, Fas, FasL) und anti-apoptotischer Proteine (Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2) untersucht. Hierzu wurden CHO-VZV-TK-Zellen für einen Zellcyclus mit 5 µM BVDU behandelt, nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten wurden Gesamtzellextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt (**Abb.44**). Die Expression von Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 blieb unverändert, während das Bid-Protein durch Caspase-8 in zwei Fragmente von 15 und 6.5 kDa gespalten wurde (was ab 36 h nach BVDU-Behandlung durch Inkubation mit einem anti-Bid-Antikörper nachgewiesen wurde; der Antikörper erkannte intaktes Bid-Protein nur schwach, hingegen erkannte er deutlich das Fragment von 15 kDa). Weiterhin wurde gezeigt, daß die Bax-Menge 48 h nach BVDU-Behandlung leicht induziert wurde; 72 h nach Behandlung war jedoch eine ~ 4-fache Bax-Induktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu sehen. Nach späteren Nachbehandlungszeiten (24-72 h) wurde der FasL nicht weiter induziert; eine maximale Induktion wurde offenbar während der ersten 24 h der Nachbehandlung erreicht (s. Abb.41C). Die Expression des Fas-Rezeptors blieb weiterhin unverändert. Eine sehr schwache Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Cytosol wurde 96 h nach BVDU-Behandlung beobachtet (**Abb.44C**) und korrelierte mit einer geringen Aktivierung der Caspase-9 (s. Abb.42A). Im Gegensatz dazu wurde ein weiteres pro-apoptotisches Protein, AIF, aus den Mitochondrien (mAIF) in das Cytosol (cAIF) freigesetzt. Die AIF-Freisetzung erfolgte relativ spät (72-96 h nach BVDU-Behandlung).



**Abb.44. Expression verschiedener apoptotischer Marker nach BVDU-Behandlung.** CHO-VZV-TK-Zellen wurden mit 5 µM BVDU für 14 h behandelt. Nach verschiedenen Nachbehandlungszeiten wurden Gesamtextrakte isoliert und zur Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die Filter wurden mit folgenden Antikörper inkubiert: (A) anti-Bid, (B) anti-Bcl-x<sub>L</sub>, anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-Fas und anti-FasL, (C) anti-Cytochrom C; mCytC-mitochondriale Fraktion, cCytC-cytosolische Fraktion und (D) anti-AIF; mAIF-mitochondriale Fraktion, cAIF-cytosolische Fraktion.

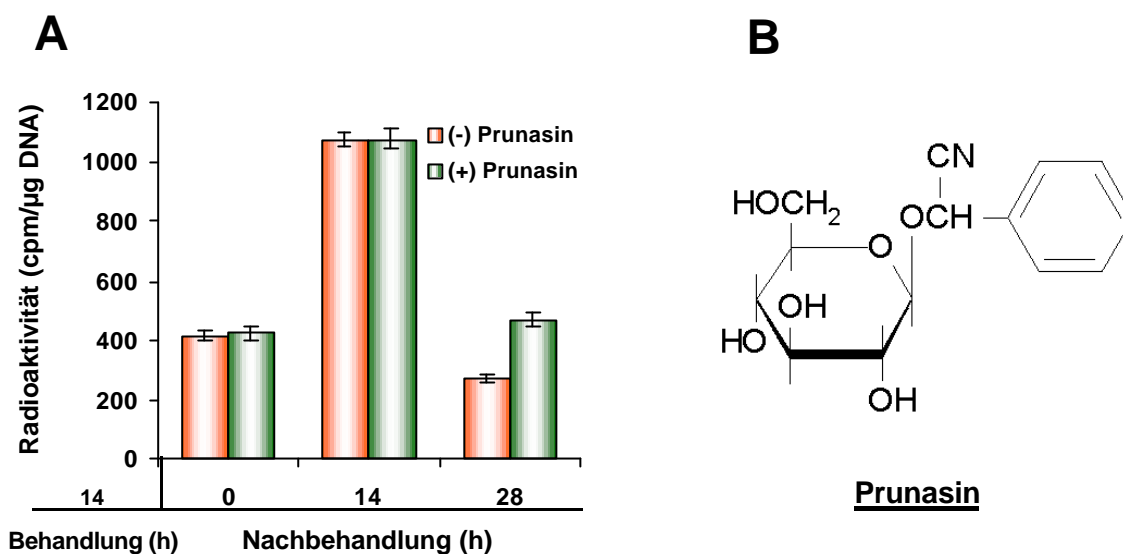
### **3.4. Untersuchungen zur Reparatur von GCV**

#### **3.4.1. Beteiligung der Polymerase $\beta$ an der Reparatur von GCV**

In den vorhergehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß GCV effizient in den HSVtk-transfizierten CHO-Zellen metabolisiert (phosphoryliert) wird und dort Apoptose auslöst (Thust *et al.*, 2000a). Um zu bestimmen, ob das in die DNA inkorporierte GCV (GCV-MP) durch einen Reparaturmechanismus prozessiert wird, wurde die zelluläre DNA aus metabolisch kompetenten CHO-HSV-TK-Zellen nach dem Einbau von  $^3\text{H}$ -GCV für einen Zellcyclus (14 h), sowie nach 14 und 28 h der Nachbehandlungszeit isoliert. Parallel dazu wurden die Experimente mit nicht-radioaktivem GCV (0.2  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt, um zu bestätigen, daß bei der applizierten Konzentration das Zellwachstum nicht beeinflusst wurde (nicht gezeigt). Wie in **Abb.45A** gezeigt, wurde GCV während des Behandlungscyclus effizient in die zelluläre DNA inkorporiert. Nach einer 14h-igen Nachinkubationszeit (i.e. nach dem 1. Nachbehandlungszellcyclus) wurde eine (~2.5-fache) Zunahme der Radioaktivität in der DNA (bis zu 1100 cpm/ $\mu\text{g}$  DNA) bestimmt, was darauf hin deutet, daß das phosphorylierte GCV noch immer innerhalb den Zellen anwesend ist und weiterhin in die DNA inkorporiert wird. Im Gegensatz dazu wurde nach dem 2. Nachbehandlungszellcyclus (28 h nach GCV-Behandlung) eine bedeutsame (~4-fache) Abnahme in der Radioaktivität (250 cpm/ $\mu\text{g}$  DNA) beobachtet, was darauf hindeutet, daß GCV aus der DNA durch einen Reparaturprozess entfernt wird. Wenn es sich nur um eine Verdünnung des radioaktiv markierten GCV durch DNA-Replikation handeln würde, könnte sich die Radioaktivität nur um die Hälfte vermindern, was die 4-fache Abnahme nicht erklären würde.

Weitere Cytotoxizitätsversuche (nicht gezeigt), bei denen unterschiedliche Reparatur-profiziente und defiziente Zellpärchen (BER, NER- und MMR-defizient) auf Sensitivität gegenüber GCV überprüft wurden, zeigten eine mögliche Beteiligung der BER bei der Reparatur von GCV. Um die Beteiligung der Polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) an der Reparatur von GCV zu überprüfen, wurden CHO-HSV-TK-Zellen mit dem spezifischen Pol  $\beta$ -Inhibitor, Prunasin (Mizushina *et al.*, 1999) behandelt (s. chemische Struktur in **Abb.45B**) und die Radioaktivität in der Fraktion der DNA bestimmt. Die Prunasin-Behandlung resultierte 28 h nach Behandlung mit 0.2  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -GCV für ein Zellcyclus in einer signifikanten Zunahme der in der DNA inkorporierten Radioaktivität im Gegensatz zu nicht-Prunasin vorbehandelten Zellen (**Abb.45A**), was die Annahme einer Rolle von Pol  $\beta$  in der Reparatur von GCV unterstützt.

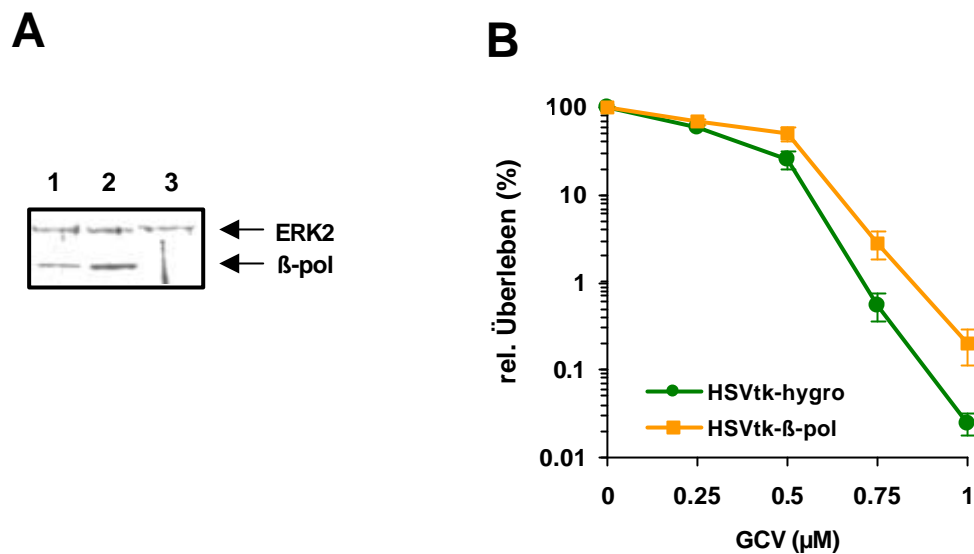
## Ergebnisse



**Abb.45. Reparatur von GCV.** CHO-HSV-TK-Zellen wurden mit radioaktiv markiertem Ganciclovir ( $0.2 \mu\text{M } ^3\text{H-GCV}$ ) für einen Zellcyclus (14 h) behandelt. Die zelluläre DNA wurde direkt nach der Behandlung (0h-Wert) wie auch 14 und 28 h nach Behandlung isoliert. Die Radioaktivität in der DNA-Fraktion ( $\text{cpm}/\mu\text{g DNA}$ ) wurde im Szintillationsgerät bestimmt. (B) Prunasin (O-[ $\beta$ -Glucopyranosyl]-D-Mandelsäurenitril), ein spezifischer Inhibitor der Polymerase  $\beta$ .

### 3.4.2. Protektive Wirkung gegenüber GCV durch Expression von Polymerase $\beta$ in CHO-HSVtk-Zellen

Um festzustellen, ob Überexpression der Pol  $\beta$  in metabolisch kompetenten CHO-HSVtk-Zellen Auswirkungen auf das Überleben der Zellen hat, wurden HSV-TK-exprimierenden CHO-Zellen mit dem rekombinanten Vektor (pcDNA3.1- $\beta$ -pol) stabil transfiziert. Der  $\beta$ -pol-exprimierende Zellklon (CHO-HSVtk- $\beta$ -pol) zeigt (im Vergleich zur CHO-HSVtk-hygro-Kontrolle), in der Western-Blot-Analyse mit einem spezifischen anti- $\beta$ -pol-Antikörper, eine etwa 4-fach erhöhte Pol  $\beta$ -Expression (**Abb.46A**). Die  $\beta$ -pol-Transfektanten und die hygro-Kontrolle wurden in einem Koloniebildungstest auf eventuelle Sensitivitätsunterschiede gegenüber GCV überprüft (**Abb.46B**). Es zeigte sich, daß die CHO-HSVtk- $\beta$ -pol-Transfektanten eine leicht erhöhte Resistenz gegenüber dem Virustatikum aufweisen.

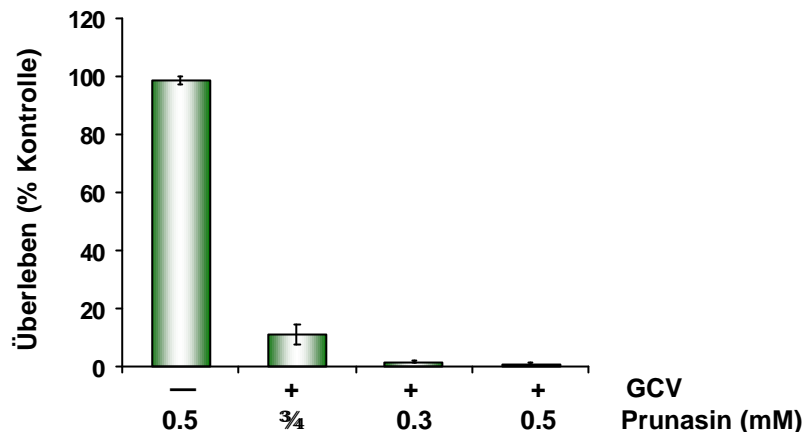


**Abb.46. Überexpression der Polymerase  $\beta$  in CHO-HSVtk-Zellen und Auswirkung auf die Cytotoxizität gegenüber GCV.** (A) Gesamtzellextrakte aus nicht transfizierten CHO-HSVtk-Zellen (Geltasche 1), CHO-HSVtk- $\beta$ -pol-Transfektanten (Geltasche 2), und  $\beta$ -pol-defizienten Mausfibroblasten (Geltasche 3) wurden isoliert und mit dem spezifischen monoklonalen anti- $\beta$ -pol-Antikörper inkubiert. ERK2 wurde als interne Beladungskontrolle verwendet. (B) Es wurden 500 CHO-HSVtk und CHO-HSVtk- $\beta$ -pol Zellen ausgesät und 6 h danach mit steigenden GCV-Konzentrationen chronisch behandelt. Nach 10 Tagen wurden die angewachsenen Klone gefärbt und ausgezählt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD.

### 3.4.3. Sensibilisierung von CHO-HSVtk-Zellen durch Unterdrückung der Polymerase $\beta$ -Aktivität

Basierend auf den Daten über die Reparatur von GCV war es von Interesse herauszufinden, ob die Inhibition der Pol  $\beta$ -Aktivität einen Einfluß auf das Überleben der CHO-HSVtk Zellen nach GCV-Behandlung hat. Hierzu wurden die Zellen chronisch mit GCV und Prunasin co-behandelt. Prunasin selbst (0.5 mM) beeinflusste weder das Überleben der Zellen im Kolonie-Bildungsassay noch die Frequenz der Apoptose (nicht gezeigt). Nur eine Kombination des Inhibitors (0.3-0.5 mM Prunasin) und des Virustatikums (0.5  $\mu$ M GCV) resultierte in einer verminderten Bildung von Kolonien und damit in verstärkter Cytotoxizität (**Abb.47**). Anhand der Daten ist es gerechtfertigt anzunehmen, daß die Inhibition der  $\beta$ -pol-Aktivität durch Prunasin aufgrund einer unvollständigen Pol  $\beta$ -abhängigen Reparatur des in die DNA inkorporierten GCV zur verstärkten Cytotoxizität in CHO-HSVtk-Zellen führt.

## Ergebnisse

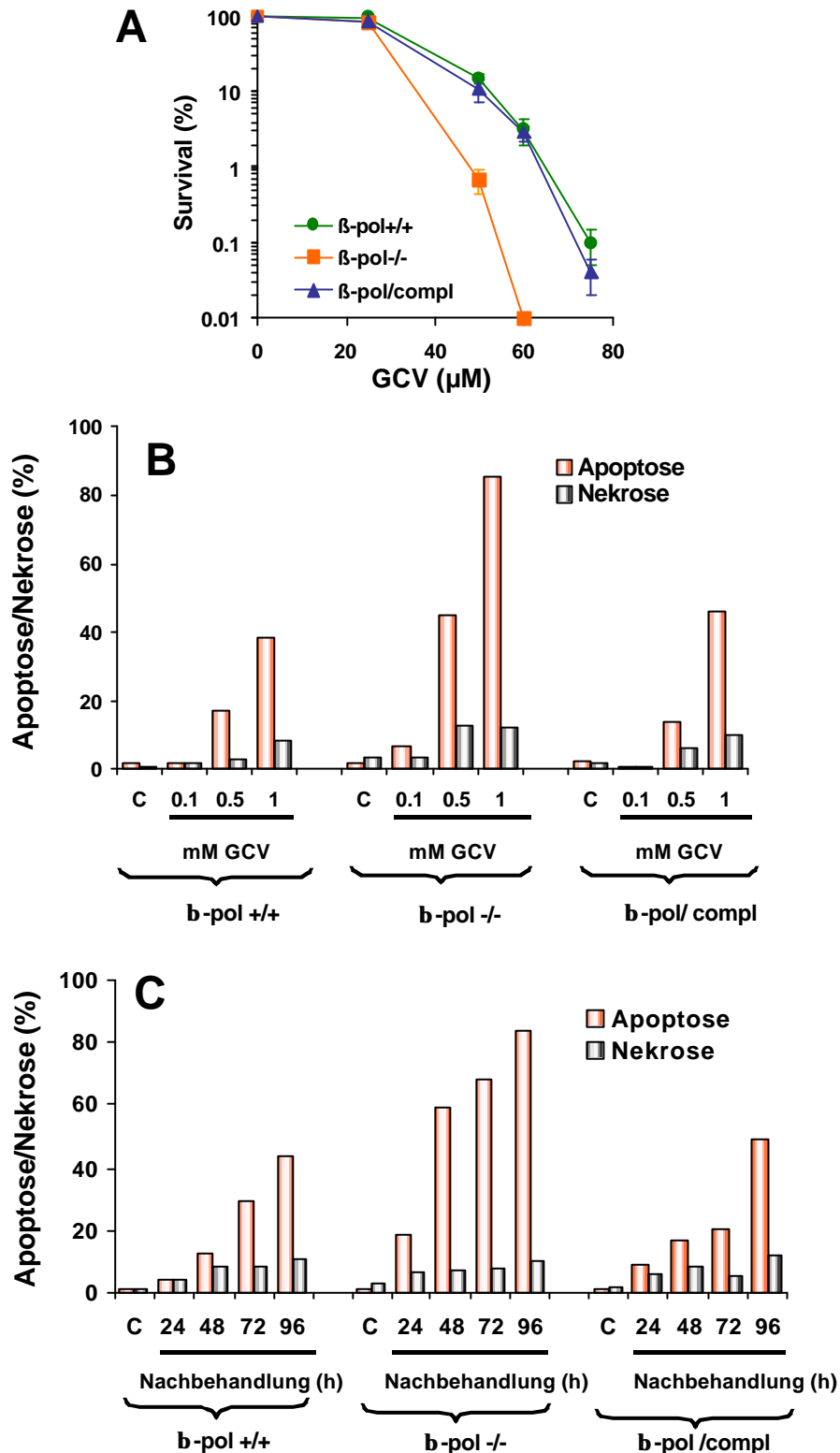


**Abb.47. Einfluß der Pol  $\beta$ -Aktivität auf das Überleben der Zellen.** CHO-HSVtk-Zellen wurden mit Prunasin (0.3-0.5 mM) für 3h vorbehandelt und danach mit 0.5  $\mu$ M GCV behandelt. Die Zellen wurden bei 37° C inkubiert, bis Zellklone hochgewachsen waren. Die Klone wurden gefärbt und ausgezählt. Es sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen als Prozent der Kontrolle  $\pm$  SD dargestellt.

### **3.4.4. Hypersensitivität $\beta$ -pol-defizienter Zellen gegenüber cytotoxischen Effekten von GCV**

Zu genaueren Untersuchung der Rolle von Pol  $\beta$  in der GCV-vermittelten Cytotoxizität wurden embryonalen Mausfibroblasten, die profizient ( $\beta$ -pol+/+), defizient (*null / knock-out* Zellen;  $\beta$ -pol/-) und komplementiert ( $\beta$ -pol/- Zellen mit  $\beta$ -pol transfiziert, hier bezeichnet als  $\beta$ -pol/compl) für  $\beta$ -pol-Aktivität waren, in den Untersuchungen eingesetzt (Sobol *et al.*, 1996; Ochs *et al.*, 1999). Wie Koloniebildungsexperimente zeigten, waren  $\beta$ -pol/- Zellen gegenüber einer chronischen Behandlung mit 25-75  $\mu$ M GCV empfindlicher als  $\beta$ -pol+/+ und  $\beta$ -pol/compl Zellen (**Abb.47A**). Bei einer Konzentration von 50  $\mu$ M GCV wurde das Überleben der  $\beta$ -pol-defizienten Zellen bis auf 1% reduziert, während das Überleben  $\beta$ -pol+/+ and  $\beta$ -pol/compl Zellen noch immer bei 20 und 10% lag. Um herauszufinden, ob  $\beta$ -pol Zellen generell [ähnlich zu HSVtk-exprimierenden Zellen (Thust *et al.*, 2000a)], nach Behandlung mit GCV durch Apoptose sterben, wurden die Zellen durchflußzytometrisch mittels Annexin V / Propidiumjodid-Färbung analysiert. Exponentiell wachsende Zellen wurden hierbei mit 0.1-1 mM GCV für einen Zellcyclus (18 h) behandelt und 96 h später präpariert.

