



KfK 4992
Januar 1992

Charakterisierung zellulärer Schutzfunktionen gegenüber der genotoxischen Wirkung von alkylierenden Agenzien in Säugetierzellen

G. Fritz
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik
und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 4992

**Charakterisierung zellulärer Schutzfunktionen gegenüber
der genotoxischen Wirkung von alkylierenden Agenzien in
Säugetierzellen**

Gerhard Fritz

Dissertation genehmigt von der Fakultät
für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik
und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 4992

**Charakterisierung zellulärer Schutzfunktionen gegenüber
der genotoxischen Wirkung von alkylierenden Agenzien in
Säugetierzellen**

Gerhard Fritz

Dissertation genehmigt von der Fakultät
für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

Zusammenfassung

Alkylierende Agenzien sind in unserer Umwelt weit verbreitet und stellen potente chemische Mutagene/Karzinogene dar. Auch in der Tumorchemotherapie finden Alkylantien eine breite Anwendung. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, zelluläre Schutzfunktionen eukaryontischer Zellen (Säugerzellen) zur Abwehr genotoxischer Schäden nach Alkylantienexposition zu charakterisieren.

Durch Transfektion von genomischer menschlicher DNA in eine Alkylantien-hypersensitive Hamster-Zelllinie (27-1) und nachfolgende Selektion auf Methyl-Methansulfonat (MMS) resistente Zellen konnten menschliche DNA enthaltende Cosmide und schließlich eine cDNA (C-81) kloniert werden, die Resistenz gegenüber monofunktionellen Alkylantien (MMS und N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG)), sowie 6-Thioguanin vermitteln. Die cDNA codiert mit großer Wahrscheinlichkeit für ein Membranglykoprotein. Mutagenbehandlung führte nicht zu einer verstärkten Expression von C-81 mRNA in menschlichen Zellen. Da die Cosmidtransfektanten im Vergleich zu Kontrolltransfektanten eine verringerte Teilungsrate aufwiesen, und C-81 mRNA verstärkt in konfluenten Zellen exprimiert wurde, erscheint es möglich, daß dem Mechanismus der Resistenzvermittlung eine Verringerung der Proliferationsgeschwindigkeit durch das von C-81 codierte Protein zugrunde liegt. Eine verringerte Teilungsrate der Zellen könnte ihnen die Reparatur von DNA-Alkylierungsschäden ermöglichen, bevor diese durch nachfolgende Replikation fixiert und manifestiert werden.

Einen weiteren Faktor, der an der Vermittlung von Alkylantienresistenz beteiligt ist, stellt die O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (MGMT) dar. Durch stabile Transfektion und Expression der menschlichen cDNA für dieses Protein in Alkyltransferase defizienten Hamsterzellen (CHO-9) konnte die Bedeutung dieses Reparaturproteins für die Vermeidung der genotoxischen Wirkung von alkylierenden Agenzien untersucht werden. Es zeigte sich, daß die O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase einen wesentlichen Beitrag zur Abwehr der toxischen, mutagenen, Aberrationen- und Schwesterchromatidenaustausch-induzierenden Wirkung von monofunktio-

nellen Alkylantien leistet. Die Stärke der Schutzwirkung der O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase ist abhängig von der zellulären MGMT-Menge, der Mutagendosis und der Art des applizierten Mutagens. Durch Verwendung eines Dexamethason-induzierbaren MGMT-Expressionskonstrukts konnte gezeigt werden, daß O⁶-Methylguanin erst nach Ablauf eines Zellzyklusses und damit wahrscheinlich erst über die Ausbildung sekundärer Läsionen seine toxische Wirkung entfaltet.

Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit auch der Nachweis einer transkriptionellen Aktivierbarkeit eines DNA-Reparaturgens (MGMT) aus Säugerzellen nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien erbracht werden. Die Induzierbarkeit der MGMT-mRNA-Expression wurde nur an Hepatomzellen von Ratten beobachtet und erfolgte durch alle zu DNA-Strangbrüchen führenden Behandlungen. Es wurde gezeigt, daß die Induktion der MGMT-mRNA-Expression von Proteinbiosynthese abhängig ist und durch Phosphatasehemmung verhindert werden kann. Die Induktion der MGMT-mRNA-Expression ist von biologischer Relevanz, da sie bei wiederholter Alkylantienexposition von Zellen zu einer Verringerung der induzierten Mutationsfrequenz in Hepatomzellen führt.

Bei der Untersuchung der molekularen Ursachen für die MGMT-Defizienz von Zellen (Mex⁻-Phänotyp) zeigte sich, daß sowohl ein völliger Verlust, als auch Punktmutationen oder Veränderungen des Methylierungsgrades des MGMT-Gens den Mex⁻-Phänotyp bedingen können.

Die Ergebnisse machen zusammengefaßt deutlich, daß mindestens 2 Funktionen an der Vermittlung von zellulärer Alkylantienresistenz beteiligt sind: ein von der C-81-cDNA codiertes Protein, sowie das Reparaturprotein O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase. Die durch MGMT-Induktion bewirkte Verringerung der Mutationsfrequenz in den induzierten Zellen deutet dabei auf die Existenz einer adaptiven Antwort auch in Säugerzellen hin.

Abstract

Characterization of Cellular Functions Protecting Against the Genotoxic Effects of Alkylating Agents in Mammalian Cells

Alkylating agents are widespread environmental mutagens/carcinogens and are often used in tumour chemotherapy. In the work presented here cellular functions which protect eukaryotic cells against the genotoxic effects of alkylation damage were characterized.

After transfection of human genomic DNA into an alkylation-hypersensitive hamster mutant cell line (27-1) and selection with methyl-methanesulfonate (MMS) cosmids and finally a human cDNA (C-81) were cloned which conferred resistance both towards simple alkylating agents such as MMS or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and 6-thioguanine. Very likely the cloned cDNA codes for a membrane glycoprotein. Mutagen treatment does not induce elevated C-81 mRNA expression in human cells. C-81 mRNA expression was enhanced in confluent human cells, as compared to cells growing logarithmically. This observation and the fact that cosmid transfectants showed a slower growth rate than control transfectants suggests that the C-81 protein mediates alkylation resistance by influencing cell cycle progression. A decreased proliferation rate could enable cells to repair alkylation damage before its fixation.

The O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase (MGMT) is another factor conferring resistance to alkylating agents. After stable transfection and expression of the human MGMT cDNA in MGMT deficient hamster cells (CHO-9) it was shown that the O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase has a great importance as cellular defence mechanism against the toxic, mutagenic, clastogenic and sister chromatid exchange inducing effects of simple alkylating agents. The extent of protection was dependent on the quantity of MGMT molecules per cell, the dose and the kind of the applied mutagen. By use of a dexamethasone inducible MGMT-expression vector it was shown that O⁶-methylguanine containing DNA needs replication to give rise to toxic effects. Thus the toxicity of this lesion is probably based on the creation of secondary lesions.

Furthermore it was shown here for the first time that a mammalian DNA repair gene (MGMT) can be transcriptionally activated upon DNA damaging treatments. The inducibility of the MGMT-mRNA expression was detected only in rat hepatoma cells after various treatments having in common to lead to DNA breakage. The MGMT-induction depends on protein synthesis and can be prevented by phosphatase inhibition. After mutagen treatment the MGMT induction gave rise to reduction of MNNG-induced mutation frequency in hepatoma cells; thus MGMT induction is biologically relevant. Investigations concerning the molecular reasons for the MGMT deficiency of cells (Mex⁻-phenotype) revealed that a total loss, point mutations or changes in methylation pattern of the MGMT gene might lead to the Mex⁻-phenotype.

In summary, the results show that at least 2 functions are participated in conferring cellular alkylation resistance: a protein coded by the C-81 cDNA and the repair protein O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. The reduction of the mutation frequency in MGMT induced cells indicates the existence of an adaptive response in mammalian cells.

INHALT

ZUSAMMENFASSUNG

ABKÜRZUNGEN

EINLEITUNG

1

MATERIALIEN

9

METHODEN

12

1. Zellkultur	12
2. Behandlung mit alkylierenden Agenzien	12
3. Überlebensversuche	13
4. Herstellung stabiler Transfektanten	13
4.1. Calciumphosphat-Transfektion	14
5. Elektroporation	14
6. Transformation	15
6.1. Hanahan-Protokoll (1986)	16
6.2. Protokoll nach Chung et al. (1989)	16
7. Klonierungstechniken	16
7.1. Restriktionsverdau und Isolation von DNA-Fragmenten	16
7.2. Dephosphorylierung von DNA	17
7.3. Ligation	17
7.4. Fill-in Reaktion	17
8. Präparation von Plasmid-DNA	18
8.1. Mini-Präparation	18
8.2. Große Plasmidpräparation	18
9. RNA-Präparation	19
9.1. Präparation von Gesamt-RNA	19
9.2. Präparation von Poly(A) ⁺ -RNA	20
10. DNA-Isolation	20
11. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	21
12. Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	21
12.1. Denaturierung der RNA mittels Glyoxal und DMSO	21
12.2. Denaturierung der RNA mittels Formaldehyd/Formamid	21

13.	Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen	22
13.1.	Southern-Transfer	22
13.2.	Northern-Transfer	22
13.3.	Slot-Blot	22
14.	Radioaktive Markierung von DNA-Proben	23
14.1.	Nick - Translation	23
14.2.	Random priming	23
15.	Hybridisierung von Nukleinsäuren	24
16.	Screenen einer Cosmidbank	25
17.	³ H-Thymidin-Einbau zur Messung der zellulären Replikation	26
18.	DNA-Sequenzierung	26
19.	Run-on-Transkriptionsanalyse	28
20.	Reinigung von Oligonukleotiden	29
21.	Messung von DNA-Reparatur- und Ribosylierungsaktivitäten	30
21.1.	O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase-Aktivitätstest	30
21.2.	Bestimmung der Adenosyl-Phosphoribosyltransferase-Aktivität	30
22.	Proteinbestimmung nach Bradford	31
23.	Herstellung von Chromosomenpräparaten	31
23.1.	Aberrationspräparate	31
23.2.	SCE-Präparate	32
24.	Bestimmung der Mutationsfrequenz am HGPRT-Locus	33
25.	Mikroinjektion von Poly(A ⁺)-RNA	33
26.	Identifizierung geringer Mengen mRNA mittels PCR ("Polymerase chain reaction")	34
26.1.	cDNA-Synthese	33
26.2.	Durchführung der PCR	35

ERGEBNISSE

	36
1. Untersuchungen zur Alkylantien-Hypersensitivität von 27-1 Zellen	36
1.1. Hemmung der DNA-Replikation nach Mutagenbehandlung	36
1.2. Beeinflussung der zellulären Resistenz durch Ribosylierung	38
2. Arbeiten zur Klonierung eines die Hypersensitivität von 27-1 Zellen komplementierenden Gens	41
2.1. Isolierung menschliche DNA enthaltender Cosmide	42
2.2. Resistenzvermittlung durch die isolierten Cosmide	43
2.3. Morphologie und Kreuzresistenz der isolierten Cosmidtransfektanten	46
2.4. Kreuzhybridisierung von aus verschiedenen Cosmidbanken isolierten Cosmiden	48
2.5. Vorhandensein und Expression von C-81 Sequenzen in menschlichen Zelllinien, Hamsterzellen sowie Transfektanten	51
2.6. Resistenzvermittlung durch C-81	55
2.7. Sequenzanalyse von C-81	57
2.8. Expression von C-81 nach Mutagenbehandlung	61
2.9. Abhängigkeit der C-81 Expression vom Wachstumszustand diploider menschlicher Fibroblasten	62
3. Untersuchung der Bedeutung der O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (MGMT) zur Vermeidung genotoxischer Effekte von Alkylantien	63
3.1. Transiente Komplementation des Mex ⁻ -Phänotyps	64
3.2. Resistenzverhalten von MGMT stabil exprimierenden CHO-9-Transfektanten	65
3.3. Einfluß der MGMT-Expression auf die Mutationsfrequenz	70
3.4. Bedeutung der MGMT bei der Entstehung von Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatidenaustauschen (SCE's)	72
3.5. Fixierung toxischer DNA-Schäden in Abhängigkeit von der Zeit	73
4. Regulation der MGMT-Expression in Säugerzellen	75
4.1. Zellzyklusabhängigkeit der MGMT-Expression	75
4.2. Induzierbarkeit der MGMT-Expression	76
4.3. Einfluß der MGMT-Induktion auf die Mutationsfrequenz und das Überleben von H4-Zellen	84
4.4. Untersuchungen zum Mechanismus der MGMT-Induktion	85

5.	Molekulare Analyse des Mex-Phänotyps	94
5.1.	Unterscheidung von Mex ⁺ /Mex ⁻ -Zellen auf genomischer und Expressionsebene	94
5.2.	Untersuchungen zur Bedeutung von DNA-Methylierungszuständen für den Mex-Phänotyp	98

DISKUSSION 102

1.	Untersuchungen zur MMS-Hypersensitivität von 27-1-Zellen	102
2.	Komplementation der Alkylantien-Hypersensitivität von 27-1 Zellen durch genomische und cDNA-Transfektion	104
3.	Die Bedeutung der O ⁶ -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase als anti-genotoxische DNA-Reparaturfunktion nach Alkylierung	108
4.	Regulation der MGMT-Expression : Ursachen für den Mex ⁻ -Phänotyp	112
5.	Induzierbarkeit des MGMT-Gens	116

LITERATUR 121

Lebenslauf

ABKÜRZUNGEN

Abb:	Abbildung
3-AB:	3-Aminobenzamid
Act D:	Actinomycin D
ada:	Bakterielle Methyltransferase
ADPRT:	ADP-Ribosyl-Transferase
Aniso:	Anisomycin
APS:	Ammoniumperoxydsulfat
ATP:	Adenosintriphosphat
5-Aza:	5-Azacytidin
bp:	Basenpaare
c-fos:	zelluläres Fos-Gen
c-myc:	zelluläres Myc-Gen
c-jun:	zelluläres Jun-Gen
cAMP:	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cd:	Cadmium
Ci:	Curie (Aktivität einer radioaktiven Substanz (1Ci=3,7x10 ¹⁰ Zerfälle/sec)
CIP:	Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)
cpm:	Counts per minute
CTP:	Cytidintriphosphat
d:	Tage
dCTP:	Desoxy-Cytidintriphosphat
DEPC:	Diethylpyrocarbonat
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT:	Dithiotreitol
E ₂₆₀ :	Extinktion bei 260 nm
EDTA:	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EMS:	Ethyl-Methansulfonat
f:	fanto
FCS:	Fötales Kälberserum
g:	Erdbeschleunigung
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G418:	Geneticin-Sulfat
h:	Stunden
H ₂ O ₂ :	Wasserstoffperoxid
HEPES:	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
gpt:	Guanin-Phosphoribosyltransferase
HeCNU:	Hydroxyethyl-chlor-nitrosoharnstoff
HGPRT:	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
k:	Kilo-
kb:	Kilo (1000)-Basenpaare
kDa:	Kilodalton
Lsg:	Lösung
M:	Molar
m:	Milli-

μ :	Mikro-
Mex ⁺ :	MGMT-positiv
Mex ⁻ :	MGMT-negativ
MG:	Molekulargewicht
MGMT:	Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (Säuger)
min:	Minute
MNNG:	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MMS:	Methyl-Methansulfonat
MNU:	N-Methyl-N'-nitrosoharnstoff
N:	Chemisches Symbol für Stickstoff
n:	Nano
NFκB:	Nuklearer Faktor kappa B
NP-40:	Nonidet P-40
O:	Chemisches Symbol für Sauerstoff
OH-urea:	Hydroxy-Harnstoff
OD:	Optische Dichte
p:	pico
PBS:	Phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PCR:	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PMSF:	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAD:	Energiedosis von Röntgenstrahlen (1RAD=1/100 J/kg)
RE:	Restriktionsendonuklease
RFLP:	Restriktionsfragmentlängen- Polymorphismus
RNA:	Ribonukleinsäure
RNase:	Ribonuklease
Rö:	Röntgenstrahlung
rRNA:	Ribosomale RNA
RSV:	Rous Sarkoma Virus
RT:	Raumtemperatur
SCE:	Sister- chromatid - exchange (Schwesterchromatidenaustausch)
sec:	Sekunde
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SV40:	Simian Virus 40
TCA:	Trichloressigsäure
TEMED:	N.N.N',N'-tetramethyl-ethylendiamin
6-TG:	6-Thioguanin
U:	Units (=spezifische Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
U/min:	Umdrehungen pro Minute (= rpm (rounds per minute))
UV:	Ultraviolette Strahlung
Zn:	Zink

EINLEITUNG

Das Überleben einer Art im Laufe der Evolution hängt wesentlich von der identischen Weitergabe der genetischen Information an die Tochtergeneration ab. Um mutagene und toxische Auswirkungen endogen- sowie umweltbedingter Schädigungen der Erbsubstanz zu vermeiden, besitzen Organismen eine Reihe von verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen (z.B. Exzisionsreparatur, Rekombinationsreparatur).

Besonders gut untersucht sind DNA-Reparaturvorgänge an *Escherichia coli* (Brent u. Ptashne, 1980; Bridges u. Lehmann, 1982; Little und Mount, 1982; Friedberg, 1985; Yarosh, 1985; Lindahl u. Sedgewick, 1988). Nach Einwirkung von Hitze, Strahlung oder chemischen Mutagenen reagieren *E. coli* Zellen mit der Induktion von Funktionen, die Schutzcharakter haben. Das nach Behandlung mit replikationsblockenden Agenzien (z.B. UV-Bestrahlung) in *E. coli* induzierte Abwehrsystem wird als "SOS-Antwort" (Radman, 1980) bezeichnet; das nach Einwirkung von alkylierenden Agenzien wie N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) induzierte Abwehrsystem trägt die Bezeichnung "adaptive Antwort" ("adaptive response"; Teo et al., 1986; Lindahl et al., 1988). Während im Zentrum der SOS-Antwort das RecA Protein steht, welches durch proteolytische Spaltung des LexA Repressors die Induktion der SOS-Antwort ermöglicht, spielt bei der "adaptive response" das sogenannte Ada-Protein (Ada = "alkylation damage") die zentrale Rolle. Dieses 38 kDa- Protein überträgt irreversibel Alkyl-Gruppen von O-Atomen der Phosphodiesterbindung, der O⁶-Position des Guanins und der O⁴-Position des Thymins auf eigene Cysteinreste, wodurch der ursprüngliche Zustand der DNA wieder hergestellt wird (Demple et al., 1985; Nakabeppu et al., 1985; Lindahl et al., 1988; Tano et al., 1989). Das funktionell inaktivierte Ada-Protein wirkt als Transkriptionsaktivator für die eigene Expression sowie anderer an der Beseitigung von DNA- Alkylierungsschäden beteiligten Gene, wie z.B. des für eine Glycosylase codierenden *alkA*-Gens (Evensen u. Seeberg, 1982; Karran et al., 1982b; Sedgewick, 1983; Teo et

al., 1984; Nakabeppu u. Sekiguchi, 1986; Sekiguchi u. Nakabeppu, 1987; Lindahl u. Sedgewick, 1988; Samson et al., 1988). Neben dem induzierbaren Ada-Protein existiert in *E. coli* außerdem noch ein konstitutiv exprimiertes Alkyltransferase-Protein, das vom *ogt*-Gen kodiert wird (Potter et al., 1987; Rebeck et al., 1988; Potter et al., 1989). Es hat ein Molekulargewicht von 19 kDa und entspricht funktionell dem N-terminalen Teil des Ada-Proteins. Im Gegensatz zum Ada-Protein repariert es allerdings keine Phosphotriester (Rebeck et al., 1988).

Auch bei Säugerzellen sind eine Reihe von zellulären Reaktionen nach DNA schädigenden Behandlungen bekannt (Herrlich et al., 1986); diese Reaktionen reichen von Genamplifikation (Lavi, 1981; Lücke-Huhle et al., 1986; Yalkinoglu et al., 1988) bis zur transkriptionellen Aktivierung von Genen zu denen u.a. *c-fos*, *c-myc*, *c-jun*, Metallothionein, Collagenase, Plasminogenaktivator und Polymerase β gehören (Miskin u. Ben-Ishai, 1981; Angel et al., 1986; Brdar u. Matulic, 1988; Fornace et al., 1988; Lambert u. Garrels, 1988; Hollander u. Fornace, 1989; Kaina et al., 1989; Stein et al., 1989a; Krämer et al., 1990; Ronai et al., 1990; Kedar et al., 1991). Weiterhin sind die Sekretion von Proteinen (Schorpp et al., 1984; Stein et al., 1989b) sowie die Aktivierung von Proteinaktivitäten wie NF κ B oder ADPRT beschrieben worden (Shall et al., 1982; Althaus et al., 1985; Bäuerle u. Baltimore, 1988). Während Metallothionein eine protektive Funktion gegenüber Schwermetallen, Radikalen und Alkylantien ausübt (Gick et al., 1981; Thornally u. Vasaki, 1985; Lohrer u. Robson, 1989; Kaina et al., 1990a), scheint *c-fos* eher an einem gegenteiligen Effekt, der Induktion von Aberrationen beteiligt zu sein (Van den Berg et al., 1991). Es ist bekannt, daß die nach DNA-Schädigung oder Mitogenbehandlung innerhalb weniger Minuten induzierbaren Gene *c-fos* und *c-jun* den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden (Angel et al., 1986, 1987, 1988; Chiu et al., 1988;). Ob dieser allerdings an der transkriptionellen Aktivierung von DNA-Reparaturgenen beteiligt ist, ist unbekannt.

Das Wissen über DNA-Reparaturgene und deren Regulation in Säugetierzellen ist gering, verglichen mit *E. coli*. Adaptive Antworten von Säugetierzellen sind zwar häufig beschrieben worden (Samson u. Schwartz, 1980; Durant et al., 1981; Kaina, 1983; Goth-Goldstein, 1987; Goth -Goldstein u. Hughes, 1987; Aquilina et al., 1988), eindeutige Erklärungen für diese Beobachtungen fehlen bisher jedoch. Lediglich für die unten noch genauer beschriebene O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase, sowie die 3-Methylpurin-DNA Glycosylase ist eine 2-3 fache Erhöhung der Aktivität nach DNA-Schädigung beobachtet worden (Lefebvre u. Laval, 1986; 1989; Frosina u. Laval, 1987; Laval, 1990; 1991). Reparaturvorgänge finden bevorzugt in aktiv transkribierten Genen statt (Mellon et al., 1986; Mellon u. Hanawalt, 1989).

Aus Hefezellen sind neben mehreren "RAD"-Genen (Friedberg, 1985) das die O⁶-Alkylguanin -DNA Alkyltransferase codierende Gen (Xiao et al., 1991) sowie ein dem bakteriellen *alkA* homologes Gen (Chen et al., 1989; Berdal et al., 1990; Chen et al., 1990) kloniert worden. Aus Säugerzellen sind bisher die ERCC-Gene 1-3 (Van Duin et al., 1986; Weber et al., 1990; Weeda et al., 1990a), das XRCC1-Gen (Thompson et al., 1990), zwei menschliche Glycosylase-Gene (die N-Alkylpurin-DNA Glykosylase cDNA (O'Connor u. Laval, 1990; Chakravarti et al., 1991) und die Uracil-DNA Gycosylase cDNA (Olsen et al., 1989)) sowie die cDNA für die menschliche O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (Hayakawa et al., 1990; Tano et al., 1990; Rydberg et al., 1990) isoliert worden. Eine Übersicht über klonierte menschliche DNA-Reparaturgene findet sich bei Kaina et al. (1991a).

Die ERCC-Gene ("Excision repair cross-complementing rodent UV- complementation group genes") wurden alle aus sekundären Transfektanten nach Transfektion von menschlicher DNA (ERCC 1, 3) bzw. Mensch-Hamster Hybrid DNA (ERCC 2) in Hamsterzellen der jeweiligen Komplementationsgruppe erhalten.

Das ERCC 1-Gen komplementiert die UV-, Mitomycin C (MMC), Ethyl-Nitrosos-harnstoff (ENU), 4-Nitroquinolinoxid- und N-Acetoxy-Acetylaminofluoren-Hypersensitivität einer CHO-9-Mutante (43-3B-Zellen) und zeigt eine par-

tielle Homologie zu den *uvr-A* und *uvr-C*-Genen von *E. coli* sowie dem *rad10* Gen der Hefe. Die genaue Wirkung des Genprodukts ist noch nicht bekannt. Das ERCC2-Gen codiert für ein Protein, das aus 760 Aminosäuren besteht und die UV-Hypersensitivität von CHO-UV5-Zellen komplementiert. Das Protein weist 73 % Homologie zum *rad 3* Gen der Hefe auf (Weber et al., 1990). Da das Hefegen für eine Helicase codiert, wird das ERCC2-Genprodukt ebenfalls als ATP-abhängige Helicase angesehen. Die 3 kb große mRNA des ERCC 3-Gens codiert für ein aus 782 Aminosäuren bestehendes Protein, welches die UV-, nicht aber die MMS-Hypersensitivität von 27-1 Zellen komplementiert. Da das Protein Nukleotid-, Chromatin- sowie DNA-Bindungsdomänen besitzt, stellt es wahrscheinlich eine DNA-Reparatur-Helicase dar. Das ERCC3-Gen komplementiert außerdem den auf einer Raster-schubmutation beruhenden Defekt von XP-B-Zellen (Weeda et al., 1990b).

Bei der Klonierung der menschlichen O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (MGMT) wurden erstmals erfolgreich spezifische *E. coli* Reparaturmutanten mit einer in einen prokaryontischen Expressionsvektor klonierten menschlichen cDNA-Bank komplementiert (Tano et al., 1990). Auf die gleiche Weise wurde auch die cDNA für die Alkylpurin-DNA-Glycosylase isoliert (O'Connor u. Laval, 1990; Chakravarti et al., 1991). Die 850 bp große menschliche MGMT-cDNA zeigt keine nennenswerte Sequenzhomologie mit der bakteriellen *ada*-cDNA; fehlende Kreuzhybridisierung dürfte auch ein Grund für die erst Jahre nach der Klonierung des *ada*-Gens (Sedgewick, 1983) erfolgreiche MGMT-Klonierung gewesen sein. Beim Vergleich der Aminosäure-Sequenz der menschlichen MGMT mit der kürzlich klonierten Ratten-MGMT (Potter et al., 1991) ergibt sich eine nur 81 % ige Homologie. Auch unter Säugern scheint das Protein demnach insgesamt nicht sehr konserviert zu sein. Lediglich im Bereich des als Methyl-Akzeptor fungierenden Cysteins sind das menschliche, Ratten-, Hefe- und bakterielle Protein identisch (Pro-Cys-His-Arg). Das aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Molekulargewicht der menschlichen Alkyltransferase beträgt 22 kDa (Tano et al., 1990); für über klassische Reinigungsverfahren isoliertes MGMT-Protein wurde ein Molekulargewicht von 25 kDa bestimmt (Brent et al., 1990; Von

Wronski et al., 1991). Die O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase arbeitet cofaktorunabhängig, wird durch Schwermetalle in ihrer Funktion gehemmt und greift bevorzugt an doppelsträngiger DNA an (Harris et al., 1983; Pegg et al., 1983; Bhattacharyya et al., 1988; Brent et al., 1990). Im Unterschied zum bakteriellen Ada-Protein repariert das menschliche Protein effizient nur O⁶-Alkylguanin-Läsionen. Außerdem besitzt es auch hohe Effektivität bei der Reparatur von längerkettigen Addukten an der O⁶-Position des Guanins, wie z.B. Propylierungen und Chlorethylierungen (Yarosh et al., 1985; Morimoto et al., 1985; Pegg, 1990).

Die von der Alkyltransferase reparierte O⁶-Alkylguanin-Läsion stellt eine prämutagene Läsion dar, die, nicht repariert, zu GC > AT Transitionen führt (Newbold et al., 1980; Saffhill et al., 1985; Yarosh, 1985; Pegg, 1990). Da solche Mutationen möglicherweise auch an der Aktivierung des zellulären H-ras Protoonkogens beteiligt sind (Sukumar et al., 1983; Mitra et al., 1989) wird der Alkyltransferase neben der antimutagenen auch antitumorogene Wirkung zugesprochen. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, daß ein protektiver Einfluß der MGMT auf durch Alkylantien induzierte Transformation von Zellen gefunden wurde (Thomale et al., 1990). Da die Alkyltransferase als einziges bisher bekanntes Protein auch die Schäden reparieren kann, die von in der Tumorchemotherapie verwendeten chlorethylierenden Agenzien gesetzt werden, kommt diesem Protein auch praktische, medizinisch-klinische Bedeutung zu (Farmer, 1985; Malpas, 1986; Rudon, 1987; Pegg, 1990). Chlornitrosoharnstoffe beispielsweise werden heute insbesondere zur Behandlung von Gehirntumoren eingesetzt. Deren therapeutische Effizienz beruht darauf, daß das Gehirn im Vergleich zu anderen Organen die geringsten MGMT- Aktivitäten aufweist (Myrnes et al., 1983; Grafstrom et al., 1983; Gerson et al., 1986; Pegg, 1990). Die Nebenwirkungen einer solchen Chemotherapie auf andere Organe bleiben somit relativ gering.

Neben ihrer Bedeutung für die Tumorchemotherapie stellen alkylierend wirkende N-Nitroso-Verbindungen (Nitrosamine) auch eine wichtige Gruppe von Umweltkarzinogenen dar (Bartsch u. Montesano, 1988; Tricker et al., 1989). Diese Substanzen können vom Menschen direkt mit der Nahrung aufgenommen oder indirekt über Verdauungsprozesse gebildet werden. Sie führen, meist erst nach metabolischer Aktivierung durch Oxygenasen über den Mechanismus der nukleophilen Substitution zu N- oder O-Alkylierungen in der DNA (Margison u. Connor, 1979; Dipple et al., 1987; Archer, 1989; Guttenplan, 1990). Die häufigsten N-Alkylierungsprodukte nach Behandlung von Zellen mit Methyl-Nitrosoharnstoff sind N⁷-Methylguanin (65 % der Gesamtalkylierungen) und N³-Methyladenin (9 % der Gesamtalkylierungen), die häufigsten O-Alkylierungen finden an der O⁶-Position des Guanins (8 %) und O⁴-Position des Thymins (0,5 %) statt (Beranek, 1990). Aufgrund der bereits erwähnten mutagenen Wirkung der O⁶-Alkylguanin-Läsion stellt die O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase damit auch eine wichtige Schutzfunktion für die Gesundheit des Menschen dar.