## Ergebnisse



**Abb.48. Induktion der Cytotoxizität in β-pol-defizienten und Wildtyp-Zellen nach GCV-Behandlung.** (A) Es wurden jeweils  $10^3$  β-pol-Zellen ausgesät und 24 h später mit 25-75 μM GCV chronisch behandelt. Nach 10-14 Tage wurden angewachsene Klone gefärbt und ausgezählt. Das Überleben ist als Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± SD. (B) Induktion der Apoptose und Nekrose (bestimmt mit Annexin V) in β-pol-Zellen in Abhängigkeit von der GCV-Konzentration nach einer chronischen Behandlung für 96 h. (C) Induktion der Apoptose und Nekrose in Abhängigkeit von der Behandlungszeit mit 1 mM GCV. Die Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ± SD.

## Ergebnisse

Da  $\beta$ -pol Zellen keine virale Thymidinkinase (HSV-TK) exprimieren, war es nötig die Zellen mit einer  $10^2$ - $10^3$ -fach höheren Konzentrationen von GCV - im Vergleich zu Experimenten mit HSVtk-transfizierten Zellen - zu behandeln, um eine signifikante Induktion der Genotoxizität und Apoptose zu erreichen (Thust *et al.*, 1996). Wie in **Abb.48B** und **C** gezeigt, war die Induktion der Apoptose von der GCV-Konzentration und der Nachbehandlungszeit abhängig. So lag die Induktion der Apoptose in  $\beta$ -pol-/- Zellen bei einer Konzentration von 1 mM GCV bei ~80%, während nur bis zu 40% der  $\beta$ -pol+/+ und ~50% der  $\beta$ -pol-komplementierten Zellen apoptotisch waren. Eine deutliche Induktion der Apoptose wurde 48-96 h nach GCV-Behandlung beobachtet, während die Induktion der Nekrose unter 10% blieb. Die Unterschiede in der Cytotoxizität sind nicht auf eine unterschiedliche Inkorporation des Virustatikums in die zelluläre DNA der  $\beta$ -pol-Zellen zurückzuführen, denn der Einbau von  $^3\text{H}$ -GCV (1  $\mu\text{M}$ ) war bei allen drei  $\beta$ -pol-Zelllinien während eines Zellcyclus identisch und betrug ~50 cpm/ $\mu\text{g}$  DNA (nicht gezeugt).

### **3.4.5. Hypersensitivität der $\beta$ -pol-defizienten Zellen gegenüber**

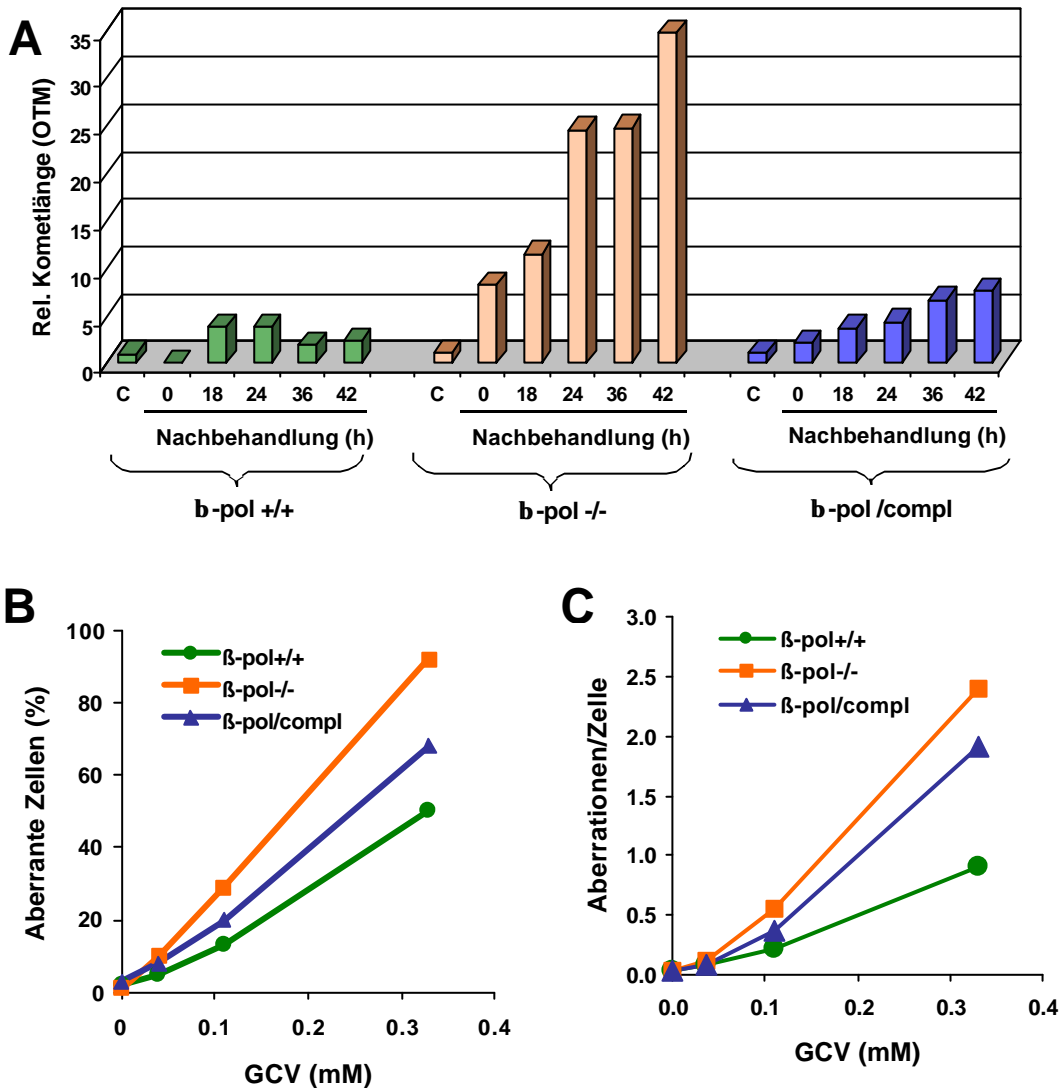
#### **klastogenen Effekte von GCV**

Es wurde bereits gezeigt, daß inkorporiertes GCV in den CHO-HSV-TK-Zellen klastogene Effekte auslöst (Thust *et al.*, 2000a; 2000b). Da in der DNA inkorporiertes GCV in den  $\beta$ -pol-defizienten Zellen schwächer repariert wird, sollte man auch eine erhöhte Genotoxizität von GCV in diesen Zellen erwarten. Um dies zu untersuchen, wurde die Rate von DNA-Strangbrüchen in  $\beta$ -pol-Zelllinien nach Behandlung mit GCV bestimmt. Die Zellen wurden mit 0.5 mM GCV für einen Zellcyclus (18 h) behandelt und nach unterschiedlichen Nachbehandlungszeiten für Einzelzellelektrophorese (Comet-Assay) präpariert, um eine mögliche Induktion von DNA-Strangbrüchen zu untersuchen. Wie in **Abb.49A** gezeigt, lag der Mittelwert der DNA-Brüche 24-42 h nach GCV-Behandlung in  $\beta$ -pol-/- Zellen bei einer rel. Kometlänge von OTM~30, während  $\beta$ -pol+/+ Zellen deutlich weniger DNA-Brüchen akkumulierten (OTM~3). Die Induktion von DNA-Strangbrüchen war in den  $\beta$ -pol-komplementierten Zellen genauso niedrig wie in  $\beta$ -pol-/- Zellen, was darauf hindeutet, daß auch eine partielle Restoration der  $\beta$ -pol-Aktivität gegenüber GCV-induzierte DNA-Schädigung schützt. Die Daten zeigen, daß  $\beta$ -pol-/- Zellen, im Vergleich zu  $\beta$ -pol+/+ und  $\beta$ -pol/compl Zellen, sehr empfindlich im Bezug auf die Entstehung von GCV-induzierten DNA-Brüche sind.

Um festzustellen, ob  $\beta$ -pol-Zellen auch eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber klastogenen Effekten von GCV aufweisen, wurden Zellen mit dem Virustatikum für 18 h behandelt und nach zwei Nachbehandlungscyclen [i.e. 36 h - die für die Induktion der replikationsabhängigen cyto- und gentoxischen Effekte des Agens, benötigte Zeit (Thust *et al.*,

## Ergebnisse

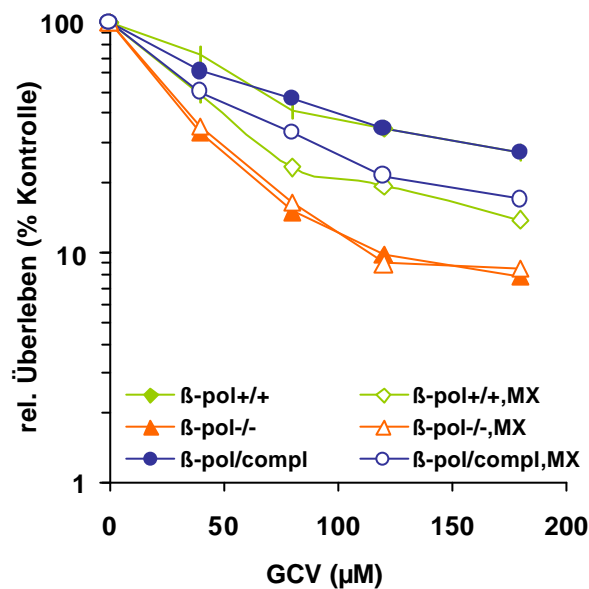
2000b)], für die Messung der Chromosomenaberrationen vorbereitet. Wie in **Abb.49B** gezeigt ist, wiesen  $\beta$ -pol<sup>-/-</sup> Zellen bei der Konzentration von 0.33 mM GCV eine Frequenz der Chromosomenaberrationen von ~ 90 % auf; im Vergleich dazu zeigten  $\beta$ -pol<sup>+/+</sup> und  $\beta$ -pol<sup>/compl</sup> Zellen eine Frequenz von 50 und 68% Aberrationen. Auch die absolute Zahl der entstandenen Aberrationen pro Zelle war in  $\beta$ -pol<sup>+/+</sup> und  $\beta$ -pol<sup>/compl</sup> Zellen geringer als in  $\beta$ -pol<sup>-/-</sup> Zellen (**Abb.49C**). Die Ergebnisse zeigen, daß ein Fehlen der  $\beta$ -pol-Aktivität die chromosomale Stabilität in GCV-behandelten Zellen stark reduziert.



**Abb.49. Induktion von DNA-Strangbrüchen und Chromosomenaberrationen in  $\beta$ -pol-Zellen nach GCV-Behandlung.** (A)  $\beta$ -pol-Zellen wurden für 18 h mit 0.5 mM GCV behandelt, nach verschiedenen Nachbehandlungszeiten für den alkalischen Comet-Assay präpariert und die Frequenz von DNA-Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen gemessen. (B) Frequenz der Chromosomenaberrationen in Abhängigkeit von der GCV-Konzentration, 36 h nach einer 18 h-igen Behandlung mit unterschiedlichen GCV-Konzentrationen. (C) Absolute Zahl der Aberrationen pro Zelle in Abhängigkeit von der GCV-Konzentration, 36 h nach 18 h-iger Behandlung mit GCV.

### 3.4.6. Sensibilisierung von Pol $\beta$ -defizienten Zellen durch Methoxyamin

Es ist bekannt, daß die  $\beta$ -pol in der *single-nucleotide* und der *long patch* Basenexzisionsreparatur (BER) beteiligt ist. Um eine mögliche Rolle des  $\beta$ -pol-abhängigen *long patch* BER bei der Sensitivität gegenüber GCV zu untersuchen, wurden die Zellen mit Methoxyamin (MX) behandelt, welches die *single-nucleotide* BER blockiert. Auf diese Weise wurde bereits die Beteiligung der  $\beta$ -pol-abhängigen *long patch* Reparatur in der Protektion der Zellen gegenüber einfachen alkylierenden Agenzien (z.B. MMS) nachgewiesen (Horton *et al.*, 2000). Co-Behandlung der  $\beta$ -pol+/+ und  $\beta$ -pol/compl Zellen mit MX sensibilisierte die Zellen gegenüber GCV. Im Gegensatz dazu hatte MX keinen Einfluß auf die Sensitivität der  $\beta$ -pol/- Zellen gegenüber GCV (**Abb.50**).



**Abb.50. Methoxyamin-vermittelte Sensibilisierung von  $\beta$ -pol-Zellen gegenüber GCV.** Es wurden jeweils  $2 \times 10^3$   $\beta$ -pol-Zellen pro 6-cm-Schale ausgesät, am nächsten Tag mit 0.5 mM GCV für 10 h behandelt und weiterhin mit 15 mM MX für 8 h co-behandelt. Das Medium wurde gewechselt und die Zellen 10-14 Tage bei 34°C inkubiert, bis Zellklone angewachsen waren. Das Überleben ist als Prozent der unbehandelten Kontrolle mit MX dargestellt. Es sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Die vorhandenen Ergebnisse implizieren, daß die Modulation der Sensitivität der Wildtyp- und Pol  $\beta$ -komplementierten Zellen zum Teil auf einer Inhibition der Pol  $\beta$ -abhängigen *single-nucleotide* BER beruht. Obwohl die Zellen gegenüber GCV in Anwesenheit von MX empfindlicher reagierten (Depletion der *single-nucleotide* BER), waren  $\beta$ -pol+/+ und  $\beta$ -pol/compl Zellen jedoch nicht so empfindlich gegenüber GCV wie die  $\beta$ -pol/- Zellen, was auch auf eine zusätzliche Beteiligung der Pol  $\beta$ -abhängigen *long-patch* BER in der Protektion der Zellen gegenüber GCV schließen läßt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Vergleich zwischen ACV, GCV und PCV bezüglich ihrer Cyto- und Gentoxizität

Der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Herstellung stabiler Transfektanten, die eine virale Thymidinkinase exprimieren, welche Virustatika vom Typ der Nukleosidanaloga effizient in cytotoxische Produkte umwandeln kann. Mithilfe dieser Transfektanten kann man die zellulären und molekularen Prozesse des Zelltods sowie die zytogenetischen Veränderungen nach Virustatika-Behandlung untersuchen. Im Falle, daß das neu etablierte System erfolgreich funktioniert, d.h. daß die generierten stabilen CHO-HSV-TK-Transfektanten bzw. CHO-VZV-TK-Transfektanten die entsprechenden Virustatika vom Typ der Purinanaloga (ACV, GCV, PCV) und der Pyrimidinanaloga (BVDU) effektiv metabolisieren, sollte eine ausgeprägte Hypersensitivität der Transfektanten gegenüber die Virustatika zu beobachten sein. Es zeigte sich, daß die CHO-HSV-TK und CHO-VZV-TK-Transfektanten tatsächlich die viralen Thymidinkinasen exprimierten, was mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen wurde. Die CHO-HSV-TK-Transfektanten wiesen, im Vergleich mit den nicht-transfizierten Kontrollzelllinien (CHO-neo), eine 100-1000-fach höhere Sensitivität gegenüber den Purinnukleosidanaloga auf. Experimente mit den verwendeten Virustatika-Konzentrationen (0.1-1  $\mu\text{M}$  GCV; 1-10  $\mu\text{M}$  PCV;  $\leq 100$   $\mu\text{M}$  ACV;  $\geq 1$   $\mu\text{M}$  BVDU) waren hoch reproduzierbar; man kann also davon ausgehen, daß die Transfektanten metabolisch kompetent sind. Dementsprechend sind sie ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung der Wirkungsweise der Virustatika.

Um die Wirkungsweise verschiedener Virustatika zu verstehen, muß man sich zuerst mit ihrer chemischen Struktur vertraut machen. Die drei Purinnukleosidanaloga ACV, GCV und PCV besitzen eine intakte Guanin-Base sowie einen "acyclischen Zucker", und ihre intrazellulär gebildeten Triphosphate kompetieren mit zellulärem dGTP um die Inkorporation in die DNA (Coen, 1992). Weil sich der "acyclische Zucker" dieser drei Virustatika voneinander unterscheidet, können diese Virustatika völlig unterschiedliche biologische Effekte auslösen. Der aliphatische Seitenstrang von ACV besitzt nur eine Hydroxyl (OH)-Gruppe, vergleichbar zur 5'-OH-Gruppe der Desoxyribose in natürlichen Nukleosiden; die freie 3'-OH-Gruppe fehlt. Deswegen führt das in die DNA inkorporierte ACV zum unmittelbaren Abbruch der DNA-Synthese (*obligate chain termination*) (s. Übersicht bei Darby, 1994). Ob dies auch in der Zelle der Fall ist, ist nicht bekannt. In der Theorie könnte ein Molekül ACV-Monophosphat *per* Replicon inkorporiert werden, aber eine signifikante Inkorporation von radioaktiv markiertem

## Diskussion

ACV in die DNA von HSVtk-exprimierenden Zellen wurde bis jetzt nicht beschrieben (Rubsam *et al.*, 1998). Wir sind der Meinung, daß die durch ACV induzierten cyto- und gentoxische Effekte die Folge des unmittelbaren Kettenabbruchs, i.e. des Replikationsstopps sind. Während des Replikationsstopps versuchen die Polymerasen, die Inkorporationsstellen, welche Blöcke für die Replikation sind, zu umgehen (*bypass*), indem Rekombinationsprozesse eingeleitet werden. Die Rekombination führt zur Bildung von Schwesterchromatidaustauschen (*sister chromatid exchanges*, SCEs) oder zur Induktion von DNA-Strangbrüchen (durch Nuclease-Angriff an offenen, arretierten Replikationsgabeln, Kaina *et al.*, 1997), die zu strukturellen Chromosomenaberrationen führen.

In metabolisch kompetenten Zellen werden ACV, GCV und PCV schnell und effizient monophosphoryliert und in die entsprechenden Triphosphate (TP) umgewandelt. Die Triphosphate des GCV und des PCV weisen eine lange Halbwertszeit auf (Smee *et al.*, 1985; Biron *et al.*, 1985; Vere Hodge, 1993; Vere Hodge & Cheng, 1993), weswegen eine große Zahl der Zellen in Kontakt mit der phosphorylierten Form der Virustatika, entweder durch die zelluläre Expression des HSVtk-Gens oder durch den interzellulären Transport der phosphorylierten Nukleoside durch *gap junctions*, kommen kann. In beiden Fällen kann eine Behandlung mit Virustatika eine mögliche Gefahr für gesunde Zellen bedeuten, nämlich dann, wenn Zellen eine Exposition überleben und genetische Folgeschäden aufweisen. Aus diesem Grund ist es wichtig aufzuklären, wie groß das gentoxische Potential dieser Agenzien im Verhältnis zu ihrer cytotoxischen Aktivität ist (s. Übersicht bei Wutzler & Thust, 2001). GCV ist ein sehr starkes gentoxisches Agens, das in der Lage ist, auch bei sub-toxischen Konzentrationen genetische Schädigungen zu verursachen. Im Gegenteil dazu ist PCV bei äquitoxischen Konzentrationen deutlich weniger gentoxisch. Die Ursache für die relativ geringe klastogene Aktivität von ACV, im Vergleich zu GCV und PCV, liegt vermutlich in der Tatsache, daß ACV-TP eine sehr kurze intrazelluläre Halbwertszeit (0.7 h; Vere Hodge & Perkins, 1989) hat, und deswegen nur schwach in die DNA inkorporiert wird. Besonders wichtig aber ist, daß ACV-TP terminal eingebaut wird; die Inkorporation endet folglich mit einem Kettenabbruch, bzw. mit der unvollständigen Replikation.

Es wurde vor kurzem in einem Modell vorgeschlagen, daß der durch chemische Mutagene induzierte DNA-Replikationsblock für die Entstehung von DNA-Brüchen und der Induktion von Chromosomenaberrationen verantwortlich ist (Kaina, 1998). Dieses Modell könnte auf Virustatika vom Typ der Purinnukleosidanaloga erweitert werden. Durch das Modell wäre erklärbar, warum durch ACV induzierte gentoxische Effekte schon unmittelbar nach der Behandlung nachweisbar sind.

Im Vergleich zum ACV wird GCV sehr stark in die genomische DNA der HSVtk-exprimierenden Zellen inkorporiert (St. Clair *et al.*, 1987; Rubsam *et al.*, 1998; Thust *et al.*,

## Diskussion

2000a). Der Einbau in die DNA macht den Hauptunterschied zwischen ACV und GCV aus. Es ist wichtig zu betonen, daß während des GCV-Inkorporationscyclus keine SCEs und Aberrationen entstehen (Thust *et al.*, 2000a). Daraus kann man schlußfolgern, daß die GCV-induzierte Rekombinationen und Klastogenität eine Folge der Störung der Replikation in den Nachbehandlungszellcyclen ist. Weiterhin ist anzunehmen, daß die hohe intrazelluläre Stabilität des GCV-TP, im Vergleich zu der des ACV-TP, sicherlich auch eine Rolle für die stärkere Gentoxizität von GCV spielt. Dies kann gleichzeitig erklären, warum es nötig ist, eine 100-fach höhere Konzentrationen von ACV einzusetzen, um mit GCV vergleichbare gentoxische Effekte zu erreichen. Das intrazellulär gebildete GCV-TP kann, ähnlich zu anderen Nukleotiden, nicht frei durch die zelluläre Membran wandern, und aufgrund seiner langen Halbwertszeit bildet sich ein intrazellulärer *Pool* von GCV-TP, das weiterhin (in späteren Zellcyclusphasen), in die DNA eingebaut werden kann. Eine ähnliche Situation ist bei PCV, nicht aber bei ACV vorstellbar, dessen Triphosphat-Form schnell abgebaut wird. Der wiederholte Einbau von GCV und die Stabilität der GCV-Läsionen führt zu einer *multylog cytotoxicity* (Rubsam *et al.*, 1998) bzw. zu verzögerten gentoxischen und apoptotischen Effekten dieses Virustakums.

Weder Experimente von Rubsam *et al.* (1998), in denen der <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau nach GCV-Gabe gemessen wurde, noch hier gezeigte BrdU-Einbau-Versuche konnten eine signifikante Inhibition der DNA-Replikation während der GCV-Inkorporation oder unmittelbar nach einer 14 h-Behandlung feststellen. Laut Rubsam *et al.* (1998) erfolgt bei apoptotischen GCV-Konzentrationen eine normale Progression der HSVtk-exprimierenden Zellen durch die ersten beiden Zellcyclen, während die Zellen in drittem Zellcyclus in der frühen S-Phase akkumulieren, wo sie bis zum Tod durch Apoptose verbleiben. Unter ähnlichen Bedingungen konnten wir mittels Durchflußzytometrie einen S-Phase-Block feststellen, in dem ~40% der Zellen arretiert waren, während sich 25% der Zellen in einem G2/M-Block befanden. Der G2/M-Block ist wahrscheinlich der Grund für eine Zunahme in der Größe der Zellen und der Kerne, die unter dem Mikroskop oft beobachtet wurde. Eine bedeutsame Zahl der Zellen ist jedoch in der Lage nach GCV-Behandlung in die Mitose einzutreten. Diese Zellen zeigen dosisabhängig Chromosomenschäden.

Die antivirale Selektivität der Virustatika vom Typ der Nukleosidanaloga beruht auf ihrer präferenziellen Monophosphorylierung durch Herpesvirus-kodierte Nukleosidkinasen (Thymidinkinase von HSV-1, HSV-2, und VZV) oder durch eine Proteinkinase, die von dem UL97-Gen des CMV kodiert wird (Sullivan *et al.*, 1992). Zusätzlich ist die Selektivität der Purinnukleosidanaloga durch deutlich niedrigere  $K_i$ -Werte von Herpesvirus-DNA-Polymerasen, im Vergleich zu ihren zellulären Pendants, charakterisiert. In früher erschienenen Arbeiten über die "Suizidgentherapie" wurde teils zu Unrecht geschlußfolgert,

## Diskussion

daß die molekulare Wirkungsweise von GCV auf der unmittelbaren Termination der DNA-Synthese und der anschließenden Induktion der Apoptose beruht. Diese Schlußfolgerung wurde aus dem direkten Vergleich mit ACV abgeleitet. Im Gegensatz zu ACV enthält der "acyclische Zucker" von GCV und PCV außer einer 5'-OH-Gruppe auch eine freie 3'-OH-Gruppe, die das Eingehen einer Phosphodiesterbindung und theoretisch auch eine interne Inkorporation dieser Virustatika in den wachsenden DNA-Strang ermöglicht. Experimente *in vitro* mit gereinigten DNA-Polymerasen aus Herpesviren und Säugerzellen sowie synthetischen *Primer-Templates* zeigten, daß GCV-TP terminal inkorporiert wird, und daß der DNA-Strang um mindestens ein weiteres Nukleotid neben dem inkorporierten GCV-Monophosphat verlängert wird, wonach es zum Kettenabbruch kommt (Reid *et al.*, 1988; Reardon *et al.*, 1989; Ilsley *et al.*, 1995). Aufgrund dieses Befundes wurde GCV als *nonobligate chain terminator* angesehen. Andererseits stellt sich die Frage, ob diese *in vitro* Untersuchungen überhaupt für die Situation in einer Zelle relevant sind, wenn man die Komplexität der Replikationsmaschinerie in Betracht zieht (Reid *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1994). Es wurde für GCV sogar gezeigt, daß es nicht die Replikation der CMV-DNA stört, und daß kürzere subgenomische DNA-Fragmente weiter synthetisiert werden, was zu einer Akkumulation von unvollständigen, nicht infektiösen viralen DNA-Fragmenten führt (Hamzeh *et al.*, 1991). Laut den erwähnten Tatsachen kann die antivirale und möglicherweise die cytotoxische Aktivität von GCV nicht ein Resultat des DNA-Replikationsstopps auf Grund des Kettenabbruchs sein. Unsere Versuche zeigten, daß GCV sehr effizient in die DNA von metabolisch kompetenten CHO-Zellen inkorporiert wird, und daß die Zellen nicht sofort in der Proliferation gehemmt, sondern nur in der Progression durch den Zellcyclus (verzögerte S-Phase, Replikation) verlangsamt waren. GCV-behandelte metabolisch kompetente CHO-HSVtk-Zellen sind auf jeden Fall in der Lage, einen kompletten Zellcyclus nach Behandlung zu durchlaufen. Dieses Ergebnis unterstützt die Befunde von St.Clair *et al.* (1987) und Rubsam *et al.* (1998), die ähnliche Ergebnisse in HSVtk-exprimierenden Mausfibroblasten und Glioblastomzellen beschrieben haben. In die DNA inkorporiertes GCV induzierte im zweiten Nachbehandlung-DNA-Replikationszellcyclus stark Schwesterchromatidaustausche (SCEs=*sister chromatid exchanges*) und Aberrationen. Es scheint, daß die Replikation des GCV-enthaltenden DNA-Templates möglicherweise durch sterische Störungen der DNA-Polymerasen auf Grund des inkorporierten GCV gehemmt ist. GCV besitzt eine intakte Guanin-Base und ist in der Lage, normale Watson-Crick Basenpaarungen mit Desoxycytosin zu bilden. Untersuchungen mit synthetischen Oligonukleotiden haben gezeigt, daß intern inkorporiertes GCV die B-Konformation der DNA-Helix aufrechterhält, aber seine thermale Stabilität reduziert ist (Marshalko *et al.*, 1995). Interessanterweise wurden im Zucker-Phosphat-Rückgrad in der Nähe der GCV-Inkorporationsstelle signifikante Verzerrungen beobachtet

## Diskussion

(Foti *et al.*, 1997). Unsere cytogenetischen Studien zeigten, daß die Virustatika GCV und PCV im Zellcyclus der Behandlung keine SCEs und Aberrationen induzieren. Ein zusätzlicher Replikationscyclus war nötig, um die gentoxischen Effekte auszulösen. Das bedeutet, daß im Fall von GCV die SCEs und Aberrationen nicht im DNA-Inkorporationscyclus, sondern im Nachbehandlungszellcyclus entstehen. Wir nehmen an, daß das inkorporierte GCV Veränderungen in der DNA-Helix verursachen kann, welche die Replikation im nächsten Zellcyclus blockieren. Diese Replikationsblöcke sind sehr wahrscheinlich die Hauptquelle von SCEs und Aberrationen, wobei SCEs durch Rekombinationsvorgänge entstehen, die der Umgehung von Replikationsblöcken dienen (Kaina *et al.*, 1997). Es kann auch spekuliert werden, daß GCV von Reparatur-Enzymen erkannt wird und daß durch Reparaturprozesse sekundäre Läsionen entstehen, die im nachfolgenden Zellcyclus Rekombinationen induzieren.

Strukturell ist PCV ähnlich zu GCV, mit der Ausnahme, daß anstatt eines Ether-Sauerstoffs in dem aliphatischen Seitenstrang des offenen "Zuckers" eine Methylen-Gruppe vorhanden ist. Offensichtlich ist diese geringfügige Veränderung in der Struktur des Zuckers für die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten dieser Virustatika verantwortlich. Es wurde vorgeschlagen, daß beide Virustatika ihre antivirale Aktivität über unterschiedliche Mechanismen entfalten; die Details über den mechanistischen Weg bleiben aber weiterhin unbekannt. Sie können nicht durch die unterschiedliche Monophosphorylierungskapazität der Herpesvirus-Nukleosidkinasen erklärt werden (Vere Hodge & Cheng, 1993). Während GCV effizient in der Therapie von Cytomegalievirus-Erkrankungen verwendet wird, ist PCV in dieser Hinsicht völlig ungeeignet. Es zeigt aber eine gute Wirkung in der Therapie von Varicella zoster-Virusinfektionen.

PCV-TP zeigt eine 100-fach schwächere Interaktion mit Herpesvirus-DNA-Polymerasen als ACV-TP (Earnshaw *et al.*, 1992). Obwohl *in vitro* Experimente mit DNA-Polymerase  $\alpha$  und HSV-2-DNA-Polymerase, synthetischen Primer und PCV-TP ähnliche Ergebnisse wie bei GCV zeigten, gibt es keine klaren Beweise dafür, daß PCV während der Replikation (*in vivo*) in die genomische DNA eingebaut wird (Earnshaw *et al.*, 1992; Darby, 1995). In unseren Einbau-Experimenten wurde ~ 500-fach weniger PCV als GCV in die DNA der CHO-HSVtk-Zellen eingebaut. Gleichzeitig war PCV weniger effektiv im Auslösen von SCEs und Chromosomenaberrationen. Aus diesem Grund war es sehr überraschend, daß sich PCV als ein sehr effektives cytotoxisches, Apoptose-auslösendes Agens in metabolisch kompetenten Zellen herausstellte.

Der klastogene Effekt von PCV war, im Vergleich zum GCV, nicht nur quantitativ sondern auch qualitativ unterschiedlich. PCV induzierte kaum Brüche und Translokationen. Irreguläre Kondensierungen des Chromatins, PCCs (*premature chromosome condensations*) waren die Hauptveränderungen des Chromatins, charakterisiert durch stark

## Diskussion

dekondensierte Chromosomen. Sie deuteten - im Vergleich zu GCV - auf einen grundsätzlich anderen Mechanismus der Genotoxizität hin. PCCs entstehen, wenn Zellen mit einem nicht-synchronisierten oder fragmentierten Chromosomensatz, wegen Zellfusion oder schwerer Chromatinschädigung, in die Mitose eintreten (Mackey *et al.*, 1988; Ianzini & Mackey, 1997). Basierend auf der Tatsache, daß PCV nur ein schwaches Klastogen ist und daß die PCCs offensichtlich ein Teil des gleichen Chromosomensatzes geschädigter Zellen sind, kann man schlußfolgern, daß PCV-induzierte PCCs aus einer nicht synchronisierten Karyokinese und Cytokinese (*uncoupling*) entstehen (Thust *et al.*, 2000b).

PCV wird klinisch in der Therapie von Herpes zoster eingesetzt, und zwar in der Form des oral-verwendbaren Famciclovirs (9-[4-acetoxy-3-acetoxymethylbut-1-yl]guanin). Nach oraler Administration von Famciclovir wird dieses Virustatikum durch Aldehyd-Oxidase und Esterasen im intestinalen Epithel und in der Leber komplett zum PCV metabolisiert. Der maximal gemessene Wert im Blutplasma ist 13 µM (*Physicians GenRx Mosby-Year Book*, 1996; VereHodge, 1993). Diese Konzentration ist deutlich höher als die cytotoxische PCV-Konzentration, die in HSVtk-transfizierten CHO-Zellen genotoxische Effekte hervorruft.

Experimente, die sich mit der Cytotoxizität beider Virustatika (GCV und PCV) befaßten, zeigten, daß in beiden Fällen der Hauptweg des Zellsterbens die Apoptose ist. Nekrose wurde nur mit niedriger Frequenz (<15%) induziert. Die höchsten erreichten apoptotischen Werte lagen 72 h nach der Behandlung mit 1 µM GCV bei ~70%, bei PCV bei ~60%. Die durch Apoptose ausgeprägte Cytotoxizität ist im Fall beider Nukleosidanaloga ein spätes Ereignis, das sich erst 2-3 Zellcyclen nach Behandlung manifestiert. Es wurde früher die Hypothese aufgestellt, daß Chromosomenaberrationen ursächlich an der Induktion der Apoptose beteiligt sind (Kaina *et al.*, 1997). Da PCV trotz seiner schwachen klastogenen Aktivität ("untypische" Aberrationen!) ein hoch potentes cytotoxisches Agens ist, kann man annehmen, daß die PCV-induzierte Apoptose durch einen anderen Mechanismus eingeleitet wird, der sich grundsätzlich vom Mechanismus des GCV unterscheidet.

Im Bereich der antiviralen Forschung ist bekannt, daß winzige Modifikationen in der chemischen Struktur der Nukleosidanaloga große Unterschiede in der biologischen Aktivität verursachen können, weswegen es keine Nukleosidanaloga gibt, die nahe verwandt sind, (sogenannte *close congener* ; Darby, 1994). Gerade am Beispiel der klastogenen und rekombinogenen Aktivität von GCV und PCV in HSVtk-transfizierten CHO-Zellen ist diese Tatsache offenbar.

Die hohe Kapazität von PCV, Apoptose und letztendlich den reproduktiven Zelltod zu induzieren, ohne größere genotoxische Effekte auszulösen, legt nahe, PCV in der "Suizidtherapie" anzuwenden. Unsere Ergebnisse deuten an, daß PCV wahrscheinlich

## Diskussion

eine bessere Alternative zum GCV in der klinischen Anwendung wäre, da es auf diese Weise eine Möglichkeit gäbe, durch GCV möglicherweise langfristig ausgelöste gentoxische Effekte in der behandelten Population zu vermeiden.

Ähnliche Experimente wie sie mit GCV und PCV in CHO-HSVtk-Zellen bezüglich Cytotoxizität und Genotoxizität durchgeführt wurden, wurden auch mit ACV durchgeführt. ACV-induzierte chromosomale Schädigungen und cytotoxische Effekte waren mit GCV vergleichbar, nur bei 100-fach höheren Konzentrationen ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ). Diese Konzentrationen sind jedoch im Blutplasma nicht erreichbar. Der Grund dafür liegt vermutlich in der Tatsache, daß ACV-TP, im Vergleich zu Triphosphaten von GCV und PCV, eine sehr kurze Halbwertszeit (0.6-0.7 h) hat (VereHodge and Perkins, 1989). Nach ACV-Behandlung waren die CHO-HSVtk-Zellen im Koloniebildungstest nur  $\sim 10$ -fach sensitiver als die CHO-neo-Kontrolle. Wegen dieser relativ kleinen Unterschiede zwischen HSVtk-positiven und HSVtk-negativen Zellen nach ACV-Behandlung ist ACV für die Verwendung in der Gentherapie möglicherweise nicht geeignet.

### **4.2. Molekularer Mechanismus der GCV-induzierten Apoptose**

Da GCV sowohl in der antiviralen Therapie (vor allem bei Transplantatempfänger als Vorbeugung gegen CMV-Infektionen) als auch in der Gentherapie maligner Tumore verwendet wird, ist es wichtig, den molekularen Mechanismus des durch GCV induzierten Zelltods zu verstehen. GCV-induzierter Zelltod erfolgt im wesentlichen über den programmierten Zelltod, die Apoptose. Die Frequenz der Apoptose nimmt mit der Erhöhung der GCV-Konzentration zu. Im Gegenteil hierzu bleibt die Nekrose unverändert ( $< 10\%$ ). Nach Behandlung exponentiell wachsender Zellen mit GCV für einen Zellcyclus (14 h) traten die ersten apoptotischen Zellen nach ungefähr 24 h Nachbehandlungszeit auf. Die Frequenz der apoptotischen Zellen nahm zu späten Zeiten (36-72 h) deutlich zu. Die Zellcyclusanalyse zeigte, daß die Zellen im Cyclus der Behandlung wie auch im ersten Nachbehandlungscyclus nicht signifikant in der Progression gehemmt sind, sondern erst im zweiten Nachbehandlungscyclus stark in der S- und G2/M-Phase des Zellcyclus inhibiert. Dies scheint ein generelles Phänomen der GCV-behandelten Zellen zu sein, das z.B in humanen Glioblastomzellen (Rubsam *et al.*, 1998) und murinen Melanomzellen (Wei *et al.*, 1998) beobachtet wurde. Halloran und Fenton (1998) schlugen vor, daß der irreversible G2/M-Block mit den Veränderungen des Cytoskelets assoziiert ist, und daß diese Veränderungen anschließend zum Zelltod führen. Wir sind der Meinung, daß der Block in der Progression der Zellen durch die einzelnen Phasen des Zellcyclus ein spätes Ereignis der GCV-induzierten

## Diskussion

primären DNA-Schädigung ist. Im ersten Nachbehandlungscyclus kommt es zur Generierung der sekundären Schäden, die im zweiten Nachbehandlungscyclus (nach erneuter Replikation) in Doppelstrangbrüche (DSBs) umgewandelt werden. Diese sekundären DNA-Schäden oder DBSs selbst induzieren vermutlich die Apoptose. Daß DSBs Apoptose auslösen können, wurde dadurch gezeigt, daß Restriktionsenzym (*PvuII*)-generierte DSBs effizient Apoptose nicht aber Nekrose auslösen (Lips & Kaina, 2001). Da DSBs aus der Replikation des GCV-enthaltenden DNA-Templates entstehen, können die Ergebnisse gleichzeitig auch die Tatsache erklären, daß GCV-induzierte Apoptose replikationsabhängig ist (Hamel *et al.*, 1996).

Es ist wichtig zu betonen, daß CHO-9-Zellen ein mutiertes p53-Protein besitzen (Orren *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde keine Transaktivierung des p53-Promotors und keine Induktion des p21 (Waf1)-Proteins nach Behandlung mit GCV beobachtet (nicht gezeigt). Daher ist anzunehmen, daß die GCV-induzierte Apoptose in CHO-HSV-TK-Zellen unabhängig von p53 abläuft. Eine Beteiligung des p53/p21-unabhängigen Weges in der GCV-induzierten Apoptose ist von besonderem Interesse hinsichtlich der Applikation der HSVtk/GCV-Suizidtherapie für die Behandlung von malignen Tumoren, die kein funktionelles p53-Protein exprimieren. Publierte Daten zeigen, daß p53 das Gen für den CD95 (Fas)-Rezeptor als Antwort auf gentoxischen Stress nach Behandlung mit Cytostatika aktivieren kann (Muller *et al.*, 1998). In unserem Zellsystem blieb Expression des Fas-Rezeptors unverändert. Lediglich eine ~ 2-fache Induktion des CD95-Ligandes (FasL) wurde beobachtet, welche von einer ~ 2-fachen Induktion der Caspase-8-Aktivität gefolgt wurde. Es ist bekannt, daß die Aktivierung der Caspase-8 zum großen Teil abhängig von der CD95-Ligand-vermittelten Oligomerisation des CD95-Rezeptors ist (Srinivasula *et al.*, 1996), aber auch Rezeptor/Ligand-unabhängig erfolgen kann (Wesselborg *et al.*, 1999). Es wurde berichtet, daß GCV (in p53-profizienten HSVtk-exprimierenden Neuroblastomzellen) die Apoptose über Aktivierung der Caspase-8 induziert, welche ihrerseits über eine p53-vermittelte Translokation des CD95-Rezeptors aus dem Cytosol zur Membran ohne Beteiligung des CD95-Liganden vermittelt wird (Beltinger *et al.*, 1999). Eine Beteiligung des Fas/FasL-Weges in der GCV-induzierten Apoptose wurde auch in verschiedenen Tumorzelllinien gezeigt, von denen alle ein funktionelles p53-Protein besaßen (Wei *et al.*, 1999; Beltinger *et al.*, 2000). Da in unserem Zellsystem die Expression des Fas-Rezeptors unverändert war und die Caspase-8 nur initial aktiviert, aber im späteren Verlauf nicht weiter induziert wurde, nehmen wir an, daß die CD95/Caspase-8-vermittelte Apoptose in Zellen, die kein funktionelles p53-Protein exprimieren, nur eine untergeordnete Rolle spielt. Daher kann man schlußfolgern, daß die GCV-induzierte Apoptose in Abhängigkeit vom Zelltyp p53-abhängig wie auch p53-unabhängig ablaufen kann.