Es existieren eine Reihe von Zelllinien, die defekt bezüglich der Reparatur von O⁶-Alkylguanin sind; sie werden als Mex⁻ (bzw. Mer⁻) bezeichnet. Im Vergleich zu Mex⁺-Zellen weisen sie eine erhöhte Sensitivität gegenüber N-Methyl-N¹-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) sowie Chlornitrosoharnstoffen auf (Day III et al., 1980; Yarosh et al., 1983; Fujio et al., 1989). Obwohl O⁶-Alkylguanin im Gegensatz zu N³-Methyladenin keine replikationsblockende Wirkung hat (Larson et al., 1985), deutet das gegenüber MNNG erhöhte Resistenzverhalten von mit der bakteriellen ada-cDNA transfizierten Mex⁻-Zellen auf eine mögliche toxische Wirkung auch der O⁶-Methylguanin-Läsion hin (Brennan u. Margison, 1986; Ishizaki et al., 1986; Kataoka et al., 1986; Samson et al., 1986; White et al., 1986). Aufgrund der 3-fachen Reparaturwirkung (O⁶-, O⁴-, Phosphotriester) des bakteriellen Ada-Proteins (MGMT repariert effizient nur O⁶-Läsionen (Yarosh et al., 1985)) stand der endgültige Beweis für diese Hypothese jedoch noch aus. Im Rahmen von Untersuchungen zur molekularen Erklärung des Mex-Phänotyps wurden nach Transfektions- sowie Zellfusionsversuchen aus Mex⁻-Zellen

MNNG resistente, MGMT defiziente Zellen erhalten (Yarosh, 1985; Kaina et al., 1987). Diese Ergebnisse zeigten, daß MNNG- Resistenz nicht, wie ursprünglich angenommen, unbedingt mit MGMT- Profizienz korreliert sein muß. Es zeigte sich außerdem, daß eine spontane Umwandlung von Mex⁻-Zellen zu Mex⁺-Zellen möglich ist (Arita et al., 1988, 1990). Ebenso können durch Transfektion von DNA aus Mex⁻-Zellen in Mex⁻-Zellen MGMT profiziente Zellen entstehen (Dolan et al., 1989). Weiterhin konnten nach SV40 Transformation von Mex⁺- Zellen mit hoher Frequenz Mex⁻ - Zellen erhalten werden (Day III et al., 1980; Green et al., 1990). Neben einer inter-individuellen Variation der MGMT-Aktivität wurden auch starke gewebe-spezifische Unterschiede in der MGMT-Aktivität festgestellt, wobei die menschliche Leber mit ca. 200 000 Molekülen/Zelle die höchsten, das menschliche Gehirn mit nur ca. 2000 Molekülen/Zelle die geringsten MGMT-Mengen aufweist (Krokan et al., 1983; Myrnes et al., 1983; Grafstrom et al., 1984). Insgesamt lassen diese Daten eine sehr komplexe Regulation des MGMT-Gens vermuten. Die Klonierung der cDNA für die menschliche O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (Tano et al., 1990) ermöglicht nun molekulare Untersuchungen zur Regulation der Expression, zur Charakterisierung des Mex/Mer-Phänotyps, sowie der genauen protektiven biologischen Funktion des Gens.

Ein großer Teil meiner Arbeit befaßte sich mit diesen Problemstellungen. Ziel der Untersuchungen war die Charakterisierung der Funktion des MGMT-Proteins in transgenen Zelllinien bezüglich seines Einflusses auf die toxische und mutagene Wirkung von alkylierenden Agenzien. Ein weiteres Ziel der Experimente bestand in der molekularen Charakterisierung des Mex-Phänotyps sowie in der Beantwortung der Frage nach der Expression, potentiellen Induzierbarkeit und Regulation des Gens in Säugerzellen.

Im Blickpunkt eines zweiten Teils der Arbeit standen Untersuchungen zur Alkylantien- Hypersensitivität der bereits oben erwähnten 27-1-Zellen (Zdzienicka u. Simons, 1986; Kaina, 1987). In diesem Rahmen wurden, aufbauend auf bereits durchgeführten Untersuchungen zur DNA-Reparatur in

27-1-Zellen (Kaina et al., 1990b), weitere Hypothesen zur kausalen Erklärung der Hypersensitivität dieser Zellen überprüft. Hauptsächlich jedoch wurde in Anlehnung an die oben erwähnte Strategie bei der Klonierung von Reparaturgenen (ERCC-Gene) versucht, den 27-1 Reparaturdefekt durch Transfektion mit genomischer menschlicher DNA zu komplementieren. Zur Verfügung stand mir hierzu bereits eine aus einer sekundären 27-1-Transfektante (T60) von Dr. Bernd Kaina (Karlsruhe) hergestellte Cosmidbank. Ziel war es, auf diese Weise ein weiteres, an der Vermittlung von Alkylantienresistenz beteiligtes Gen zu isolieren.

MATERIALIEN

Chemikalien und Enzyme

Bakterienplatten:	Greiner, Nürtingen
BrdU:	Serva, Heidelberg
FCS, NBS:	Gibco, Eggenstein
G418:	Gibco, Eggenstein
Gentamycin:	Gibco, Eggenstein
HeCNU:	Von Prof. Eisenbrand (Kaiserslautern) zur Verfügung gestellt
Hybond-Nylonfilter:	Amersham-Buchler, Braunschweig
Medien für Bakterienkultur:	Difco Laboratories, Detroit
Medien für Zellkultur:	Gibco, Eggenstein
MMS:	Sigma
MNU:	Sigma
³ H-MNU:	Amersham-Buchler, Braunschweig
Nick-Translationskitt:	Amersham-Buchler, Braunschweig
Radionukleotide (α - ³² P-ATP)	Amersham-Buchler, Braunschweig
Random prime ¹ T Kitt:	Stratagene
Restriktions-Endonukleasen:	Bio Labs, Schwalbach b. Frankfurt; Boehringer, Mannheim; Pharmacia, Freiburg; Promega Biotec, Heidelberg
Taq-Polymerase:	Amersham
6-Thioguanin:	Sigma
T7-ExoMet TM Sequenzierkitt:	Stratagene
Whatman 3MM-Papier:	Bender & Hobein, Karlsruhe
Zellkulturmaterial:	Greiner, Nürtingen

Alle weiteren verwendeten Chemikalien und Enzyme stammen von Boehringer (Mannheim), Bio Rad Laboratories (München), BRL Inc. (Neu-Isenburg), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Heidelberg), Promega Biotec (Heidelberg), Stratagene (Heidelberg) oder Sigma (München).

Plasmide

pSVT7: Erhalten von U. Günthert (Kernforschungszentrum Karlsruhe, IGT)

pSVL-ADPRT: Von A. Schweiger (Innsbruck) zur Verfügung gestellt

pKT100: Von S. Mitra (Oak Ridge, USA) zur Verfügung gestellt

c2xB; pRGAPDH-13; pSV2neo: Erhalten von B. Kaina (Kernforschungszentrum Karlsruhe, IGT)

Wichtige Puffer und Lösungen

20xSSC: 175,3 g NaCl / 88,2 g NaCitrat (pro Liter, pH 7,0)

TE: 10 mM Tris (pH 7,4) / 1 mM EDTA

10xTBE: 54 g Tris Base / 27,5 g Borsäure / 20 ml 0,5 M EDTA (pro Liter)

10xCIP-Puffer: 0,5 M Tris (pH 9,0) / 0,1 M MgCl₂ / 1 mM ZnCl₂

10xLigase-Puffer: 0,5 M Tris (pH 7,4) / 0,1 M MgCl₂ / 0,1 M DTT /
10 mM Spermidin / 10 mM ATP / 1 mg/ml BSA

10xNick-Translations-Puffer: 0,5 M Tris (pH 7,2) / 0,1 M MgSO₄ / 1 mM DTT /
0,5 mg/ml BSA

10xKinase-Puffer: 0,5 M Tris (pH 7,4) / 0,1 M MgCl₂ / 50 mM DTT /
10 mM Spermidin

Calciumphosphat-Transfektionspuffer A: 1,5 mM Na₂PO₂ / 50 mM Hepes /
280 mM NaCl (pH 7,1)

Calciumphosphat-Transfektionspuffer B: 10 mM Hepes / 250 mM CaCl₂ (pH 7,1)

Hanahan-Puffer zur Herstellung kompetenter E. Coli:

STB: 100 mM KCl / 45 mM MnCl₂·4H₂O / 10 mM CaCl₂·2H₂O /
3 mM HAcCoCl / 10 mM KMes / 15 % Glycerin (pH 6,2)

DnD: 90 % DMSO / 1 M DTT / 10 mM KAc (pH 7,4)

Puffer zur Poly(A)⁺ - RNA-Präparation:

STE: 20 mM Tris / 10 mM EDTA / 100 mM NaCl (pH 7,4)

HSB: 10 mM Tris / 5 mM EDTA / 300 mM NaCl / 0,1 % SDS (pH 7,4)

Denaturierungspuffer zur Gesamt-RNA-Präparation:

4 M Guanidiniumthiocyanat / 25 mM NaCitrat / 0,5 % Sarkosyl /
0,1 M 2-Mercaptoethanol

Denaturierungspuffer zur DNA-Isolation:

10 mM Tris / 10 mM EDTA / 150 mM NaCl / 0,5 % SDS / 300 µg/ml Proteinase K

Lösung zur Plasmidpreparation: 25 mM Tris / 10 mM EDTA / 50 mM Glucose /
4 mg/ml Lysozym (pH 8,0)

Vorhybridisierungslösung: 0,5 M NaP-Puffer / 1 mM EDTA / 7 % SDS (pH 7,2)

Hybridisierungslösung: Vorhybridisierungslösung + 1% BSA

Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton / 5 g Hefe-Extrakt / 10 g NaCl (pH 7,4)
Angaben pro Liter

XT-Medium: 50 mM Tris / 20 mM MgSO₄ / 25 g Bacto-Trypton / 7,5 g Hefe-
Extrakt / 0,1 g Diaminopimellinsäure / 0,04 g Thymidin (pH 7,5)
Angaben pro Liter

SOB-Medium: 20 g Bacto-Trypton / 5 g Hefe-Extrakt / 10 ml 1 M NaCl /
2,5 ml 1 M KCl / 10 ml 2 M MgCl₂/MgSO₄ (pH 7,0)

SOC-Medium: SOB-Medium + 20 mM Glucose

Zur Selektion auf Ampicillin-Resistenz wurde dem Medium 50 µg/ml
Ampicillin zugesetzt.

Zelllinien und Bakterienstämme

Folgende Zelllinien wurden in der Arbeit verwendet:

CHO-9:	Hamsteroarialzellen
27-1:	CHO-9 Mutante (UV-, MNNG-, MMS-sensitiv)
F9:	Teratokarzinomzellen der Maus
GM637:	SV40 transformierte menschliche Zellen
H4IIE, FTO-2B:	Rattenhepatomzellen
HepG2:	Menschliche Hepatomzellen
HeLa MR:	Menschliche Gebärmutterkarzinomzellen; Mex ⁻
HeLa S3:	Menschliche Gebärmutterkarzinomzellen; Mex ⁺
NIH3T3:	Mausfibroblasten
V79:	Hamsterfibroblasten
VH44, SL88, GM10:	Diploide, nicht etablierte menschliche Fibroblasten
208F:	Rattenfibroblasten

Die verschiedenen Zelllinien wurden mir von Dr. Bernd Kaina (Kernfor-
schungszentrum Karlsruhe, IGT) zur Verfügung gestellt.

Bakterienstämme

E. coli DH5 : F⁻; endA1; hsdR17 (rk⁻; mk⁺); supE44; thi-1; -; recA1; gyrA96;
relA1; β(argF-lac_zya); U169; 80 dLacZBM15

E. coli XL1: endA1; hsdR17 (rk⁻; mk⁺); supE44; thi-1; -; recA1; gyrA96; relA1;
(lac⁻); [F', proAB, lacIqZBM15, Tn10, (tetr)]

METHODEN

1. ZELLKULTUR

Die Zelllinien HeLa MR, HeLa S3, CHO-9, 27-1, V79 sowie FTO-2B wurden in F10/Dulbecco (+ 5% FCS) kultiviert, GM10, VH44 und GM637 Zellen in gleichem Medium jedoch mit 10% FCS. NIH3T3, F9, SL88 und HepG2 Zellen erhielten Dulbecco Medium (+ 10% FCS), H4 IIE Zellen (in der Arbeit vereinfacht als H4 bezeichnet) Alpha Medium (+ 5% FCS). Zum Passagieren bzw. zum Versuchsansatz wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit einigen Tropfen PBS/0,25% Trypsin bei 37 °C (ca. 10 min) vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und die enzymatische Aktivität des Trypsins durch Zugabe eines Überschusses an Medium (3-5 ml) gestoppt. Anschließend wurden die Zellen zur Weiterkultivierung 1:2 - 1:8 (abhängig von der Zelllinie) bzw. für einen Versuchsansatz nach vorausgegangener Zellzählung mittels Neubauer-Kammer in neue Kulturgefäße eingesät. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und einem CO₂-Anteil der Luft von 6 %.

2. BEHANDLUNG MIT ALKYLIERENDEN AGENZIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Alkylantien wurden als Stocklösungen in sterilem PBS oder destilliertem Wasser hergestellt. MNNG, MNU und ENU wurden dabei zuerst in einem geringem Volumen DMSO gelöst. Anschließend wurden die Stocklösungen in kleine Portionen verteilt und bei -20 bis -80 °C aufbewahrt. Zur Behandlung der Zellen wurden diese Stocks bei 37 °C schnell aufgetaut, das Mutagen dem Medium in entsprechender Konzentration zugesetzt und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Aufgrund der Instabilität dieser Verbindungen wurde vor Mutagenzugabe auf einen korrekten, neutralen pH-Wert des Mediums geachtet (Medium enthält einen Farbindikator der im basischen Bereich nach rot umschlägt). Andere, nicht alkylierend wirkende Substanzen wurden in destilliertem Wasser gelöst (Ausnahme: 6-TG: 0,1 M NaOH; O⁶-Methyl (Benzyl)-Guanin: 0,1 N HCL).

3. ÜBERLEBENSVERSUCHE

Hierbei wurden 300-500 Zellen pro 5 cm Kulturschale eingesät und die Zellen 6-12 h später für 1 h bei 37 °C mit verschiedenen Konzentrationen des entsprechenden Mutagens behandelt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium erneuert. Bei Bestrahlung wurde das Medium zuerst entfernt. Nach 7-10 Tagen (in Abhängigkeit von der Teilungsrate der jeweiligen Zelllinie) wurden die Zellen dann fixiert (nach Absaugen des Mediums und Waschen des Zellrasens mit PBS für 10 min mit Methanol) und die Koloniezahl nach Färbung der Zellen (10 min, 0,25 % Kristallviolett, 1 % Giemsa in Wasser) bestimmt. Zur Bestimmung der Überlebensrate wurde die Zahl der die Mutagenbehandlung überlebenden Kolonien in % zur unbehandelten Kontrolle (Plattierungseffizienz (PE)) berechnet. Zur Endauswertung wurden im allgemeinen die Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 Meßpunkten pro Mutagenkonzentration verwendet.

4. HERSTELLUNG STABILER TRANSFEKTANTEN

Zur Herstellung stabiler transgener Zelllinien wurden Transfektionen im allgemeinen als Cotransfektion mit dem Neomycin Resistenzgen (Plasmid pSV2-neo) als Marker durchgeführt. Die Selektion erfolgte mit G418 (1,5 mg/ml für Hamsterzellen). G418 stellt ein Aminoglycosid-Antibiotikum dar, welches die Funktion der 80 s Ribosomen beeinträchtigt und durch eine bakterielle Phosphotransferase (Produkt des neo-Gens) inaktiviert werden kann. Teilweise wurden auch Vektoren mit bereits eingebautem neo-Gen verwendet (Cosmidvektor c2xB, pMAMneo-Vektor). Eine Cotransfektion mit pSV2neo war hier nicht mehr nötig; die Selektion erfolgte wie oben beschrieben ebenfalls mit G418. Transfektanten wurden routinemäßig in Medium mit G418 kultiviert. Ausnahmen zur dieser Selektionsmethode stellen die primären und sekundären Transfektanten T38, T60 und T70 dar, die mit dem bakteriellen gpt-Gen als Selektionsmarker transfiziert worden waren und deshalb zur Selektion auf eine stabile Transfektantenpopulation rou-

tinemäßig in MAX-Medium kultiviert wurden (MAX-Medium: F10/Dulbecco-Medium (+ 5 % FCS) mit Mycophenolsäure (25 µg/ml), Hypoxanthin (15 µg/ml), Thymidin (5 µg/ml), Xanthin (10 µg/ml), Deoxycytidin (2,3 µg/ml) und Aminopterin (0,2 µg/ml)).

Zur Selektion mutagenresistenter Zellen wurden G418 resistente Zellen einer zweiten Selektion mit MMS, MNNG oder HeCNU unterzogen. Teilweise wurde zum Erhalt stabiler Transfektanten auch eine Doppelselektion mit G418 und Mutagen (Zugabe 24 h später) durchgeführt (bei der Isolierung von CHO-9-MGMT-Transfektanten).

4.1. Calciumphosphat-Transfektion

24 h nach Einsaat von 5×10^5 Zellen/ 10 cm Kulturschale erfolgte die Transfektion. Dazu wurden 5-10 µg Plasmid-DNA + 0,5-1 µg pSV2neo (eventuell noch 10 µg Heringssperma-DNA als Carrier) pro zu transfizierender Platte für 15 min in 0,5 ml Puffer A (280 mM NaCl, 50 mM Hepes, 1,5 mM Na_2HPO_2 , pH 7,1) äquilibriert und nach tropfenweiser Zugabe von 0,5 ml Puffer B (250 mM CaCl_2 , 10 mM Hepes, pH 7,1) zur Präzipitatbildung für 1 h bei RT inkubiert. Nach Mischen wurde dann 1 ml dieser DNA haltigen Lösung pro Kulturschale zugegeben und über Nacht im Brutschrank (37 °C; 6 % CO_2) inkubiert. Nach DMSO-Schock (5 ml eiskaltes 30 % DMSO (in Medium) zu 10 ml Medium, 15-30 min 37 °C im Brutschrank), anschließendem Entfernen des DMSO und waschen des Zellrasens mit PBS wurde den Zellen dann frisches Medium zugesetzt. 2 Tage später erfolgte dann zur Selektion der stabilen Transfektanten ein 1:4 Umsatz der transfizierten Zellen in G418 haltiges Medium. Bei gleichzeitiger Selektion auf Mutagenresistenz wurde das Mutagen 1 d nach G418 Behandlung zugesetzt.

5. ELEKTROPORATION

Diese Methode, die ebenfalls zur Transfektion von DNA in eukaryontische Zellen oder Bakterien geeignet ist, wurde hier zum Einbringen von Proteinen (Restriktionsenzymen) in Säugerzellen verwendet. Nach Trypsinieren und Waschen der Zellen mit Elektroporationspuffer (10 mM Na_2HPO_4 , 75 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 130 mM Sucrose, pH 7,2) wurden die Zellen in einer Dichte von $10^7/\text{ml}$ in Elektroporationspuffer resuspendiert. 200 μl dieser Zellsuspension wurden dann die gewünschte Menge an Restriktionsenzym zugesetzt und die Elektroporation durchgeführt (500 V, 6 Pulse von je 1 ms Dauer (1 s Pause zwischen 2 Pulsen, RT)). Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen dann in Medium ausgesäht und 24 h später zur RNA-Präparation geerntet.

6. TRANSFORMATION

Kompetente *E. coli* Bakterien (Stamm: DH5 α) wurden nach Protokollen von Hanahan (1986) bzw. Chung et al. (1989) hergestellt und mit 10-100 ng Plasmid-DNA transformiert. Zur Transformation wurden 100-200 μl kompetenten Zellen 10 μl Plasmid-DNA zugesetzt, 30 min auf Eis inkubiert und die Bakterien anschließend zur Aufnahme der Fremd-DNA für 90 sec hitzegechockt (42 °C). Nach nochmaliger Inkubation auf Eis für 2 min wurden die Zellen anschließend zur Expression des im Plasmid vorhandenen Ampicillin-Resistenzgens nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium (LB-Medium + 10 mM MgSO_4 + 20 mM Glucose) für 1 h im Schüttelinkubator (37 °C) inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Bakterien abzentrifugiert (5000 rpm, RT), in 200 μl LB-Medium resuspendiert, diese auf Ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) enthaltende LB-Platten ausplattiert und die Platten zum Wachstum der Ampicillin resistenten Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6.1. Hanahan-Protokoll (1986)

100 ml SOB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur von DH5 α angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 hochwachsen gelassen. Nach 10 minütigem Abkühlen der Zellen in Eiswasser wurden die Zellen abzentrifugiert (3000 x g, 10 min., 4 °C). Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Bakterien vorsichtig in 10 ml STB (auf Eis) suspendiert und anschließend das Volumen an STB auf 20 ml erhöht. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis wurden die kompetenten Zellen nochmals abzentrifugiert (3000 x g, 10 min, 4 °C), in 4 ml STB suspendiert und zur Transformation eingesetzt bzw. in flüssigem Stickstoff zur Lagerung eingefroren. Zur weiteren Erhöhung der Transformationseffizienz wurde den Zellen teilweise noch DnD-Lösung (2x7 μ l/200 μ l kompetenter Zellen) zugesetzt und nochmals je 10 min auf Eis inkubiert.

6.2. Protokoll nach Chung et al. (1989)

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 inkubiert. Anschließend wurde diese Zellsuspension mit dem doppelten Volumen eiskaltem 2xTSS (TSS: LB + 10 % PEG (MG 8000) + 5 % DMSO + 20 mM MgCl₂, pH 6,5) versetzt und vorsichtig gemixt. Die so behandelten Zellen wurden zur Transformation eingesetzt oder zur Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

7. KLONIERUNGSTECHNIKEN

7.1. Restriktionsverdau und Isolation von DNA-Fragmenten

Zur Restriktionsverdau wurden genomische bzw. Plasmid-DNA für 1 h bis über Nacht mit 2-10 U RE/ μ g DNA verdaut. Zur Präparation von Plasmid-Fragmenten wurde die verdaute DNA gelelektrophoretisch in Low-melting

Agarose aufgetrennt (50-100 V; 1xTBE-Laufpuffer). Nach Identifizierung und Ausschneiden der gewünschten Fragmente unter UV-Licht (254 nm) wurden die DNA enthaltenen Agarosestücke durch 10 minütiges Erhitzen auf 60 °C geschmolzen und anschließend sofort für 15 min in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gefrorene Agarose wurde dann in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei RT für 15 min auf einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bedingt wird die Agarose während des Auftauens pelletiert, die DNA findet sich im Überstand und wurde mittels Ethanol präzipitiert (0,1 M NaCl, 2 faches Volumen Ethanol). Die so gewonnenen DNA-Fragmente wurden nun zu Klonierungszwecken oder zur radioaktiven Markierung eingesetzt.

7.2. Dephosphorylierung von DNA

Hierzu wurde der Restriktionsverdau mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 5 µl CIP-Puffer (0,5 M Tris (pH 9,0), 10 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂) + 24 µl H₂O + 1 µl alkalische Phosphatase (2 Units)) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Hitzedenaturierung der Phosphatase (10 min, 68 °C) und anschließender Phenol/Chloroform Extraktion wurde das gewünschte Restriktionsfragment über ein präparatives Gel (0,8 %, "Low-melting") isoliert.

7.3. Ligation

Zur Ligation wurden 0,1 µg gereinigtes Insert mit 0,1 - 0,5 µg dephosphoryliertem Vektor, 2 µl 10 x Ligase Puffer (0,5 M Tris (pH 7,4), 0,1 M MgCl₂, 0,1 M DTT, 10 mM Spermidin, 10 mM ATP, 1 mg/ml BSA) und 1-3 U T4 Ligase für 4 h bei 14 °C oder ü. N. bei 4 °C in einem Volumen von 10-20 µl inkubiert. Das ligierte Material wurde anschließend zur Transformation eingesetzt.

7.4. Fill-in Reaktion

Zur Durchführung dieser Reaktion, die z.B. Voraussetzung zu "Blunt-end" Ligationen ist, wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert: 20 µl

DNA-Probe + 3 μ l 10 x Nick-Translations-Puffer + 3 μ l 10 mM DTT + 3 μ l dNTP-Mix (jedes Nukleotid 0,5 M) + 1-3 U Klenow- Polymerase. Diese besitzt 5' -> 3' Polymerase-Aktivität, jedoch keine 3' -> 5' Exonuklease-Aktivität. Der Reaktionsstop erfolgte durch Erhitzen (10 min, 70 °C). Die so behandelte DNA wurde dann nach Ethanol-fällung sofort zur Ligation bzw. Dephosphorylierung eingesetzt.

8. PRÄPARATION VON PLASMID-DNA

8.1. Mini-Präparation

Hierzu wurden 1,5 ml einer E. coli Übernachtskultur in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt, 1 min bei 4 °C auf einer Eppendorfszentrifuge bei 10 000 x g zentrifugiert und das Bakterienpellet in 100 μ l eiskalter, lysozymhaltiger Lösung (4 μ g/ml Lysozym in 25 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose (pH 8,0)) suspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Die Zellyse erfolgte anschließend unter alkalischen Bedingungen durch Zugabe von 200 μ l Lysislösung (0,2 M NaOH, 1 % SDS). Nach vorsichtigem Mischen und 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden weitere 150 μ l eiskalte 3 M KAC-Lsg (pH 4,8) zugegeben, 10 sec mittels Vortex gemischt, anschließend wiederum für 5 min auf Eis inkubiert und zum Entfernen der denaturierten Zellproteine und der chromosomalen Bakterien-DNA 10 min zentrifugiert (10 000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde Phenol/Chloroform extrahiert, die Plasmid DNA mit Ethanol für 5 min bei RT gefällt und abschließend durch Zentrifugation (10 000 x g, RT) pelletiert. Nach Aufnahme der Plasmid-DNA in 50 μ l TE wurden dann 5 μ l dieser Lösung in Gegenwart von RNase A (20 μ g/ml) mit dem gewünschten RE verdaut.

8.2. Große Plasmidpräparation

Zur Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden 300-500 ml einer Übernachtskultur von E. coli aufgearbeitet. Nach Pelletieren der Zellen (10 min, 5000 rpm) wurden diese vergleichbar mit den Minipreparationen in 10

ml Lysozymlösung suspendiert, 5 min bei RT inkubiert und mit 20 ml Denaturierungslösung alkalisch denaturiert (10 min, 0 °C). Nach Zugabe von 15 ml eiskalter KAc-Lsg., 10 minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation (20 min, 10 000 x g) wurde die DNA auch hier mittels Ethanol präzipitiert (20 min, RT) und abzentrifugiert (10 000 x g, 30 min, RT). Das Pellet wurde in 8 ml TE aufgenommen und die Plasmid DNA nach Zugabe von Cäsiumchlorid (CsCl, 8,5 g) und Ethidiumbromid (EtBr; 200 µl 10 mg/ml Stocklösung) durch Zentrifugation gereinigt (36 h, 45 000 rpm (Ty 65 Rotor), 20 °C). Die Plasmid-DNA wurde dann wie bei Maniatis (1982) beschrieben aus dem CsCl-Gradienten geerntet, das EtBr durch Extraktion mit H₂O gesättigtem Butanol entfernt und die DNA nach Dialyse (2x4h mit TE/0,1 M NaCl) mit 2 fachem Volumen Ethanol gefällt.

9. RNA-PRÄPARATION

9.1. Präparation von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte nach einer Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Im einzelnen wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums und Waschen des Zellrasens mit PBS auf der Platte in 250 µl (pro 2,5 cm Platte) Denaturierungslösung (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM NaCitrat, 0,5 % Sarcosyl, 0,1 M 2-Mercaptoethanol) lysiert, das lysierte Material in Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und nach Zugabe von 25 µl 2 M NaAcetat Lösung (pH 4,0) vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurden 250 µl H₂O gesättigtes Phenol zugesetzt, erneut vorsichtig geschüttelt und abschließend 50 µl Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) zugegeben und kräftig geschüttelt. Die nun milchige Lösung wurde, nach 15 minütiger Inkubation auf Eis, zentrifugiert (20 min, 4 °C, 10 000 x g). Die obere, RNA enthaltende Phase wurde abgenommen, die RNA in doppeltem Volumen Ethanol für 1 h bei -20 °C präzipitiert und anschließend abzentrifugiert (15 min, 4 °C, 10 000 x g). Das RNA-Pellet wurde mit 80 % igem Alkohol abgespült, getrocknet und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

9.2. Präparation von Poly(A)⁺-RNA

Nach Absaugen des Mediums und Spülen des Zellrasens mit PBS wurden die Zellen auf der Platte (ϕ 14,5 cm) in 10 ml STE (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7,4) + 3 mg Proteinase K + 250 μ l 20 % SDS lysiert. Durch mehrmaliges Aufsaugen der Suspension mittels Spritze durch eine dünne Kanüle wurde die DNA geschert. Nach Proteinase K Verdau (1 h, 37 °C) und Phenol/Chloroform Extraktion wurde die NaCl-Konzentration auf 0,5 M eingestellt. Die Bindung der RNA an Oligo-dT (100 mg/10 Platten) erfolgte ü.N. bei RT unter leichter Rotation. Nach Abzentrifugieren des Oligo-dT-Materials (1000 x g, 2 min, RT) und 3 maligem Waschen mit HSB-Puffer zum Entfernen chromosomaler DNA und ribosomaler RNA (HSB: 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 % SDS, 10 mM Tris, pH 7,4) wurde die Poly(A)⁺-RNA mittels DEPC behandeltem Wasser (3 x 1 ml) von der Oligo-dT-Cellulose eluiert. Die Fällung erfolgte in 2,5 fachem Volumen Ethanol in Anwesenheit von 0,3 M NaAc und 10 μ g t-RNA/ml als Carrier.

10. DNA-ISOLATION

Auch hier wurden die Zellen auf der Platte (15 cm) mittels 10 ml Lysislösung (150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5 % SDS, 10 mM Tris, 300 μ g/ml Proteinase K, pH 8,0) lysiert. Der Proteinase K Verdau erfolgte für 5 h bei 50 °C. Nach 2 maliger Phenol/Chloroform Extraktion und nachfolgende Chloroform-Extraktion wurde eine RNase Behandlung durchgeführt (50 μ g/ml RNase A, 1 h, 37 °C), anschließend nochmals Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit 2 fachem Volumen Ethanol bei RT gefällt. Das sich bildende DNA-Knäuel wurde mittels Pasteurpipette entnommen und die hochmolekulare DNA in TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4) gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4 °C.

11. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Durch Messung der Extinktion einer nukleinsäurehaltigen Lösung bei 260 nm im Photometer kann die Nukleinsäurekonzentration der Lösung bestimmt werden. Einer OD von 1,0 entspricht hierbei 50 µg/ml (DNA), 40 µg/ml (RNA) bzw. 20 µg/ml (Oligonukleotide). Als Hinweis für Verunreinigungen kann der Quotient E260/E280 herangezogen werden; für saubere DNA sollte er 1,8, für RNA 2,0 betragen.

12. GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON RNA

Die zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA verwendeten Methoden unterscheiden sich durch die Art der Denaturierung der RNA. Die hier verwendeten Methoden bedienen sich der Denaturierung mittels Glyoxal/DMSO, bzw. mittels Formaldehyd/Formamid.