## Diskussion

Es wurden die Expression verschiedener pro- und anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie (Bax, BAD, Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>), die PARP-Expression, sowie die Aktivität der einzelnen Caspasen nach GCV-Behandlung untersucht. PARP wurde in CHO-HSV-TK-Zellen nicht aber in CHO-neo-Zellen gespalten. Die Expression von Bax und Bcl-x<sub>L</sub> blieb unverändert, was im Gegenteil zu publizierten Daten über die Bax-Zunahme in Rattengliomzellen nach einer GCV-Behandlung steht (Craperi *et al.*, 1999). In metabolisch kompetenten CHO-HSV-TK-Zellen wurde eine Zunahme des hypophosphorylierten BAD-Protein gefunden. In der CHO-neo-Kontrolle lag BAD hingegen nach GCV-Behandlung in der anti-apoptotischen hyperphosphorylierten Form vor. Es ist bekannt, daß die Phosphorylierung von BAD durch die Proteinkinase Akt erfolgt, welche eine essentielle Rolle bei der durch Wachstumsfaktoren vermittelten Hemmung der Caspaseaktivierung spielt (Datta *et al.*, 1997). Ein wichtiger Merkmal der GCV-induzierten Apoptose in CHO-HSV-TK-Zellen war die Bcl-2-Abnahme. Durch RT-PCR-Versuche wurde gezeigt, daß Ursache für die Abnahme der Bcl-2-Menge nicht in einer veränderten *bcl-2*-Transkription oder in einer verminderten mRNA-Stabilität liegt, was impliziert, daß die Regulation der Bcl-2-Menge nach GCV-Behandlung abhängig von post-translationalen Ereignissen ist.

Um den Mechanismus der Bcl-2-Abnahme sowie die Beteiligung der Caspasen in der GCV-induzierten Apoptose näher aufzuklären, wurde die Wirkung von Caspaseinhibitoren untersucht. Der Caspase-3-Inhibitor (zDEVD) hemmte zum Teil die Bcl-2- und PARP-Spaltung (um etwa 40%) und reduzierte in geringerem Ausmaß die Apoptose. Dies zeigt, daß Caspase-3 in CHO-HSV-TK-Zellen nach GCV-Behandlung nicht die Hauptrolle bei der Apoptose spielt. Andererseits waren der spezifische Caspase-9-Inhibitor (zLEHD) und der allgemeine Caspaseinhibitor (zVAD) sehr effizient hinsichtlich der Suppression der GCV-induzierten PARP/Bcl-2-Spaltung und der Apoptose. Dies zeigt, daß Caspase-9-Aktivierung ein wichtiges Ereignis der GCV-induzierten PARP-Spaltung und der eingeleiteten Apoptose ist. Zusätzlich zeigt dieses Ergebnis, daß Bcl-2 hauptsächlich durch Caspase-9 und deutlich geringer durch Caspase-3 gespalten wird. Die Caspasen-vermittelte Spaltung des Bcl-2-Proteins ist über einen Amplifikationsmechanismus für die weitere Bcl-2-Abnahme verantwortlich. Dies wurde durch Transfektion der dominant-negativen (DN) Varianten der Caspase-9 und Caspase-3 in die CHO-HSV-TK-Zellen gezeigt. Die Expression der DN-Caspase-9 inhibierte die Bcl-2-Spaltung und Apoptose nach GCV-Behandlung, während die DN-Caspase-3 nur einen geringen Einfluß hatte. Falls Caspase-9 prädominierend in der Bcl-2-Spaltung involviert ist, sollte eine Überexpression der konstitutiv aktiven Variante der Caspase-9 einige durch GCV eingeleitete Effekte imitieren. Dies war tatsächlich der Fall, denn die transient transfizierte aktive Wildtyp-Caspase-9 konnte Bcl-2 auch ohne GCV-Behandlung und in Anwesenheit des Caspase-3-Inhibitors spalten. Diese Experimente

## Diskussion

konnten nur unter Bedingungen einer transienten Transfektion durchgeführt werden, denn eine stabile Expression aktiver Caspase-9 führt zum Auflösen der transfizierten Zellklone, die nicht in der Lage sind diese Expression zu überleben.

Eine direkte Interaktion zwischen Caspase-3 und Bcl-2 wurde in einigen Säugerzelllinien gezeigt (Cheng *et al.*, 1997; Grangirard *et al.*, 1998; Fujita & Tsuruo, 1998). Jedoch wurde die Bcl-2-Spaltung durch Caspase-9 noch nicht beschrieben. Das Spaltprodukt von 23 kDa (Bcl-2 p23) ist identisch mit dem Produkt, welches durch Caspase-3 entsteht. Es akkumulierte stark nach GCV-Behandlung in CHO-HSV-TK-Zellen. Für das Bcl-2-Fragment wurde gezeigt, daß es in der mitochondrialen Membran lokalisiert ist und die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Cytosol stimuliert, wodurch es aktiv in der Promotion der Apoptose beteiligt ist (Kirsch *et al.*, 1999).

Die Spaltung von Bcl-2 durch Caspasen erfolgt an einer spezifischen Stelle in der Bcl-2-Sequenz, die zuerst für Caspase-3 im humanen und Ratte-Bcl-2-Protein beschrieben wurde (Cheng *et al.*, 1997). Um die intakte (putative) Caspase-Schnittstelle in der Sequenz des Hamster-Bcl-2-Proteins zu bestimmen, wurde die Hamster-bcl-2-cDNA kloniert (Tomicic *et al.*, 2000). Hierbei zeigte sich, daß potentielle Schnittstellen von Caspasen vom Hamster und anderen Säugetieren (Maus, Ratte, Mensch) stark konserviert sind. Die Caspase-3-Schnittstelle in der Hamster-Bcl-2-Sequenz ist wahrscheinlich die Stelle, an welcher beide Caspasen, 3 und 9, das intakte Bcl-2-Protein *in vivo* schneiden. Hierfür gibt es mehrere Gründe: (i) Rekombinantes Bcl-2-Protein wurde *in vitro* durch aktive Caspase-3 und Caspase-9 geschnitten, und resultierte in einem Fragment von der gleichen Größe (23 kDa); (ii) Bcl-2-Spaltung *in vitro* und in intakten Zellen wurde durch Punktmutationen in der Caspase-3-Schnittstelle blockiert (Cheng *et al.*, 1997); (iii) überexprimiertes punktmutiertes Bcl-2-D34A-Protein konnte nicht gespalten werden (siehe Ergebnisse); (iv) Caspase-9 zeigt eine starke Reaktivität mit anderen Peptiden oder Proteinen, welche ein DxxD-Motif enthalten; z.B. PARP wird durch Caspase-3 (Nicholson *et al.*, 1995) und Caspase-9 (Duan *et al.*, 1996) an der gleichen Caspase-3-Schnittstelle in das 85 kDa-große Fragment gespalten.

Eine der frühesten apoptotischen Ereignissen in CHO-HSV-TK-Zellen nach der GCV-Behandlung war die Freisetzung von Cyt C. Die Freisetzung erfolgte schon bevor eine signifikante Bcl-2-Abnahme sichtbar wurde. Da die initiale Cyt C-Freisetzung nicht durch Caspaseinhibitoren gehemmt wurde, was auch für die durch chemische Agenzien induzierte Apoptose berichtet wurde (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999), ist die Caspase-9-vermittelte Bcl-2-Spaltung sehr wahrscheinlich nicht für die frühe sondern spätere Cyt C-Freisetzung verantwortlich.

Basierend auf unseren Ergebnissen wird folgendes Modell der GCV-induzierten Apoptose vorgestellt (**Abb.51**): Inkorporation von GCV-TP in die zelluläre DNA führt zur

## Diskussion

Entstehung von sekundären DNA-Läsionen im nächsten Nachbehandlungszellcyclus, wahrscheinlich wegen Fehler in der DNA-Replikation oder auf Grund von DNA-Reparatur. Es kommt zur Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) und Chromosomenaberrationen, die durch einen bis jetzt noch nicht aufgeklärten Mechanismus die Cyt C-Freisetzung stimulieren (eventuell durch eine geringe initiale Bcl-2-Abnahme, die das Verhältnis Bax:Bcl-2 ändert). Cyt C bindet an Apaf-1 und Procaspase-9. Dadurch wird Caspase-9 aktiviert (Li *et al.*, 1997), was weitere exekutive *down-stream* Caspasen aktiviert (Slee *et al.*, 1999) und andere Substrate wie z.B. PARP durch Spaltung inaktiviert. Die aktive Caspase-9 und auch in geringerem Maße Caspase-3 spalten Bcl-2. Das Produkt der Spaltung - ein pro-apoptotisches Bcl-2-Fragment (Bcl-2 p23) - stimuliert die zusätzliche Freisetzung von Cyt C und eine weitere Aktivierung der Caspase-9. Dieser positive "Amplifikationsloop" scheint eine Besonderheit der GCV-induzierten Apoptose in CHO-HSV-TK-Zellen zu sein; er könnte die hohe GCV-induzierte Apoptose-Frequenz in Abwesenheit von funktional aktiven p53 erklären.

Die Tatsache, daß die Caspase-9 essentiell für die GCV-induzierte Apoptose in p53-defizienten CHO-HSV-TK-Zellen ist, könnte Bedeutung für die Entwicklung neuer Strategien der HSVtk/GCV-Suizidgentherapie haben. Durch Co-Transfer der Caspase-9 mit dem HSVtk-Gen in Zielzellen könnte der therapeutische Effekt von GCV verbessert werden, indem die Apoptose in transduzierten Tumorzellen oder Tumorzellen, die durch metabolische Kooperation sensibilisiert sind, stärker eingeleitet wird. Dieses Protokoll könnte von besonderem Nutzen für Tumorzellen sein, die eine starke intrinsische Resistenz besitzen, weil anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> überexprimiert werden (Feinmesser *et al.*, 1999; Gallo *et al.*, 1999), oder Defekte in der Caspase-9-Expression oder Regulation aufweisen (Srinivasula *et al.*, 1999; Seol & Billiar, 1999). Verstärkte Apoptose von Tumorzellen könnte eine Verwendung geringerer Konzentrationen von GCV ermöglichen, was die allgemeine Effektivität der Therapie steigern würde. Auf dieser Weise könnte die starke systemische Toxizität von GCV reduziert werden, was die Wahrscheinlichkeit einer Erholung der Patienten nach der Behandlung vergrößern würde.

## Diskussion

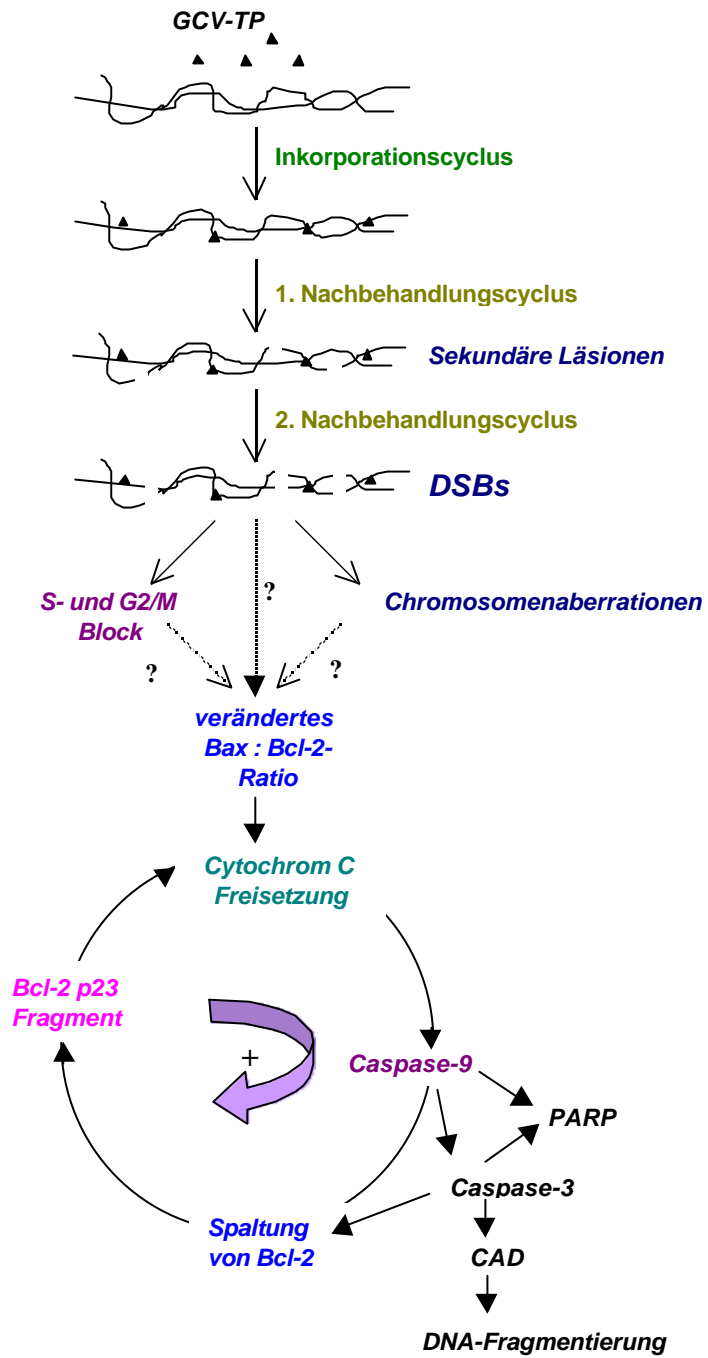


Abb.51. Modell des molekularen Mechanismus der GCV-induzierten Apoptose.

### **4.3. BVDU-Wirkung in CHO-VZV-TK-Zellen**

Ähnlich zu den meisten anderen Antiherpes-Virustatika beruht die antivirale Aktivität von BVDU auf einer selektiven Monophosphorylierung durch Herpesvirus-kodierte Thymidinkinasen (TKs). Im Gegensatz zu viralen Thymidinkinasen können die zellulären Thymidinkinasen, wegen ihrer stringenten Substratspezifität, BVDU nicht phosphorylieren (Cheng *et al.*, 1981; Ciucci *et al.*, 1997). In Herpesvirus-infizierten Zellen wird BVDU-Monophosphat durch die Thymidylatkinase-Funktion (TMP-K), die mit einigen viralen Thymidinkinasen assoziiert ist (z.B. bei HSV-1 und VZV), zum BVDU-Diphosphat phosphoryliert (Coen *et al.*, 1989; Cazaux *et al.*, 1998). Die Thymidylatkinase (TMP-K) - Funktion viraler TK ist für die antivirale Aktivität von BVDU essentiell, denn das Virustatikum ist in Herpesviren, deren TKs keine TMP-K-Funktion aufweisen (z.B. HSV-2) inaktiv (Fyfe, 1982; Degrève *et al.*, 2001). Letztendlich wird BVDU-Diphosphat durch zelluläre Nucleosid-Diphosphatkinasen zum Triphosphat phosphoryliert. Es ist generell akzeptiert, daß BVDU-Triphosphat der ultimale antivirale Metabolit des BVDU ist, welcher entweder die Herpesvirus-kodierte DNA-Polymerase hemmt, oder durch Einbau in die DNA die neu synthetisierte virale DNA destabilisiert (Allaudeen *et al.*, 1981; Mancini *et al.*, 1983; Prusoff *et al.*, 1984; Yokota *et al.*, 1984).

Außer bei der Anwendung in der antiviralen Therapie hat BVDU auch eine starke Bedeutung für die Anwendung in der Suizidgentherapie maligner Tumoren gewonnen, nachdem gezeigt wurde, daß sehr niedrige BVDU-Konzentrationen selektiv HSVtk-transfizierten Säugerzellen *in vitro* töten können (Balzarini *et al.*, 1985; 1986; 1994). Dies war in HSVtk-transfizierten CHO-Zellen nicht reproduzierbar; es konnten keine starken Unterschiede in der Sensitivität gegenüber BVDU zwischen HSVtk-transfizierten und nicht-transfizierten CHO-Zellen festgestellt werden. Daher unterscheiden sich unsere Daten bezüglich der Sensitivität der HSVtk-Zellen gegenüber BVDU von den publizierten Daten (Balzarini *et al.*, 1985; 1986; 1994). Die Arbeitsgruppe von Balzarini berichtete über eine 3000-fach geringere BVDU IC<sub>50</sub> in HSVtk-transfizierten murinen Mammarkarzinomzellen FM3A, im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen. Diese Diskrepanz könnte eventuell mit der Tatsache erklärt werden, daß FM3A-Zellen defizient für die cytosolische Thymidinkinase (TK1) waren, was *per se* einen permanenten "Thymidylat-Stress" verursacht, während die CHO-Zellen TK1-profizient sind. Andererseits wurde für eine HSVtk-transfizierte humane Brustkarzinomzelllinie und eine Glioblastomzelllinie der Ratte, die TK1-profizient waren, berichtet, daß sie auch gegenüber BVDU hypersensitiv reagierten (Grignet-Debrus *et al.*, 2000b). Bis jetzt existiert keine Erklärung dafür, warum CHO-HSVtk-Zellen nicht sensitiv gegenüber BVDU sind; dieses Thema verdient daher sicherlich weitere Untersuchungen.

## Diskussion

Unterstützend für unsere Daten ist die Tatsache, daß die Thymidylatsynthetase (TS) - Aktivität in CHO-HSV $tk$ -Zellen - im Vergleich zu CHO-VZV $tk$ -Zellen - sogar bei einer hohen BVDU-Konzentration (100  $\mu$ M) nicht gehemmt wurde. Im Gegenteil hierzu wurde die TS-Aktivität in FM3A-HSV $tk$ -Zellen stark inhibiert (Balzarini *et al.*, 1987). Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus HSV $tk$ -transfizierten CHO-Zellen wirkte BVDU in CHO-Zellen, die mit dem VZV $tk$ -Gen transfiziert wurden, stark cytotoxisch. Dies bestätigte die Ergebnisse von VZV $tk$ -transfizierten Tumorzelllinien des Menschen und von Nagertieren (Degrève *et al.*, 1997; Grignet-Debrus & Calberg-Bacq, 1997; Grignet-Debrus *et al.*, 2000a,b).

Zuerst haben wir vermutet, daß die Unterschiede in der Cytotoxizität zwischen den untersuchten HSV $tk$ - und VZV $tk$ -exprimierenden CHO-Zellen auf unterschiedlichen BVDU-Inkorporationsraten in die zelluläre DNA beruhen. Es zeigte sich jedoch, daß in beiden Zelllinien (CHO-HSV $tk$  und CHO-VZV $tk$ ) beinahe identische Mengen von BVDU in die zelluläre DNA inkorporiert werden. Dies zeigt indirekt, daß die Aktivität der HSV- und VZV-Thymidinkinasen in den ausgewählten Klonen etwa gleich ist, und führt zu den Schlußfolgerung, daß der BVDU-Einbau in die DNA wahrscheinlich nicht für die ausgelöste Cytotoxizität in CHO-VZV $tk$ -Zellen verantwortlich ist. Man kann davon ausgehen, daß die gemessene Radioaktivität in der DNA tatsächlich von radioaktiv eingebautem BVDU stammt, da der BVDU-Einbau von mehreren unabhängigen Arbeitsgruppen bestätigt wurde, die andere Isolationsmethoden (Bestimmung der Tritium-Menge in TCA-nicht-löslicher Zellfraktion) und andere HSV $tk$  und VZV $tk$ -exprimierende Zelllinien verwendet haben (Degrève *et al.*, 1997; Hamel *et al.*, 2001). Es ist interessant anzumerken, daß in einer vor kurzem publizierten Arbeit von Hamel *et al.* (2001) über HSV $tk$ -exprimierende Zelllinien berichtet wurde, welche ähnliche Einbau-Raten von BVDU aufweisen, aber unterschiedliche Cytotoxizität-Profile zeigen; eine Zelllinie war sensitiv, eine andere resistent gegenüber BVDU.

In diesem Sinne unterscheidet sich der BVDU-Mechanismus der Induktion der zellulären Schädigung von anderen antiviralen Nukleosidanaloga, welche in die DNA eingebaut werden müssen, oder die DNA-Replikation hemmen, um die cytotoxische Aktivität auszuüben.

Auch bezüglich der chemischen Struktur und der möglichen Wirkungsweise unterscheidet sich BVDU von den anderen Nukleosidanaloga. Während andere Antiherpes oder anti-HIV Virustatika, durch den stark veränderten "Zucker" signifikante Verzerrungen in der DNA-Struktur verursachen können oder einen Kettenabbruch nach Einbau in die DNA bewirken, ist die Desoxyribose des BVDU völlig unverändert, wodurch sie das Eingehen der regulären Phosphodiesterbindungen ermöglicht. Der einzige Unterschied liegt in der veränderten Thymin-Base, in welcher 2-Methyl durch 2-Bromovinyl substituiert ist. 2-Bromovinyl partizipiert jedoch nicht in der Bildung der Wasserstoff-Brücken in der Doppel-

## Diskussion

DNA-Helix. Es bleibt deswegen unklar, wie das eingebaute BVDU-MP die DNA-Struktur ändern sollte. Bis heute gibt es keinerlei chemische Untersuchungen von BVDU-substituierter DNA. Offensichtlich ist aber, daß BVDU unterschiedlich von zellulären bzw. viralen Thymidinkinasen akzeptiert wird, und daß die Interaktion des BVDU-TP mit der Substrat-Bindedomäne der Herpesvirus-DNA-Polymerasen beeinflusst ist (Allaudeen *et al.*, 1981; Mancini *et al.*, 1983; Prusoff *et al.*, 1984; Yokota *et al.*, 1984). Die zellulären Polymerasen lassen sich durch BVDU-TP nicht beeinflussen, und die DNA-Replikation ist hier nicht gestört.

Offensichtlich beruhen die antiviralen und cytostatischen / cytotoxischen Aktivitäten von BVDU auf zwei grundsätzlich unterschiedlichen Wirkungsmechanismen. Während die antivirale Aktivität von BVDU durch eine BVDU-TP-induzierte Inhibition der Herpesvirus-DNA-Polymerase und/oder durch Destabilisierung der BVDU-substituierten DNA charakterisiert ist, wird angenommen, daß BVDU-MP der Metabolit ist, welcher für die cytotoxische Aktivität verantwortlich ist, wobei er die Thymidylatsynthetase hemmt (Balzarini *et al.*, 1987). Die Thymidylatsynthetase ist ein essentielles Enzym bei der *de novo* Synthese des Desoxythymidin-Monophosphats, und die Herpesvirus-Thymidinkinase-exprimierenden CHO Zellen sterben dementsprechend wahrscheinlich nach Behandlung mit BVDU an Thymidylatmangel (*thymidylate depletion*). In CHO-VZV-TK-Zellen wurde die TS-Aktivität schon bei einer Konzentration von 2 µM BVDU nach 3 h-igen Behandlung um 50% inhibiert. Im Gegensatz dazu wurde in CHO-HSVtk-Zellen nur eine sehr schwache Hemmung der TS bei einer sehr hohen Konzentration von 100 µM BVDU beobachtet. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß die TS-Inhibition der auslösende Faktor für die Cytotoxizität ist. Die TS-Inhibition führt zu einem Mangel an Desoxythymidin-Triphosphat (dTTP) und in Folge dessen zur Akkumulation des Desoxyuridin-Triphosphats (dUTP), das in die DNA eingebaut wird. Im Anschluß daran wird Uracil durch Uracil-DNA-Glykosylase aus der DNA entfernt. Die entstandene apyrimidine Stelle kann, falls nicht repariert, DNA-Brüche erzeugen (Curtin *et al.*, 1991; Van Triest *et al.*, 2000). Wenn man diese bekannten Folgen der TS-Inhibition in Betracht nimmt, überrascht die Tatsache, daß die CHO-VZV-TK-Zellen nach BVDU-Behandlung im Comet-Assay (unter alkalischen und neutralen Bedingungen) so gut wie keine DNA-Brüche aufweisen. Dies ist auf keinen Fall eine Frage der Test-Sensitivität, denn mit den Virustatika vom Typ der Purinanaloge (ACV, GCV und PCV) konnte man die Unterschiede in Wirkungsmechanismen dieser Virustatika im Comet-Assay sehr gut verfolgen (s. Kapitel 3.1.4). Die geringe Induktion der Brüche könnte man eventuell durch zwei Faktoren erklären: (1) der Thymidylat-Stress ist nur transient ausgeprägt, denn BVDU-MP wird im Laufe der Zeit abgebaut; (2) durch die TS-Inhibition entstandenen AP-Stellen werden schnell und effizient repariert.

## Diskussion

Unsere Versuche zeigten weiterhin, daß es sich bei BVDU um ein relativ schwaches Klastogen handelt, wobei die Chromosomenaberrationen erst bei einer Konzentration von 5 µM BVDU (24 h Nachbehandlungszeit) zu 40% induziert wurden (Thust, nicht publizierte Daten). Bei einer Konzentration von 0.5 bis 1 µM BVDU, bei welcher in Koloniebildung nur 1% der Zellen überlebte, wurden keine Aberrationen beobachtet (Thust, nicht publizierte Daten). Im Vergleich dazu induzierte GCV Aberrationen bei einer Konzentration von 0.4 µM GCV, bei welcher 60% der Zellen in Koloniebildung überlebten (s. Abb.10 und 13).

Um festzustellen, ob die Hemmung der TS-Aktivität in CHO-VZV-TK-Zellen einen Replikationsblock bzw. einen S-Phase-Arrest verursacht, wurden S-Phase-Zellen mit BrdU pulsmarkiert und danach mit 50 µM BVDU für 6 und 9 h behandelt. Diese Zeitpunkte wurden auf Grund der frühen TS-Inhibition (3 h nach BVDU-Behandlung) ausgewählt. Parallel hierzu wurden CHO-HSV-TK-Zellen untersucht. Zwischen den BVDU-exponierten und nicht-exponierten CHO-VZV-TK-Zellen sowie CHO-HSV-TK-Zellen war keinen signifikanten Unterschied zu sehen. Daraus kann man schließen, daß der "Thymidylat-Stress" nicht zu einem S-Phase-Arrest oder zu einem späten G1-Phase-Block führt. Ähnliche Ergebnisse wurden mittels Sub-G1-DNA-Gehalt-Durchflußzytometrie in der Zeitspanne von 6 bis 72 h der BVDU-Behandlung erhalten (nicht gezeigt).

### **4.4. Molekularer Mechanismus der BVDU-induzierten Apoptose**

Bis heute gibt es keine Untersuchungen, die zeigen auf welche Weise metabolisch kompetente Zellen nach Behandlung mit BVDU sterben. Deswegen war es sehr interessant herauszufinden, daß CHO-VZV-TK-Zellen mit ungefähr gleicher Frequenz an Apoptose und Nekrose sterben. In diesem Sinne unterscheidet sich die BVDU-induzierte Cytotoxizität von der durch Purinnukleosidanaloga (ACV, GCV, PCV) induzierte Cytotoxizität, wobei diese Virustatika fast ausschließlich Apoptose in CHO-HSV-TK-Zellen auslösen, während die Nekrosefrequenz relativ gering bleibt (Thust *et al.*, 2000a). Die zelluläre Antwort auf ansteigende BVDU-Konzentrationen ist nicht linear; geringe Konzentrationen induzieren ähnliche Apoptose- und Nekrose-Raten wie höhere BVDU-Konzentrationen. Dies deutet darauf hin, daß die Inkorporation von BVDU *per se* nicht für die Cytotoxizität verantwortlich ist, und daß wahrscheinlich auch geringere Mengen von BVDU-MP ausreichend sind, um Cytotoxizität auszulösen. Die Apoptosefrequenz stimmte allerdings mit der Inhibition der TS-Aktivität überein. Bei einer Konzentration von 2 µM BVDU wurde TS-Aktivität um ~50%, bei 20 µM 55% und bei 100 µM ~60% gehemmt.

## Diskussion

Da gezeigt werden konnte, daß der Fas-Ligand während der ersten 12 h der BVDU-Behandlung induziert wird, wurde die Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1 überprüft. Es ist bekannt, daß im Promotor des FasL-Gens eine AP-1-Bindestelle vorhanden ist (Faris *et al.*, 1998, Kasibhatla *et al.*, 1998) über die, nach der Bindung des durch JNK-phosphorylierten (aktivierten) AP-1-Faktors, die Induktion des FasL-Gens erfolgt. Um eine mögliche AP-1-Induktion nach BVDU-Behandlung zu untersuchen, wurden Bandshift-Analysen mit Oligonukleotiden, welche die AP-1-Bindestelle enthalten, durchgeführt. Mittels dieser Methode kann man indirekt auf die Transkription der den AP-1-Faktor kodierenden Gene sowie auf die Synthese der entsprechenden Proteine und deren Aktivierung (Phosphorylierung *via* JNK oder p38) schließen. Es konnte gezeigt werden, daß AP-1 bereits 3 h nach BVDU-Behandlung induziert wird, und daß die Induktion nach zusätzlichen 3 h (insgesamt 6 h nach BVDU-Zugabe) ihr Maximum erreicht. Danach kommt es über 10 h hinweg zur Abnahme der Bindungsaktivität. Die Kinetik der AP-1-Induktion liegt zwischen der Inhibition der TS-Aktivität und der Induktion des FasL. Daher kann man annehmen, daß der zelluläre Stress durch den BVDU-vermittelten Thymidylat-Mangel das auslösende Signal für die Induktion von AP-1 ist. Das c-Jun-Protein odere andere Mitglieder der Jun-Familie bilden zusammen mit c-Fos oder ATF2 den AP-1-Faktor (van Dam *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, daß auch die Menge des c-Jun-Proteins nach BVDU-Behandlung zunimmt; die c-Jun-Induktion erfolgt parallel zur AP-1-Induktion.

In allen apoptotischen Prozessen kommt es zur Aktivierung von Caspasen. Bei der BVDU-induzierten Apoptose spielt die Aktivierung der Caspase-8 die initiale Rolle, da nur der spezifische Caspase-8-Inhibitor (zIETD-fmk) die BVDU-ausgelöste Apoptose um 60% hemmen konnte. Caspase-8 aktiviert offenbar die *downstream* Caspase-3, denn die Apoptose wird durch Caspase-3-Inhibitor (zDEVD-fmk) um 30% gehemmt. Die Aktivierung der Caspase-3 konnte im Caspasenaktivitätstest sowie indirekt über die PARP-Spaltung und DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden. PARP wird direkt durch Caspase-3 gespalten (Nicholson *et al.*, 1995), was 24 bis 72 h nach BVDU-Behandlung zu sehen ist. Zusätzlich reaktiviert die Caspase-3 eine DNase, die als CAD (*caspase activated DNase*) bezeichnet wird, welche an der Fragmentierung der DNA beteiligt ist (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998). Caspase-8 aktiviert Bid, indem sie Bid spaltet. Das gespaltene Produkt von 15 kDa (tBid, *truncated Bid*) interagiert mit Bax (*BH3 only proteins*) im Cytosol, so daß Bax sich konformationell ändert und in die mitochondriale Membran verankert wird. Mehrere Bax-Molekülen bilden Kanäle in der Membran, durch welche pro-apoptotische Proteine freigesetzt werden. Obwohl 72 h nach BVDU-Behandlung die Bax-Expression zunahm, i.e. sich das Verhältnis Bax:Bcl-2 oder Bax:Bcl-x<sub>L</sub> veränderte, wurde Cyt C nur ganz gering aus den Mitochondrien freigesetzt. Dies könnte erklären, warum Caspase-9 72 h nach der

## Diskussion

Behandlung nur sehr schwach aktiviert wurde. Es konnte jedoch die Freisetzung eines anderen apoptotischen Faktors, AIF, aus den Mitochondrien in das Cytosol beobachtet werden, was dafür spricht, daß der mitochondriale Weg der Apoptose ebenfalls eine (geringere) Rolle bei der BVDU-induzierten Apoptose spielt. Wie man sich der Mechanismus der BVDU-induzierten Apoptose vorstellt, ist in **Abb.52** dargestellt.

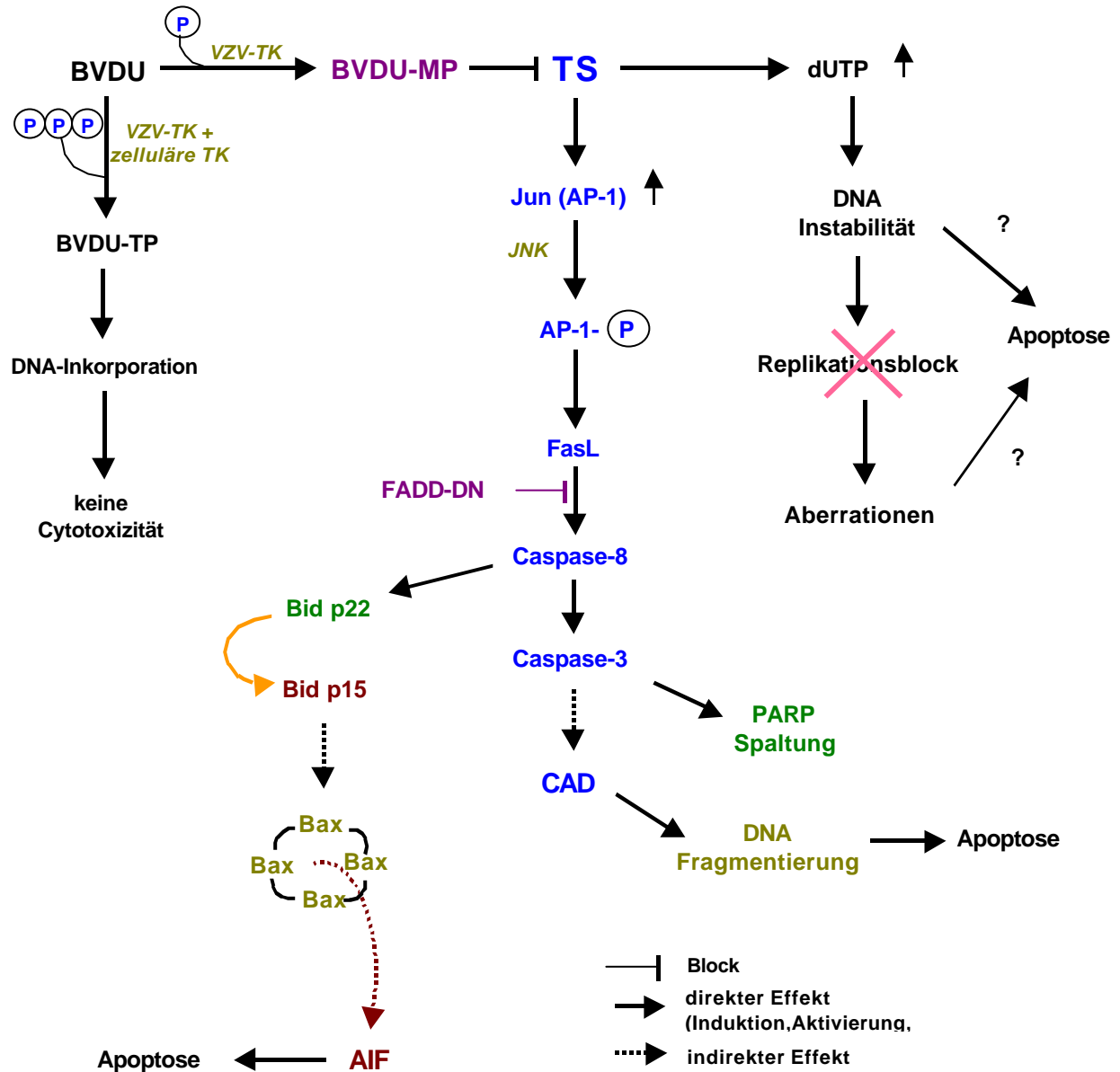


Abb.52. Modell des molekularen Mechanismus der BVDU-induzierten Apoptose.

#### **4.5. Reparatur von GCV**

Die Behandlung der HSVtk-exprimierenden CHO-Zellen mit  $^3\text{H}$ -GCV zeigte, daß in der zellulären DNA GCV sehr effizient inkorporiert wird, was unsere vorherigen Ergebnisse bestätigte (Thust *et al.*, 2000a). Der GCV-Einbau erfolgte nicht nur im Expositionscyclus, sondern auch im nächsten Nachbehandlungscyclus, da GCV-TP intrazellulär akkumulierte. Im Vergleich zum GCV, kann GCV-TP nicht frei durch die Zellmembran wandern. Wegen seiner langen Halbwertszeit von 12-18h (Biron *et al.*, 1985) steht GCV-TP im ersten Nachbehandlungscyclus für einen weiteren Einbau zur Verfügung. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß es nach dem zweiten Nachbehandlungscyclus (28 h nach GCV-Behandlung) zu einer 4-fachen Reduktion der Radioaktivitätsmenge in der DNA kam. Diese starke Verdünnung des inkorporierten Virustatikums kann nicht nur durch Ausverdünnung alleine erklärt werden, da durch Zellteilung nur eine Halbierung der Radioaktivitätsmenge zu erwarten ist. Eine Möglichkeit diese starke Abnahme des inkorporierten GCV zu erklären wäre die Entfernung von GCV durch Reparaturprozesse.

Um festzustellen, ob und welcher Reparaturweg an der Reparatur von GCV beteiligt sein könnte, wurden Zellen, welche Defizienzen in der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) aufweisen, auf Sensitivität gegenüber GCV analysiert. Zellen die defizient in ERCC1 (CHO-43-3B) oder ERCC3 (CHO-27-1) sind, zeigten keine unterschiedliche Sensitivität bezüglich der GCV-induzierten Cytotoxizität und Klastogenität (nicht gezeigt), was darauf hindeutete, daß die NER mit großer Wahrscheinlichkeit an der Reparatur von GCV-Läsionen nicht beteiligt ist. Im Gegensatz hierzu konnte eine mögliche Beteiligung der Basenexzisionsreparatur mittels Einbau-Experimenten und Cytotoxizitätsversuchen in CHO-HSVtk-Zellen gezeigt werden, in denen die  $\beta$ -pol-Aktivität durch einen spezifischen Inhibitor (Prunasin) gehemmt wurde. *In vitro* Experimente zeigten, daß Prunasin spezifisch die Aktivität der Polymerase  $\beta$  nicht aber der anderen Polymerasen wie  $\alpha$ ,  $\delta$ , und  $\epsilon$  hemmt (Mizushina *et al.*, 1999). Im Einbau-Versuch konnte gezeigt werden, daß nach dem zweiten Zellcyclus (28 h nach der Behandlung mit GCV) die Menge der Radioaktivität in der zellulären DNA, in Anwesenheit von Prunasin, bzw. unter Blockierung der Pol  $\beta$ -Aktivität, erhöht wurde. Da die Guanin-Base selbst und nicht der "acyclische Zucker" radioaktiv markiert ist, kann man diesen Versuch nur so erklären, daß die Erkennung der GCV-Läsion in der DNA und/oder der Einschnitt der glykosidischen Verbindung von einer Glykosylase abhängig ist, die mit der Polymerase  $\beta$  einen Komplex bildet. Erste Cytotoxizitätsversuche mit OGG1-defizienten (*knock-out*) Mausfibroblasten zeigten, daß 8-Oxyguanin-DNA-Glykosylase möglicherweise an der Reparatur von GCV-Läsionen beteiligt sein könnte; defiziente Zellen sind im Vergleich mit den profizienten Wildtypzellen im Koloniebildungstest sensitiver

## Diskussion

gegenüber GCV. Es besteht jedoch Bedarf zusätzliche Versuche durchzuführen. In Koloniebildungsversuchen mit dem Pol  $\beta$ -Inhibitor Prunasin, bei nicht-toxischen Konzentrationen, konnte man den cytotoxischen Effekt von GCV in HSV-TK-exprimierenden Zellen noch verstärken. Dies deutet darauf hin, daß Pol  $\beta$  in der Reparatur von GCV eine Rolle spielt.

Um die Beteiligung der BER in der Reparatur von GCV zu verifizieren, wurden die cytotoxischen und klastogenen Effekte von GCV in  $\beta$ -pol-defizienten Mausfibroblasten untersucht.  $\beta$ -pol-defiziente Zellen waren in der Koloniebildung sowie in der Induktion der Apoptose sensitiver als  $\beta$ -pol-Wiltpzellen und  $\beta$ -pol-/- Zellen, welche mit dem  *$\beta$ -pol*-Gen retransfiziert wurden und Pol  $\beta$  wieder exprimieren ( *$\beta$ -pol/compl*). Interessanterweise wiesen die  $\beta$ -pol-/- Zellen auch eine höhere Frequenz von DNA-Strangbrüchen und Chromosomenaberrationen nach GCV-Behandlung auf. Dies deutet darauf hin, daß nicht bzw. unvollständig repariertes GCV mit einer erhöhten Induktion von DNA-Strangbrüchen und letztendlich mit einer Induktion von Chromosomenaberrationen zusammenhängt. Es ist durchaus vorstellbar, daß eine Akkumulation von nicht-reparierten DNA-Strangbrüche und/oder akkumulierte Aberrationen die Apoptose auslöst. Diese Vorstellung ist konsistent mit dem Zeitverlauf der Ereignisse, innerhalb derer DNA-Strangbrüche und Aberrationen im Vergleich zu apoptotischen Zellen auftreten.