12.1. Denaturierung der RNA mittels Glyoxal / DMSO

Nach Aufnahme der RNA (5-10 µg) in 20 µl Denaturierungspuffer (255 µl H₂O, 50 µl 0,2 M NaH₂PO₄, 195 µl 30 % deionisiertes Glyoxal, 500 µl DMSO) erfolgte die Denaturierung für 3-60 min bei 50 °C. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt, geschüttelt, mit 4 µl Ladelösung (50 % Glycerol, 10 mM NaH₂PO₄ (PB), 0,4 % Bromphenolblau) versehen und über ein 1 % Agarosegel aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 10 mM NaH₂PO₄ (Pufferwechsel alle 30 min). Nach 3-4 h Laufzeit bei 100 V wurde das Gel in PB/Acridinorange (1000:1) für 10 min gefärbt, anschließend für 3x15 min mit PB entfärbt und die RNA dann auf Nylonfilter transferiert (s. Kapitel 13.2).

12.2. Denaturierung der RNA mittels Formaldehyd/Formamid

Hier wurde die RNA (5-20 µg) in 4,5 µl H₂O und 15,5 µl Aufnahmebuffer (2 µl 5x Puffer (0,2 M MOPS, 50 mM NaAc, 5 mM EDTA, pH 5,5-7,0) + 3,5 µl Formaldehyd + 10 µl deion. Formamid) gelöst und für 15 min bei 55 °C denatu-

riert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte über ein Agarose Gel für 2-3 h bei 100 V mit 1x Puffer als Lauffpuffer. Nach Visualisierung der aufgetrennten RNA unter UV-Licht (254 nm) und photographischer Dokumentation wurde auch hier die RNA auf Nylonfilter transferiert (s. Kapitel 13.2).

13. TRANSFER VON NUKLEINSÄUREN AUF MEMBRANEN

13.1. Southern - Transfer

Hier wird die nach Restriktionsverdau auf Agarosegelen gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA mittels Kapillarkräften auf Nylonfilter übertragen. Eine genaue Beschreibung findet sich bei Maniatis (1982). Der Transfer erfolgte hier unter denaturierenden Bedingungen mit 0,4 M NaOH über Nacht auf Hybond N⁺-Filter (Amersham). Nach Spülen der Membran mit 2xSSC wurde diese dann luftdicht eingeschweißt und bis zur Hybridisierung bei 4 °C aufbewahrt.

13.2. Northern - Transfer

Im Unterschied zum Southern Transfer wurde hierbei der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA auf Nylonmembran (Hybond N⁺) mit 20xSSC durchgeführt. Die Fixierung der RNA an den Filter nach Beendigung des Transfers erfolgte durch 5 minütige Behandlung der Membran mit 50 mM NaOH. Aufbewahrt wurde der Filter wie unter 13.1 beschrieben.

13.3. Slot Blot

Nach Denaturierung von RNA gemäß der in 12.2. beschriebenen Weise wurde ein Aliquot der RNA haltigen Lösung (1-2 µg Gesamt-RNA) mit einem gleichen Volumenanteil 20 xSSC gemischt und unter Verwendung einer Slot-Blot Apparatur (Hybri-SlotTM Manifold, BRL) in einem Gesamtvolumen von 20-30 µl auf trockene Hybond N⁺ Nylonmembran aufgetragen. Die Fixierung der

RNA an der Membran erfolgte anschließend durch 5 minütige Inkubation der Membran in 50 mM NaOH-Lösung. Nach Spülen mit 2 x SSC wurde die Membran dann wie unter 13.1. bis zur Hybridisierung bei 4 °C aufbewahrt.

14. RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-PROBEN

14.1. Nick-Translation

Hierzu wurde ein Kit von Amersham verwendet. 100 ng DNA wurden zusammen mit 6 µl dTTP, dATP, dGTP-Mix, 20-50 µCi- α -³²P-dCTP (3000 Ci/mmol) und 2 µl Enzym (DNase I-Polymerase I-Gemisch) für 2 h bei 15 °C inkubiert. Die radioaktive Markierung der DNA Probe erfolgt aufgrund der gleichzeitigen Endonuclease, Exonuklease- und Polymerase-Aktivität des verwendeten Enzymgemisches. Nach Stoppen der Reaktion mit 30 µl Stopp-lösung (20 mM Tris, 1 % SDS, 30 mM EDTA, pH 7,5) wurde die Probe von freiem, nicht eingebautem ³²P-dCTP gereinigt, indem das markierte Material durch eine Sephadex-G-50-Säule (1 ml Volumen) zentrifugiert (3 min, 1200 rpm) und diese 2x mit je 50 µl TE nachgewaschen wurde. Freies ³²P-dCTP verbleibt hierbei im Säulenmaterial.

14.2. Random priming

Hierzu wurde ein Kit von Stratagene (Prime it™) verwendet. Nach Denaturierung der Probe (25 ng DNA für 5 min bei 95 °C) in Anwesenheit von 10 µl Primer (34 µl Gesamtvolumen) und 5 minütiger Inkubation bei RT zwecks Hybridisierung des Primers an die Proben-DNA erfolgte die eigentliche Reaktion für 10 min bei 37 °C. Im Gesamtvolumen von 50 µl waren 10 µl Nukleotidpuffer (enthält kein dCTP), 20-50 µCi α -³²P-dCTP (3000 Ci/mmol) und 2 U T7 DNA-Polymerase enthalten. Die Reinigung der Probe erfolgte wie oben bereits beschrieben säulenchromatographisch.

15. HYBRIDISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

Zur Hybridisierung der unter 13. auf Nylonmembran fixierten Nukleinsäuren wurde die Membran in Vorhybrisierungslösung (7 % SDS, 1 mM EDTA, 0,5 M Na_2HPO_4 , pH 7,2) für 1-2 h bei 65 °C zum Absättigen unspezifischer Bindungen vorhybrisiert. Die eigentliche Hybrisierung erfolgte dann in Anwesenheit einer radioaktiv markierten Probe (10^6 - 10^7 cpm pro ml Hybridisierungslösung) über Nacht bei 65 °C in Hybridisierungslösung (Vorhybrisierungslösung + 1 % BSA; ca. 0,05 ml/cm² Membran). Das Waschen der Filter erfolgte ebenfalls bei 65 °C für 2-3 x 30 min in Waschlösungen mit abnehmender Salzkonzentration (2xSSC (1x, 0,5x), 1 % SDS, 1 mM EDTA). Abschließend wurde der Filter in 2xSSC gespült (RT) und nach Einschweißen in Haushaltsfolie unter Verwendung einer Verstärkerfolie auf Röntgenfilm (Amersham) für 1-14 Tage exponiert. Die quantitative Auswertung von Expressionsanalysen (Northern-Blots) erfolgte densitometrisch (Laserdensitometer Ultrascan XL (LKB)). Zur Berechnung von Induktionsfaktoren wurde zur Bestimmung der tatsächlich aufgetragenen RNA-Mengen eine Kontrollhybridisierung mit GAPDH (0,9 kb Eco RI cDNA-Fragment aus pR GAPDH-13) durchgeführt.

16. SCREENEN EINER COSMIDBANK

Die in *E. coli* vorliegende, von Dr. B. Kaina (Karlsruhe) in einen c2xB Vektor klonierte Cosmidbank (Komplexität 2×10^5) wurde in einer Dichte von 10^6 -Zellen pro Platte (25x25 cm) auf einen auf XT-Platten liegenden Filter (Gene Screen Plus) ausplattiert (Masterfilter). Nach 14-20 h Wachstum (37°C ; nahezu geschlossener Bakterienrasen mit kleinen, aber deutlichen Kolonien) wurden pro Masterfilter 2 Abdrücke (Replikafilter) angefertigt und die auf Master- und Replikafilter sich befindenden Bakterien nochmals zum Hochwachsen für ca. 6 h bei 37°C weiterinkubiert. Die Masterplatte wurde anschließend bei 4°C gelagert, die Replikafilter zur Amplifikation der Cosmide nochmals für 24 h auf ampicillinhaltige XT-Platten mit Chloramphenicol ($50 \mu\text{g/ml}$) aufgelegt. Die Lyse der Bakterien auf dem Filter erfolgte durch jeweils 3 minütige Behandlung der Filter mit $0,2 \text{ M NaOH} - 1\% \text{ SDS}$, $0,5 \text{ M NaOH} - 1 \text{ M Tris (pH 7,4)}$, wobei die Filter vorsichtig (mit den Bakterien nach oben) auf die Oberfläche der entsprechenden Lösungen gelegt wurden. Anschließend wurden die Filter in $2 \times \text{SSC} - 0,1\% \text{ SDS}$ überführt, der Bakterien Schleim mittels Kleenex vorsichtig abgerieben, und die Filter nach nochmaligem Spülen in $2 \times \text{SSC}$ ü.N. bei RT zur Fixierung der DNA an den Filter getrocknet. Die Hybridisierung erfolgte dann wie oben beschrieben. Nach Identifizierung identischer Signale auf beiden Replikafiltern wurden, rückgreifend auf die Masterplatte, die Bakterienklone des entsprechenden Bereichs mit $5-10 \mu\text{l}$ 10 mM MgSO_4 -Lösung abgepickt und in einer Verdünnung von etwa 1:500 erneut ausplattiert. Hierbei wurde die Verdünnung so gewählt, daß nach Hochwachsen der Bakterien Einzelklone deutlich identifizierbar waren und so nach "Screening" dieser Kolonien mittels "Colony-Lifting" (Maniatis, 1982) gezielt zu einem dritten "Screen" bzw. Southern-Analysen abgenommen werden konnten.

17. ³H-THYMIDIN-EINBAU ZUR MESSUNG DER ZELLULÄREN REPLIKATION

Beim Wachstum von Zellen in Anwesenheit von ³H-Thymidin kann der Einbau dieser radioaktiv markierten Base in die DNA verfolgt und als Maßstab für die zelluläre Replikation herangezogen werden. Zur Bestimmung des Einflusses von Mutagenen auf die Replikation wurden $2-5 \times 10^4$ Zellen pro Miniwellplatte (0,2 ml Medium) eingesäht und 24 h später unter Verwendung von konditioniertem Medium mit dem jeweiligen Mutagen behandelt. Zur Bestimmung der Replikationsrate wurden 100 µl ³H-Thymidin enthaltendes Medium (5 µCi/ml) für 30 min auf die Zellen gegeben. Nach Entfernung des markierten Mediums wurden die Zellen abtrypsiniert und nach Zugabe von 200 µl PBS mittels "Zellharvester" (Combi cell harvester (Skatron)) auf Skatron-Filtermatten gesaugt. Die bei der nachfolgenden Szintillationsmessung detektierte, an diese Filter gebundene Radioaktivität kann dann als Maß für die Replikationsgeschwindigkeit der Zellen angesehen werden. Pro Meßpunkt wurden 8-12 Parallelmessungen (8-12 Wells) durchgeführt und davon das arithmetische Mittel gebildet.

18. DNA-SEQUENZIERUNG

Die hier durchgeführten Sequenzierungen erfolgten als Doppelstrangsequenzierung nach der Didesoxymethode von Sanger (1977) unter Verwendung eines Sequenzierkits von Stratagene (T7-ExoMet™ Sequenzierungskitt bzw. T7-Sequenase-Kitt). Im Einzelnen wurde 2-3 µg aus Minipräparationen gewonnene Plasmid-DNA für 15 min bei RT in einem Volumen von 100 µl RNase A (1,5 µg) verdaut, nach Zugabe von 40 µl 3 M NaAc (pH 4,8) + 260 µl H₂O mit Phenol/Chloroform sowie Chloroform extrahiert, mit EtOH für 30 min bei -80 °C gefällt und zentrifugiert (10 000 x g, 4 °C). Die Denaturierung der DNA erfolgte durch Resuspendieren des DNA-Pellets in 40 µl Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH, 0,2 M EDTA) für 5 min bei RT. Nach erneuter Fällung, Waschen und Trocknen wurde die DNA in 7 µl H₂O resuspen-

diert. Nach Zugabe von 2 μ l Sequenzier-Puffer und 1 μ l Primer (5 μ g/ml) wurde die zu sequenzierende Probe für 3 min bei 65 °C erhitzt und für 30 min zur Hybridisierung des Primers bei RT abgekühlt. Zum Anlaufen des Sequenzierreaktion wurden anschließend folgende Agenzien zupipettiert: + 1 μ l 0,1 M DTT, + 2 μ l Nukleotid-Mix + 1 μ l α -³⁵S-ATP, + 2 μ l T7-Polymerase (3 U). Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurden je 3,5 μ l dieses Gemisches in auf 37 °C vorgewärmte Terminationsgefäße gegeben (enthalten je 2,5 μ l G-, A-, T- bzw. C-Mix, mit den für den Abbruch der Sequenzierreaktion verantwortlichen Didesoxynukleotiden) und für genau 5 min bei 37 °C weiterinkubiert. Gestoppt wurde die Sequenzierungsreaktion durch Zugabe von 4 μ l Formamid-Puffer (950 μ l Formamid, 50 μ l 20 x TBE, 0,1 mg Bromphenolblau, 0,1 mg Xylenblau). Nach Erhitzen (3 min, 75-80 °C) wurden die Proben dann sofort auf Eis abgekühlt und anschließend über ein 6 % Polyacrylamid-Sequenziergel (Stocklösung: 50 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30:1), 25 ml 10xTBE, 125 g Harnstoff, mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt und filtriert) mit 1x TBE als Laufpuffer für 1-3 h aufgetrennt (1500 V, 12 mA). Das Auftragevolumen bei dem hier verwendeten Gelsystem (30 cm x 15 cm x 0,1 cm) beträgt 4 μ l.

Als Primer zur Durchführung der Sequenzierungen wurde nach vorausgegangenen Exo III-Deletionen immer der gleiche Primer (T3-Primer) benutzt oder verschiedene, nach Ergebnissen der Sequenzierungen mit dem T3-Primer synthetisierte Oligonukleotide verwendet. Die Verwendung des T3-Primers war deshalb möglich, weil die zu sequenzierende cDNA im Bluescript-Vektor vorlag (enthält T3-Promotor). Das Prinzip von Exo III-Deletionen beruht darauf, daß durch Restriktionsverdau mit zwei nahe nebeneinander schneidenden Enzymen 5' und 3' überhängende Enden geschaffen werden, wobei 3' Überhänge von dem Exo III-Enzym nicht angegriffen und somit geschützt sind. Nach Restriktionsverdau erfolgte der ExoIII-Verdau mit 20 U/ μ g DNA bei 30 °C (0,2 μ g DNA/ μ l). Alle 10 s wurden Proben (50 μ l (= 10 μ g) entnommen und die Reaktion durch EDTA gestoppt. Die so entstandenen Deletionen des zu sequenzierenden Gens können dann durch nachfolgenden S1-Verdau (37 °C, 1 h; Puffer: 1,5 M NaCl, 150 mM NaAc, 15 mM ZnSO₄, 50

$\mu\text{g/ml}$ Kalbsthymus DNA, 40 U S1-Nuclease), Fill in Reaktion zur Reparatur der Enden, "Blunt end"-Ligation und Transformation in E.coli amplifiziert werden. Die Sequenzierung der einzelnen Deletionen kann dann unter Verwendung des gleichen Primers durchgeführt werden. Sequenziert wurden überlappende Klone.

19. RUN-ON-TRANSKRIPTIONSANALYSE

Hiebei wird durch in vitro Transkription in isolierten Zellkernen neu synthetisierte prä-RNA radioaktiv markiert und als Probe eingesetzt. Vorteil dieser Methode ist, daß so direkt die Transkriptionsrate und nicht die insgesamt vorliegende Menge an mRNA gemessen werden kann. $2-4 \times 10^6$ H4 Zellen wurden pro 14,5 cm Gewebekulturschale eingesäht und 24 h später mit 5 bzw. 10 μM MNNG behandelt. Weitere 24 h später wurden dann die Zellkerne präpariert. Dazu wurden die Zellen nach Waschen des Zellrasens mit PBS in 5 ml eiskaltem PBS abgeschabt, abzentrifugiert ($400 \times g$, 4°C) und das Zellpellet in 1 ml Lysis-Puffer (0,5 % NP40, 3 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,4) resuspendiert. Nach Lyse der Zellen (5 min, auf Eis) wurden die Zellkerne abzentrifugiert (5 min, $400 \times g$, 0°C) und nochmals mit 2 ml Lysispuffer gewaschen. Bis zur eigentlichen Reaktion wurden die Kerne dann in 100 μl Glycerolpuffer (40 % Glycerol, 5 mM MgCl_2 , 0,1 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8,3) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur "nuclear run-on" Reaktion wurden die aufgetauten Kerne mit 100 μl Reaktionspuffer (5 mM MgCl_2 , 300 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8,0, je 0,5 mM ATP, GTP, CTP und 100 μCi α - ^{32}P -dUTP (400 Ci/mmol) gemischt und 30 min bei 30°C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von DNase I (20 $\mu\text{g/ml}$) und 5 minütiger Inkubation bei 30°C . Die Reaktionsansätze wurden dann für 30 min bei 42°C Proteinase K verdaut (+ 50 μl 5 % SDS, 25 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7,5, + 2,5 μl Proteinase K (10 mg/ml)). Nach zweimaliger Phenol/Chloroform Extraktion und Zugabe von 25 μg Hefe tRNA pro

Ansatz wurden 250 μ l 10 % TCA, 60 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ hinzupipettiert, 30 min auf Eis inkubiert, das Präzipitat mittels einer Mehrfachfiltereinrichtung auf Nitrozellulosefilter (BA85, 25 mM, Porengröße 0,45 μ M) gesammelt und 3x mit 10 ml 3 % TCA, 30 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ gewaschen. Der DNaseI- Verdau erfolgte in Packard-Plastikszintillationsgefäßen für 30 min bei 37 °C nach Zugabe von 0,9 ml DNase Puffer (25 μ g DNase I, 5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 20 mM Hepes pH 7,5). Gestoppt wurde der Verdau durch Zugabe von SDS und EDTA (1 % bzw. 15 mM). Nach Elution der RNA von den Filtern (10 min, 65 °C), weiterer 10 minütiger Inkubation bei 65 °C (+ 0,5 ml 1 % SDS, 5 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7,4) wurden beide Flüssigkeiten vereinigt und nochmals durch Zugabe von 25 μ g Proteinase K verdaut (30 min, 37 °C). Abschließend wurde die RNA nach erneuter Phenol/Chloroform Extraktion in Anwesenheit von 0,1 M NaCl mit dem 2,5 fachen Volumen Ethanol ü.N. gefällt.

Zur Hybridisierung wurden das die MGMT- und GAPDH-cDNA enthaltenden Plasmide (je 7,5 μ g) hitzedenaturiert (10 min, 95 °C), auf Hybond N⁺- Membran immobilisiert (Slot-Blot Apparatur von BRL) und wie unter 13. beschrieben mit der markierten RNA hybridisiert. Gewaschen wurde der Filter für 3 x 30 min mit 2xSSC, wobei nach dem ersten Waschen noch ein RNase A-Verdau zwischengeschaltet wurde (15 min, 37 °C).

20. REINIGUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN

Oligonukleotide wurden mittels eines Oligonukleotidsynthesizers (Gene Assembler Plus (Pharmacia)) hergestellt. Die Elution der Oligonukleotide aus der trockenen Kassette erfolgte mit 1 ml 25 % iger Ammoniaklösung ü. N. bei 50 °C. Nach Eindampfen des Ammoniak, Aufnahme des Pellets in dest. Wasser und nochmaligem Eindampfen erfolgte die Reinigung von kurzkettigen Produkten durch dünnschichtchromatographische Auftrennung der Oligonukleotide (Whatmann, Silica Gel 60A, Laufmittel: 55 ml n-Propanol, 35 ml NH_3 , 10 ml H_2O ; Kammersättigung). Nach Identifizierung und Markierung der Oligonukleotidbande unter UV-Licht (254 nm) wurde das entsprechende Plattenmaterial abgekratzt, die Oligonukleotide durch H_2O (1x300 μ l, 2x100 μ l) eluiert und mit Ethanol gefällt.

21. MESSUNG VON DNA-REPARATUR- UND RIBOSYLIERUNGS- AKTIVITÄTEN

21.1. O⁶-Alkylguanin-DNA -Alkyltransferase -Aktivitätstest

Das Prinzip dieses Aktivitätstests beruht auf der irreversiblen Übertragung einer radioaktiv markierten Methyl-Gruppe von als Substrat verwendeter Kalbsthymus-DNA auf das Methyltransferase-Protein und anschließender Bestimmung der Radioaktivität im Proteinpellet. Die Alkylierung der Substrat-DNA erfolgte mit ³H-MNU (3000 Ci/mmol) in 0,2 M NaCa-coadylat + 1 mM EDTA (pH 7,5) für 4 h bei 37 °C und anschließender Fällung sowie Dialyse (ü.N.) der alkylierten DNA. Die so gereinigte DNA wurde in 50 ml TE aufgenommen. Zur Aktivitätsmessung wurden 0,1 - 1,0 mg Gesamtzellprotein sowie 50 µl der Substrat-DNA (30 000 cpm) in einem Gesamtvolumen von 200-500 µl eingesetzt (10x Reaktionspuffer: 700 mM Hepes/KOH, 10 mM DTT, 10 mM EDTA, pH 7,8) Nach Ablauf der Transferase- Reaktion (15 min, 37 °C) wurde die DNA durch Zugabe von TCA (Endkonzentration 10 %) und Erhitzen (10 min, 90 °C) hydrolysiert, und das Protein durch nachfolgende Inkubation auf Eis (30 min) gefällt. Nach Abzentrifugieren (10 000 x g, 4 °C) des Proteins und Waschen des Proteinpellets mit Aceton wurde das Proteinpellet in 300 µl 0,1 N NaOH hydrolysiert, und die Radioaktivität nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler bestimmt.

21.2. Bestimmung der Adenosyl-Phosphoribosyltransferase- Aktivität

Die Messung der ADPRT-Aktivität erfolgte in permeabilisierten Zellen. 24 h nach Einsaat von 3×10^5 Zellen / 5 cm Platten wurden die Zellen für 2 h mit 5 mM MMS behandelt. Anschließend wurde zur Permeabilisierung das Kulturmedium durch 600 µl Permeabilisierungspuffer (150 mM Sucrose, 4 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 6 mM DTT, 20 mM Tris, pH 7,8) ersetzt. Nach 30 min bei 4 °C wurden 100 µl Reaktionspuffer (20 mM MgCl₂, ¹⁴C-NAD (200 000 cpm), 100 mM Tris, pH 7,8) zugegeben und die Zellen für 1 h im Brutschrank

bei 37 °C inkubiert (alle 15 min leichtes Schwenken). Anschließend wurden die Zellen in 5 ml PBS mit Gummischabern abgeschabt und die Proteine TCA gefällt (Endkonzentration TCA: 10 %). Die so gefällten Makromoleküle wurden unter Verwendung einer Absaugvorrichtung (Schleicher u. Schüll) auf Glasfaserfilter (Whatman GF/C) gesaugt und die Filter nach Waschen (1x5 ml 10 % TCA, 1x 5 ml 5 % TCA) und Lufttrocknen unter Verwendung von Szintillationsflüssigkeit im Szintillator auf gebundene Radioaktivität hin ausgemessen.

22. PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Nach Zellaufschluß durch Beschallung (Branson Sonifier, 40 W, 3 x 15 s, auf Eis) und Abzentrifugieren der Zelltrümmer (10 000 x g, 4 °C) erfolgte die Proteinbestimmung im Überstand nach Bradford (1976). Hierbei wird der Proteingehalt über eine Farbreaktion zwischen den Aminogruppen des Proteins und Coomassie Brilliant Blue G-250 ermittelt. Verwendet wurde hier die Makromethode, bei der Proteinmengen von 10-100 µg in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit 5 ml Bradfordreagenz versetzt werden (0,01 % Serva Blau G 250, 50 ml EtOH, 100 ml Phosphorsäure). Die Messung der Absorption gegen einen Leerwert erfolgt bei 595 nm. Die Eichkurve wurde mit BSA im Bereich von 50-500 µg/ml erstellt.

23. HERSTELLUNG VON CHROMOSOMENPRÄPARATEN

23.1. Aberrationspräparate

20-22 h nach Mutagenbehandlung logarithmisch wachsender Zellen wurden diese für 2 h mit dem Mitosehemmstoff Colcemid (50 ng/ml) behandelt. Anschließend wurde das Medium in 15 ml Zellkulturröhrchen umgefüllt, die Zellen abtrypsinisiert, in das jeweilige Medium zurück überführt und pelletiert (5 min, 1000 rpm). Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen im Restmedium gut resuspendiert. Die Hypotonie-Behandlung der

Zellen erfolgte durch Zugabe von 10 ml 0,075 M KCl-Lösung und Inkubation für 7 min bei RT. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 1000 rpm) wurde der Überstand bis auf ca. 0,5-1 ml abgesaugt und tropfenweise Methanol/Eisessig (3:1) zur Fixierung zugegeben. Nach Zugabe von insgesamt 10 ml dieser Fixierungslösung wurde für 10 min bei RT fixiert, die Zellen abzentrifugiert und noch 2x mit Methanol/Eisessig (3:1) gewaschen. Nach dekantieren des Überstandes bis auf 1-2 ml und Resuspension der Zellen wurden diese mittels Pasteurpipette auf fettfreie, eiskalte, gewässerte Objektträger aufgetropft und flammenfixiert. Die Anfärbung der Präparate erfolgte für 10 min in PBS/4 % Giemsa.

23.2. SCE-Präparate

Im Unterschied zur Herstellung von Aberrationspräparaten wurden hierzu die Zellen nach Mutagenbehandlung in Anwesenheit von 10 µg BrdU/ml Medium weiterinkubiert. Diese Substanz wird anstelle von Thymin in die DNA eingebaut und ermöglicht durch eine nachfolgende Farbreaktion die Identifizierung von SCE's. Voraussetzung ist die Anwesenheit des BrdU über 2 Generationszyklen (24 h bei CHO-Zellen). Die Herstellung der Präparate erfolgte dann wie oben bereits beschrieben. Zur Sichtbarmachung der SCE's wurden die Präparate mit 0,5xSSC (+ 0,5 µg Bisbenzimid/ml) überschichtet und 20 min mit UV bestrahlt (254 nm, 1000 J/m²). Anschließend wurden die Präparate mit 1xSSC gespült und in der gleichen Lösung für 1 h bei 80 °C inkubiert. Nach erneutem Spülen mit 1xSSC wurden die Präparate dann wie oben beschrieben angefärbt, wobei nur die Chromatiden anfärbbar sind, die kein BrdU enthalten. SCE's sind folglich am Wechsel zwischen dunkler und heller Färbung (und umgekehrt) des gleichen Chromatids erkennbar.

24. BESTIMMUNG DER MUTATIONSFREQENZ AM HGPRT-LOCUS

Als Marker für die nach Mutagenbehandlung von Zellen auftretenden Gen-Mutationsfrequenzen wurde der X-chromosomal lokalisierte HGPRT-Locus gewählt. Bei Mutation an diesem Locus sind die Zellen nicht mehr in der Lage dem Kulturmedium in toxischer Konzentration zugesetztes 6-Thioguanin (6-TG) in die eigene DNA einzubauen und überleben daher diese Behandlung. Damit ist die Zahl der die 6-TG Behandlung überlebenden Kolonien ein direktes Maß für die Mutationsfrequenz an diesem Locus. Die zur Selektion einzusetzenden toxischen 6-TG Konzentrationen sind von Zelltyp zu Zelltyp verschieden und müssen jeweils in Vorversuchen für die jeweilige Zelllinie festgelegt werden. 24 h nach Einsaat von 2×10^5 Zellen pro 10 cm Kulturschale wurden die Zellen mit Mutagen behandelt (Dauerbehandlung) und weitere 4 Tage später je nach toxischer Wirkung des Mutagens 1:5 - 1:20 umgesetzt (Vermeidung metabolischer Kooperation). Da die optimale Expressionszeit für HGPRT-Mutationen 5-7 Tage beträgt wurden die Zellen erst 3 Tage später zur 6-TG-Selektion in einer Dichte von 2×10^5 pro 10 cm Platte in 6-TG-haltiges Medium umgesetzt. Die zur genauen Bestimmung der Mutationsfrequenz nötige Bestimmung der Plattierungseffizienz wurde durch gleichzeitiges Ausplattieren eines Aliquots von Zellen in Normalmedium ermöglicht.

25. MIKROINJEKTION VON POLY(A)⁺-RNA

Diese Methode eignet sich zur transienten Komplementation eines spezifischen Defekts und Identifizierung der Größe (kb) der komplementierenden RNA-Fraktion(en). Poly(A)⁺ - RNA aus HeLa S3 Zellen (Mex⁺) wurde mittels Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation in einem 5-20 % Sucrose Gradienten (+ 0,5 % SDS, 5 mM EDTA, pH 7,4) größenfraktioniert (14 h, 25 000 rpm, SW40 Rotor (Beckmann)) und anschließend 11 Fraktionen geerntet. Diese wurden dann für die Injektionsversuche verwendet. Hierzu wurden 5×10^4 CHO-9 Zellen pro 10 cm Kulturschale ausgesät und 24 h später 250-400 Zellen innerhalb eines auf der Platte gekennzeichneten Bereiches mikroin-

jiziert (Eppendorf Mikroinjektor 5242). Die RNA der Fraktionen wurde dazu nach Etanol-Fällung in destilliertem Wasser gelöst (0,3 µg/ml). 20 h später wurden die injizierten , sowie eine unbehandelte Kontrollplatte mit 80 µM HeCNU behandelt, und die Zahl der überlebenden Klone in dem markierten Bereich 8-10 d später ausgezählt.

26. NACHWEIS GERINGER MENGEN AN mRNA MITTELS PCR ("POLYMERASE CHAIN REACTION")

Durch die "Polymerase chain reaction" (PCR) ist eine enorme Amplifikation und damit Detektion ansonsten mit herkömmlichen Verfahren (Northern-Blot, Southern-Blot) nicht detektierbarer RNA/DNA Mengen möglich (Amplifikationsfaktor bei Vorhandensein nur 1 Kopie: 2^n , wobei n die Anzahl der ablaufenden Cyclen angibt). Das Prinzip beruht auf einer 5' und 3' Hybridisierung eines bekannten definierten Primers an die zu amplifizierende Sequenz, gefolgt von einem nachfolgenden Polymerisationsschritt, Denaturierung, Hybridisierung und erneuter Polymerisation. Ermöglicht wird dieser Zyklus durch Verwendung der temperaturresistenten Taq-Polymerase.