Da in die DNA inkorporiertes GCV eine stabile Läsion ist, die eine Konformationsänderung in der sekundären Struktur der DNA auslöst (Marshalko *et al.*, 1995; Foti *et al.*, 1997), ist es wahrscheinlich, daß sie auch die Erkennung durch Reparaturenzyme signalisiert. Co-Behandlung der  $\beta$ -pol+/+ und  $\beta$ -pol/compl Zellen mit Methoxyamin (MX) sensibilisierte die Zellen gegenüber GCV. Die Wirkungsweise des MX (**Abb.53**) kann man wahrscheinlich folgenderweise erklären: MX reagiert mit dem C1'-Atom des "acyklischen Zuckers" in der Struktur des GCV-Monophosphats bzw. der AP-Stelle (C2' ist nicht vorhanden) und resultiert in einem stabilen MX-Zucker-Addukt, das nicht durch  $\beta$ -Elimination der Desoxyribosephosphat (dRP)-Lyaseaktivität von  $\beta$ -pol entfernt werden kann. Basierend auf ähnlichem Wirkungsmechanismus von MX wurde gezeigt, daß die *single-nucleotide* BER blockiert wird, was die Sensibilisierung der  $\beta$ -pol-profizienten und komplementierten  $\beta$ -pol-Zellen gegenüber einfachen alkylierenden Agentien verstärkt (Horton *et al.*, 2000).

Obwohl Wildtyp- und komplementierten  $\beta$ -pol-Zellen in Anwesenheit von MX bzw. bei einer blockierten *single-nucleotide* BER deutlich gegenüber GCV sensibilisiert waren, reagierten die  $\beta$ -pol-/- Zellen noch immer sensitiver gegenüber GCV als  $\beta$ -pol+/+ und  $\beta$ -pol/compl Zellen. Dies impliziert, daß zusätzlich zur  $\beta$ -pol-abhängigen *short-patch* BER auch die  $\beta$ -pol-abhängige *long-patch* BER an der Reparatur von GCV-Läsionen beteiligt ist. Es gibt Daten die zeigen, daß beide Reparaturwege  $\beta$ -pol-abhängig ablaufen, bzw. daß  $\beta$ -pol,

## Diskussion

unabhängig von der Natur der AP-Stelle - das erste Nukleotid in den Reparatur-gap hinzufügt (Podlutzky *et al.*, 2001).

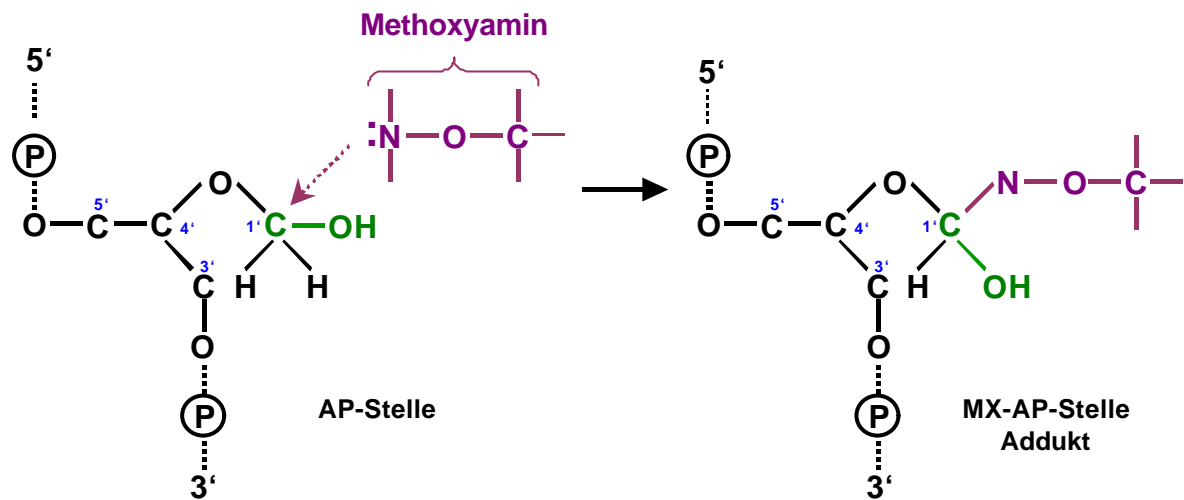


Abb.53. Mechanistische Wirkung von Methoxyamin (MX).

Zusammengefaßt zeigen die hier präsentierten Ergebnisse, daß inkorporiertes GCV durch BER repariert wird und daß Polymerase  $\beta$  Zellen gegenüber der GCV-induzierten Cytotoxizität und Gentoxizität schützt. Die Daten haben auch Implikationen für die antivirale Therapie und für die Getherapie maligner Tumoren. Es wurde gezeigt, daß Tumorzellen unterschiedliche Mengen von  $\beta$ -pol exprimieren (Srivastava *et al.*, 1999), was die Antwort von Tumorzellen auf GCV-Behandlung beeinflussen könnte. Eine Möglichkeit, die intrinsische Resistenz von Tumorzellen zu reduzieren, könnte darin bestehen, die systemische (intravenöse) GCV-Behandlung mit der Zugabe eines spezifischen  $\beta$ -pol-Inhibitors nach der Transduktion des "Suizidgens" in Zielzellen zu kombinieren. Ob dieser Ansatz zu einer Optimierung der GCV-Getherapie führen kann, muß allerdings in weiterführenden Arbeiten und auch in klinischen Studien getestet und überprüft werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung der Frage, wie Virustatika vom Typ der Nukleosidanaloga cyto- und gentoxisch auf Säugerzellen wirken, wurden Zelllinien des Chinesischen Hamsters (CHO) etabliert, die stabil die Thymidinkinase (TK) des Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-TK) oder des Varicella zoster-Virus (VZV-TK) exprimieren und somit Virustatika vom Typ der Nukleosidanaloga metabolisieren können. Stabil transfizierte Zellklone exprimierten sowohl die mRNA als auch das Protein der viralen TK. In den HSV-TK-exprimierenden Zellen wurde die Cyto- und Gentoxizität der Virustatika vom Typ der Purinanaloga Aciclovir (ACV), Ganciclovir (GCV) und Penciclovir (PCV) untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Virustatika nach einer 14 h-igen Behandlung (welche der Dauer eines Zellcyclus entspricht) bei nahezu toxischen Konzentrationen nach 24-36 h Nachbehandlungszeit Apoptose, aber kaum Nekrose auslösen. ACV und GCV waren stark klastogen, während PCV nur geringe und qualitativ andersartige Chromosomenaberrationen induzierte. Bei höchster ACV-Konzentration (1 mM) war eine Induktion von Chromosomenaberrationen bereits im ersten Nachbehandlungszellcyclus zu sehen, bei jeder verwendeten GCV- oder PCV-Konzentration war die Klastogenität hingegen erst im zweiten Nachbehandlungszellcyclus zu beobachten. GCV und PCV werden in die DNA eingebaut, worauf erst in den nächsten Replikationsrunden DNA-Brüche entstehen, welche Klastogenität bewirken, während ACV einen *obligate chain terminator* darstellt.

GCV induzierte in den CHO-HSV-TK-Zellen konzentrations- und zeitabhängig die Apoptose; die Nekrose blieb hingegen unverändert unter 15%, was mittels Annexin V-Färbung gezeigt wurde. Diese Ergebnisse wurden durch durchflußzytometrische Bestimmung des SubG1-DNA-Gehaltes und durch Nachweis der internucleosomalen DNA-Fragmentierung bestätigt. Auf molekularer Ebene wurde die Expression der apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie (Bax, BAD, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>), die Proteinexpression von PARP und Cytochrom C und die Aktivierung von Caspasen wie auch des Fas-Rezeptors (Fas) und des Fas-Liganden (FasL) untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß in den apoptotischen CHO-HSV-TK-Zellen Caspasen 3, 8 und 9 induziert werden. Die Caspase-8 wurde nur initial, nicht aber im weiteren Verlauf der Apoptose induziert, was mit einer schwachen Induktion des FasL übereinstimmte. Der Fas-Rezeptor blieb unverändert in der Proteinmenge, was annehmen läßt, daß die Fas (CD95/APO-1)-vermittelte Apoptose eine untergeordnete Rolle bei der GCV-induzierten Apoptose spielt. Im Gegensatz dazu persistierte die Induktion (d.h. erhöhte Enzymaktivität) der Caspasen 3 und 9 über den gesamten Untersuchungszeitraum. Bei der Untersuchung der apoptotischen Marker zeigte sich, daß die Expression der Proteine Bax und Bcl-x<sub>L</sub> nach GCV-Behandlung unverändert blieb und das Protein BAD in seiner

## Zusammenfassung

apoptotischen hypophosphorylierten Form vorlag. Im Gegensatz hierzu konnte nach GCV-Behandlung eine deutliche Reduktion der Menge des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins nachgewiesen werden. Es konnte auch gezeigt werden, daß die Ursache der Bcl-2-Abnahme auf einer post-translationalen Spaltung von Bcl-2 in ein Spaltprodukt von 23 kDa beruht. Durch Verwendung spezifischer Caspaseinhibitoren wurde nachgewiesen, daß die Spaltung von Bcl-2 nach GCV-Behandlung hauptsächlich durch Caspase-9 und - in geringerem Ausmaß - durch Caspase-3 erfolgt. Dies konnte nicht nur in intakten Zellen, sondern auch *in vitro* nachgewiesen werden. Hierzu wurde rekombinantes Hamster-Bcl-2-Protein (26.4 kDa) hergestellt und mit rekombinanter aktiver Caspase-9 oder -3 inkubiert. Das entstandene Spaltprodukt zeigt für beide Caspasen die gleiche Größe, was darauf hindeutet, daß beide Caspasen eine identische Schnittstelle (die putative Caspase-3-Schnittstelle) in der Hamster-Bcl-2-Proteinsequenz benutzen. Diese Schlußfolgerung wurde durch Experimente unterstützt, in welchen eine für Caspase-3-Schnittstelle punkt-mutierte Form des Bcl-2-Proteins in CHO-HSV-TK-Zellen transfiziert wurde, die nach GCV-Behandlung keine Spaltung aufwies. Das 23 kDa-große Bcl-2-Fragment wirkt im Gegensatz zum intakten Bcl-2-Protein pro-apoptotisch und verstärkt die Cytochrom C-Freisetzung und damit auch die Aktivierung der Caspase-9, die ihrerseits wieder Bcl-2 spaltet. Dieser Vorgang führt zu einem positiven "Amplifikationsloop" des mitochondrialen apoptotischen Weges, welcher eine Erklärungsgrundlage für die effiziente durch GCV induzierte Apoptose bieten könnte.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß in die DNA inkorporiertes GCV durch den Basenexzisionsreparaturmechanismus repariert wird. GCV-exponierte CHO-HSV-TK-Zellen wiesen in Anwesenheit eines spezifischen Inhibitors der DNA-Polymerase  $\beta$  (Prunasin) eine Reduktion der Reparatur sowie der Koloniebildungseffizienz auf. Pol  $\beta$ -defiziente Mausfibroblasten zeigten im Vergleich zu Pol  $\beta$ -profizienten und mit dem  *$\beta$ -pol*-Gen komplementierten Pol  $\beta$ -defizienten Zellen eine erhöhte Frequenz an Apoptose sowie von DNA-Brüchen und Chromosomenaberrationen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß Pol  $\beta$  eine entscheidende Rolle bei der Reparatur von GCV spielt. Da viele Tumore eine erhöhte Pol  $\beta$ -Aktivität zeigen, könnte der Einsatz von Pol  $\beta$ -Inhibitoren die Effizienz einer HSV-TK/GCV-Suizidgentherapie möglicherweise optimieren.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde der Mechanismus der Brivudin (BVDU)-induzierten Apoptose in CHO-VZV-TK-Zellen untersucht. Die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen wurde bei einer Konzentration von  $\sim 1 \mu\text{M}$  BVDU stark reduziert. Hierbei wurden vergleichbare Frequenzen von Apoptose und Nekrose induziert. Es wurde gezeigt, daß für die BVDU-induzierte Cytotoxizität die Hemmung der Thymidylatsynthetase (TS) und nicht der BVDU-Einbau in die DNA verantwortlich ist. BVDU induzierte keinen Replikationsblock, kaum DNA-Brüche und war ein relativ schwaches Klastogen bei toxischen Konzentrationen.

### Zusammenfassung

Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Apoptose zeigten, daß innerhalb von 0-3 h nach der TS-Hemmung eine Zunahme der c-Jun-Proteinmenge sowie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 zu verzeichnen war, was zu einer anschließenden Induktion von FasL und Caspase-8 führte. Die Überexpression des dominant-negativen FADD-Proteins reduzierte die BVDU-induzierte Apoptosefrequenz um die Hälfte. Dies läßt darauf schließen, daß es einen Zusammenhang zwischen dem "Thymidylatstress", der c-Jun/AP-1-Induktion und der FasL/Caspase-8-vermittelte Apoptose gibt. Die Aufklärung des molekularen Mechanismus der BVDU-induzierten Apoptose könnte möglicherweise helfen, das experimentell verwendete Suizidtherapieprotokoll mit BVDU in Kombination mit dem VZVtk-Suizidgen zu verbessern.

## 6. LITERATUR

Allaudeen,H.S., Kozarich,J.W., Bertino,J.R. and De Clerq,E. (1981) On the mechanism of selective inhibition of herpesvirus replication by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2698-2702.

Allen,R.T., Cluck,M.W. and Agrawal,D.K. (1998) Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 427-445.

Alnemri,E.S., Livingston,D.J., Nicholson,D.W., Salvesen,G., Thornberry,N.A., Wong,W.W. and Yuan,J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**, 171.

Balzarini,J., De Clerq,E., Verbruggen,A., Ayusawa,D. and Seno,T. (1985) Highly selective cytostatic activity of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine derivatives for murine mammary carcinoma (FM3A) cells transformed with the herpes simplex virus type 1 or type 2 thymidine kinase gene. *Mol. Pharmacol.*, **28**, 581-587.

Balzarini,J., De Clerq,E., Verbruggen,A., Crumpacker,D., Ayusawa,D. and Seno,T. (1986) Increased sensitivity of thymidine kinase-deficient (TK-) tumor cell lines to the cell growth inhibitory effect of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU) and related compounds. *Anticancer Res.*, **6**, 1077-1084.

Balzarini,J., de Clerq,E., Verbruggen,A., Crumpacker,C., Ayusawa,D. and Seno,T. (1987) Thymidylate synthase is the principal target enzyme for the cytostatic activity of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-doexyuridine against murine mammary carcinoma (FM3A) cells transformed with the herpes simplex virus type 1 or type 2 thymidine kinase gene. *Mol. Pharmacol.*, **32**, 410-416.

Balzarini,J., Bohman,C., Walker,R.T., de Clerq,E. (1994) Comparative cytostatic activity of different antiherpetic drugs against herpes simplex virus thymidine kinase gene-transfected tumor cells. *Mol. Pharmacol.*, **45**, 1253-1258.

Barzilay,G and Hickson,I.D. (1995) Structure and function of apurinic/aprimidinic endonucleases. *Bioessays*, **17**, 713-719.

Beltinger,C., Fulda,S., Kammertoens,T., Meyer,E., Uckert,W. and Debatin,K.-M. (1999) Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8699-8704.

Beltinger,C., Fulda,S., Kammertoens,T., Uckert,W. and Debatin,K.-M. (2000) Mitochondrial amplification of death signals determines thymidine kinase/ganciclovir-triggered activation of apoptosis. *Cancer Res.*, **60**, 3212-3217.

Bessho,T. (1999) Nucleotide excision repair 3' endonuclease XPG stimulates the activity of base excision repair enzyme thymine glycol DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 979-983.

Biron,K.K., Stanat,S.C., Sorrell,J.B., Fyfe,J.A., Keller,P.M., Lambe,C.U. and Nelson,D.J. (1985) Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2473-2477.

Boldin,M.P., Varfoloneev,E.E., Panver,I.L., Mett,J.H., Camonis,J.H. and Wallach,D. (1995) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO-1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol Chem.*, **270**, 7795-7798.

Boldin,M.P., Goncharov,T.M., Goltsev,Y.V. and Wallach,D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, **85**, 805-815.

## Literatur

- Bossy-Wetzels, E., Newmeyer, D.D. and Green, D.R. (1998) Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.*, **17**, 37-49.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Cappelli, E., Taylor, R., Cevasco, M., Abbondandolo, A., Caldecott, K and Frosina, G. (1997) Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. *J. Biol. Chem.*, **272**, 23970-23975.
- Cazaux, C., Tiraby, M., Loubiere, L., Haren, L., Klatzmana, D. and Tiraby, G. (1998) Phosphorylation and cytotoxicity of therapeutic nucleoside analogues: a comparison of alpha and gamma herpesvirus thymidine kinase suicide genes. *Cancer Gene Ther.*, **5**, 83-91.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.-W., Kyin, S., Wang, X. and Shi, Y. (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, **406**, 855-862.
- Cheng, Y.C., Dutschman, G., De Clerq, E., Jones, A.S., Rahim, S.G., Verhelst, G. and Walker, R.T. (1981) Differential affinities of 5-(2-halogenovinyl)-2'-deoxyuridines for deoxythymidine kinases of various origins. *Mol. Pharmacol.*, **20**, 230-233.
- Cheng, E.H.-Y., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K and Hardwick, J.M. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*, **278**, 1966-1968.
- 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.
- Chinnaiyan, A.M. and Dixit, V.M. (1996) The cell-death machine. *Curr. Biol.*, **6**, 555-562.
- Ciucci, A., Iafrate, E.M., Manzini, S. and Giachetti, A. (1997) Mechanism of antiviral action of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU): direct evidence with [<sup>14</sup>C]BVDU in herpes simplex virus-infected cells. *Antiviral Chem. Chemother.*, **8**, 565-571.
- Cleary, M.L., Smith, S.D. and Sklar, J. (1986) Cloning and structural analysis of cDNAs for *bcl-2* and a hybrid *bcl-2*/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*, **47**, 19-28.
- Coen, D.M., Irmieri, A.F., Jacobson, J.G. and Kerns, K.M. (1989) Low levels of herpes simplex virus thymidine-thymidylate kinase are not limiting for sensitivity to certain antiviral drugs or for latency in a mouse model. *Virology*, **168**, 221-231.
- Coen, D.M. (1992) Molecular aspects of anti-herpesvirus drugs. *Virology*, **3**, 3-12.
- Craperi, D., Vicat, J.M., Nisson, M.F., Mathien, J., Baudier, J., Benabid, A.L. and Verna, J.M. (1999) Increased bax expression is associated with cell death induced by ganciclovir in a herpes thymidine kinase-expressing glioma cell line. *Hum. Gene Ther.*, **10**, 679-688.
- Crumpacker, C.S. (1996) Ganciclovir. *N. Engl. J. Med.*, **335**, 721-729.
- Culver, K.W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E.H. and Blaese, R.M. (1992) *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumours. *Science*, **256**, 1550-1552.
- Curtin, N.J., Harris, A.L. and Aherne, G.W. (1991) Mechanism of cell death following thymidylate synthase inhibition: 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate accumulation, DNA damage, and growth inhibition following exposure to CB3717 and dipyridamole. *Cancer Res.*, **51**, 2346-2352.
- Darby, G. (1994) A history of antiherpes research. *Antiv. Chem. Chemother.*, **5** (Suppl. 1), 3-9.
- Darby, G. (1995) In search of the perfect antiviral. *Antivir. Chem. Chemother.*, **6** (Suppl 1), 54-63.

## Literatur

Datta,S.R., Dudek,H., Tao,X., Masters,S., Fu,H., Gotoh,Y. and Greenberg,M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231-241.

Degrève,B., Andrei,G., Izquierdo,M., Piette,J., Morin,K., Knauss,E.E., Wiebe,L.I., Basrah,I., Walker,R.T., de Clerq,E. and Balzarini,J. (1997) Varicella zoster virus thymidine kinase gene and antiherpetic pyrimidine nucleoside analogues in a combined gene/chemotherapy treatment for cancer. *Gene Ther.*, **4**, 1107-1114.

Degrève,B., Esnouf,R., De Clerq,E. and Balzarini,J. (2001) Mutation of Gln125 to Asn selectively abolishes the thymidylate kinase activity of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *Mol.Pharmacol.*, **59**, 285-293.

DeMott,M.S., Zigman,S. and Bambara,R.A. (1998) Replication protein A stimulates long patch DNA base excision repair. *J. Biol. Chem.*, **273**, 27492-27498.

Demple,B. and Harrison,L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu.Rev.Biochem.* **63**, 915-948.

Deveraux,Q.-L., Takahashi,R., Salvesen,G.-S. and Reed,J.C. (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, **388**, 300-304.

Dianov,G.L., Prasad,R., Wilson,S.H. and Bohr,B.A. (1999) Role of DNA polymerase  $\beta$  in the excision step of long patch mammalian base excision repair. *J. Biol. Chem.*, **274**, 13703-13743.

Dianov,G.L., Thybo,T., Dianova,I.I., Lipinski,L.J. and Bohr,V.A. (2000) Single nucleotide patch base excision repair is the major pathway for removal of thymine glycol from DNA in human cell extracts. *J. Biol. Chem.*, **275**, 11809-11813.

Dilber,M.S., Abedi,M.R., Christensson,B., Bjorkstrand,B., Kidder,G.M., Naus,C.C., Gahrton,G. and Smith,C.I. (1997) Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase *in vivo*. *Cancer Res.*, **57**, 1523-1528.

Dimmeler,S., Breitschopf,K., Haendeler,J. and Zeiher,A.M. (1999) Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J. Exp. Med.*, **189**, 1815-1822.

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

Du,C, Fang,M, Li,Y., Li,L. and Wang,X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP activation. *Cell*, **102**, 33-42.

Duan,H., Orth,K., Chinnaiyan,A.M., Poirier,G.G., Froelich,C.J., He,W.-W. and Dixit,V.M. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 16720-16724.

Earnshaw,D.L., Bacon,T.H., Darlison,S.J., Edmonds,K., Perkins,R.M., Vere Hodge, R.A. (1992) Mode of antiviral action of penciclovir in MRC-5 vells infected with herpes simplex virus (HSV-1), HSV-2, and varicella-zoster virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 2747-2757.

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.

Faris, M., Mantis, K. M. Kempiak, S. J., Koretzky, G. A. and Nel, A. (1998) Stress-induced Fas ligand expression in T cells is mediated through a MEK kinase 1-regulated response element in the Fas ligand promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 5415-5424.

Feinberg,A.P. and Vogelstein,B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **268**, 11838-11844.

## Literatur

- Feinmesser,M., Halpern,M., Fenig,E., Tsabari,C., Hodak,E., Sulkes,J., Brenner,B. and Okon,E. (1999) Expression of the apoptosis-related oncogenes bcl-2, bax,, and p53 in Merkel cell carcinoma: Can they predict treatment response and clinical outcome? *Hum. Path.*, **30**, 1367-1372.
- Foti,M., Marshalko,S.J., Schuster,E. Kumar,S., Beardsley, G.P. and Schweitzer, B.I. (1997) Solution structure of a DNA decamer containing the antiviral drug ganciclovir: combined use of NMR, restrained molecular dynamics, and full relaxation matrix refinement. *Biochemistry*, **36**, 5336-5345.
- Fraker,P.J., King,L.E., Lill-Elghanian,D. and Telford,W.G. (1995) Quantification of apoptotic events in pure and heterogeneous populations of cells using flow cytometer. *Methods Cell Biol.*, **46**, 57-76.
- Freeman,S.M., Abound,C.N., Whartenby,K.A., Packman,C.H.,Koeplin,D.S.,Moolten,F.L. and Abraham,G.N. (1993) The 'bystander effect': Tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.*, **53**, 5274-5283.
- Fujita,N. and Tsuruo,T. (1998) Involvement of Bcl-2 cleavage in the acceleration of VP-16-induced U937 cell apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 484-488.
- Fyfe,J.A. (1982) Differential phosphorylation of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine monophosphate by thymidylate kinases from herpes simplex viruses types 1 and 2 and varicella zoster virus. *Mol. Pharmacol.*, **21**, 432-437.
- Gallo,O., Chiarelli,I., Boddi,V., Bocciolini,C., Bruschini,L. and Porfirio,B. (1999) Cumulative prognostic value of p53 mutations and bcl-2 protein expression in head-and-neck cancer treated by radioactivity. *Int. J. Cancer*, **84**, 573-579.
- Gary,R., Kim,K., Cornelius,H.L., Park,M.S. and Matsumoto,Y. (1998) Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *J. Biol. Chem.*, **274**, 4354-4363.
- Grangirard,D., Studer,E., Monney,L., Belser,T., Fellay,I., Borner,C. and Michel,M.R. (1998) Bcl-2 overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. *EMBO J.*, **17**, 1268-1278.
- Grignet-Debrus,C. and Calberg-Bacq,C.-M. (1997) Potential of Varicella zoster virus thymidine kinase as a suicide gene in breast cancer cells. *Gene Ther.*, **4**, 560-569.
- Grignet-Debrus,C., Cool,V., Baudson,N., Degreve,B, Balzarini,J., de Laval,L., Debrus,S., Velu,T., Calberg-Bacq,C.-M. (2000a) Comparative in vitro and in vivo cytotoxic activity of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU) and its arabinosyl derivative, (E)-5-(2-bromovinyl)-1-β-D-arabinofuranosyluracil (BVaraU), against tumor cells expressing either the Varicella zoster or the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Cancer Gene Ther.*, **7**, 215-223.
- Grignet-Debrus,C., Cool,V., Baudson,N., Velu,T. and Calberg-Bacq,C.-M. (2000b) The role of cellular- and prodrug-associated factors in the bystander effect induced by the Varicella zoster and Herpes simplex viral thymidine kinases in suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther.*, **7**, 1456-1468.
- Gross,A. et al. (1998) Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.*, **17**, 3878-3885.
- Grunstein,M. and Hogness,D.S. (1975) Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3961-3965.
- Haldar,S., Jena,N. and Croce,C.M. (1995) Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4507-4511.
- Halloran,P.J. and Fenton,R.G. (1998) Irreversible G<sub>2</sub>-M arrest and cytoskeletal reorganization induced by cytotoxic nucleoside analogues. *Cancer Res.*, **58**, 3855-3865.

## Literatur

Hamel,W., Magnelli,L., Chiarugi,V.P. and Israel,M.A. (1996) Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Res.*, **56**, 2697-2702.

Hamel,W., Zirkel,D., Mehdorn,H.M., Westphal,M. and Israel,M.A. (2001) (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine potentiates ganciclovir-mediated cytotoxicity on herpes simplex virus-thymidine kinase-expressing cells. *Cancer Gene Ther.*, **8**, 388-396.

Hamzeh,F.M. and Lietman,P.S. (1991) Intranuclear accumulation of subgenomic noninfectious human cytomegalovirus DNA in infected cells in the presence of ganciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 1818-1823.

Hanahan,D. (1986) Techniques for the transformation of *E. coli*. In: Clover;D.M. DNA cloning (ed.), **1**, IRL Press, Oxford, UK.

He,M., Wilde,A. and Kaderbhai,M.A. (1990) A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1660.

Higgins,D.G. and Sharp,P.M. (1989) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *CABIOS*, **5**, 151-153.

Hirota,Y., Arai,Y., Matsumoto,A., Nii,S. and Wataja,Y. (1995) Different mechanisms of inhibition of DNA synthesis by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in cells transfected with gene for thymidine kinase of herpes simplex virus type 1 and in cells infected with the virus. *Nucleosides Nucleotides*, **14**, 2079-2087.

Horton,J.K., Prasad,R., Hou,E. and Wilson,S.H. (2000) Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase  $\beta$ -dependent long patch base excision repair. *J. Biol. Chem.*, **275**, 2211-2218.

Hu,T., Miller,C.M., Ridder,G.M. and Aardema,M.J. (1999) Characterization of p53 in Chinese hamster cell lines CHO-K1, CHO-WBL, and CHL: implications for genotoxicity testing. *Mutat. Res.*, **426**, 51-62.

Ianzini,F. and Mackey,M.A. (1997) Spontaneous premature chromosome condensation and mitotic catastrophe following irradiation of HeLa S3 cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, **73**, 409-421.

Illesley,D.D., Lee,S.H., Miller,W.H., Kuchta,R.D. (1995) Acyclic guanosine analogs inhibit polymerases  $\alpha$ ,  $\delta$ , and  $\epsilon$  with very different potencies and have unique mechanisms of action. *Biochemistry*, **34**, 2504-2510.

Izquierdo,M., Martin,V., de Felipe,P., Izquierdo,J.M., Perez-Higueras,A., Cortes,M.L., Paz,J.F., Isla,A. and Blazquez,M.G. (1996) Human malignant brain tumor response to herpes simplex thymidine kinase (HSVtk)/ganciclovir gene therapy. *Gene Ther.*, **3**, 491-495.

Ioannou,Y.A. and Chen,F.W. (1996) Quantification of DNA fragmentation in apoptosis. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 992-993.

Jacobson,M.D., Weil,M. and Raff,M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell*, **88**, 347-354.

Kaina,B., Ziouta,A., Ochs,K. and Coquerelle,T. (1997) Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by  $\text{O}^6$ -methylguanine in  $\text{Mex}^-$ ,  $\text{Mex}^+$  and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat. Res.*, **381**, 227-241.

Kaina,B. (1998) Critical steps in alkylation-induced aberration formation. *Mutat. Res.*, **404**, 119-124.

Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A. and Green, D. R. (1998) DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol. Cell*, **1**, 543-551.

## Literatur

- Kawai,H., Yoshida,I. and Suzutani,T. (1993) Antiviral activity od 1- $\beta$ -arabinofuranosyl-E-5-(2-bromovinyl)uracil against thymidine kinase negative strains of varicella zoster virus. *Microbiol. Immunol.*, **37**, 877-882.
- Kerr,J.F.R. (1971) Shrinkage necrosis a distinct mode of cell death. *J. Pathol.*, **105**, 13-20.
- Kirsch,D.G., Deseff,A., Chau,B.N., Lim,D.-S., de Souza-Pinto,N.C., Hansford,R., Kastan,M.B., Lazebnik,Y.A. and Hardwick,J.M. (1999) Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome C. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21155-21161.
- Klatzmann,D., Philippon,J., Valery,A., Bensimon,G. and Salzman,J.-L. (1996) Gene therapy for glioblastoma in adult patients: Safety and efficacy evaluation of an in situ injection of recombinant retroviruses producing cells carrying the thymidine kinase gene of the herpes simplex type 1 virus, to be followed with administration of ganciclovir. *Hum. Gene Ther.*, **7**, 109-126.
- 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.
- Koyano,S., Suzutani,T., Yoshida,I and Azuma,M. (1996) Analysis of phosphorylation pathways of antiherpesvirus nucleosides by varicella-zoster virus-specific enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 920-923.
- 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 the outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.*, **53**, 4701-4714.
- Kroemer,G. (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med.*, **3**, 614-620.
- Kumar,S. and Lavin,M.F. (1996) The ICE family of cysteine proteases as effector of cell death. *Cell Death Differ.*, **3**, 255-267.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- Lazebnik,Y.A., Kaufmann,S.H., Desnoyers,S., Poirier,G.G. and Earnshaw,W.C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, **371**, 346-347.
- Lee,H., Lerner,J.M. and Mamlin,J.L. (1997) Cloning and characterization of Chinese hamster p53 cDNA. *Gene*, **184**, 177-183.
- 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.
- Lips,J. and Kaina,B. (2001) DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53 deficient fibroblasts. *Carcinogenesis*, **22**, 579-585.
- Liu,X., Zou,H., Slaughter,C. and Wang,X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, **86**, 147-157.
- 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.

## Literatur

- Mackey, M.A., Morgan, W.F. and Dewey, W.C. (1988) Nuclear fragmentation and premature chromosome condensation induced by heat shock in S-phase Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.*, **48**, 6478-6483.
- Mancini, W.R., de Clerq, E. and Prusoff, W.H. (1983) The relationship between incorporation of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine into herpes simplex virus type 1 DNA with virus infectivity and integrity. *J. Biol. Chem.*, **258**, 792-795.
- Mandel, M. and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, **53**, 159-162.
- Marshalko, S.J., Schweitzer, B.I., Beardsley, G.P. (1995) Chiral chemical synthesis of DNA containing (S)-9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine (DHPG) and effects on thermal stability, duplex structure, and thermodynamics of duplex formation. *Biochemistry*, **34**, 9235-9248.
- Martin, S.J. and Green, D.R. (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, **82**, 349-352.
- Martin, J.L., Brown, C.E., Matthews-Davis, N. and Reardon, J.E. (1994) Effects of antiviral nucleoside analogs on human DNA polymerases and mitochondrial DNA synthesis. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, **38**, 2743-2749.
- Matsumoto, Y., Kim, K., Hurwitz, J., Gary, R., Levin, D.S., Tomkinson, A.E., Park, M.S. (1999) Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/aprimidinic sites with purified human proteins. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33703-33708.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkeo, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.*, **16**, 2794-2804.
- Mesnil, M., Piccoli, C., Tiraby, G., Willecke, K. and Yamasaki, H. (1996) Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 1831-1835.
- Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M. and Thompson, C.B. (1997) Bcl-x<sub>L</sub> forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, **385**, 353-357.
- Mitra, S. and Kaina, B. (1993) Regulation of repair of alkylation damage in mammalian genomes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **44**, 109-142.
- Mizushima, Y., Takahashi, N., Ogawa, A., Tsurugaya, K., Koshino, H., Takemura, M., Yoshida, S., Matsukage, A., Sugawara, F. and Sakaguchi, K. (1999) The cyanogenic glucoside, prunasin (D-mandelonitrile-beta-D-glucoside), is a novel inhibitor of DNA polymerase  $\beta$ . *J. Biochem.* **126**, 430-436.
- Moolten, F.L. (1986) Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: Paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.*, **46**, 5276-5281.
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israele, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M. and Krammer, P.H. (1998) p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med.*, **188**, 2033-2045.
- Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51**, 263-273.
- 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.

## Literatur

Muzio,M, Chinnaiyan,A.M., Kischkel,F.C., O'Rourke,K., Shevchenko,A., Ni,J., Scaffidi,C., Bretz,J.D., Zhang,M., Gentz,R., Mann,M., Krammer,P.H., Peter,M.E. and Dixit,V.M. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, **85**, 817-827.

Muzio,M, Salvesen,G.S. and Dixit,V.M. (1997) FLICE induced apoptosis in a cell-free system. *J. Biol. Chem.*, **272**, 2952-2956.

Muzio,M, Stockwell,B.R., Stennicke,H.R., Salvesen, G.S. and Dixit,V.M: (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 2926-2930.

Negrini,M., Silini,E., Kozak,C., Tsujito,Y. and Croce,C.M. (1986) Molecular analysis of mbcl-2: structure and expression of the murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. *Cell*, **49**, 455-463.

Nicholson,D.W. *et al.* (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, **376**, 37-43.

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. Meth.*, **139**, 271-279.

Nomura,M., Shinizu,S., Ito,T., Narita,M, Matsuda,H. and Tsujimoto,Y. (1999) Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res.*, **59**, 5542-5548.

Ochs,K. Sobol,R.W., Wilson,S.H. and Kaina,B. (1999) Cells deficient in DNA Polymerase  $\beta$  are hypersensitive to alkylating agent-induced apoptosis and chromosomal breakage, *Cancer Res.*, **59**, 1544-1551.

Oldfield,E.H., Ram,Z., Culver,K.W., Blaese,R.M., DeVroom,H.L. and Anderson,W.F. (1993) Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum. Gene Ther.*, **4**, 39-69.

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.

Orren,D.K., Petersen,L.N. and Bohr,V.A. (1995) A UV-responsive G2 checkpoint in rodent cells. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3722-3730.

Pegg,A.E., Boosalis,M., Samson,L., Moschel,R.C., Byers,T.L., Swenn,K. and Dolan,M.E. (1993) Mechanism of inactivation of human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase by O<sup>6</sup>-benzylguanine. *Biochemistry*, **32**, 11998-2006.

Pegg,A.E., Dolan,M.E. and Moschel,R.C. (1995) Structure, function and inhibition of O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **51**, 167-223.

Podlutzky,A.JA., Dianova,I.I., Podust,V.N., Bohr,V.A., and Dianov,G.L. (2001) Human DNA polymerase  $\beta$  initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA. *EMBO J.*, **20**, 1477-1482.

Prasad,R., Dianov,G.L., Bohr,V.A., and Wilson,S.H. (2000) FEN1 stimulation of DNA polymerase  $\beta$  mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair. *J. Biol. Chem.*, **275**, 4460-4466.

Prusoff,W.H., Mancini,W.R., Lin,T.-S., Lee,J.J., Siegel,S.A. and Otto,M.J. (1984) Physical and biological consequences of incorporation of antiviral agents into virus DNA. *Antiviral Res.*, **4**, 303-315.

## Literatur

- Pue, M.A. and Benet, L.Z. (1993) Pharmacokinetics of famciclovir in man. *Antiv. Chem. Chemoth.*, **4** (Suppl.1), 114-121
- Radicella, J.P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M.S. and Boiteux, S. (1997) Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8010-8015.
- Reardon, J.E. (1989) Herpes simplex virus type 1 and human DNA polymerase interactions with 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate analogues. *J. Biol. Chem.*, **264**, 19039-19044.
- Reid, R., Mar, E.C., Huang, E.S., Topal, M.D. (1988) Insertion and extension of acyclic dideoxy, and ara nucleotides by herpesviridae, human  $\alpha$ , and human  $\beta$  polymerases: a unique inhibition mechanism for 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine triphosphate. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3898-3904.
- Roy, N., Deveraux, Q.-L., Takahashi, R., Salvesen, G.-S. and Reed, J.C. (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.*, **16**, 6914-6925.
- Rubsam, L.Z., Davidson, B.L. and Shewach, D.S. (1998) Superior cytotoxicity with ganciclovir compared with acyclovir and 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylthymine in Herpes Simplex Virus-Thymidine kinase-expressing cells: a novel paradigm for cell killing. *Cancer Res.*, **58**, 3873-3882.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Sato, T., Irie, S., Krajewski, S. and Reed, J.C. (1994) Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl-2 protein. *Gene*, **140**, 291-292.
- Seol, D.W. and Billiar, T.R. (1999) A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **274**, 2072-2076.
- Shendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M. and Reed, J.C. (1997) Channel formation by anti-apoptotic protein, Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5113-5118.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, **175**, 184-191.
- Slee, E.A., Zhu, H., Chow, S.C., MacFarlane, M., Nicholson, D.W. and Cohen, G.M. (1996) Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (zVAD-FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem J.*, **315**, 21-24.
- 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., Green, D.R. and Martin, S.J. (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.
- Smee, D.F., Boehme, R., Chernow, M., Binko, B.P. and Matthews, T.R. (1985) Intracellular metabolism and enzymatic phosphorylation of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine and acyclovir in herpes simplex virus-infected and uninfected cells. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 1049-1056.
- Sobol, R.W., Horton, J.K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R.K., Prasad, R., Rajewski, K. and Wilson, S.H. (1996) Requirement of DNA polymerase  $\beta$  in base excision repair. *Nature*, **379**, 183-186.
- Southern, P.J. and Berg, P. (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 327-341.
- 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. USA*, **93**, 14486-14491.

## Literatur

Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Guo,Y., Zhan,Y., Lazebnik,Y., Fernandes-Alnemri,T. and Alnemri,E.S. (1999) Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can regulate apoptosis. *Cancer Res.*, **59**, 999-1002.

Srivastava,D.K., Berg,B.J., Prasad,R., Molina,J.T., Beard,W.A., Tonkinson,A.E. and Wilson,S.H. (1998) Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J. Biol. Chem.*, **273**, 21203-21209.

Srivastava,D.K., Husain,I., Arteaga,C.L. and Wilson,S.H. (1999) DNA polymerase  $\beta$  expression differences in selected human tumors and cell lines. *Carcinogenesis*, **20**, 1049-1054.

St. Clair,M.H., Lambe,C.U. and Furman,P.A. (1987) Inhibition by ganciclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpesvirus genetic information. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 844-849.

Stewart,J.A., Reef,S.E., Pellett,P.E., Corey,L. and Whitley,R.J. (1995) Herpesvirus infections in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.*, **21** (Suppl.) 15114-15120.

Sullivan,V., Talarico,C.L., Stanat,S.C., Davis,M., Coen,D.M. and Biron,K.K. (1992) A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature*, **358**, 162-164.

Sun,X.-M., MacFarlane,M., Zhuang,J., Wolf,B.B., Green,D.R. and Cohen,G.M. (1999) Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5053-5060.

Susin,S.A. *et al.* (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature*, **397**, 441-446.

Tafani,M., Minchenko,D.A., Serroni,A. and Farber,J.-L. (2001) Induction of the mitochondrial permeability transition mediates the killing of HeLa cells by staurosporine. *Cancer Res.*, **61**, 2459-66.

Tanaka,S., Saito,K. and Reed,J.C. (1993) Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. *J. Biol. Chem.*, **268**, 10920-10926.

Thompson,C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science*, **267**, 1456-1462.

Thust,R., Schacke,M. and Wutzler,P. (1996) Cytogenetic genotoxicity of antiherpes virostatics in Chinese hamster V79-E cells. I. Purine nucleoside analogues. *Antiviral Res.*, **31**, 105-113.

Thust,R., Tomicic,M., Klöcking,R., Voutilainen,N., Wutzler,P. and Kaina,B. (2000a) Comparison of the genotoxic and apoptosis-inducing properties of ganciclovir and penciclovir in CHO cells transfected with the thymidine kinase gene of HSV-1: implications for gene therapeutic approaches. *Cancer Gene Ther.* **7**, 107-117.

Thust,R., Tomicic,M., Klöcking,R., Wutzler,P. and Kaina,B. (2000b) Cytogenetic genotoxicity of anti-herpes purine nucleoside analogues in CHO cells expressing the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1: comparison of ganciclovir, penciclovir and aciclovir. *Mutagenesis*, **15**, 177-184.