26.1. cDNA-Synthese

2-3 µg Poly (A)⁺- RNA der zu untersuchenden Zelllinie wurden zur cDNA Synthese eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit Hilfe der AMV reversen Transkriptase für 90 min bei 42 °C. (Reaktionspuffer: 75 mM Tris/HCl pH 7,5, 1,5 mM DTT, 6 mM MgCl₂; dNTP-Mix (Endkonzentration je Nukleotid 1,5 mM); 30 U RNasin; 20 U AMV Reverse Transkriptase). Nach Beendigung der Reaktion wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

26.2. Durchführung der PCR-Reaktion

2 μ l des cDNA Ansatzes wurden zur PCR-Reaktion eingesetzt. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 100 μ l (16 μ l dNTP's (je 1,25 mM) + 10 μ l 10 x Reaktionspuffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1 % Gelatine, 100 mM Tris/HCl pH 8,3) + 100 pmol Primer 1 + 100 pmol Primer 2 + 2 μ l cDNA + 0,5 U Taq-Polymerase + H₂O (auf 100 μ l)). Im allgemeinen wurden 30 Zyklen durchgeführt (Coy Temp. Cyclor (Fröbel), wobei die Denaturierungstemperatur 94 °C, die Hybridisierungstemperatur 55-60 °C und die Polymerisationstemperatur 72 °C betrug. Nach Ablauf der Reaktion wurden 2-20 μ l des Ansatzes auf einem 0,8 % Agarose- Gele aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert (Southern - Blot) und zur sicheren Identifizierung der gesuchten Sequenzen mit der entsprechenden Probe hybridisiert.

ERGEBNISSE

1. Untersuchungen zur Alkylantien- Hypersensitivität von 27-1-Zellen

Bei der 27-1-Zelllinie handelt es sich um eine gegenüber monofunktionellen Alkylantien und UV-Strahlung hypersensitive CHO-9-Mutante (Zdzienicka u. Simons, 1986; Kaina, 1987). Während die UV-Hypersensitivität wahrscheinlich auf einen Inzisionsdefekt nach UV-Bestrahlung zurückzuführen ist und durch das ERCC 3-Gen komplementiert werden kann (Weeda et al., 1990a), ist die Ursache der Alkylantienhypersensitivität dieser Zelllinie weiterhin ungeklärt. In Fortführung der Untersuchungen von Kaina et al. (1990b) sollten hier weitere mögliche Erklärungsmodelle für die Hypersensitivität von 27-1-Zellen überprüft werden.

1.1. Hemmung der DNA-Replikation nach Mutagenbehandlung

Eine mögliche Erklärung für zelluläre Hypersensitivität gegenüber DNA schädigenden Agenzien besteht in einer fehlenden oder verzögerten Replikationshemmung nach DNA-Schädigung. Als Folge dieser fehlerhaften Replikationshemmung ist die Wirksamkeit von Reparaturfunktionen aufgrund schnellerer Manifestation prämutagener und prätoxischer Schäden verringert. Eine solche gegenüber Normalzellen verringerte DNA-Replikationshemmung nach Röntgenstrahlung ist beispielsweise im Zusammenhang mit der Röntgen-Hypersensitivität von Ataxia-Zellen diskutiert worden (Painter u. Young, 1980; De Witt et al., 1981; Jaspers et al., 1982).

Die hier untersuchte Mutanten-Zelllinie 27-1 zeigte nach MMS -Behandlung jedoch keine gegenüber dem CHO-9 "Wildtyp" verzögerte bzw. verringerte Replikationshemmung (Abb. 1). Nach Mutageneinwirkung erfolgte konzentrationsabhängig in beiden Zelllinien eine transiente Verringerung der DNA-Replikation mit einer maximalen Reduktion 2 h nach Behandlung. Die MMS-

Hypersensitivität der 27-1-Zellen kann folglich nicht auf Veränderungen in der Replikationshemmung nach Mutagenbehandlung zurückgeführt werden.

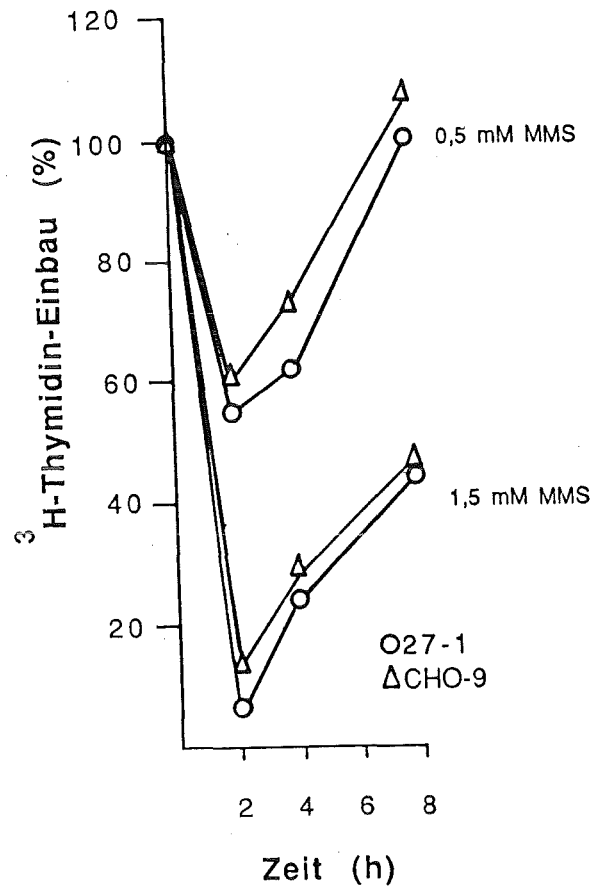


Abb. 1: Vergleich der DNA-Replikation von 27-1- und CHO-9-Zellen nach MMS- Behandlung.

Angegeben ist die ³H-Thymidin-Indkorporation in % der Kontrolle zum Zeitpunkt t=0. 24 h nach Einsaat von 5×10^4 Zellen/Miniwell (0,2 ml Medium) wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C mit MMS behandelt (Verwendung von konditioniertem Medium). Die ³H-Thymidin- Markierung (5 µCi/ml) erfolgte für 30 min bei 37 °C. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen (reproduzierbaren) Versuchs.

1.2. Beeinflussung der zellulären Resistenz durch Ribosylierung

Es ist bekannt, daß an der Exzisionsreparatur beteiligte Enzyme durch Ribosylierung in ihrer Aktivität modifiziert werden können (Althaus et al., 1985; Cleaver u. Morgan, 1985). Untersuchungen mit Hemmstoffen der Ribosylierung (3-Aminobenzamid) zeigten, daß Ribosylierungsvorgänge an der Vermittlung von MMS und UV-Resistenz beteiligt sind; Hemmung der ADP-Ribosyl-Transferase (ADPRT) führt zu einer erhöhten Sensitivität von Zellen gegenüber diesen Mutagenen (Shall et al., 1982; Althaus et al., 1985; Shall, 1987). Ausgehend von diesen Daten wurde hier untersucht, ob CHO-9- und 27-1-Zellen sich in ihrer ADPRT abhängigen Ribosylierung unterscheiden, und ob solche Unterschiede möglicherweise eine funktionelle Bedeutung für die MMS- Hypersensitivität der 27-1-Zellen haben.

Es konnte festgestellt werden, daß 27-1-Zellen sowohl geringere Mengen ADPRT- mRNA exprimieren (Abb. 2B), als auch eine gegenüber CHO-9-Zellen um 30 % verringerte ADPRT-Aktivität aufweisen (CHO-9: 205 fmol/h/10⁶ Zellen; 27-1: 146 fmol/h/10⁶ Zellen). Diese geringere Ribosylierungsaktivität der 27-1-Zellen und die daraus zu folgernde verringerte Ligase II-Aktivität stellen eine Erklärungsmöglichkeit für die von Kaina et al. (1990b) für diese Zellen beschriebene erhöhte DNA-Reparatursyntheserate nach MNNG-Behandlung dar.

Falls die im Vergleich zu CHO-9 verringerte ADPRT-Expression der 27-1-Zellen funktionelle Bedeutung für deren Alkylantien-Hypersensitivität hat, sollte diese durch Überexpression von ADPRT komplementierbar sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden durch Cotransfektion eines die menschliche ADPRT- cDNA enthaltenden Expressionsplasmids (von M. Schweiger, Innsbruck zur Verfügung gestellt) und dem pSV2neo Marker- gen stabile Transektanten hergestellt. Bei nachfolgender MMS-Selektion der G418 resistenten Massenkultur zeigten die ADPRT-Transfektanten ge-

gegenüber Kontrollzellen nur ein geringfügig erhöhtes MMS-Resistenzverhalten (3-4 fach höhere Überlebensrate). Die geringe Bedeutung von ADPRT für die zelluläre MMS-Resistenz spiegelt sich auch in einem zur genaueren Analyse isolierten Einzelklon wieder (Abb. 2). Diese 27-1-ADPRT-Transfektante zeigte im Vergleich zur Kontrolle neben einer erhöhten ADPRT-Expression (Abb. 2B) eine Verdopplung der ADPRT-Aktivität, eine Verringerung der Aberrationsfrequenz nach MMS-Behandlung (Abb. 2C) sowie eine leicht erhöhte MMS-Resistenz (Abb. 2A). Aufgrund des Eingangs erwähnten Inzisionsdefekts von 27-1 nach UV-Bestrahlung weist die ADPRT-Transfektante gegenüber der verwendeten Kontrolle erwartungsgemäß keine erhöhte UV-Resistenz auf (Abb. 2A).

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich nach Transfektion von CHO-9-Zellen. Auch hier zeigte die isolierte ADPRT-Transfektante gegenüber der Kontrolle eine erhöhte ADPRT-Expression (Abb. 2B) und geringfügig erhöhte MMS- bzw. UV-Resistenz (Abb. 2A). Obwohl die 27-1-ADPRT-Transfektante in ADPRT-Aktivität und ADPRT-Expression das Niveau des CHO-9-"Wildtyps" erreicht bzw. sogar übertrifft, konnte keine vollständige Komplementation des 27-1-Defekts erzielt werden; die 27-1-ADPRT-Transfektante erreicht bei weitem nicht die MMS-Resistenz von CHO-9-Zellen. Daraus kann geschlossen werden, daß Ribosylierungsunterschiede zwischen 27-1- und CHO-9-Zellen nicht allein für die Alkylantien-Hypersensitivität der 27-1-Zelllinie verantwortlich sein können.

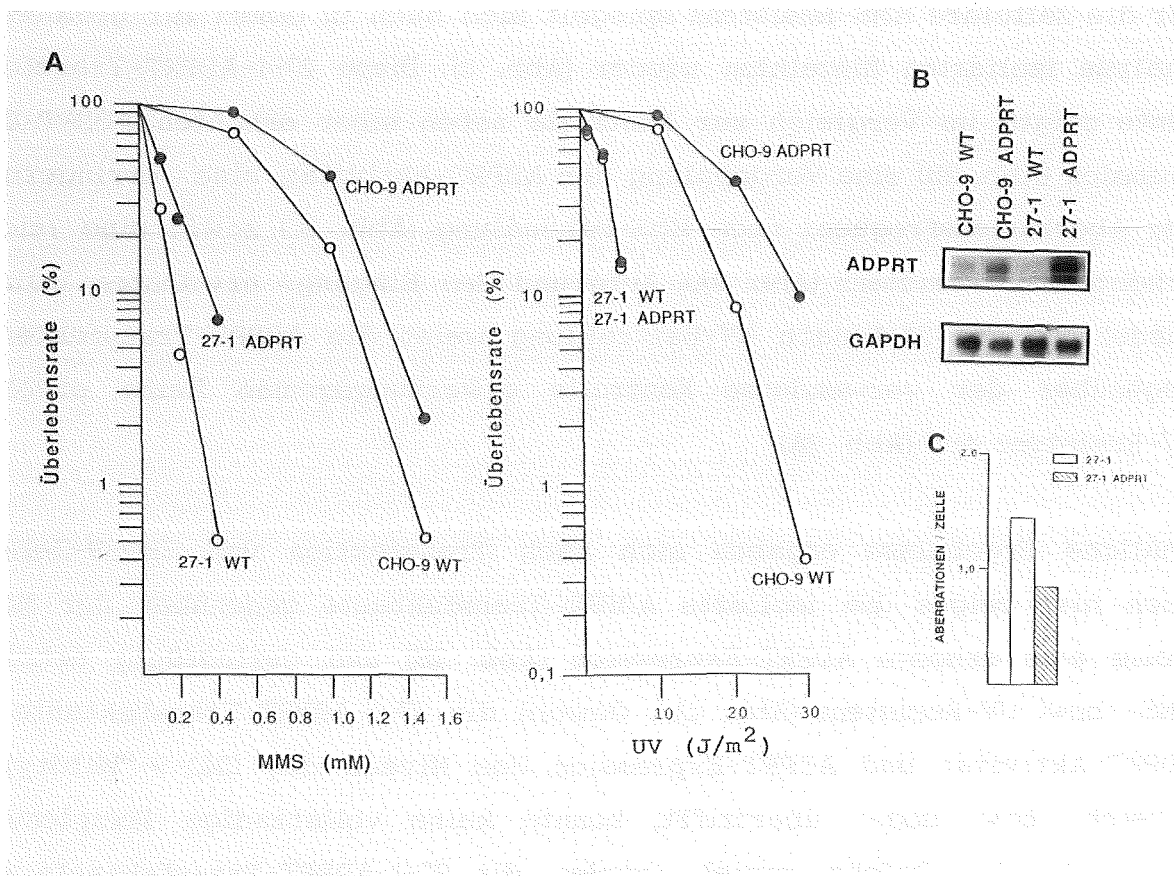


Abb. 2: Einfluß der ADPRT-Expression auf das Überleben von CHO-9- und 27-1-Zellen nach Behandlung mit MMS oder UV.

- A: Die dargestellten Meßpunkte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen. Die MMS-Behandlung erfolgte für 1 h bei 37 °C.
- B: Northern-Analyse von Wildtyp und ADPRT-Transfektanten. 5 µg Poly(A)⁺-RNA wurden nach der im Methodikteil beschriebenen Glyoxal/DMSO Methode auf einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt. Als Hybridisierungsprobe wurde ein 1,6 kb Eco RI -Fragment der ADPRT-cDNA verwendet.
- C: Zur Bestimmung der Aberrationsfrequenz pro Zelle wurden logarithmisch wachsende 27-1-Zellen für 1 h bei 37 °C mit 1,25 mM MMS behandelt. Die Colcemid-Behandlung erfolgte 20 h später für 2 h. Nach Fixierung wurden jeweils 50 Metaphasen ausgewertet (alle Aberrationstypen außer Lücken (gaps) berücksichtigt).

2. Arbeiten zur Klonierung eines die Hypersensitivität von 27-1-Zellen komplementierenden Gens

Die vorangegangenen Untersuchungen zur Alkylantien-Hypersensitivität der 27-1-Zellen ergaben keine Hinweise für mögliche Ursachen ihres im Vergleich zu CHO-9-Zellen verringerten Resistenzverhaltens gegenüber MMS. Aus diesem Grunde wurde im nun folgenden Teil der Arbeit versucht, die MMS-Hypersensitivität der 27-1-Zellen durch Transfektion mit menschlicher DNA zu komplementieren. Auf diese Weise sollte das für den 27-1 Defekt verantwortliche Gen isoliert werden.

Ausgangspunkt dieser Arbeiten war eine Cosmidbank, die von Dr. B. Kaina (Karlsruhe) bereits aus einer sekundären 27-1-Transfektante (T60) hergestellt worden war. Sowohl die primäre (T38), als auch die sekundäre Transfektante (T60) sind MGMT-defizient (Mex^-), verstärkt MNNG-, MMS - und 6-Thioguanin - resistent, zeigen eine mehr fibroblastoide Morphologie und bilden nach Injektion in Nacktmäuse keine Tumore mehr (Kaina, 1987; 1989). Einen ähnlichen Phänotyp zeigte auch eine nach Transfektion von menschlicher DNA in CHO-9-Zellen erhaltene sekundäre Transfektante (T70; Kaina et al., 1987; 1989). Zum besseren Verständnis zeigt Abb. 3 einen Überblick über die bei diesen Klonierungsarbeiten verwendete Vorgehensweise.

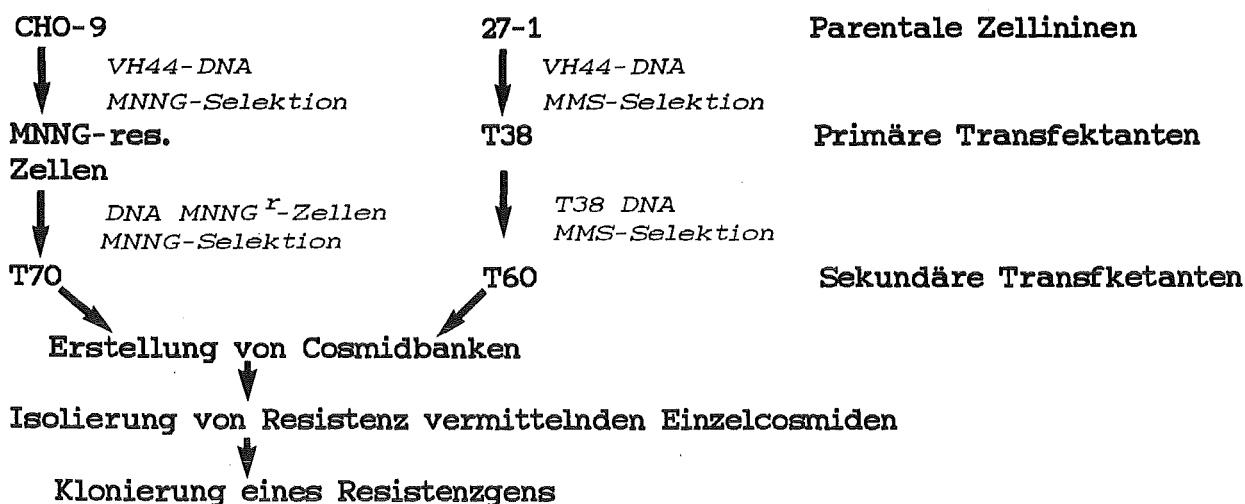


Abb. 3: Vorgehensweisen zur Klonierung Alkylantienresistenz vermittelnder Gene.

2.1. Isolierung menschliche DNA enthaltender Cosmide

Nach Hybridisierung der mir aus der sekundären Transfektante T60 (siehe Abb. 3) zur Verfügung stehenden Cosmidbank (Komplexität: 2×10^5 unabhängige Klone) mit repetitiven menschlichen Sequenzen (Alu-Sequenzen) konnten 4 Cosmide isoliert werden, die im Restriktionsverdau Unterschiede aufwiesen und menschliche Sequenzen enthalten (Abb. 4B). Die Cosmide besitzen z.T. Restriktionsfragmente gleicher Größe; einige von ihnen kreuzhybridisieren mit der menschlichen Alu-Hybridisierungsprobe sowie mit Vektorsequenzen (Abb. 4).

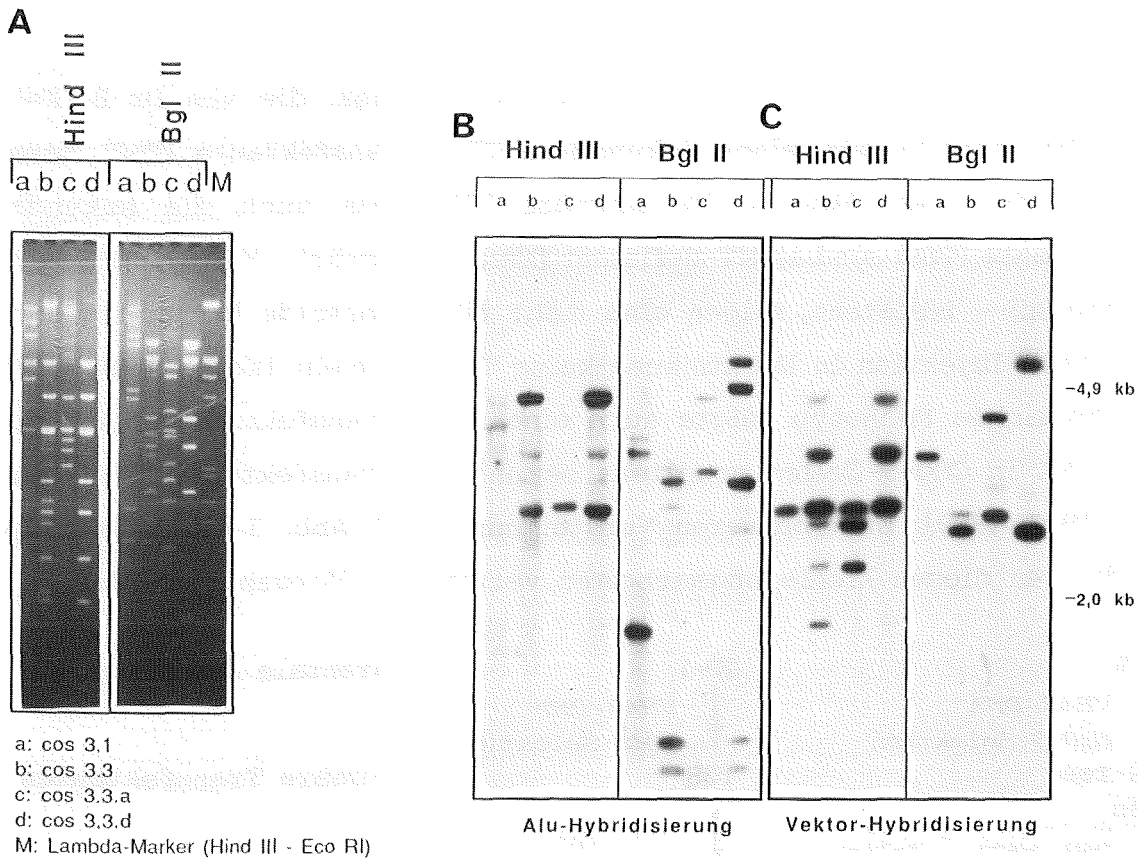


Abb. 4: Southern-Analyse der isolierten Cosmide.

Zum Restriktionsverdau wurden je $1 \mu\text{g}$ des entsprechenden Cosmids eingesetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte über ein 0,8 % Agarose-Gel. Als Größenmarker wurde der λ -III-Marker (λ -DNA Hind III-Eco RI verdaut) verwendet. Die radioaktive Markierung der eingesetzten Proben erfolgte durch Nick-Translation mit α - ^{32}P -dCTP.

A: Ethidium-Bromid gefärbtes Gel

B: Southern-Hybridisierung mit repetitiver menschlicher DNA (Alu-Sequenzen) als Hybridisierungsprobe.

C: Southern-Hybridisierung mit dem Cosmidvektor(c2xB) als Hybridisierungsprobe

2.2. Resistenzvermittlung durch die isolierten Cosmide

Zur Überprüfung der Frage, ob die isolierten Cosmide zur Vermittlung von MMS-Resistenz befähigt sind, wurden diese sowohl als Gemisch (Cosmide 3.1, 3.3.a, 3.3.d) als auch einzeln in 27-1-Zellen transfiziert (Cosmidvektor c2xB enthält bereits das neo-Gen). Nach MMS-Selektion der G418 resistenten Zellen zeigten die Cosmidtransfektanten eine im Vergleich zu Kontrolltransfektanten (27-1- pSV2neo) deutlich höhere Überlebensfrequenz (Tab. 1A,1B). Zur Überprüfung der Frage, ob die die MMS-Selektion überlebenden Zellen tatsächlich (stabil) resistent gegenüber MMS sind, wurden sie nochmals mit MMS behandelt. Die resistentesten Zellklone wurden auf diese Weise nach Transfektion mit den Cosmiden 3.3 und 3.3.d erhalten (Tab. 1B, Seite 44).

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, sind nur ein Teil der Klone, die die erste MMS-Selektion überlebt haben, stabil MMS-resistent. Etwa 30 % der Klone haben im Laufe mehrerer Passagen (während des Hochziehens der Einzelklone) ihre MMS-Resistenz verloren.

Eine Analyse der MMS-Sensitivität einiger der isolierten Einzelklone in Form von Dosis-Wirkungs-Kurven ist in Abb. 5 dargestellt. Die stärkste MMS-Resistenz wiesen die nach Transfektion mit den Cosmiden 3.3 und 3.3.d erhaltenen Klone Id-2 und La-2 auf (Abb. 5B, Seite 45). Diese Transfektanten erreichen nahezu die MMS-Resistenz von CHO-9-"Wildtyp"-Zellen. Die nach Transfektion mit dem Cosmid 3.1. erhaltene Transfektante Ha-1 zeigte eine mittlere MMS-Sensitivität (Abb. 5B). Die nach Transfektion mit dem Cosmidgemisch erhaltenen Transfektanten wiesen ebenso wie Ha-1 ein mittleres Resistenzverhalten auf (Abb. 5A, Seite 45).

Tab. 1: MMS-Resistenzvermittlung durch menschliche DNA enthaltende Cosmide nach Transfektion in 27-1-Zellen.

G418 resistente Zellen wurden in einer Dichte von 10^5 Zellen / 10 cm Kulturschale replattiert und 6 h später mit 0,2 mM MMS selektioniert (identische Zahl an selektionierten Zellen bei Kontrolltransfektanten und Cosmidtransfektanten). Angegeben sind die Anzahl der insgesamt isolierten Klone aus 3 (A) bzw. 2 (B) unabhängigen Transfektionsexperimenten. Zur Isolierung stabiler Einzelklone wurden einige der nach der ersten MMS-Selektion erhaltenen Klone nochmals mit 0,15 mM MMS behandelt (getestet/resistent).

A: Zur Transfektion der Cosmide als Gemisch wurden je 5 µg Cosmid-DNA der Cosmide 3.1, 3.3.a und 3.3.d (insgesamt 15 µg) eingesetzt.

B: Zur Transfektion der Einzelcosmide wurden 5 µg Cosmid-DNA pro Transfektion eingesetzt.

A Cosmide insgesamt

Zelllinie	Selektion (MMS)	Überlebende Klone (Gesamtzahl)	Resistenz (getestet/resistent)
27-1 neo	0,2 mM	1	- (1/0)
27-1 cos	0,2 mM	12	- bis ++ (12/6)

B Cosmide einzeln

Zelllinie	Selektion (MMS)	Überlebende Klone (Gesamtzahl)	Resistenz (getestet/resistent)
27-1 neo	0,2 mM	1	nb
27-1 cos 3.1	"	21	- bis ++ (4/3)
27-1 cos 3.3	"	9	- bis +++ (4/3)
27-1 cos 3.3.a	"	12	- bis + (3/2)
27-1 cos 3.3.d	"	21	- bis +++ (5/4)

nb : nicht bestimmt

- : nicht resistent

+ : schwach resistent

+++ : stark resistent (vergleichbar mit CHO-9)

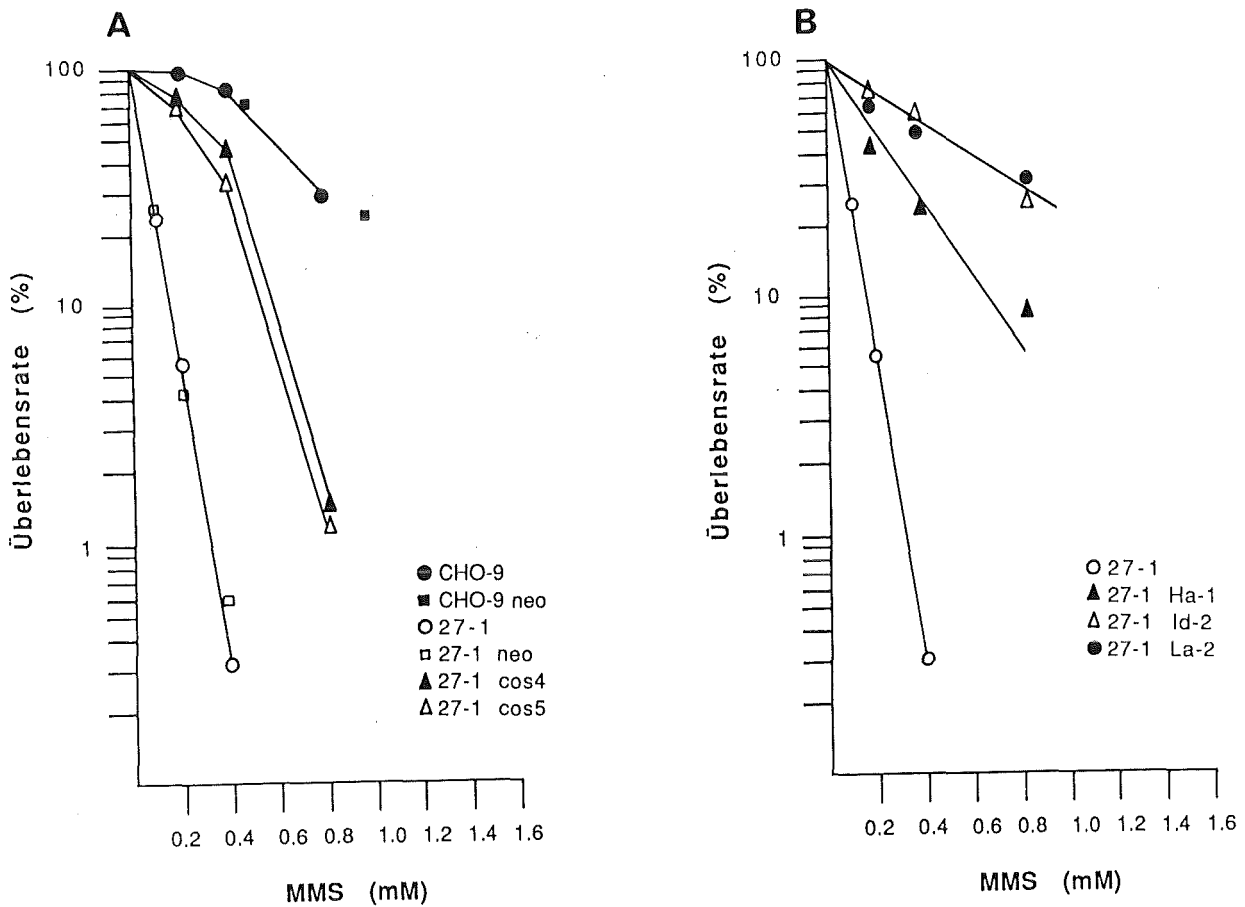


Abb. 5: Resistenz verschiedener 27-1-Cosmidtransfektanten (Einzelklone) gegenüber MMS.

Die Mutagenbehandlung erfolgte 6 h nach Einsaat von 500 Zellen/5 cm Platte für 1 h bei 37 °C. Dargestellt ist das Überleben mutagenbehandelter Zellen in % zur unbehandelten Kontrolle.

A: Resistenzverhalten von Cosmidtransfektanten, die nach Transfektion mit einem Cosmidgemisch isoliert wurden (vgl. Tab. 1A). Die dargestellten Meßpunkte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

B: Resistenzverhalten von Einzelcosmid-Transfektanten, die auf die in Tab. 1B dargestellte Weise isoliert wurden (neo: pSV2neo Kontrolltransfektante; Ha-1: cos 3.1-Transfektante; La-2: cos 3.3.d-Transfektante; Id-2: cos 3.3-Transfektante). Die dargestellten Meßpunkte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

2.3. Morphologie und Kreuzresistenz der isolierten Cosmidtransfektanten

Die nach Transfektion der einzelnen Cosmide in 27-1-Zellen erhaltenen Zellklone zeigten eine im Vergleich zu Kontrolltransfektanten abweichende Morphologie. Die Zellen wiesen einen fibroblastoiden Phänotyp auf (Abb. 6).