Tomicic,M.T., Christmann,M. and Kaina,B. (2000) Cloning and functional analysis of cDNA encoding the hamster Bcl-2 protein. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **275**, 899-903.

Tomicic,M.T. and Kaina,B. (2001) Hamster Bcl-2 protein is cleaved *in vitro* and in cells by caspase-9 and caspase-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 404-408.

Tsujimoto,Y. and Croce,C.M. (1986) Analysis of the structure, transcripts, and protein products of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5214-5218.

## Literatur

Van Dam,H., Duyndan,M., Rottier,R., Bosch,A., de Vries-Smith,L., Herrlich,P., Zantana,A., Angel,P. and van der Eb,A.J. (1993) Heterodimer function of c-Jun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.*, **12**, 479-487.

Van Triest,B., Pinedo,H.M., Giaccone,G and Peters,G.J. (2000) Downstream molecular determinants of response to 5-fluorouracil and antifolate thymidylate synthase inhibitors. *Ann. Oncol.*, **11**, 385-391.

Vaux,D.L. and Strasser,A. (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2239-2244.

Vere Hodge,R.A. (1993) Famciclovir and penciclovir. The mode of action of famciclovir including its conversion to penciclovir. *Antivir. Chem. Chemother.*, **4**, 67-84.

Vere Hodge,R.A. and Cheng,Y.-C. (1993) The mode of action of penciclovir. *Antivir. Chem. Chemother.*, **4** (Suppl. 1), 13-24.

Vere Hodge,R.A. and Perkins,R.M. (1989) Mode of action of 9-(4-hydroxymethylbut-1-yl)guanine (BRL 39123) against herpes simplex virus in MRC-5 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**, 223-229.

Vermes,I., Haanen,C. Steffens-Nakken,H. and Reutelingsberger,C. (1995) A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V, *J. Immunol. Meth.*, **184**, 39-51.

Wang,X. and Studzinski,G.P. (1997) Antiapoptotic action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 is associated with increased mitochondrial Mcl-1 and Raf-1 proteins and reduced release of cytochrome *c*. *Exp. Cell Res.*, **235**, 210-217.

Wei,S.J., Chao,Y., Hung,Y.M., Lin,W.C., Yang,D.M., Shih,Y.L., Chang,L.Y., Whang-Peng,J. and Yang,W.K. (1998) S- and G2-phase cell cycle arrests and apoptosis induced by ganciclovir in murine melanoma cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. *Exp. Cell Res.*, **241**, 66-75.

Wei,S.J., Chao,Y., Shih,Y.L., Yang,D.M., Hung,Y.M. and Yang,W.K. (1999) Involvement of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in apoptosis induced by ganciclovir treatment of tumor cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. *Gene Ther.*, **6**, 420-431.

Wesselborg,S., Engels,I.H., Rossmann,E., Los,M. and Schulze-Osthoff,K. (1999) Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood*, **93**, 3053-3063.

White,E. (1996) Life, death and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.*, **10**, 1-15.

Wutzler,P. and Thust,R. (2001) Genetic risks of antiviral nucleoside analogues – a survey. *Antiviral Res.*, **49**, 55-74.

Wyllie,A.H., Kerr,J.F.R. and Currie,A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Dev. Cyt.*, **68**, 251-306.

Yokota,T., Konno,K., Shigeta,S. and De Clerq,E. (1984) Comparative inhibition of DNA polymerases from varicella zoster virus (TK+ and TK-) strains by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate. *Mol. Pharmacol.*, **26**, 376-380.

Zamzami,N., Susin,S.A., Marchetti,P., Hirsch,T., Monterrey,I.G., Castedo,M. and Kroemer,G. (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.*, **183**, 1533-1544.

## 7. ANHANG

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A	Adenin
ACV	Aciclovir
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AP-Stelle	apurine/apyrimidine Stelle
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
As	Aminosäure(n)
Bax	<i>Bcl-2 associated protein X</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2 / B cell leukemia 2</i>
BER	<i>base excision repair</i> (Basenexzisionsreparatur)
Bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
BVDU	Brivudin
β-pol	DNA-Polymerase β
C	Cytosin
ca.	cirka
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
Ci	Curie
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSBs	Doppelstrangbrüche
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK2	<i>extracellular signal receptor regulated kinase 2</i>
f	femto
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (Fötale Rinderserum)
FITC	Fluorescein

## Anhang: Abkürzungsverzeichnis

g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCV	Ganciclovir
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde(n) oder human
HAP	humane apurine/apyrimidine Endonuklease
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HNPCC	<i>hereditary nonpolyposis colon cancer</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerettich Peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalactosid
J	Joule
k	kilo
kBp	Kilobasenpaar(e)
kD	Kilodalton
L	Liter
LMP-Agarose	<i>low melting point</i> Agarose (Agarose mit niederem Schmelzpunkt)
mA	Miliamper
ml	Mililiter
min	Minute(n)
µl	Mikroliter
m	milli
M	molar
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MMR	Mismatch Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
n	nano
NER	<i>nucleotide excision repair</i> (Nukleotidexzisionsreparatur)
O <sup>6</sup> -MeG	O <sup>6</sup> -Methylguanin
PAA	Polyacrylamid (38%) / Bispolyacrylamid (2%)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)

### Anhang: Abkürzungsverzeichnis

PCV	Penciclovir
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	T4-Polynukleotid-Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SCE	Schwesterchromatidenaustausch
SCGE	Einzelzellgelelektrophorese
SDS	Natrium( <i>Sodium</i> )dodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SSBs	Einzelstrangbrüche
SSC	<i>Standard saline citrate</i> (Standard-Salz-Citrat-Puffer)
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
TS	Thymidylatsynthetase
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris - (Hydroxymethyl)-Aminoethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
Vol	Volumen
z.B.	zum Beispiel
XC	Xylen-Cyanol
°C	Grad Celcius

## **7.2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

- Abb.1.** Chemische Struktur der Virustatika vom Typ Purinanaloga.
- Abb.2.** Chemische Struktur der Virustatika vom Typ Pyrimidinanaloga.
- Abb.3.** Protokoll-Schema der HSVtk/GCV-Gentherapie.
- Abb.4.** Schematische Darstellung des Mechanismus der Basenexzisionsreparatur.
- Abb.5.** Mechanismus der Rezeptor-vermittelten Apoptose
- Abb.6.** Mechanismus der Rezeptor-unabhängigen (mitochondrialen) Apoptose
- Abb.7.** Northern- und Western-Blot-Analyse HSVtk-exprimierender Transfektanten.
- Abb.8.** Einfluß der Virustatika-Behandlung auf das Wachstum der CHO-HSV-TK-Transfektanten.
- Abb.9.** Einbau von radioaktiv markierten [<sup>3</sup>H]-GCV und [<sup>3</sup>H]-PCV in die DNA der CHO-HSV-TK-Zellen.
- Abb.10.** Reproduktiver Zelltod nach der Behandlung der CHO-HSV-TK- und CHO-neo-Zellen mit den Virustatika vom Typ Purinanaloga.
- Abb.11.** Induktion der Apoptose und Nekrose in CHO-HSV-TK-Zellen als Funktion der Dosis und der Nachbehandlungszeit.
- Abb.12.** Induktion von Einzel- und Doppelstrangbrüchen nach Behandlung mit Virustatika vom Typ Purinnukleosidanaloga.
- Abb.13.** Induktion von Chromosomenaberrationen in CHO-HSV-TK-Zellen nach Virustatika-Behandlung.
- Abb.14.** Cytogenetische Präparationen aus CHO-HSV-TK-Zellen.
- Abb.15.** Quantitative und qualitative Bestimmung der Apoptose in CHO-HSV-TK-Zellen nach Behandlung mit GCV.
- Abb.16.** Progression der CHO-HSV-TK-Zellen durch den Zellcyclus.
- Abb.17.** Zeitlicher Ablauf der Caspaseaktivierung nach Behandlung mit GCV.
- Abb.18.** Hemmung der Apoptose durch Caspaseinhibitoren.
- Abb.19.** Hemmung der GCV-induzierten PARP-Spaltung durch Caspaseinhibitoren.
- Abb.20.** Expression der Proteine aus der Bcl-2-Familie.
- Abb.21.** Expression des Fas-Rezeptors und des Fas-Liganden.
- Abb.22.** Intrazelluläre Lokalisation des Cytochrom C.
- Abb.23.** Caspasen-vermittelte Spaltung des Bcl-2 Proteins.
- Abb.24.** Expression und Aktivität von unterschiedlichen Caspase-Varianten.
- Abb.25.** Auswirkung der Expression von Caspase-Varianten auf die Bcl-2 Spaltung.
- Abb.26.** *In vitro* Spaltung von Bcl-2 durch Caspasen.
- Abb.27.** Auswirkung der Expression des punkt-mutierten Bcl-2-Proteins auf die Bcl-2-Spaltung und die Induktion der Apoptose.
- Abb.28.** Nukleotidsequenz der *bcl-2*-cDNA und die abgeleitete Aminosäuresequenz des Hamster-Bcl-2-Proteins.
- Abb.29.** Vergleich der Aminosäuresequenzen von Mensch-, Maus- und Hamster-Bcl-2-Protein.

## Anhang: Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb.30.** Northern-Blot-Analyse von *bcl-2*-Transkripten aus vier Säugerzelllinien.
- Abb.31.** Auswirkungen der Expression des Hamster-Bcl-2-Proteins auf die alkylierungs-induzierte Cytotoxizität in HeLa MR-Zellen.
- Abb.32.** Herstellung des GST-Bcl-2-Fusionsproteins und Spaltung des GST-Anteil mit der Thrombin-Protease.
- Abb.32.C** Verifikation des Hamster-Bcl-2-Proteins mittels Western-Blot-Analyse.
- Abb.33.** Expression der Thymidinkinase von Varicella zoster-Virus.
- Abb.34.** Einfluß der BVDU-Behandlung auf das Wachstum der CHO-VZV-TK-Transfektanten.
- Abb.35.** Einbau von radioaktiv markiertem <sup>3</sup>H-BVDU in VZVtk und HSVtk-exprimierenden CHO-Zellen.
- Abb.36.** Reproduktiver Zelltod nach Behandlung der Zellen mit BVDU.
- Abb.37.** Bestimmung der Apoptose/Nekrose-Frequenz.
- Abb.38.** Induktion der DNA-Strangbrüchen.
- Abb.39.** Bestimmung der Thymidylatsynthetase (TS) - Aktivität.
- Abb.40.** Progression markierter S-Phase-Zellen durch den Zellcyclus nach Behandlung mit BVDU in Abhängigkeit von der Zeit.
- Abb.41** Induktion von c-Jun, AP-1 und FasL nach BVDU-Behandlung.
- Abb.42.** Aktivierung von Caspasen und Einfluß der Caspaseinhibitoren auf die Apoptose.
- Abb.43.** Spaltung von PARP.
- Abb.44.** Expression verschiedener apoptotischer Marker nach BVDU-Behandlung.
- Abb.45.** Reparatur von GCV.
- Abb.46.** Überexpression der Polymerase  $\beta$  in CHO-HSV-TK-Zellen und Auswirkung auf die Cytotoxizität gegenüber GCV.
- Abb.47.** Einfluß der Pol  $\beta$ -Aktivität auf das Überleben der Zellen.
- Abb.48.** Induktion der Cytotoxizität in  $\beta$ -pol-defizienten und Wildtyp-Zellen nach GCV-Behandlung.
- Abb.49.** Induktion von DNA-Strangbrüchen und Chromosomenaberrationen in  $\beta$ -pol-Zellen nach GCV-Behandlung.
- Abb.50.** Methoxyamin-vermittelte Sensibilisierung von  $\beta$ -pol-Zellen gegenüber GCV.
- Abb.51.** Modell des molekularen Mechanismus der GCV-induzierten Apoptose.
- Abb.52.** Modell des molekularen Mechanismus der BVDU-induzierten Apoptose.
- Abb.53.** Mechanistische Wirkung von Methoxyamin (MX).
- Tab. I** Basenexzisionsreparatur einer AP-Stelle in Säugerzellen *in vitro*.
- Tab. II** BrdU-Einbau während GCV-Behandlung und im Nachbehandlungszellcyclus.

### 7.3. Veröffentlichungen

Tomicic,M.T., Thust,R., Sobol,R.W. and Kaina,B. (2001) DNA polymerase  $\beta$  mediates protection of mammalian cells against ganciclovir-induced cytotoxicity and DNA breakage. *Cancer Res.*, **61**:7399-7403.

Tomicic,M.T. and Kaina,B. (2001) Hamster Bcl-2 protein is cleaved *in vitro* and in cells by caspase-9 and caspase-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**:404-408.

Tomicic,M.T., Christmann,M. and Kaina,B. (2000) Cloning and functional analysis of cDNA encoding the hamster Bcl-2 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**:899-903.

Thust,R., Tomicic,M., Klöcking,R., Voutilainen,N., Wutzler,P. and Kaina,B. (2000a) Comparison of the genotoxic and apoptosis-inducing properties of ganciclovir and penciclovir in Chinese hamster ovary cells transfected with the thymidine kinase gene of herpes simplex virus-1: Implications for gene therapeutic approaches. *Cancer Gene Ther.* **7**:107-117.

Thust,R., Tomicic,M., Wutzler,P. and Kaina,B. (2000b) Cytogenetic genotoxicity of anti-herpes purine nucleoside analogues in CHO cells expressing the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1: comparison of ganciclovir, penciclovir and aciclovir. *Mutagenesis*, **15**:177-184.

Tomicic,M.T., Thust,R. and Kaina,B. Ganciclovir-induced apoptosis in HSV-1 thymidine kinase expressing cells: critical role of DNA breaks, Bcl-2 decline and caspase-9 activation, zur Publikation eingereicht.

Tomicic,M.T., Bey,E., Wutzler,P., Thust,R. and Kaina,B. Comparative analysis of DNA breakage, chromosomal aberrations and apoptosis induced by the anti-herpes purine nucleoside analogues aciclovir, ganciclovir and penciclovir, zur Publikation eingereicht.

Tomicic,M.T., Friedrichs,C., Wutzler,P., Thust,R. and Kaina,B. Induction of apoptosis, necrosis and genotoxic damage by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU) in CHO cells transfected with different herpesvirus thymidine kinase genes, in Vorbereitung.

\*\*\*

Grombacher,T., Tomicic,M., Digweed,M. and Kaina,B. (1999) Overexpression of cDNA encoding FANCC, SPHAR, MPG, SNM1 or HA3611 does not render CHO cells more resistant to DNA crosslinking agents. *Anticancer Res.*, **19**:1729-1736.

Tomicic,M., Eschbach,E. and Kaina,B. (1997) Expression of yeast but not human apurinic/aprimidinic endonuclease renders Chinese hamster cells more resistant to DNA damaging agents. *Mutat. Res.*, **383**:155-165.

Tomicic,M. and Franekic,J. (1996) Effect of overexpression of *E. coli* 3-methyladenine-DNA glycosylase I (Tag) on survival and mutation induction in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.*, **385**:861-872.

Tomicic,M. and Franekic,J. (1996) Modulation of genotoxic response in *Salmonella typhimurium* by the overexpression of *Escherichia coli* 3-methyladenine-DNA glycosylase II (AlkA). *Period. biol.*, **98**:255-257.

## 7.4. Kongressteilnahme

### 7.4.1. Posterpräsentationen

Tomicic,M., Thust,R. and Kaina,B. (1998) HSV-1 thymidine kinase overexpressing Chinese hamster ovary cells are hypersensitive to antiherpes virostatic drugs undergoing apoptosis. *Period. biol.*, **4** (suppl), [1<sup>st</sup> Congress of Croatian Geneticists with International Participation, Hvar, Croatia].

Tomicic,M., Thust,R. and Kaina,B. (1998) Chinese hamster ovary cells expressing HSV-1 thymidine kinase are hypersensitive to antiherpes virostatic drugs undergoing apoptosis. *Anticancer Res.*, **18** (suppl.), [6<sup>th</sup> International Conference of Anticancer Research, Kallithea, Halkidiki, Greece].

Thust,R., Tomicic,M., Wutzler,P. and Kaina,B. (2000) Genotoxic activity of ganciclovir in HSV-1 thymidine kinase expressing CHO cells. Comparison with penciclovir. *J. Gene Med.*, **2** (suppl.), [8<sup>th</sup> Meeting of the European Society of Gene Therapy, Stockholm, Sweden].

Tomicic,M.T., Thust,R. and Kaina,B. Mitochondrial apoptosis is amplified *via* caspase-mediated cleavage of Bcl-2 in HSVtk expressing cells following exposure to GCV. [6. Workshop der Deutschen Sektion des DNA-Repair Network, Essen, 2000].

Tomicic,M.T., Thust,R. and Kaina,B. (2001) Ganciclovir-induced apoptosis is amplified *via* caspase-mediated cleavage of Bcl-2 in CHO cells expressing thymidine kinase of Herpes simplex virus-1. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **127** (suppl.1), [11<sup>th</sup> Congress of the Division of Experimental Cancer Research (AEK), Heidelberg].

\*\*\*

Tomicic,M., Franekic,J. and Kaina,B. (1997) Stable yeast but not human apurinic/apyrimidinic endonuclease transfectants of Chinese hamster cells are more resistant to genotoxic agents. *Mutat. Res.*, **379** (suppl.1), [7<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens, Toulouse, France].

Tomicic,M. and Kaina,B. (1997) Modulation of apurinic (AP) endonuclease activity in mammalian cells: transfection of yeast AP endonuclease renders cells more resistant to genotoxic agents. *Arch. Pharmacol.*, **355** (suppl.), [38. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz].

Tomicic,M., Eschbach,E. and Kaina, B.: Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing yeast apurinic/apyrimidinic endonuclease become more resistant to alkylating agents and oxidative stress. [5. Workshop der Deutschen Sektion des DNA-Repair Network, Mainz, 1998].

### 7.4.2. Vorträge

Tomicic,M.: "Sensibilisierung von Zellen durch HSVtk-Gentransfer gegenüber Ganciclovir und Penciclovir: Genotoxische und Apoptose-induzierende Wirkungen", [Workshop des DNA-Reparatur Netzwerks, Thema: Chemosensitivität / Chemoresistenz und DNA-Reparatur: Grundlagen und Klinik, Essen, 1999].

Tomicic,M., Thust,R. and Kaina,B. (2000) Molecular mechanisms of ganciclovir induced genotoxicity and apoptosis. *Arch. Pharmacol.*, **361** (suppl). [41. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz].

## Lebenslauf

### **7.5. Lebenslauf**

**Name:** MajaTomicic-Christmann

**Geburtsdatum und –ort:** 16. Juni 1971 in Zagreb

**Staatsangehörigkeit:** kroatisch

**Religion:** römisch-katholisch

**Familienstand:** verheiratet

**Eltern:** Jasna Tomicic, geb. Rukavina  
geboren am 20. August 1946 (Dipl. Betriebswirtschaftlerin)  
Dragutin Tomicic  
geboren am 25. Januar 1946 (Arzt-Kardiologe)

**Schulausbildung:** 1977-1985 Hauptschule in Zagreb  
1985-1989 Gymnasium in Zagreb  
Abschluß: Abitur in Mai 1989

**Studium der Biologie:** 1989-1994 an der Universität Zagreb  
Abschluß: Diplomprüfung in Januar 1994  
Thema der Diplomarbeit: „Molekulargenetische und cytogenetische Charakterisierung der Satelliten-DNA des Insekts *Palorus ratzeburgii*“

**Nachdiplomstudium:** 1994-1997 zur wissenschaftlichen Fortbildung im Fachbereich Biologie (Molekular- und Zellbiologie), zum Erreichen des „Master-Grades“

**Jüngere Assistentin:** 1994-1998 an der Fakultät für Ernährungstechnologie und Biotechnologie der Universität Zagreb

**DAAD-Stipendiatin:** 1995-1997 Praktischer Teil der Masterarbeit am Institut für Toxikologie unter Betreuung von Prof. Dr. B. Kaina  
Abschluß: Masterprüfung an der Uni-Zagreb in Mai 1997  
Titel der Masterarbeit: „Beteiligung der Endonukleasen an der DNA-Reparatur in Zellen des Chinesischen Hamsters (CHO)“

**Promotion:** 1998-2001 am Institut für Toxikologie, Abteilung für Angewandte Toxikologie, unter Betreuung von Prof. Dr. B. Kaina  
Thema der Promotionsarbeit: Mechanismus der Apoptose, Gentoxizität und DNA-Reparatur in Herpesvirus-Thymidinkinase-exprimierenden Säugerzellen nach Behandlung mit Antiherpes-Virustatika vom Typ der Nukleosidanaloga“

**Sprachkenntnisse:** Kroatisch Muttersprache  
Deutsch fließend im Wort und Schrift  
Englisch fließend im Wort und Schrift  
Italienisch fließend im Wort und Schrift  
Russisch befriedigend im Wort und fließend im Schrift