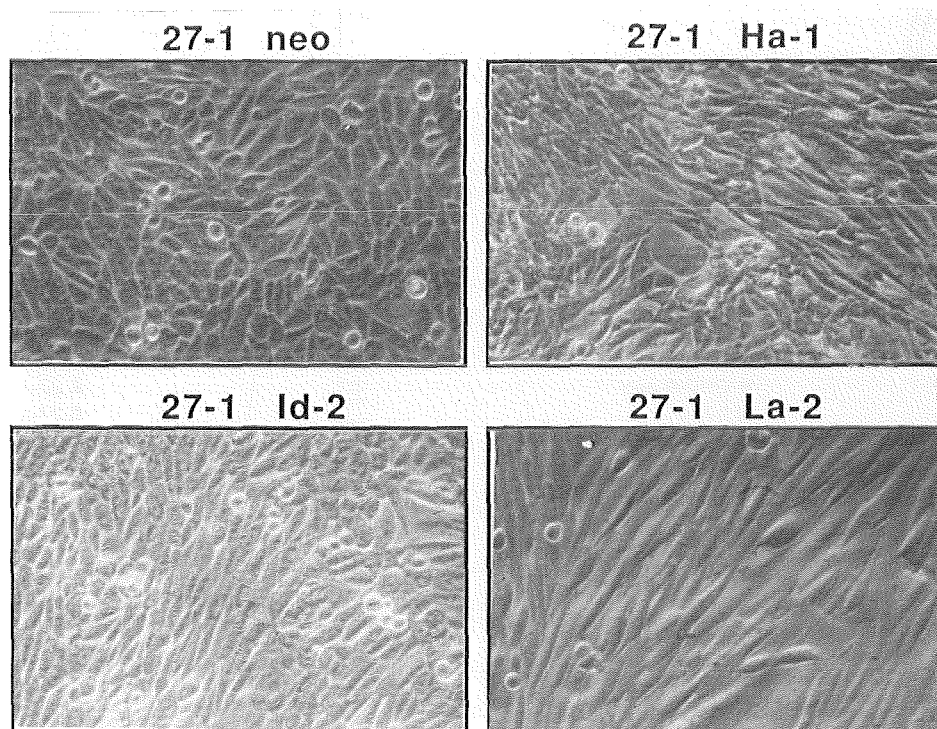


Abb. 6: Morphologie der isolierten 27-1-Cosmidtransfektanten.
Dargestellt ist die Morphologie subkonfluenter Kulturen.
27-1neo: Zellklon isoliert nach Kontrolltransfektion mit pSV2neo

Neben der veränderten Morphologie und MMS-Resistenz zeigten die Cosmidtransfektanten eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber MNNG und 6-Thioguanin, sowie eine leicht erhöhte Serumabhängigkeit (Abb. 7). Die Wachstumsrate der Cosmidtransfektanten in Medium mit 0,5 % FCS war deutlich geringer als die der Kontrolle; die Generationszeit der Cosmidtransfektanten lag bei 19-22 h, die der Kontrolle bei 16 h. Die Sensitivität gegenüber UV-Bestrahlung hingegen blieb unverändert (Abb. 7).

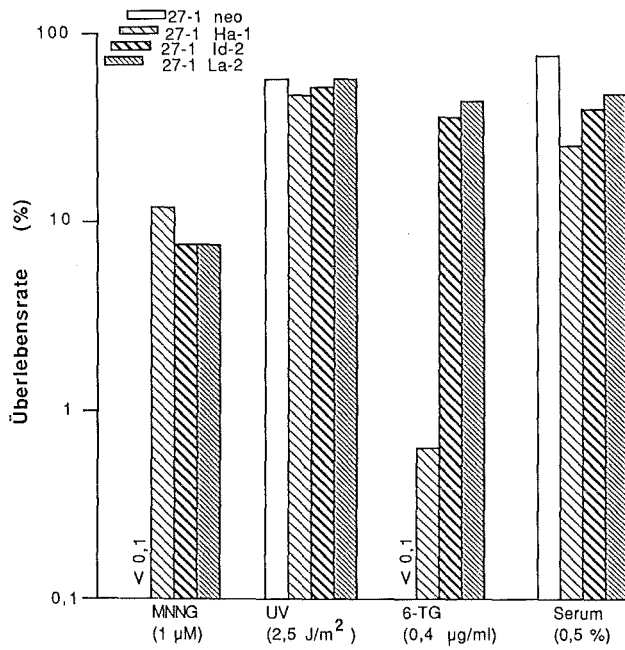


Abb. 7: Einfluß von Serumkonzentration, MNNG, UV und 6-TG auf die Koloniebildungsfähigkeit der getesteten Cosmidtransfektanten.

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen. Die MNNG-Behandlung erfolgte 6 h nach Ein-saat von 500 Zellen / 5 cm Platte für 1 h bei 37 °C. 6-TG verblieb im Medium. Zur UV-Behandlung wurde das Medium entfernt. Die zur Behandlung eingesetzten Konzentrationen und Dosen sind der Abbil-dung zu entnehmen. Zur Bezeichnung der Zellklone siehe Abb. 5.

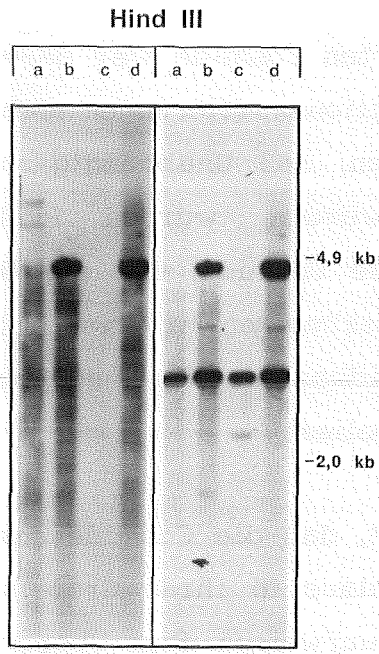
2.4. Kreuzhybridisierung von aus verschiedenen Cosmidbanken isolierten Cosmiden

Neben den Arbeiten zur Komplementation des 27-1 Defektes wurden von Dr. B. Kaina Transfektionen mit CHO-9-Zellen durchgeführt (vgl. Abb. 3) und MNNG-Resistenz vermittelnde Cosmide aus einer T70-Cosmidbank isoliert (Kaina 1989). Ein 1,6 kb Hind III-Fragment aus einem dieser Cosmide (cos 9-5 RC2) zeigte hierbei eine Hybridisierung mit menschlicher cDNA, nicht aber mit repetitiven menschlichen Fragmenten bzw. mit Vektorsequenzen.

Das gleiche 1,6 kb Hind III Fragment von cos 9-5 RC2 weist nun überraschenderweise auch eine Kreuzhybridisierung mit den von mir aus der T60-Cosmidbank isolierten Cosmiden 3.3. und 3.3.d auf (Abb. 8A). Bei den kreuzhybridisierenden Cosmiden handelt es sich um diejenigen, welche auch die beste Resistenzvermittlung in den Transfektionsexperimenten zeigten (vgl. 2.2).

Mit dem gleichen 1,6 kb Hind III Fragment aus cos 9-5 RC2 als Hybridisierungsprobe wurde von Dr. Kaina aus einer menschlichen cDNA-Bank (im Bluescript-Vektor vorliegend) ein cDNA-Klon (C-81; Länge des Inserts: ca. 1,8 kb) isoliert. Unter Verwendung dieser C-81 cDNA als Hybridisierungsprobe wiesen nun alle von mir aus der T60- Cosmidbank isolierten Cosmide eine deutliche Kreuzhybridsierung auf (Abb. 8B). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß unabhängig voneinander, unter Verwendung unterschiedlicher Zelllinien und Selektionsverfahren (MMS- bzw. MNNG-Selektion, vgl. Abb. 3) identische Sequenzen kloniert wurden, die an der Vermittlung von Alkylantienresistenz beteiligt sind.

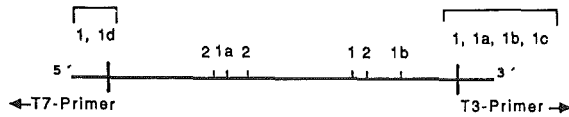
A



cos 9-5 RC2 (1,6 kb -Probe) C-81-Probe

- a: cos 3.1
- b: cos 3.3
- c: cos 3.3.a
- d: cos 3.3.d

B



1 = EcoRI; 1a = HINDIII; 1b = HINCII; 1c = XhoI; 1d = BamHI 2 = PvuII

☐ = Linkerbereich

Abb. 8: Southern-Analyse der aus der T60-Cosmidbank isolierten Cosmide nach Hind III- Verdau.

Bei dem Filter handelt es sich um eine Rehybridisierung des in Abb. 4 verwendeten Filters. Die Markierung der Proben erfolgte durch Nick-Translation mit α -³²P-dCTP.

A: Als Hybridisierungsprobe wurde ein ³²P-markiertes, 1,6 kb Hind III- Fragment aus dem Cosmid cos 9-5 RC2 (von Dr. Kaina aus der T70- Cosmidbank isoliert), bzw. die C-81 cDNA verwendet.

B: Restriktionskarte der im Bluescript-Vektor vorliegenden C-81 cDNA .

Aufgrund von Instabilitäten aller klonierten Cosmide war deren vergleichende Analyse auf der Basis von Restriktionskartierungen nicht möglich. Um trotzdem die Aussage zu verifizieren, daß unabhängig voneinander identische Cosmidfragmente kloniert wurden, wurden RFLP-Analysen durchgeführt. Verwendet wurden dazu die Cosmide, die die deutlichste Resistenzvermittlung in Transfektionsexperimenten ergeben hatten, nämlich cos 3.3.d (von mir aus der T60-Cosmidbank isoliert) und cos 9-5 RC2 (von Dr. Kaina aus der T70- Cosmidbank isoliert).

Das in Abb. 9 dargestellte Ergebnis zeigt, daß die Cosmide cos 3.3.d und cos 9-5 RC2 in mehreren Restriktionsverdauungen in ihrer Größe identische, mit C-81 kreuzhybridisierende Fragmente aufweisen. Eine Übereinstimmung in der Länge aller Restriktionsfragmente war nicht zu erwarten, da die sekundären Transfektanten, aus denen die Cosmidbanken hergestellt wurden, mehrmals mit Mutagenen selektioniert worden waren; zufällige Entstehung oder Verlust von Restriktionsschnittstellen sind somit leicht erklärbar.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß auf zwei unterschiedlichen Wegen (vgl. Abb. 3) miteinander kreuzhybridisierende und damit sehr wahrscheinlich identische, Alkylantien- sowie 6-Thioguanin- Resistenz vermittelnde Sequenzen kloniert wurden. Die Tatsache einer mehrmaligen, unabhängig voneinander erfolgten Klonierung offenbar identischer menschlicher DNA-Fragmente unterstützt die Annahme, daß die Alkylantienresistenz in den Transfektanten durch Expression der klonierten DNA bewirkt wird. Auf dieser Erklärungsgrundlage werden auch die unter 2. beschriebenen Übereinstimmungen im Phänotyp zwischen den Transfektanten T38, T60 und T70 verständlich.

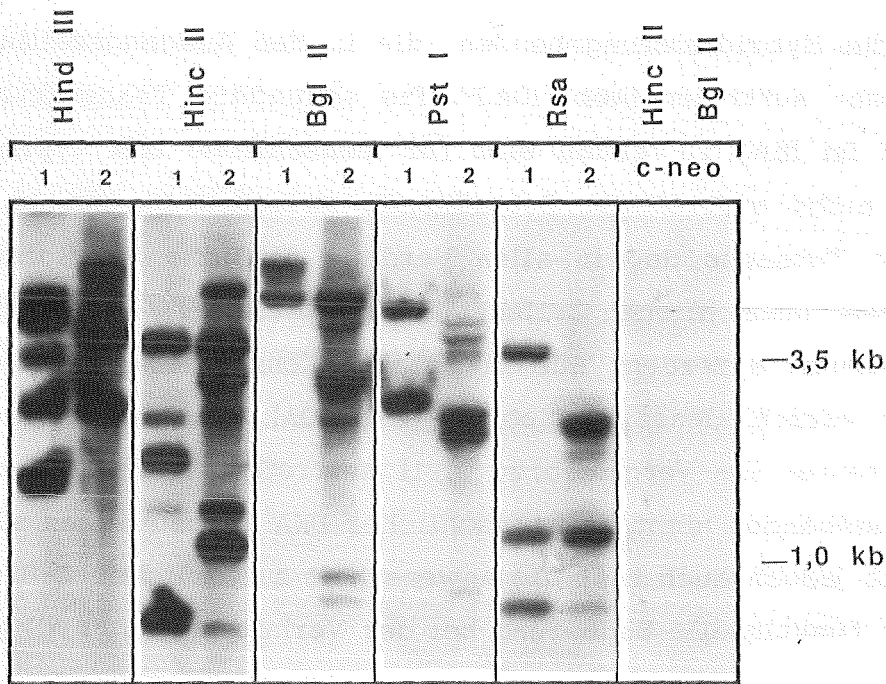


Abb. 9: Vergleichende Southern-Analyse der Cosmide *cos 3.3.d* (2) und *cos 9-5 RC2* (1).

Zum Restriktionsverdau wurden jeweils 1 μ g Cosmid-DNA eingesetzt. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte über ein 0,8 % Agarose Gel. Als Hybridisierungsprobe wurde die gesamte, durch "Random priming" 32 P-markierte C-81 cDNA eingesetzt. *cos 3.3.d* stammt aus der T60-Cosmidbank, *cos 9-5 RC2* aus der T70-Cosmidbank.

2.5. Vorhandensein und Expression von C-81 Sequenzen in menschlichen Zellen, Hamsterzellen sowie Transfektanten

Falls die Annahme, daß die klonierten C-81-Sequenzen bei der Vermittlung von Alkylantienresistenz eine Rolle spielen zutrifft, sollten solche Sequenzen auch in den primären und sekundären Transfektanten T38, T60 und T70 vorhanden sein.

Wie nach Hybridisierung genomischer DNA mit C-81 erkennbar wurde, zeigen sowohl die primäre Transfektante T38, als auch die sekundären

Transfektanten T60 und T70 , sowie die Cosmidtransfektanten Id-2 und La-2 zusätzliche Hybridisierungsbanden, die in den Ausgangszelllinien 27-1 und CHO-9 nicht auftreten (Abb. 10A,B). Die sekundäre Transfektante T70 weist hierbei im Hinc II-Verdau eine für menschliche DNA typische, bei Hamster-DNA nicht auftretende Doppelbande zwischen 10 und 15 kb auf (Abb. 10A). Die Tatsache daß in allen Verdaus ähnliche Hybridisierungsmuster zwischen menschlichen Zellen und Hamsterzellen festgestellt werden konnten, deutet außerdem auf eine starke Konservierung des Gens für C-81 zwischen verschiedenen Spezies hin (Abb. 10A). Wenngleich die bei den 27-1-Transfektanten (im Vergleich zu 27-1) auftretenden zusätzlichen C-81 Hybridisierungsbanden nicht bei menschlicher DNA nachzuweisen sind (Abb. 10B), so deutet jedoch auch hier die Anwesenheit zusätzlicher C-81-Sequenzen auf deren funktionelle Bedeutung bei der Vermittlung von Alkylantienresistenz hin.

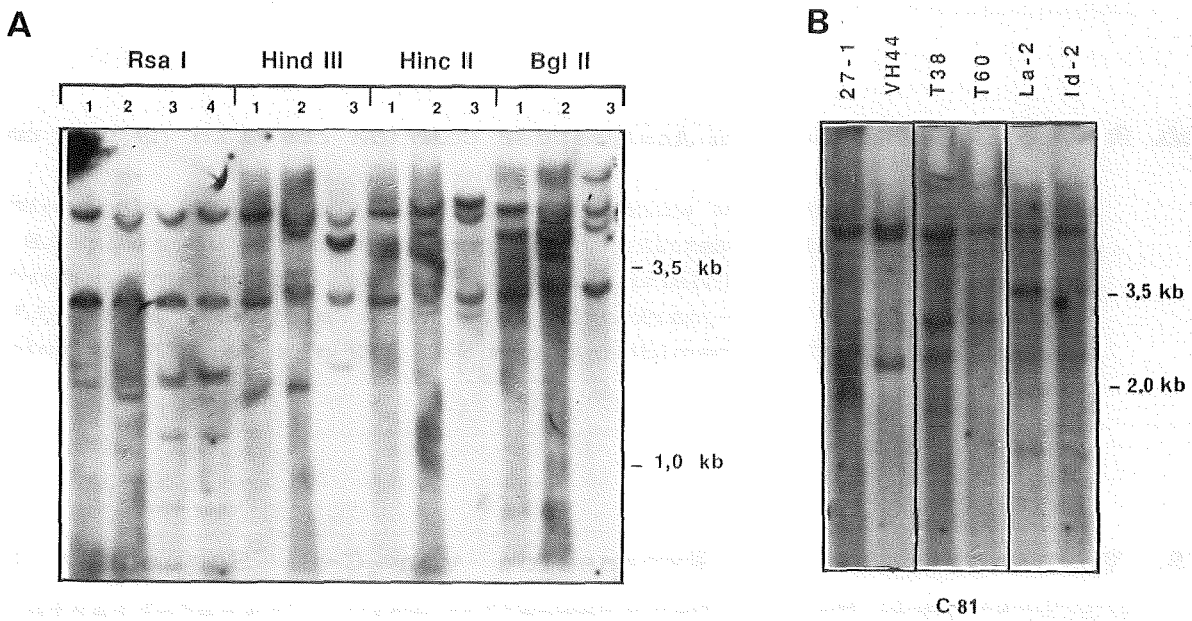


Abb. 10: Southern-Analyse menschlicher Zellen, Hamsterzellen sowie transgener Zelllinien zum Nachweis von C-81-Sequenzen.

Zum Restriktionsverdau wurden 10 µg genomische DNA eingesetzt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über ein 0,8 % Agarose Gel. Zur Hybridisierung wurde ein ³²P-markiertes 0,9 kb großes Hind III - Hinc II Fragment aus C-81 eingesetzt.

A: Vergleichende Southern-Analyse von CHO-9 Hamster DNA (1), DNA aus der transgenen Zelllinie T70 (2) und menschlicher DNA (VH44 (3) bzw. GM637 (4)).

B: Southern-Analyse von 27-1 Transfektanten nach Hinc II-Verdau.

Zum Nachweis der Expression von C-81-Sequenzen wurden zunächst Northern-Blot Analysen durchgeführt. Dabei diente eine wiederholte Hybridisierung zum Nachweis der GAPDH - mRNA (GAPDH stellt ein "housekeeping" Gene dar) als Kontrolle zur Bestimmung der aufgetragenen mRNA-Mengen.

Auf der Ebene der Expression zeichnen sich menschliche Zellen durch das Auftreten von insgesamt 3 Hybridisierungsbanden im Bereich der 18S und 28S RNA aus (Abb. 11A). In Hamsterzellen (27-1, CHO-9) war demgegenüber die Expression der beiden 2-2,5 kb großen, mit C-81 hybridisierenden mRNA Spezies nicht eindeutig nachweisbar (Abb. 11B). Unter Berücksichtigung der GAPDH-Kontrollhybridisierung exprimieren menschliche Zellen außerdem bedeutend höhere Mengen an C-81-Sequenzen (Abb. 11B). Für die 27-1 Transfektanten T38 und T60, nicht jedoch für T70, konnten im Rahmen dieser Northern-Blot Analysen zusätzliche C-81-Hybridisierungsbanden im Bereich der 18S RNA nachgewiesen werden (Abb. 11B). Letzteres spricht für eine im Vergleich zu 27-1 erhöhte Expression von C-81-spezifischen Sequenzen in den 27-1-Transfektanten.

Aufgrund der relativ schwachen Expression von C-81-Sequenzen in den Hamsterzellen wurde im folgenden mittels der weitaus sensitiveren PCR-Methode untersucht, inwieweit Hamsterzellen bzw. Transfektanten spezifisch C-81-Sequenzen exprimieren. Nach PCR-Amplifikation von C-81-Sequenzen konnten sowohl bei menschlichen HeLa-Zellen als auch bei Hamsterzellen PCR-Produkte der erwarteten Länge (1,2 kb) gefunden werden (vgl. Sequenzanalyse Abb.12). Der Nachweis der Spezifität der PCR-Produkte erfolgte durch nachfolgende C-81-Hybridisierung. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß Hamsterzellen nicht völlig defekt bezüglich der C-81-Expression sind und sowohl menschliche Zellen, als auch die Transfektanten T38 und T70 eine im Vergleich zu 27-1- bzw. CHO-9-Zellen eine erhöhte C-81-Expression aufweisen (Abb. 11C). Wegen der schwierigen Quantifizierung von PCR-Reaktionen ist eine präzise quantitative Aussage jedoch nicht möglich.

Insgesamt deuten die dargestellten Ergebnisse darauf hin, daß die erhöhte Alkylantienresistenz in den Transfektanten wahrscheinlich auf eine verstärkte C-81-Expression zurückzuführen ist (siehe auch Diskussion).

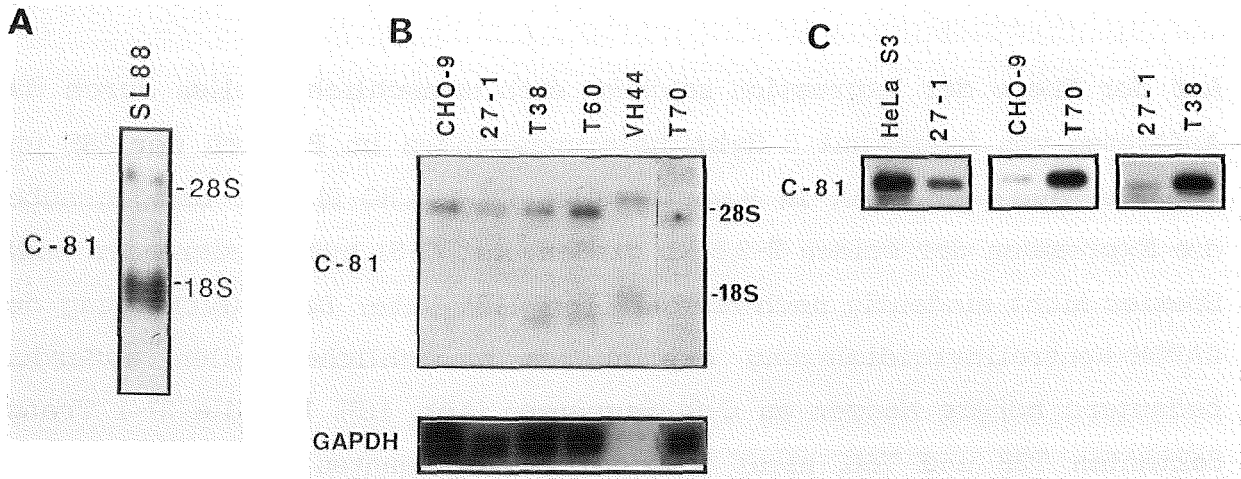


Abb. 11: C-81- Expression in menschlichen Zellen, Hamsterzellen sowie transgenen Zelllinien.

Als Hybrisierungsprobe wurde ein ^{32}P -markiertes ("Random priming") 0,9 kb Hind III-Hinc II Fragment von C-81 verwendet.

A: Northern-Analyse. Aufgetragen wurden 5 μg Poly(A) $^{+}$ -RNA einer diploiden menschlichen Fibroblasten-Zelllinie (SL 88). Die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte über ein 1 % Agarose-Gel.

B: Northern Analyse nach Auftrennung von 5 μg Poly(A) $^{+}$ - RNA aus menschlichen Zellen (VH44), Hamsterzellen (CHO-9, 27-1) und Transfektanten (T38, T60, T70) über ein 1 % Agarose Gel.

C: Southern-Analyse nach PCR-Amplifikation von C-81-Sequenzen. 2 μg Poly(A) $^{+}$ - RNA wurden zur cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase eingesetzt. 1/10 dieses Reaktionsvolumens wurde für die PCR-Reaktion verwendet (30 Cyclen, Denaturierung für 1 min bei 94 $^{\circ}\text{C}$; Hybridisierungstemperatur 60 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; Polymerisation bei 72 $^{\circ}\text{C}$ für 3 min). 20 μl (bzw. nur 2 μl bei HeLa S3) aus dieser Reaktion wurden über ein 1 % Agarose Gel aufgetrennt, die PCR-Produkte auf eine Nylonmembran transferiert und zur Identifizierung C-81 spezifischer Sequenzen mit C-81 hybridisiert. Zur PCR wurden folgende Oligonukleotide (24 mere) verwendet: Oligo 1: TCT GCC TAG TCC TGG AGC TGT GCG (Position 187-211); Oligo 2: TCT AAA GAG CTG GAC TGC AAC TAA (Position 1443-1467). Die Positionsangaben beziehen sich auf die in Abb. 12 dargestellt C-81 Sequenz.

2.6. Resistenzvermittlung durch C-81

Um zu prüfen, ob die klonierte cDNA auch funktionell wirksam ist, d.h. Alkylantienresistenz zu vermitteln vermag, wurde sie gerichtet in einen eukaryontischen Expressionsvektor (pSVT7) umkloniert (vgl. Abbildung in Tab. 2).

Quantitative Transfektionen mit diesem C-81-Expressionskonstrukt (als Cotransfektion mit pSV2neo) in CHO-9- und 27-1-Zellen mit anschließender MNNG- bzw. MMS-Selektion der G418 resistenten Zellen ergaben, daß C-81 eine schwache, aber deutlich protektive Funktion gegenüber der toxischen Wirkung der eingesetzten Alkylantien (MNNG, MMS) ausübt (Tab. 2).

Die mit dem C-81 - Expressionsplasmid transfizierten Zellen überlebten die Mutageneselektion 2-10 mal häufiger als die Kontrolltransfektanten (pSVT7-Vektor + pSV2neo, Tab. 2). Eine MNNG- bzw. MMS-Selektion (analog zum in Tab. 2 dargestellten Selektionsschema) von G418 resistenten Transfektanten, bei denen die C-81-cDNA in Antisense-Orientierung in den pSVT7-Vektor kloniert worden war (Bam HI - Xho I-Fragment (C-81) in Bam HI - Sac I - Stelle des Polylinkers von pSVT7) zeigten eine im Vergleich zu den Kontrolltransfektanten um ca. 50 % reduzierte Überlebenshäufigkeit. Die Expression von C-81- Antisense- RNA führte also nicht zu einer erheblichen Sensitivierung der Transfektanten gegenüber den verwendeten Alkylantien. Allerdings unterstreichen die unter Verwendung des Antisense-Konstrukts erhaltenen Ergebnisse das positive Ergebnis einer Resistenzvermittlung durch das C-81-Sense -Expressionskonstrukt.

Erklärungsmöglichkeiten für die wider Erwarten geringe Frequenz der Resistenzvermittlung durch das C-81-Sense-Expressionskonstrukt werden im Diskussteil gegeben.

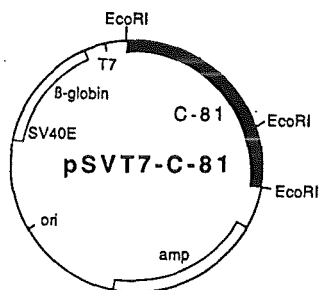
Tab. 2: MNNG- und MMS-Resistenzvermittlung von pSVT7- C-81 nach stabiler Transfektion in Hamsterzellen.

Die Transfektion erfolgte als Cotransfektion mit pSV2neo als Markerplasmid. Zur Transfektion wurden 1 µg pSV2neo + 7,5 µg pSVT7-C-81 (bzw. pSVT7-Vektor bei der Kontrolltransfektion) + 10 µg Heringssperma-DNA (Carrier) eingesetzt.

A : pSVT7-C-81-Expressionskonstrukt (schematische Darstellung). Die Klonierung der C-81 cDNA in das Expressionsplasmid erfolgte gerichtet unter Verwendung der NotI-SalI-Schnittstellen des pSVT7 Polylinkers bzw. des die C-81 cDNA enthaltenden Bluescript-Vektors.

B : 6-8 h nach Ausplattieren von 10^5 G418 resistenten Zellen / 10 cm Platte wurden die Zellen mit MNNG (12,5 µM; CHO-9) bzw. MMS (0,125 mM; 27-1) behandelt und die Zahl der überlebenden Klone 10 d später bestimmt.

A



B

Versuch Nr.	Kontrolltransfektion (Überlebende/ 10^5 Zellen)	pSVT7-C-81-Transfektion (Überlebende/ 10^5 Zellen)	Faktor
<u>CHO-9</u>			
1	2,7	15,5	5,7
2	7,2	68,3	9,5
3	0,6	4,0	6,7
4	0,7	7,0	10,0
<u>27-1</u>			
1	6,2	29,4	4,7
2	6,4	10,5	1,7
3	0,8	6,3	7,8
4	1,2	3,6	3,0

Die nach MNNG- bzw. MMS-Behandlung isolierten C-81-Transfektanten wiesen ebenso wie die Cosmidtransfektanten (vgl. Abb 7) Kreuzresistenz gegenüber 6-TG auf. Um zu prüfen, ob die isolierte cDNA direkt 6-TG Resistenz vermittelt, oder ob die erwähnte 6-TG-Resistenz lediglich eine Folge der vorausgegangenen Alkylantienbehandlung ist, wurden CHO-9-C-81-Transfektanten direkt mit 6-TG (2 µg/ml) behandelt. Es zeigte sich, daß, im Vergleich zu Kontrolltransfektanten, 5-7 mal mehr C-81-Transfektanten diese 6-TG-Selektion überlebten (Ergebnis von 3 Versuchen). Gleichzeitig wiesen die auf diese Weise isolierten CHO-9-Transfektanten Kreuzresistenz gegenüber MNNG auf. Damit stimmen diese Ergebnisse mit den vorher dargestellten Befunden einer mit Alkylantienresistenz gekoppelten 6-TG-Resistenz bei den Cosmidtransfektanten überein (vgl. Abb. 6,7) und deuten auf die gleichzeitige Vermittlung von Alkylantien- und 6-TG-Resistenz durch C-81-Expression hin.

2.7. Sequenzanalyse von C-81

Die Sequenzierung der C-81- cDNA ergab die in Abb. 12 dargestellte Sequenz. Die Computeranalyse ergab, daß die cDNA einen offenen Leserahmen von 1227 bp enthält und für ein aus 409 Aminosäuren bestehendes Protein codieren kann.

```
CGGCACGAG
CGGCACGAGCGGCACGAGCGGCACGAGGGTCATCAGTGTCTTTGACCCAGGTCCAGCGAGCCTTTTCCCTGG
TGTTCAGCTGTTGTTGTACCGCCGCCGTCCGCCCGTCCGCCCTGCTCTGCGGGGTC141ATGGTGTGCTTCCGCCCT
M V C F R L
CTTCCGGTTCGGCTCA GGGCTCAGGCTCGTTCTGGTCTGCTTAGTCCCTGGGAGCTGTGCGGTCTTATGCATTGGAAC309
F R F R S G L R L V L V C L V L G A V R S Y A L E L
TAATTTGACAGATTGAGAAAATGCCACTTGCCTTTATGCAAAAATGGCAGATGAATTTACAGTAGGCTATGAAACTA
N L T D S E N A T C L Y A K W Q M N F T V G Y E T T
CAAATAAAACTTATAAACTGTAACCATTTGACACCATGGCAGTGTGACATATAATGGAAGCATTGTGCGGGATGA
N K T Y K T V T I S D H G T V T Y N G S I C G D D
TCAGAATGGTCCCAAAAATACGAGTGCAGTTCGGACCTGGCTTTTCCCTGGATTCGAATTTTACCAAGGCAGCATCTA
Q N G P K I A V Q F G P G F S W I A N F T K A A S T
```

CTTATTCAATTGACAGCGTCTCATTTTCTACAACACTGGTGATAACACAACATTTCTGATGCTGAAGATA⁵⁴⁰AGGA
Y S I D S V S F S Y N T G D N T T F P D A E D K G
ATTCTTACTGTTGATGAACTTTTGGCCATCAGAATTCCATTGAATGACCTTTTTAGATGCAATAGTTTATCAACTTTGG
I L T V D E L L A I R I P L N D L F R C N S L S T L E
AAAAGAATGATGTTGTCCAACACTACTGGGATGTTCTTGTACAAGCTTTTTGTCCAAAAATGGCACAGTGAGCACAAA
K N D V V Q H Y W D V L V Q A F V Q N G T V S T N
TGAGTTCCTGTGTGATAAAGACAAA ACTTCAACAGTGGCACCACCACATACAC ACCACTGTGCCATCTCCTACTAC⁷⁶⁷
E F L C D K D K T S T V A P T I H T T V P S P T T
AACACCTACTCCAAAGGAAAAACCAGAAGCTGGAACCTATTTCAGTTAATAATGGCAATGATACTTGTCTGCTGGC
T P T P K E K P E A G T Y S V N N G N D T C L L A
TACCATGGGGCTGCAGCTGAACATCACTCAGGATAAGGTTGCTTCAGTTATTAACATCAACCCCCAATACAACCTCA
T M G L Q L N I T Q D K V A S V I N I N P N T T H
CTCCACAGCAGCTGCCGTCTCACATGCTCTACTT AGACTCAATAGCAGCACCATTAAGTATCTAGACTTTTGTCTTTG⁹⁹⁷
S T A A A V S H A L L R L N S S T I K Y L D F V F A
CTGTGAAAAATGAAAACCGATTTTATCTGAAGGAAGCGAACATCAGCATGTATTTGGTTAATGGCTCCGTTTTTCAGC
V K N E N R F Y L K E A N I S M Y L V N G S V F S
ATTGCAAATAACAATCTCAGCTACTGGATGCCCCCTGGAAGTTCTTATAATGTGCAACAAAGAGCAGACTGTTTCA
I A N N N L S Y W M P P G S S Y M C N K E Q T V S
GTGCTGGAGCATTTCAGATAAATACCTTTGATCTAAGGGTTCAGCCTTTC AATGTGACACAAGGAAAGTATTCTAC¹²³⁶
V S G A F Q I N T F D L R V Q P F N V T Q G K Y S T
AGCCCAAGAGTGTTCCTGGATGATGACAGGATTCTAATCCCAATTATAGTTGGTGTGGTCTTTTCAGGCTTGATTAT
A Q E C S L D D D R I L I P I I V G A G L S G L I I
CGTTATAGTGATTGCTTACGTAATTGGCAGAAGAAAAAGTTATGCTGGATATCAGACTCTG¹³⁶⁸TAACACTAATACGTGAT
V I V I A Y V I G R R K S Y A G Y Q T L STOP
CTCTGTACAAAAGAAAAAGCAAGTACAAGTTCCAACATGCAATACTGGTCAACTTAAGGTATATTTAGTTGCAGTC¹⁵³⁶
CAGCTCTTTAGAAATGGGTGGTATGGGGGATTTCAAACCTTAAACAAAAAACTATCAACTACAAATTAGTTGCCTGACT
TTGGTTTTTCCAACCAAGCA¹⁷⁷⁰ATTTTAAACTGTTATTTTTTACAGCAAAAAGATGTGCAAAAATCACTGGATTATAAGTT
CTATTTTACTGTCTTGAATTAGTATTTTCAGTGTTCATTTTACTACTAAAAATACTCCGTTTAGAAAAACAAGTTTTTC
AAAAGAGATTTTTTCTGCAGGTAGTTGAGTTGGAACAACATGTTCTACCGTGGATTTGACTTGTCTCTTTTGTCTC

Abb. 12: Nukleotidsequenz der menschlichen cDNA für C-81 sowie der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz des Proteins.

Zur Sequenzanalyse wurden beide Stränge sequenziert. Die erste Sequenzierung erfolgte vom 3'-Ende (poly-A-Schwanz) her durch Herstellung von ExoIII- Deletionen; zur Verifizierung dieser Sequenz wurden unter Verwendung der Erststrangsequenzierung Oligonukleotide zur Sequenzierung des 2. Stranges hergestellt.

- : Start- und Stoppcodon
- == : Polyadenylierungssignal

Ein Vergleich der ermittelten Sequenz mit in der EMBL-Datenbank gespeicherten Sequenzen ergab eine hohe Homologie von C-81 mit dem menschlichen lysosomalen Membranglykoprotein Lamp 2. Auf Nukleotidebene beträgt die Homologie bis zur Position 1243 über 99 %, dann nur noch 80 %. Auf Proteinebene liegt die Homologie bei insgesamt 91,6 % (Abb. 13A,B). Der hier isolierte cDNA Klon codiert also für ein dem Lamp 2 -Protein homologes, aufgrund eines unterschiedlichen C-Terminus aber nicht identisches Protein. Entweder sind lamp-2 und C-81 unterschiedliche Spliceprodukte des gleichen Gens, oder aber sie stellen 2 unterschiedliche Gene dar. Einen Vergleich der Proteinsstruktur zwischen Lamp 2 und C-81 zeigt Abb. 13B.

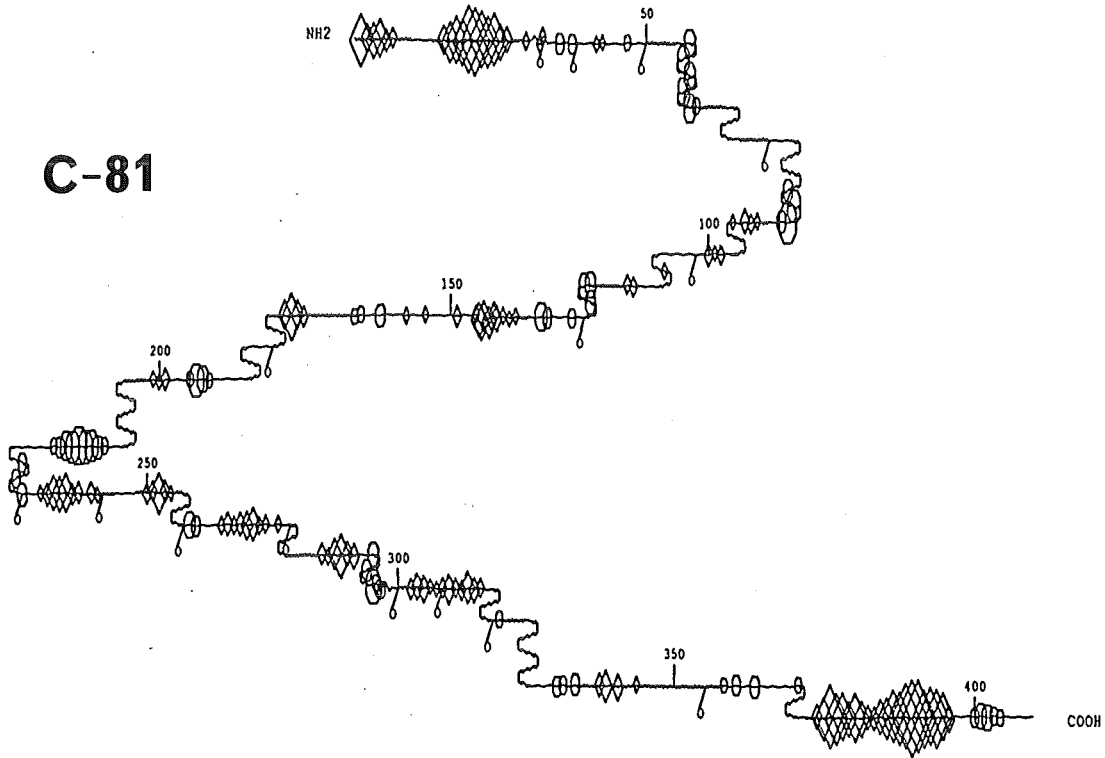
```

C-81      - 1 MVCFRLEFRFRSGLRLVLVCLVGLGAVRSYALELNLTDSENATCLYAKWQMN 50
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Lamp 2-   1 MVCFRLEFPV.PGSGLVLVCLVGLGAVRSYALELNLTDSENATCLYAKWQMN 49
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          51 FTVGYETTnkTYKtVtISDHGtVtYNGsICGDDQNGPKIAVQFGPGFSWI 100
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          50 FTvryETTnkTYKtVtISDHGtVtYNGsICGDDQNGPKIAVQFGPGFSWI 99
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          101 ANFTKAAsTYSIDSVsFSYNTGDNTtFPDAEDKGIltVDELLAIRIPLND 150
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          100 ANFTKAAsTYSIDSVsFSYNTGDNTtFPDAEDKGIltVDELLAIRIPLND 149
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          151 LFRcNSLSTLEKNDVvQHYWdVlVQAFVQNGtVStNEFLCDKDKtStVAP 200
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          150 LFRcNSLSTLEKNDVvQHYWdVlVQAFVQNGtVStNEFLCDKDKtStVAP 199
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          201 TIHTtVpSPTtTPtPkEPEAGtYsVnNGNDtCLLAtMGLQlNItQDKVA 250
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          200 TIHTtVpSPTtTPtPkEPEAGtYsVnNGNDtCLLAtMGLQlNItQDKVA 249
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          251 SVININpNtThStAAVSh.AllRlNSStIKYlDFvFAVKnENRfYLKEA 299
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          250 SVININpNtThStGScRShTAlLRlNSStIKYlDFvFAVKnENRfYLKEV 299
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          300 NISMYLVNGSVFSIANNnLSYwMPPGSSyMcnKEQTVsVSGAFQINTFDL 349
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          300 NISMYLVNGSVFSIANNnLSYwMPP.SSyMcnKEQTVsVSGAFQINTFDL 348
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          350 RVQPFNVtQgKYStAQECsLDDDRILiPIiVgAGLSGLiiViViAYViGR 399
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          349 RVQPFNVtQgKYStAQDCsADDDNFlVPIAvGAALAGVLlLVLLAYFiGL 398
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          400 RKSYAGYQTL*H 411
          .. .|||: |:
          399 KHHHAGYEQF*N 410

```

Abb. 13: Vergleich des von C-81 codierten Proteins mit dem Lamp2-Protein. Zur Analyse wurde ein Software-Programm (GCG sequence analysis software package (Version 7)) verwendet.
A: Aminosäurevergleich von C-81 und Lamp 2.
B: Vergleich der Sekundärstruktur von Lamp 2 und C-81 (nächste Seite). Grundlage dieses Vergleichs ist eine Vorhersage nach Chou-Fasman (1974).
 ◊ : Potentielle Glycosylierungsstellen
 ◇ : Hydrophober Bereich
 ○ : Hydrophiler Bereich
 |,: : Homologiegrad der Aminosäuren (abnehmend)

C-81



Lamp 2

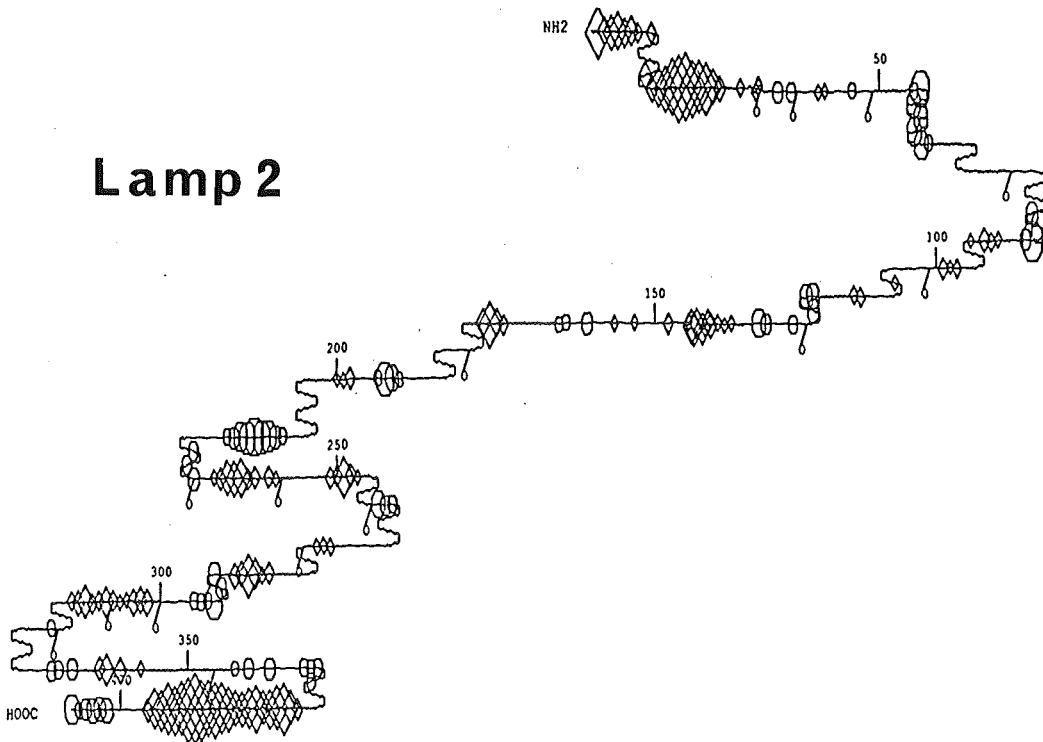


Abb. 13 B: Vergleich der Sekundärstruktur des C-81-Proteins mit der des Lamp 2-Proteins.
Die Vorhersage erfolgte nach Chou-Fasman (1974) unter Verwendung eines Software Programms (vgl. Abb. 13A)..

2.8. Expression von C-81 nach Mutagenbehandlung

HeLa S3-Zellen wurden mit verschiedenen MNNG- bzw. MMS- Konzentrationen behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten RNA extrahiert. Unter den gewählten Bedingungen konnte kein eindeutiger Anstieg der C-81 mRNA-Mengen festgestellt werden (Abb. 14). Die densitometrische Auswertung der Ergebnisse zeigte eine nur geringfügige Erhöhung der C-81-Expression 2 h nach MNNG bzw. MMS-Behandlung (150 % im Vergleich zur Kontrolle). Solche schwachen Abweichungen von nicht mutagenbehandelten Kontrollen werden im Rahmen dieser Arbeit jedoch als nicht signifikante Schwankungen bewertet (vgl. dazu auch in Kap. 4 dargestellte densitometrische Analysen). Nach den vorliegenden Ergebnissen wird C-81 konstitutiv exprimiert.

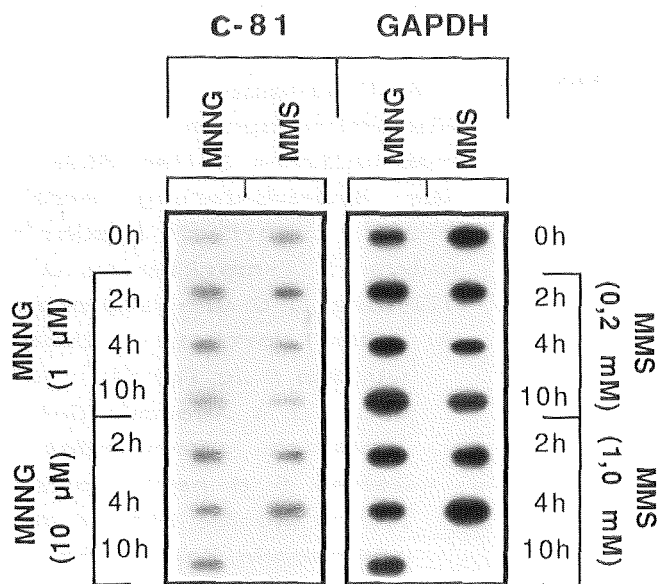


Abb. 14: Fehlende Induzierbarkeit der C-81 Expression nach Mutagenbehandlung von HeLa S3 Zellen.

Logarithmisch wachsende HeLa S3 Zellen wurden mit verschiedenen Mutagenkonzentrationen behandelt und nach verschiedenen Zeiten (2-10 h) Gesamt-RNA präpariert. 2 µg der Gesamt-RNA wurden mittels einer Slot-Blot Apparatur (BRL) auf Nylonfilter fixiert und anschließend mit ³²-P-markiertem C-81 (0,9 kb Hind III-Hinc II-Fragment) hybridisiert. Zur genauen vergleichenden Analyse wurde eine Kontrollhybridisierung (Rehybridisierung des gleichen Filters) mit GAPDH (0,9 kb Eco RI-Fragment) durchgeführt.

2.9. Abhängigkeit der C-81 Expression vom Wachstumszustand diploider menschlicher Fibroblasten

Da die C-81-Expression nach Mutagenbehandlung nicht induzierbar ist, stellt sich die Frage nach dem Mechanismus der Resistenzvermittlung durch C-81. Eine mögliche Erklärung wäre die, daß das C-81 Protein Einfluß auf den Zellzyklus ausübt.

Durch Untersuchung von logarithmisch wachsenden bzw. 5 Tage konfluenten diploiden menschlichen Zellen konnte gezeigt werden, daß C-81 Sequenzen verstärkt (Faktor 4) in konfluenten Zellen exprimiert werden (Abb. 15A). In Abhängigkeit von der Zeit (12, 16, 20 und 24 h - Werte) nach Umsatz der konfluenten Zellen zeigte sich außerdem eine Veränderung der C-81-Expression (Abb. 15 B). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß C-81 in Abhängigkeit vom Wachstumszustand der Zellen exprimiert wird.

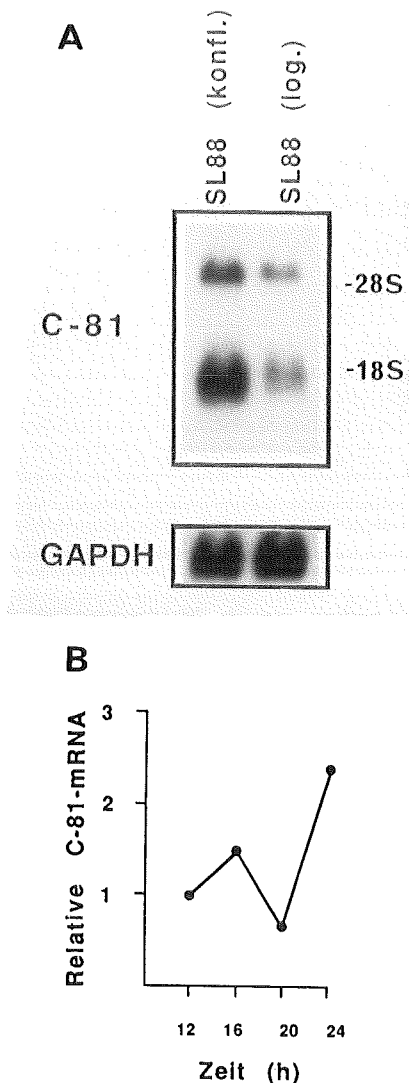


Abb. 15: C-81 Expression in Abhängigkeit vom Wachstumszustand von diploiden menschlichen Zellen (SL88).

Die Hybridisierung erfolgte, wie bereits mehrfach beschrieben, mit einem 32 P-markierten 0,9 kb Hind III-Hinc II C-81 -Fragment.

A: Zur Northern-Blot Analyse wurden 5 μ g Poly(A)⁺-RNA eingesetzt (1 % Agarose-Gel). Zur RNA Isolation verwendet wurden Zellen 5 d nach optischer Konfluenz (konfl.) bzw. logarithmisch wachsende Zellen (log.).

B: C-81 Expression verschiedene Zeiten nach Umsatz 5 d konfluenter SL 88-Zellen. Die Analyse erfolgte nach Präparation von Gesamt-RNA durch Slot-Blot Hybridisierung. Nach densitometrischer Analyse wurde die relative C-81 Expression (C-81/GAPDH) 12 h nach Umsatz gleich 1 gesetzt.

3. Untersuchung der Bedeutung der O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (MGMT) zur Vermeidung genotoxischer Effekte von Alkylantien

Da das MGMT-Protein O⁶-Alkylguanin, welches GC→AT Transitionen bewirkt, repariert, wird der MGMT antimutagene Wirkung zugesprochen (Loechler et al., 1984; Pegg, 1990). Eine protektive Funktion des MGMT-Proteins gegenüber der zum Zelltod führenden Wirkung von Alkylantien war bisher umstritten. Die toxische Wirkung der O⁶-Alkylguanin-Läsion konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Aus diesem Grunde wurde hier die Bedeutung der MGMT als anti-genotoxische Reparaturfunktion nach Alkylierung genauer untersucht. Als Endpunkte der genotoxischen Wirkung von Alkylantien wurden dabei die Zytotoxizität (gemessen anhand der Koloniebildungsfähigkeit), die Induktion von Gen-Mutationen (am HGPRT-Locus) sowie die Induktion von Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatidenaustauschen (SCE's) gewählt.

Die oben erwähnte Fragestellung wurde bearbeitet, indem isogene Zellstämme isoliert wurden, die sich lediglich in der Expression der menschlichen MGMT-cDNA unterschieden. Dazu wurde die MGMT-cDNA (Tano et al., 1990) in einen eukaryontischen Expressionsvektor (pSV2neo) umkloniert, wobei das neo-Gen des pSV2neo-Vektors durch die MGMT-cDNA ersetzt wurde (Abb. 17C). Anschließend wurden CHO-9-Zellen (Mex⁻) mit diesem Expressionskonstrukt stabil transfiziert. Da die transgenen Zelllinien sich von den Ausgangszellen nur durch das Vorhandensein der MGMT unterscheiden, können alle beobachteten biologischen Effekte auf die Anwesenheit dieser Reparaturfunktion zurückgeführt werden.

Neben der stabilen Komplementation von Mex⁻-CHO-9-Zellen durch Transfektion wurden diese auch transient, durch Mikroinjektion von mRNA, komplementiert. Dabei wurde der Einfluß verschiedener injizierter mRNA-Fractionen aus HeLa S3 (Mex⁺) auf die toxische Wirkung von HeCNU (chlorethylierendendes Agenz) getestet. Zunächst sollen die Versuche zur transienten Komplementation dargestellt werden.

3.1. Transiente Komplementation des Mex⁻ -Phänotyps

Wie in der Literatur beschrieben, zeichnen sich Mex⁻-Zellen durch eine Hypersensitivität gegenüber chlorethylierenden Agenzien aus (Fujio et al., 1989; Pegg, 1990). Durch Mikroinjektion von mRNA aus Mex⁺-Zellen (HeLa S3) in Methyltransferase defiziente CHO-9 Zellen (Mex⁻) konnte die Sensitivität dieser Zellen gegenüber HeCNU transient komplementiert werden (Abb. 16). Es konnte gezeigt werden, daß effizient nur die die MGMT-mRNA enthaltende mRNA Fraktion (Fraktion Nr. 7) den durch HeCNU gesetzten Defekt komplementieren kann (Abb. 16). Daraus folgt, daß die MGMT der wichtigste Faktor für das Überleben HeCNU behandelter Zellen ist. Das Ergebnis zeigt weiterhin, daß zur Isolierung von Mex⁺-Zellen eine Selektion auf HeCNU-Resistenz gut geeignet ist (Fritz et al., 1990).

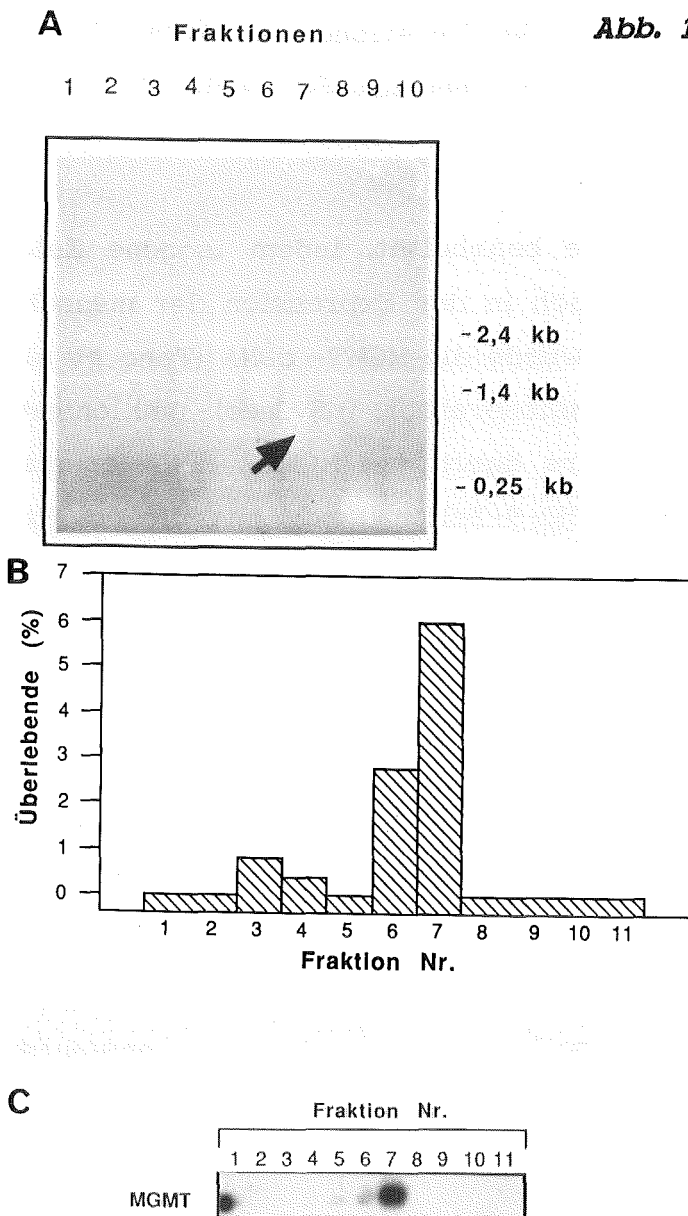


Abb. 16: Transiente Komplementation der HeCNU-Hypersensitivität von Mex⁻-Zellen (CHO-9) durch Mikroinjektion von Poly(A)⁺-RNA aus Mex⁺-Zellen (HeLa S3). Poly(A)⁺-RNA aus HeLa S3 Zellen wurde mittels eines Saccharosegradienten größenfraktioniert und die verschiedenen Fraktionen in das Cytoplasma von CHO-9-Zellen mikroinjiziert. 20 h später wurden die injizierten sowie nicht injizierte Kontrollzellen mit HeCNU (80 µM) behandelt und die Zahl der überlebenden Zellklone 7 d später ausgewertet.

A: Acridinorange gefärbtes Gel des Poly(A)⁺-Gradienten. 1-2 µg mittels Glyoxal/DMSO denaturierter mRNA wurden über ein 1 % Agarose Gel aufgetrennt.

B: Zahl der überlebenden Zellklone nach Mikroinjektion der verschiedenen mRNA-Größenfraktionen.

C: Northern-Analyse des mRNA-Gradienten. Als Probe wurde die ³²P-markierte MGMT-cDNA eingesetzt

3.2. Resistenzverhalten von MGMT stabil exprimierenden CHO-9-Transfektanten

Zur Isolierung von die MGMT stabil überexprimierenden Zellklonen wurden CHO-9- Zellen (Mex⁻) mit der in einen eukaryontischen Expressionsvektor umklonierten MGMT-cDNA (pSVMGMT; Abb. 17C) und pSV2neo cotransfiziert und die Zellen gleichzeitig auf G418- und HeCNU-Resistenz (80 µM) selektio- niert. Auf diese Weise wurden eine große Zahl stabil HeCNU-resistenter Zellklone erhalten, die im folgenden weiter untersucht wurden.

Die isolierten Klone wiesen unterschiedliche MGMT-Aktivitäten (34-1230 fmol/mg Protein) auf. Die gemessenen MGMT-Mengen lagen bei 20 000 bis 200 000 Moleküle / Zelle (Abb. 17A). Durch Northern-Blot Analysen wurde auch die Expression der MGMT-cDNA in den Transfektanten bestätigt (Abb. 17B).

Unter Verwendung eines monoklonalen MGMT-Antikörpers konnte im Labor von Dr. S. Mitra (Oak Ridge, USA) spezifisch auch das menschliche MGMT-Protein in den CHO-9-Transfektanten nachgewiesen werden (Arbeiten von Dr. B. Kaina). Diese Daten bestätigen, daß die in den CHO-9-MGMT-Transfektan- ten gemessenen MGMT-Aktivitäten (Abb. 17A) auf die Transfektion und Ex- pression der menschlichen MGMT-cDNA zurückzuführen sind. Eine zufällige Reaktivierung des endogenen Hamstergens für die Methyltransferase kann ausgeschlossen werden.

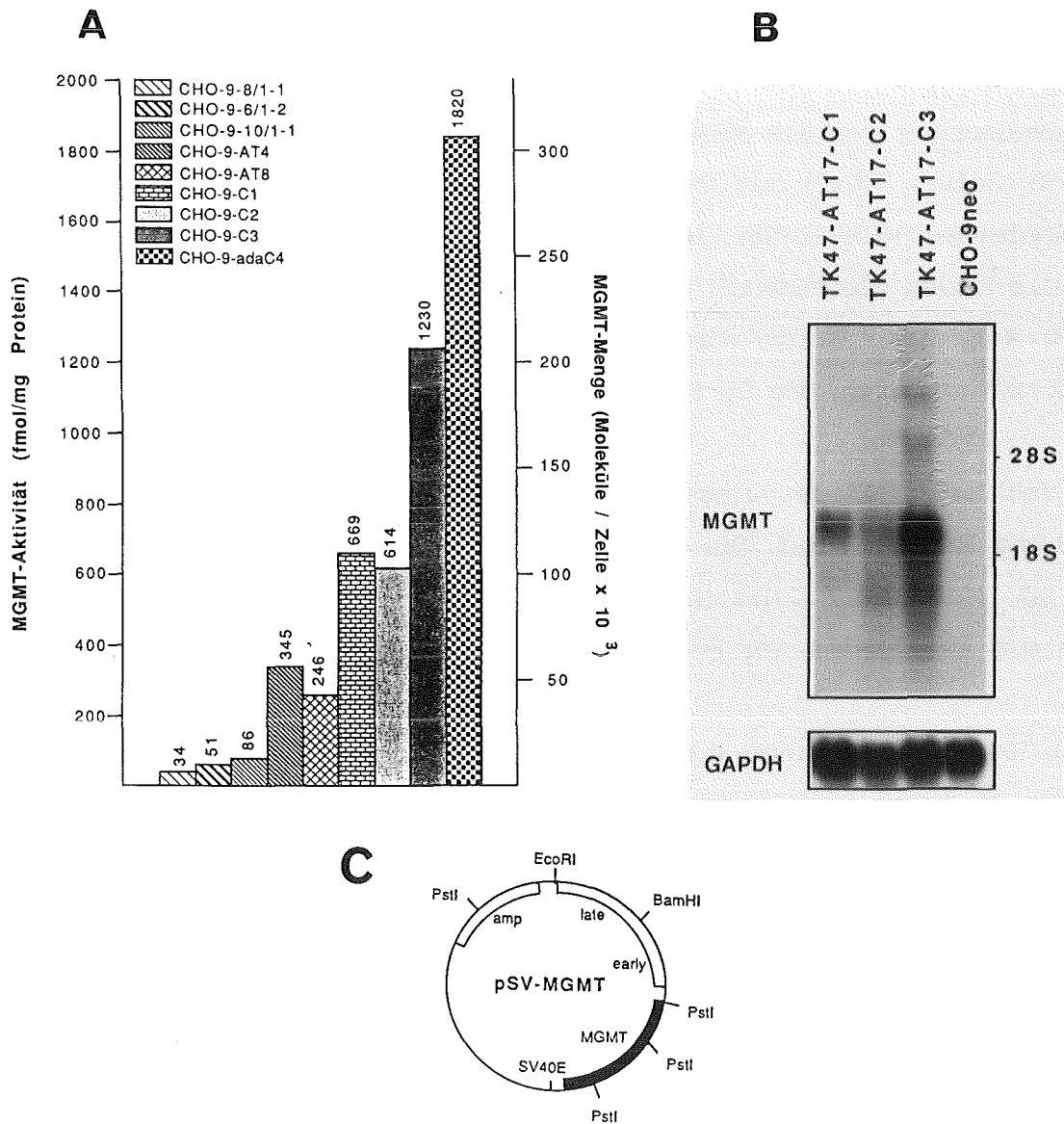


Abb. 17: MGMT-Aktivität und MGMT-mRNA-Expression in stabilen CHO-9-MGMT-Transfektanten.

CHO-9-neo: neo Kontrolltransfektante; CHO-9-adaC4: mit der bakteriellen ada-cDNA transfizierter Zellkon. Alle anderen Transfektanten enthalten die menschliche MGMT-cDNA.

A: MGMT-Aktivität der isolierten Zellklone. Zum Aktivitätstest wurden 500 µg Gesamtprotein eingesetzt.

B: Northern-Analyse einiger Zellklone mit hoher MGMT-Aktivität. 5 µg Poly (A)⁺-RNA wurden über ein 1 % Agarose Gel aufgetrennt und mit der ³²P-markierten MGMT-cDNA hybridisiert.

C: Schematische Darstellung des MGMT-Expressionskonstruks (pSVMGMT). Zur Herstellung wurde das neo-Gen des pSV2neo-Vektors (Hind III-Sma I-Fragment) durch die MGMT-cDNA (EcoRI-Fragment) ersetzt.

Nach Behandlung mit HeCNU, MNNG und MNU zeigten die MGMT-Transfektanten deutlich höhere Überlebensraten als die Mex⁻ Kontrollzellen (CHO-9 und CHO-9 neo; Abb. 18). Eine Resistenzvermittlung durch die MGMT-Reparaturfunktion erfolgte, wenn auch in geringerem Ausmaß, auch gegenüber MMS, nicht jedoch gegenüber UV und ENU (Abb. 18).

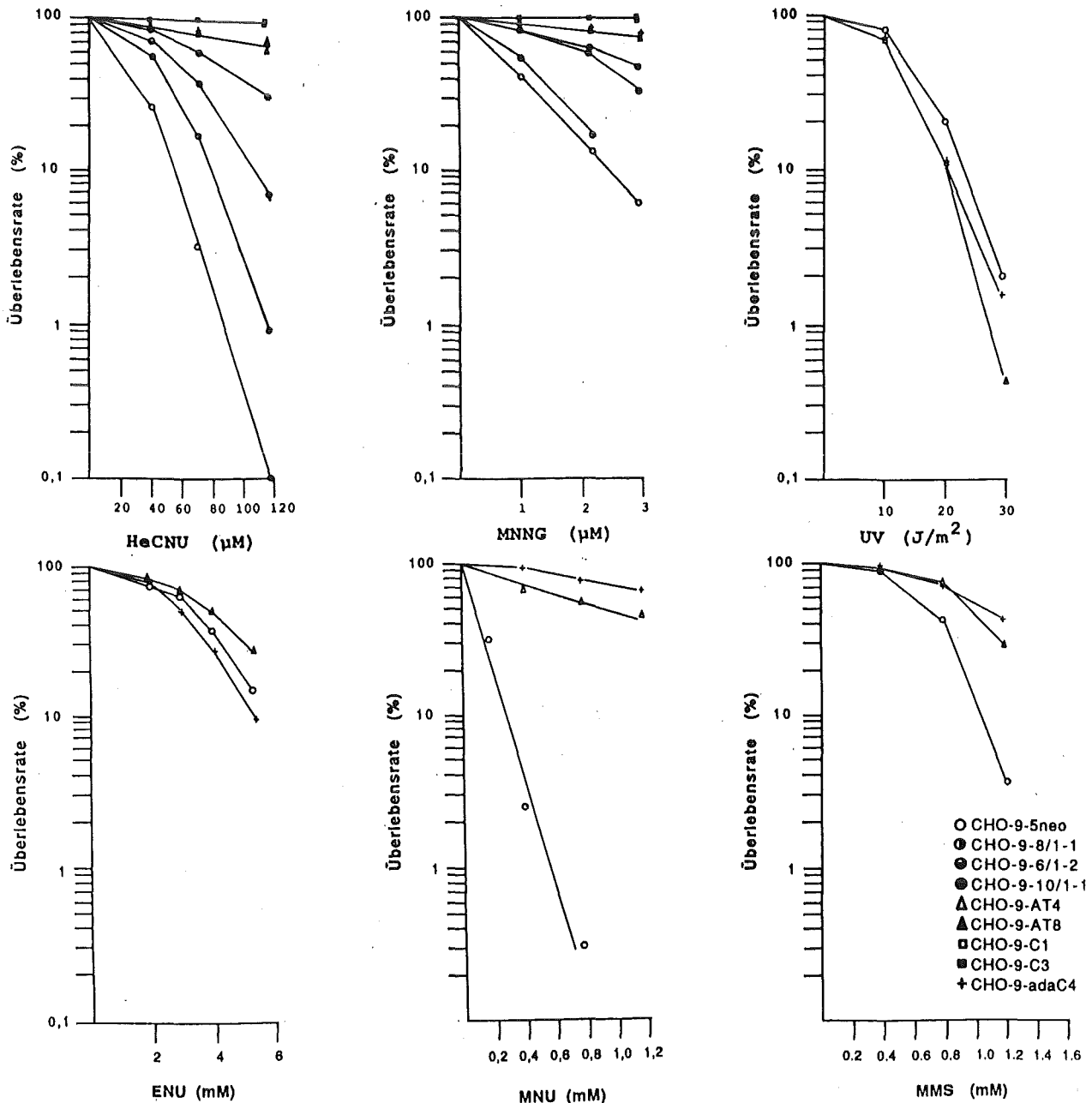


Abb. 18: Überlebensraten (Koloniebildungsfähigkeit) von stabilen CHO-9-MGMT-Transfektanten in Abhängigkeit von der Dosis verschiedener Mutagene.

Die Alkylantienbehandlung erfolgte 6 h nach Einsaat von 500 Zellen/Platte für 1 h bei 37 °C. Angegeben sind die Zahl der die Mutagenbehandlung überlebenden Klone in % zur unbehandelten Kontrolle. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen. Bezeichnung der Transfektanten: s. Abb. 17.

Die in Abb. 18 dargestellten Daten ergaben außerdem, daß ein mit der bakteriellen ada-cDNA transfizierter CHO-9-Zellklon (CHO-9-adaC4) das gleiche Resistenzverhalten gegenüber den verwendeten Mutagenen aufwies, wie die MGMT-Transfektanten. Aufgrund der Reparatureigenschaften des bakteriellen Proteins (vgl. Einleitung) läßt dies den Schluß zu, daß die von dem bakteriellen Protein zusätzlich reparierten O-Alkylierungen am Thymidin oder der Phosphodiesterbindung im Vergleich zu O⁶-Alkylguanin wahrscheinlich keine bedeutende toxische Wirkung ausüben. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, daß O⁶-Alkylguanin, induziert durch Einwirkung von MNNG, MNU, HeCNU und MMS eine bedeutende toxische Läsion ist. Erörterungen bezüglich der fehlenden protektive Wirkung der MGMT gegenüber ENU erfolgen im Diskussionsteil.

Die Auswertung der Toxizität von MNNG bzw. HeCNU (D₅₀) in Abhängigkeit von der MGMT-Aktivität der untersuchten Transfektanten ergab, daß eine deutliche positive Korrelation zwischen MGMT- Aktivität und HeCNU- bzw. MNNG-Resistenz besteht (Abb. 19). Der Verlauf der Kurve hat Sättigungscharakter. Bei MGMT-Mengen bis zu etwa 100 000 Molekülen pro Zelle zeigte sich eine lineare Beziehung zur beobachteten MNNG bzw. HeCNU-Resistenz; höhere MGMT-Konzentrationen pro Zelle haben nicht mehr die bei einer linearen Korrelation zu erwartenden protektiven Effekte (zur Interpretation siehe Diskussionsteil).

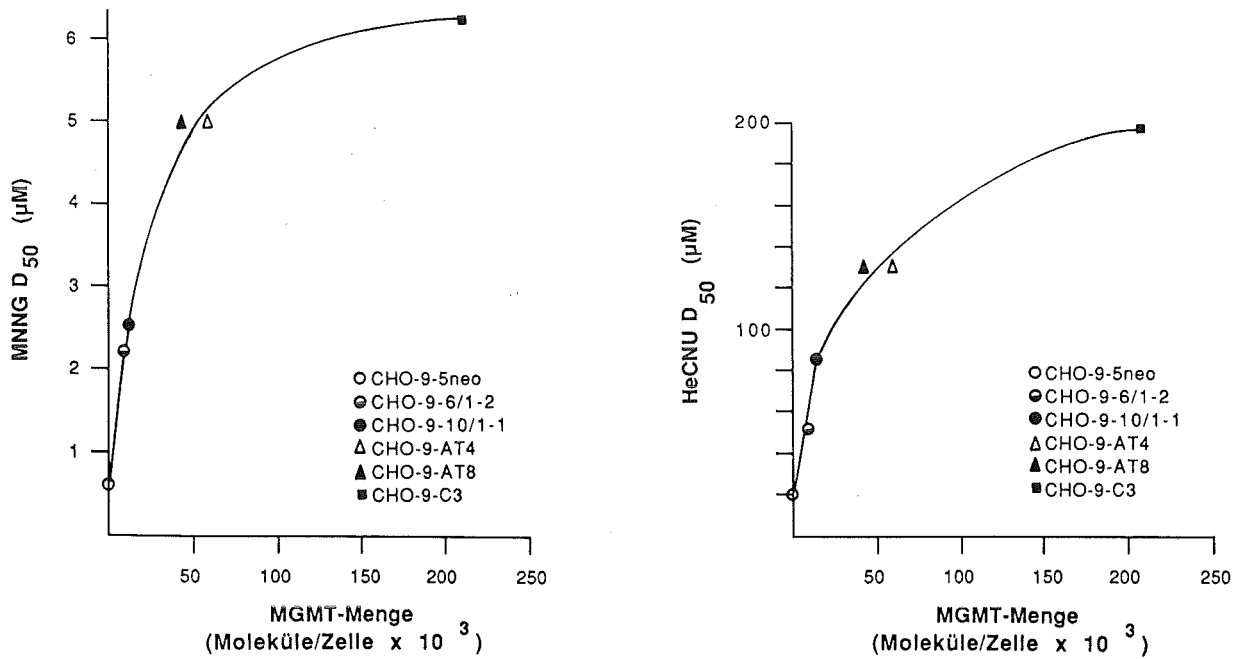


Abb. 19: Korrelation zwischen der Anzahl der MGMT-Moleküle/Zelle und dem Resistenzverhalten von CHO-9-MGMT-Transfektanten gegenüber MNGG und HeCNU.

Als Maß für die zelluläre Resistenz wurden die D₅₀-Werte, d.h. die Mutagenkonzentration, bei der 50 % der behandelten Zellen überleben, verwendet.

3.3. Einfluß der MGMT-Expression auf die Mutationsfrequenz

Einige der stabilen MGMT-Transfektanten wurden verwendet, um den Einfluß der MGMT-Expression auf die Induktion von Mutationen am HGPRT-Locus zu untersuchen.

Es zeigte sich, daß die menschliche, wie auch die bakterielle Alkyltransferase, eine deutlich protektive Funktion bezüglich der mutagenen Wirkung von MNNG und ENU ausüben (Abb. 20A). Die Mutationsfrequenzen der MGMT-Transfektanten (CHO-9-AT4, CHO-9-AT8) sowie der Ada-Transfektante (CHO-9-ada-C4) überschritten nach MNNG-Behandlung kaum den Basalwert unbehandelter Zellen, während die Kontrolle (CHO-9-neo-C5) einen deutlichen Anstieg der Mutationsfrequenz aufwies. Auch nach ENU-Behandlung zeigten die MGMT-Transfektanten eine im Vergleich zur Kontrolle 4-5 fache Reduktion der Mutationsfrequenz, wobei der Basallevel jedoch nicht erreicht wurde. Beim Vergleich der mutagenen Wirkung der in äquitoxischen Dosen eingesetzten Alkylantien MNNG und ENU zeigte sich außerdem, daß ENU das weitaus stärkere Mutagen darstellt.

Die in Abb. 20B dargestellte Korrelationsanalyse zwischen der Mutationsfrequenz nach MNNG-Behandlung und der MGMT-Aktivität ergab eine inverse Korrelation; die Zahl der Mutationen nimmt mit zunehmender MGMT-Menge pro Zelle ab. Bei 40 000 MGMT-Molekülen pro Zelle kann die Mutationsfrequenz unter den hier gewählten Bedingungen (1 μ M MNNG) um mehr als 95 % reduziert werden. Dies bedeutet, daß O⁶-Methylguanin die wesentlichste mutagene Läsion nach MNNG-Alkylierung ist, und das MGMT-Protein eine entscheidende antimutagen wirkende Reparaturaktivität darstellt.

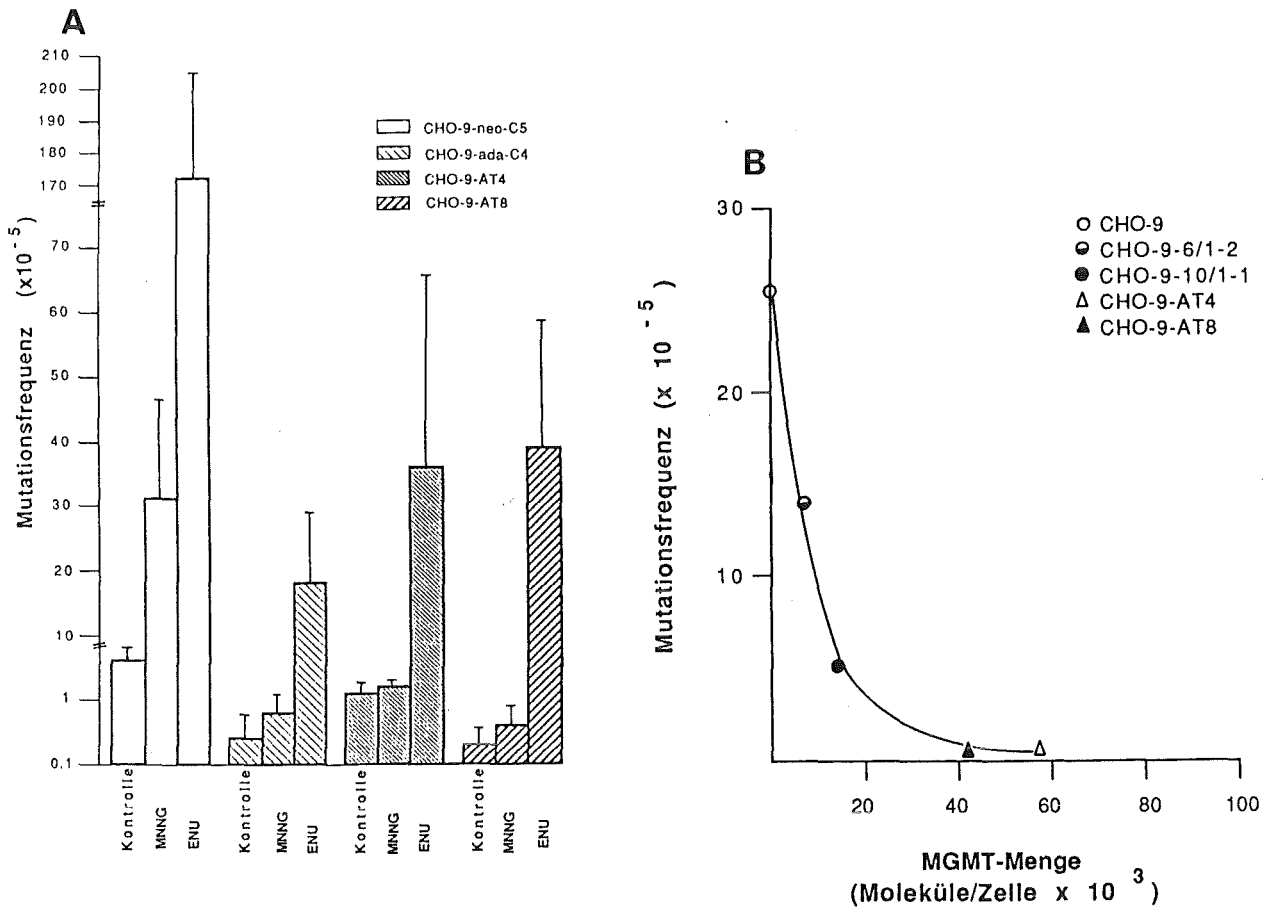


Abb. 20 Mutationsfrequenzen am HGPRT-Locus nach Behandlung verschiedener CHO-9-MGMT-Transfektanten mit MNNG und ENU. MNNG und ENU wurden in äquitoxischen Dosen (1 μ M MNNG; 2 mM ENU) eingesetzt (Überlebensrate ca. 50 %). Nach Mutagenbehandlung erfolgte kein Mediumwechsel. Die Selektion der 6-TG-resistenten Klone erfolgte nach einer Expressionszeit von 7 d mit 3 μ g 6-TG/ml Medium.

A: Dargestellt sind die Mutationsfrequenzen als Mittelwert + Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

B: Korrelation zwischen MGMT-Aktivität und induzierter Mutationsfrequenz nach MNNG-Behandlung. Die Mutationsfrequenzen stellen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen dar.

3.4. Bedeutung der MGMT bei der Entstehung von Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatidenaustauschen (SEC's)

In Anbetracht der antitoxischen und antimutagenen Wirkung des MGMT-Proteins nach Alkylierung von Zellen stellte sich die Frage, ob die Expression der MGMT auch zur Vermeidung zytogenetisch sichtbarer Veränderungen wie Chromosomenaberrationen und SCE's beiträgt. Wie in Abb. 21 dargestellt, übt die MGMT auch eine protektive Funktion gegenüber der Aberrationen und SCE induzierenden Wirkung von MNNG aus. Die MGMT-Expression führte zu einer Reduktion der Zahl der SCE's (Abb. 21A) bzw. Aberrationen (Abb. 21B) pro Zelle um mindestens 50 %. Somit stellt die O⁶-Methylguanin-Läsion nicht nur, wie oben gezeigt, einen toxischen und mutagenen, sondern auch einen clastogenen und SCE-induzierenden Schadenstyp dar.

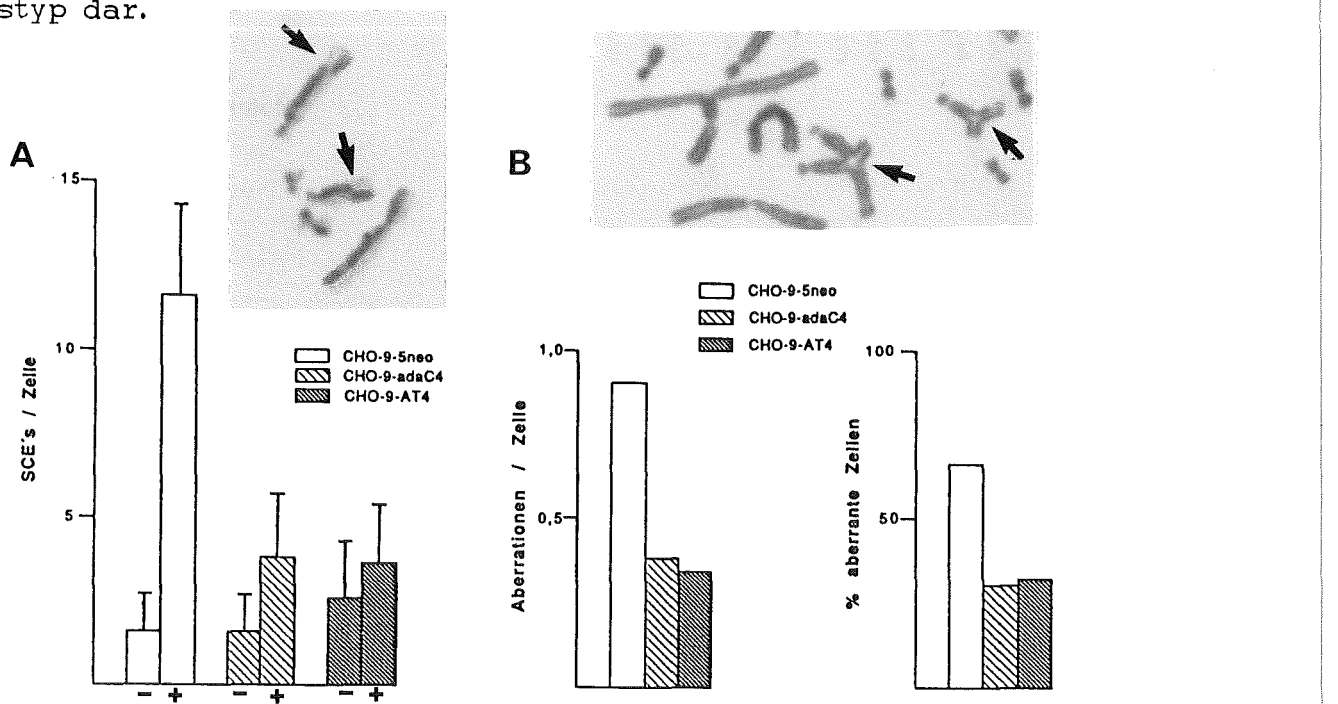


Abb. 21: Einfluß der MGMT auf die Induktion von SCE's (A) und Aberrationen (B) nach MNNG-Behandlung.

A: Die Behandlung der Zellen erfolgte für 1 h bei 37 °C mit 0,5 µM MNNG. Ausgewerte wurden 25 Metaphasen. Die Postinkubationszeit (Zeitdauer von der Mutagenbehandlung bis zur Colcemid-Behandlung) betrug 24 h. - = unbehandelt, + = mutagenbehandelt.

B: Die Behandlung erfolgte für 1 h bei 37 °C mit 20 µM MNNG (Postinkubationszeit 22 h). Ausgewertet wurden 50 Metaphasen.

→ : Ausschnitt einer Metaphase (mit SCE's bzw. Aberrationen)

3.5. Fixierung toxischer DNA-Schäden in Abhängigkeit von der Zeit

Um Aussagen bezüglich der Geschwindigkeit machen zu können, mit der die durch Alkylierung verursachten DNA-Schäden als toxische Schäden manifestiert werden, wurde die MGMT-cDNA unter Kontrolle eines durch Dexamethason induzierbaren Promotors kloniert (Abb. 22C). Mit diesem Konstrukt wurden anschließend HeLa MR-Zellen (Mex⁻) stabil transfiziert und durch Selektion mit HeCNU ein MGMT-induzierbarer Zellklon isoliert (Abb. 22A). Die Zeitdauer von der Dexamethason-Behandlung bis zum Auftreten deutlich erhöhter MGMT-Aktivität in diesem Zellklon beträgt 4 h (Abb. 22A).

Durch die Dexamethason abhängige Induktion der MGMT-Expression kann, wie in den vorher dargestellten Ergebnissen gezeigt (vgl. Abb. 18,19), die zelluläre Resistenz gegenüber der toxischen Wirkung von HeCNU und MNNG erhöht werden. Durch Bestimmung der Überlebensrate, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der MGMT-Induktion nach Mutagenbehandlung, können folglich auch Aussagen über die Geschwindigkeit der Fixierung lethal wirkender Schäden gemacht werden.

Wie Abb. 22B zeigt, erfolgte die Fixierung toxischer Schäden nach HeCNU-Behandlung sehr schnell; zum effektiven Schutz vor der toxischen Wirkung von HeCNU muß die MGMT-Reparaturfunktion bereits vor der Mutagenbehandlung vorhanden sein. Die nach Chlorethylierung von O⁶-Guanin erfolgende Ausbildung von "cross-links" (Ludlum, 1991) findet nach den vorliegenden Daten innerhalb von 4-8 h statt.

Demgegenüber bedarf es für die Fixierung der nach MNNG-Behandlung produzierten O⁶-Methylguanin-Läsionen als lethalen Schadenstyp einer bedeutend längeren Zeit. Gemäß Abb. 22B manifestieren sich toxische Wirkungen des O⁶-Methylguanins wahrscheinlich erst nach Ablauf eines Zellzyklus (Generationszeit HeLa MR: 22 h). Versuche, bei denen im Unterschied zu Abb. 22B höhere Zellzahlen eingesät wurden (5x10⁴/10 cm Kulturschale), ergaben prinzipiell die gleichen Ergebnisse.

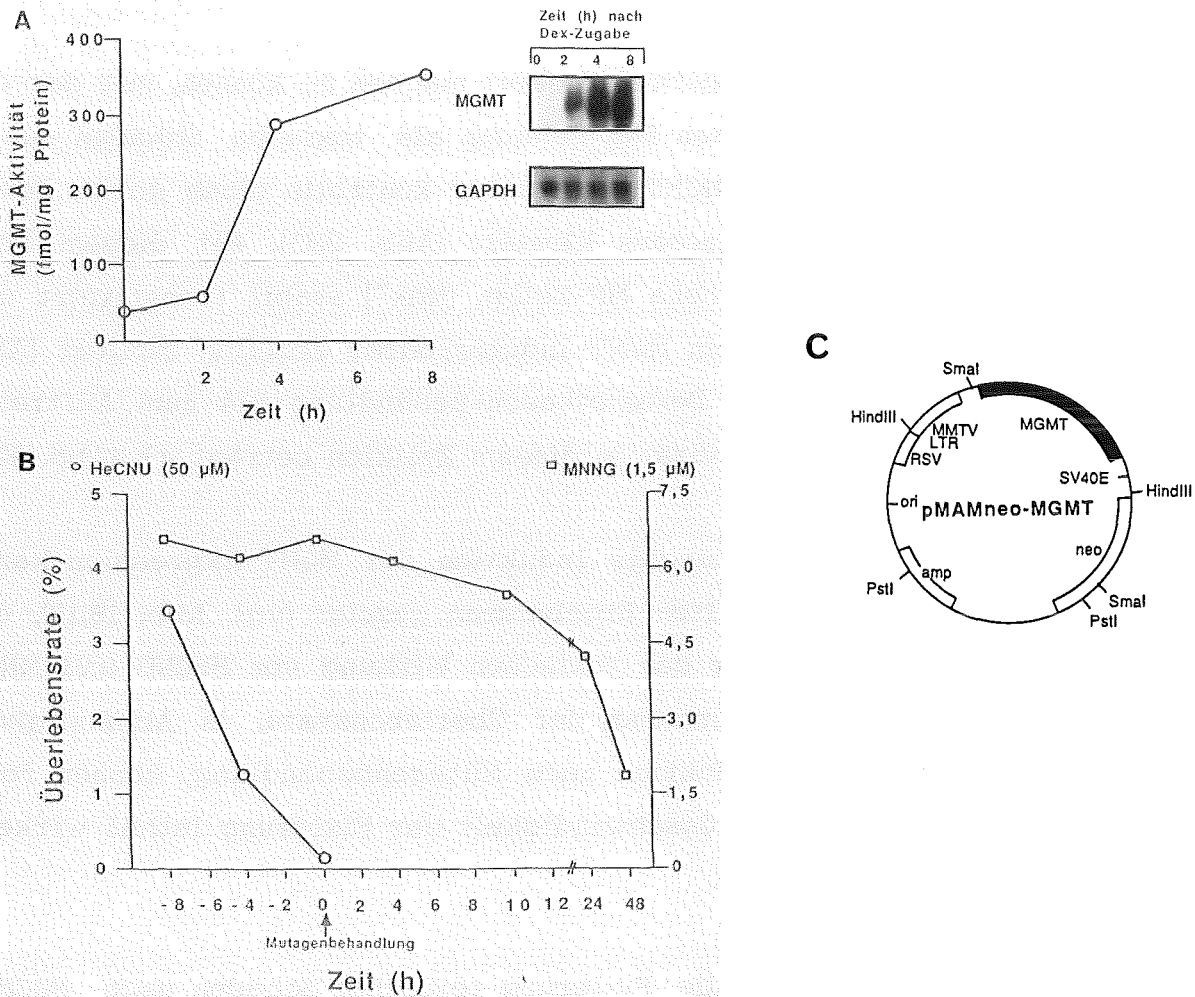


Abb. 22: Vergleich der toxischen Wirkung eines chlorethylierenden Agens (HeCNU) und eines einfachen monofunktionellen Agens (MNNG) in zeitlicher Abhängigkeit von der MGMT-Induktion.

A: MGMT-Aktivität und MGMT-mRNA Expression verschiedene Zeiten nach Dexamethason-Behandlung (2×10^{-7} M) in einer HeLa-MR-pMAMneo-MGMT-Transfektante.

B: Überlebenshäufigkeit MNNG und HeCNU behandelter HeLa MR-pMAMneo-MGMT-Zellen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Dexamethason-Behandlung (2×10^{-7} M) der Zellen. Die Mutagenbehandlung erfolgte 16 h nach Aussaat von 1500 Zellen/5cm Kulturschale. Das Mutagen verblieb im Medium, Dexamethason wurde nach 24 h entfernt. Die Überlebensfrequenz ohne Dexamethason lag bei 0% (HeCNU) bzw. unter 0,5 % (MNNG).

C: Schematische Darstellung des Dexamethason induzierbaren MGMT-Expressionskonstrukts (pMAMneo-MGMT).

4. Regulation der MGMT-Expression in Säugerzellen

Nachdem in den bisherigen Arbeiten die Bedeutung der MGMT als anti-genotoxische Reparaturfunktion untersucht wurde, sollen im folgenden Aspekte der MGMT-Expression betrachtet werden. Im Vordergrund stand hierbei die Frage nach einer Induzierbarkeit der MGMT-Expression nach DNA-Schädigung. Zuvor soll jedoch überprüft werden, inwieweit die MGMT zellzyklusabhängig exprimiert wird.

4.1. Zellzyklusabhängigkeit der MGMT-Expression

Zur Untersuchung der zellzyklusabhängigen MGMT-Expression wurden durch Serumentzug synchronisierte, diploide menschliche Fibroblasten verwendet. Es zeigte sich, daß die MGMT-mRNA zellzyklusabhängig exprimiert wird. In Relation zur GAPDH-Expression fand sich die höchste Expression in der G₀-Phase, die geringste in der S-Phase (Abb. 23).

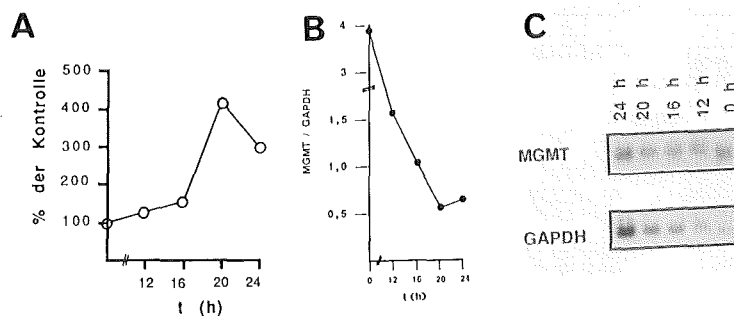


Abb. 23: Abhängigkeit der MGMT-Expression vom Zellzyklus.

Diploide menschliche Zelle (GM10) wurden durch 7 tages Wachstum in Medium mit 0,5 % FCS synchronisiert und anschließend durch Zugabe von Medium mit 15 % FCS aus der G₀-Phase entlassen.

A: ³H-Thymidin-Einbau (5 µCi/ml; 30 min) verschiedene Zeiten nach Seruminduktion.

B: Densitometrische Auswertung der Northern-Analyse in C. Die MGMT-Expression wurde hierbei in Relation zur GAPDH-Expression gesetzt (Kontrolle (t=0) = 1 gesetzt).

C: Northern-Analyse zur Bestimmung der MGMT-Expression verschiedene Zeiten nach Seruminduktion (Gesamt-RNA verwendet).

4.2. Induzierbarkeit der MGMT-Expression

Wie in der Einleitung beschrieben, ist das *ada*-Gen von *E. coli* durch Alkylantien spezifisch induzierbar. Davon ausgehend sollte überprüft werden, ob auch die MGMT von Säugern in ähnlicher Weise induzierbar ist. Sämtliche Versuche wurden, wenn nicht anders erwähnt, in logarithmisch wachsenden Kulturen durchgeführt. Um quantitative Aussagen zu ermöglichen, wurden zur Bestimmung der tatsächlich aufgetragenen RNA-Mengen Kontrollhybridisierungen mit GAPDH durchgeführt.

Bei den in Abb. 24 untersuchten *Mex*⁻ bzw. *Mex*⁺-Zelllinien (HeLa MR, V79; HeLa S3, NIH3T3) konnten keine erhöhten MGMT-mRNA-Mengen nach MNNG-Behandlung gefunden werden. In diesen Zelllinien ist die MGMT-Expression durch Alkylierung demnach nicht induzierbar.

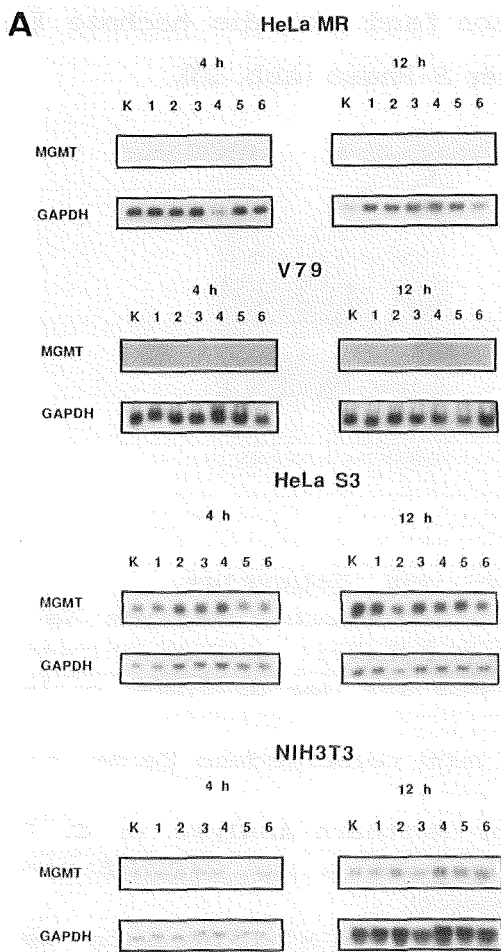
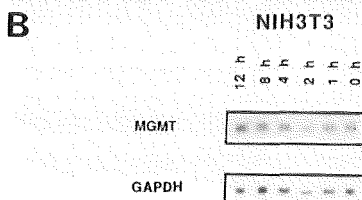


Abb. 24: Expression des MGMT-Gens nach MNNG-Behandlung in *Mex*⁻- und *Mex*⁺-Zelllinien.

Die MNNG-Behandlung erfolgte 4 h bzw. 12 h vor der Präparation der Gesamt-RNA mit 1 nM (1), 10 nM (2), 100 nM (3), 1 μM (4), 5 μM (5) und 15 μM (6) MNNG. Nach Behandlung erfolgte kein Mediumwechsel. Zur Hybridisierung wurde die ³²P-markierte ("random priming") MGMT-cDNA (bzw. 0,9 kb GAPDH-cDNA-Probe) eingesetzt. Die Auftrennung der Gesamt-RNA (20 μg) erfolgte nach Denaturierung mittels Formaldehyd über ein 1,2 % Agarose Gel. K = unbehandelte Kontrolle.

A: Konzentrationsabhängigkeit der MGMT-Expression 4 h bzw. 12 h nach Mutagenbehandlung

B: Zeitabhängigkeit der MGMT-Expression nach 5 μM MNNG-Behandlung von NIH3T3-Zellen.

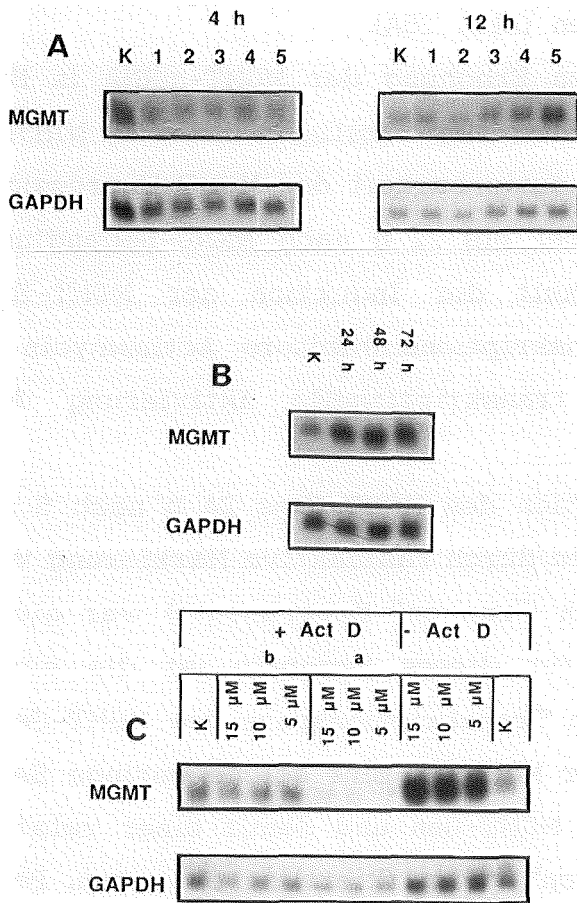


Im Gegensatz zu den vorher untersuchten Zelllinien konnte nach MNNG-Behandlung in der Zelllinie H4 (Hepatomzelllinie der Ratte) eine erhöhte MGMT-mRNA-Menge nachgewiesen werden (Abb. 25A).

Dieses Ergebnis einer MNNG-abhängigen Erhöhung der MGMT-mRNA in H4-Zellen, nicht aber in den oben untersuchten Mex⁺-Zelllinien (HeLa S3, NIH3T3) spricht für eine zelllinienspezifische Induzierbarkeit der MGMT-Expression. Erhöhte MGMT-mRNA-Mengen sind hierbei bis 72 h nach MNNG-Behandlung nachweisbar (Abb. 25B). Die Hemmbarkeit der Induktion der MGMT-Expression durch den Einsatz des Transkriptioneninhibitors Actinomycin D zeigte, daß nach Alkylierung eine transkriptionelle Aktivierung des MGMT-Gens vorliegt (Abb. 25C).

Der direkte Nachweis einer Transkription des MGMT-Gens 24 h nach 5 µM und 10 µM MNNG-Behandlung von H4-Zellen durch radioaktive Markierung von in vitro transkribierter MGMT-prä-RNA ("run on"-Experimente) war nicht möglich. Eine Erklärungsmöglichkeit für dieses Ergebnis ist die einer sehr geringen basalen bzw. induzierten Transkriptionsrate des MGMT-Gens oder einer zu geringen Sensitivität der Methode. Eine solche geringe Sensitivität wäre bei einem sehr großen MGMT-Gen und damit einer relativ langen prä-mRNA (diese wird im "run on" ³²P markiert) zu erwarten. Persönliche Mitteilungen von S. Mitra (Oak Ridge; USA) über die Größe des MGMT-Gens (150-200 kb) lassen auch die letztgenannte Erklärung als möglich erscheinen.

Abb. 25: Induzierbarkeit des MGMT-Gens nach MNNG-Behandlung in H4 Zellen.



Nach Formaldehyd-Denaturierung und gelelektrophoretischer Auftrennung der Gesamt-RNA (20 μg/Probe; 1,2 % Agarose-Gel) erfolgte die Hybridisierung mit ³²P-markierter MGMT-cDNA. K = unbehandelte Kontrolle.

A: Northern-Analyse. Zur Mutagenbehandlung wurden MNNG-Dosen von 1nM bis 5 μM eingesetzt (1=1nM; 2=10nM; 3=100nM; 4=1μM; 5=5μM). Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte 24 h nach MNNG-Behandlung.

B: Northern-Analyse nach Behandlung von H4-Zellen mit 5 μM MNNG und Präparation von Gesamt-RNA nach verschiedenen Zeiten.

C: Transkriptionelle Aktivierung des MGMT-Gens nach MNNG-Behandlung (5-15 μM). Actinomycin D (Act D) wurde entweder sofort (a) oder 6 h (b) nach MNNG-Behandlung in einer Konzentration von 5 μg/ml zugesetzt. Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte 12 h nach Mutagenbehandlung.

Die quantitative, densitometrische Auswertung der in Abb. 25 erhaltenen Daten (Northern-Blots) ist in Abb. 26 dargestellt. Es wird deutlich, daß die MGMT-Induktion nach MNNG-Behandlung sowohl zeit-, als auch konzentrationsabhängig erfolgt (Abb. 26A,B). Erhöhte MGMT-mRNA-Mengen konnten erstmals 12 h nach Mutagenbehandlung gemessen werden; maximale MGMT-mRNA-Mengen wurden 24 h nach Mutagenbehandlung erreicht (Abb. 26A). Die eine 3-fache MGMT-Induktion bewirkende MNNG-Dosis von 5 μM MNNG übt dabei lediglich eine relativ schwache toxische Wirkung aus; im Koloniebildungstest überlebten 60 % der H4-Zellen diese Mutagenbehandlung (Abb.

26C). Somit sind die bereits zur Erhöhung der MGMT-Expression führenden MNNG-Dosen noch als "physiologisch", d. h. als biologisch relevant zu bezeichnen. Auch auf Proteinebene konnten bereits 24 h nach Mutagenbehandlung erhöhte MGMT-Aktivitäten nachgewiesen werden (Abb. 26D).

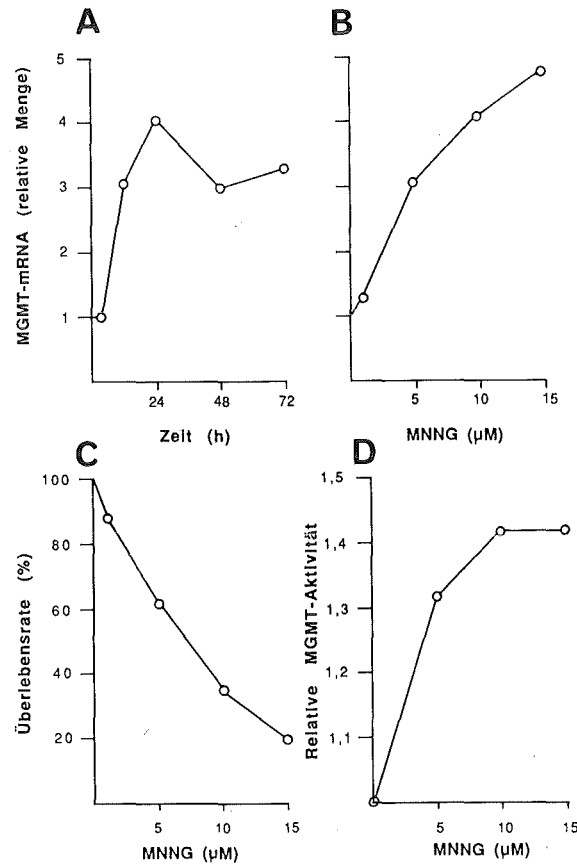


Abb. 26: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der MGMT-Induktion in H4 Zellen nach MNNG-Behandlung.

Die densitometrische Auswertung der Northern-Analysen aus Abb. 24 u. 25 erfolgten mittels Laserdensitometer(LKB). Die unbehandelte Kontrolle MGMT mRNA/GAPDH mRNA wurde gleich 1 gesetzt und die Induktionsfaktoren nach MNNG-Behandlung entsprechend berechnet.

A: Zeitabhängigkeit der MGMT-Induktion. Die dargestellten Werte beziehen sich auf eine 5 µM MNNG-Behandlung.

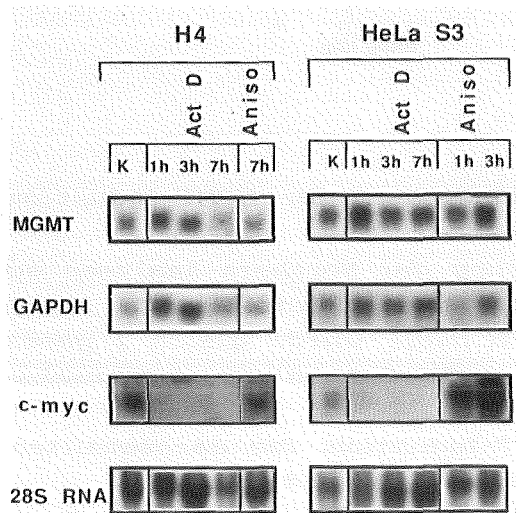
B: Konzentrationsabhängigkeit der MGMT-Induktion. Dargestellt sind die Induktionswerte 12 h nach Mutagenbehandlung.

C: Überlebenskurve von H4 Zellen nach MNNG-Behandlung. Die MNNG-Behandlung (1 h, 37 °C) erfolgte 6 h nach Einsaat von 500 Zellen/5 cm Platte.

D: Relative Induktion der MGMT-Aktivität 24 h nach Behandlung mit verschiedenen MNNG-Dosen.

Wie in Abb. 25 C gezeigt wurde, gehen die nach MNNG-Behandlung nachweisbaren erhöhten MGMT-mRNA Mengen auf eine verstärkte Transkription des MGMT-Gens zurück. Unter Annahme einer hohen Stabilität der MGMT-mRNA wären die in den Northern-Blot-Analysen nachgewiesenen erhöhten MGMT-mRNA -Mengen nach MNNG-Behandlung auch bei einer nur geringfügigen Erhöhung der Genexpression möglich. Zur Abklärung dieser Frage wurde die Stabilität der MGMT-mRNA im Vergleich zur GAPDH- und c-myc-mRNA bestimmt. Wie in Abb. 27 dargestellt, liegt die Halbwertszeit der MGMT-mRNA im Bereich der des "housekeeping" Gens GAPDH ($t_{1/2}$ größer 7 h), während die c-myc-mRNA mit einer Halbwertszeit von nur ungefähr 30 min deutlich instabiler ist. Der Einsatz des Proteinbiosyntheseinhibitors Anisomycin hingegen führt, wie bei HeLa S3 gezeigt (Abb. 27), infolge einer Verringerung der RNA-Degradation zu einer Akkumulation der c-myc-mRNA, während die mRNA-Mengen bei GAPDH und MGMT nahezu unverändert bleiben. Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, daß das MGMT-Gen sowohl konstitutiv als auch nach MNNG-Induktion auf einem relativ geringen Niveau exprimiert wird.

Abb. 27: Northern-Analysen zur Bestimmung der Halbwertszeit der MGMT-mRNA und des Einflusses der Proteinbiosynthese auf die MGMT-mRNA-Menge.



Actinomycin D (Act D) wurde in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$, Anisomycin (Aniso) in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt. Die GesamtrNA-Präparation erfolgte verschiedene Zeiten (1-7 h) nach Behandlung. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Formaldehyd-Denaturierung der RNA über ein 1,2 % Agarose Gel. K = unbehandelte Kontrolle.

Die hier gefundene Induzierbarkeit der MGMT-Expression in Rattenleberzellen (H4) ist insoweit von besonderem Interesse, als daß Leberzellen in vivo die höchsten MGMT-Aktivitäten aufweisen (Myrnes et al., 1983) und die Leber als wichtigstes Detoxifizierungsorgan in vivo auch den größten Alkylantien- Belastungen ausgesetzt ist.

Um festzustellen, ob die in H4 beobachtete MGMT-Induktion möglicherweise spezifisch für Hepatozyten ist, wurden noch andere Leberzelllinien auf ihre Induzierbarkeit durch MNNG-Behandlung untersucht. Tatsächlich konnte auch in einer anderen Rattenleberzelllinie (FTO-2B) eine Induktion der MGMT-mRNA-Expression nach Alkylierung (10 µM MNNG) beobachtet werden, während menschliche Leberzellen (HepG2) keine MGMT Induzierbarkeit aufwiesen (Abb. 28). Es kann hier jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß HepG2 Zellen im Laufe ihrer Kultivierung leberspezifische Funktionen und damit möglicherweise auch die MGMT-Induzierbarkeit verloren haben.

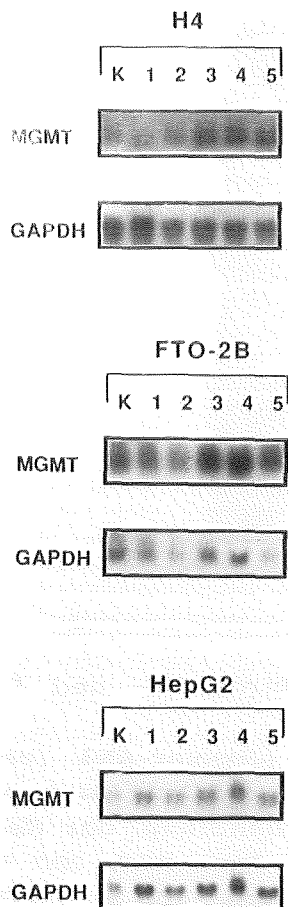


Abb. 28: Induktion des MGMT-Gens in Rattenleberzellen (H4, FTO-2B) und menschlichen Leberzellen (HepG2) 24 h nach MNNG-Behandlung. Die eingesetzten MNNG-Konzentrationen betragen 1, 5, 10, 15, 20 µM. Dargestellt ist eine Northern-Analyse mit Gesamt-RNA (20 µg). K = unbehandelte Kontrolle. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte über ein 1,2 % Agarose-Gel, die Hybridisierung mit der ³²-P markierten MGMT-cDNA.

Die Induzierbarkeit des MGMT-Gens in H4 oder FTO-2B Zellen beschränkt sich jedoch nicht nur auf MNNG und andere Alkylantien (MNU, HeCNU, MMS), sondern auch UV- und Röntgen- Strahlung können als Induktor wirken (Abb. 29). Damit liegt in Säugerzellen eine andere Situation vor als in *E. coli*, wo das *ada*-Gen nur durch Alkylierung induzierbar ist. In Übereinstimmung mit den Befunden nach Alkylierung konnte auch nach Röntgen-Bestrahlung keine erhöhte MGMT-Expression in den menschlichen HepG2-Zellen festgestellt werden.

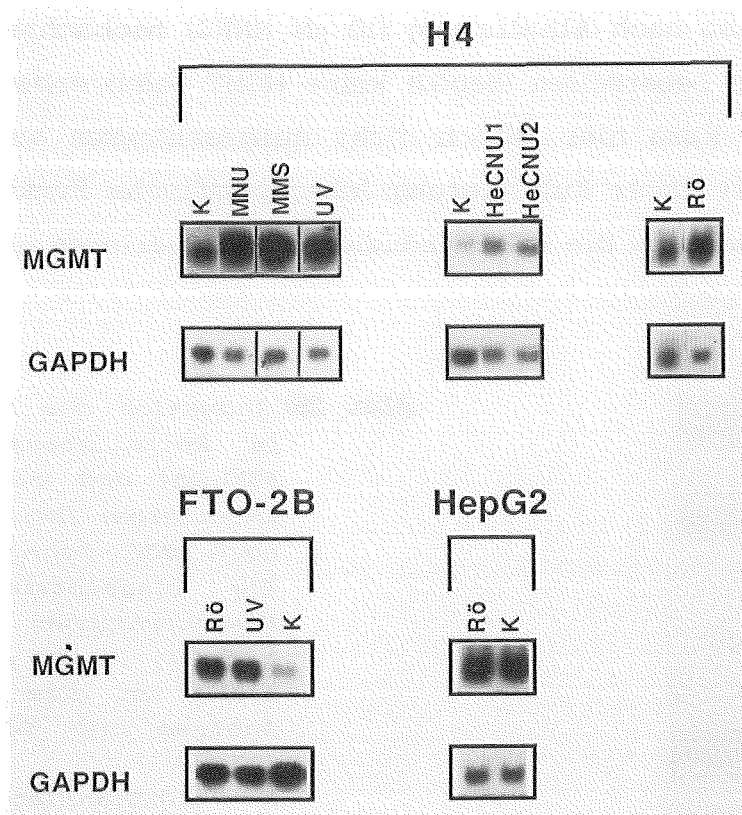


Abb. 29: Induktion des MGMT-Gens in H4-Zellen durch UV- und Röntgen-Strahlung sowie alkylierende Agenzien. Northern Analyse. Die RNA-Präparation (Gesamt-RNA (bzw. Poly (A)⁺-RNA bei FTO-2B) zur Northern-Analyse erfolgte 24 h nach Behandlung (Ausnahme: FTO-2B, 48 h nach Behandlung) der Zellen. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 10 J/m² (UV); 200 RAD (Rö), 0,2 mM (MMS); 1 mM (MNU), 75 µM (HeCNU (1)) bzw. 150 µM (HeCNU (2)) . K = unbehandelte Kontrolle. Die Denaturierung der RNA erfolgte mittels Formaldehyd, die Hybridisierung mit der MGMT-cDNA nach Auftrennung über ein 1,2 % Agarose Gel.

Die quantitative densitometrische Auswertung der Northern-Blot Hybridisierungen (Abb. 25 und 29) ergab eine nach Mutagenbehandlung um 2,5 bis 4,5 fach erhöhte MGMT-mRNA-Mengen; unter gleichen Behandlungsbedingungen stieg die MGMT-Aktivität um das 1,5 bis 5 fache an (Abb. 30). Die unterschiedlichen Induktionsfaktoren für MGMT-mRNA und MGMT-Aktivität sind möglicherweise darauf zurückzuführen, daß nach Induktion des MGMT-Gens neu translatiertes MGMT-Protein mit noch in der DNA persistierenden O⁶-Alkylgruppen reagiert und damit inaktiviert wird; die im Aktivitätstest gemessenen MGMT-Aktivitäten wären damit geringer als die MGMT-Proteinmengen und würden somit die tatsächliche Stärke der Geninduktion nicht direkt widerspiegeln.

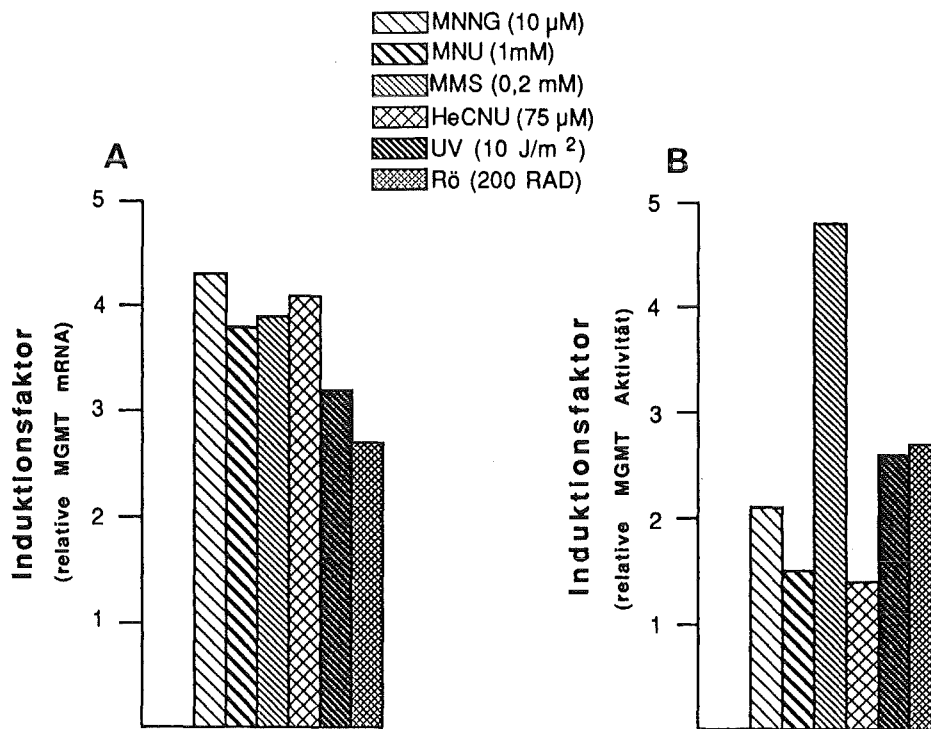


Abb. 30: Vergleich der MGMT-Induktion nach Behandlung von H4-Zellen mit verschiedenen DNA schädigenden Agenzien auf Ebene der Expression (A) sowie Proteinebene (B).

Die Bestimmung des Induktionsfaktors auf RNA-Ebene bezieht sich auf RNA-Präparationen 24 h nach Mutagenbehandlung. Das Verhältnis MGMT-mRNA/GAPDH-mRNA wurde für die unbehandelte Kontrolle gleich 1 gesetzt und die Induktionsfaktoren nach Behandlung entsprechend berechnet. Zur Bestimmung der MGMT-Aktivität wurden die Zellen 48 h nach Behandlung geerntet. Die MGMT-Aktivität der unbehandelten Kontrolle wurde auch hier gleich 1 gesetzt.

4.3. Einfluß der MGMT-Induktion auf die Mutationsfrequenz und das Überleben von H4-Zellen

Nach Induktion der MGMT-Expression durch MNNG- oder Rø-Vorbehandlung zeigten H4-Zellen bei nachfolgender Behandlung mit hohen MNNG-Dosen eine gegenüber der nicht vorbehandelten Kontrolle um 30-50 % verringerte induzierte Mutationsfrequenz (Abb. 31). Die Induktion der MGMT-Expression hat somit auch eine direkte protektive biologische Funktion für H4-Zellen. Bei wiederholter Alkylantienexposition wird die Zahl der induzierten Mutationen auf einem bestimmten maximalen Niveau konstant gehalten und somit additive mutagene Effekte verhindert. Bei den unter Abb. 31 genannten Vorbehandlungsbedingungen war bei nachfolgender HeCNU-Selektion ($150 \mu\text{M}$) auch die Zahl der überlebenden H4-Zellklone gegenüber nicht vorbehandelten H4-Zellen um das 3-5 fache erhöht. Damit hat die Induktion der MGMT-Expression auch Schutzcharakter gegenüber der toxischen Wirkung wiederholter Alkylantienexpositionen.

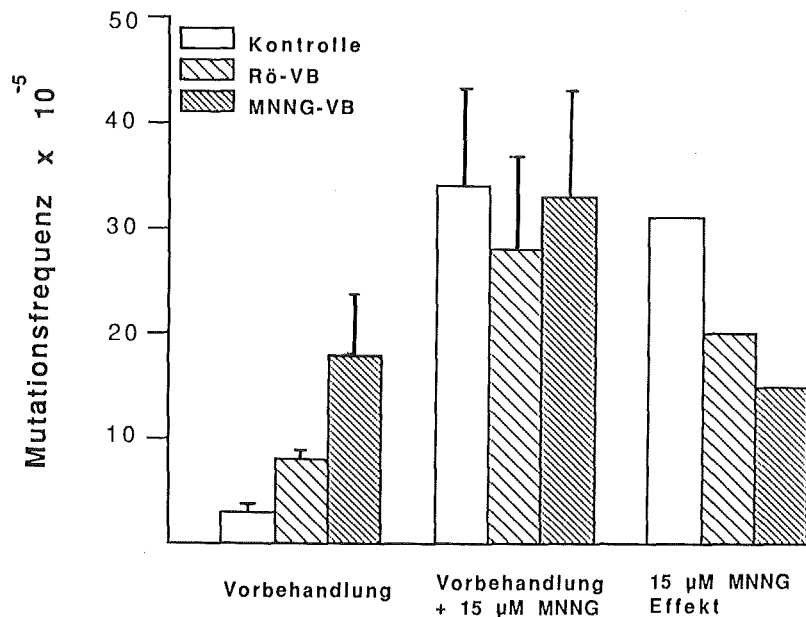


Abb. 31: Einfluß der MGMT-Induktion auf die Mutationsfrequenz von H4-Zellen.

Logarithmisch wachsende Zellen (24 h nach Einsaat von 10^5 Zellen/10 cm Platte) wurden mit $5 \mu\text{M}$ MNNG bzw. 200 RAD vorbehandelt. 48 h später wurden die Zellen nochmals mit $15 \mu\text{M}$ MNNG behandelt. Die Bestimmung der Genmutationsfrequenz am HGPRT-Locus erfolgte nach einer Expressionszeit von 7 d mit $1,5 \mu\text{g}$ 6-TG pro ml Medium.

4.4. Untersuchungen zum Mechanismus der MGMT-Induktion

Aufgrund der Tatsache, daß alle hier untersuchten DNA schädigenden Behandlungen zu einer Induktion des MGMT-Gens führten, stellt sich die Frage nach dem gemeinsamen, induktionsauslösenden Signal. Aus diesem Grund wurde die Wirkung weiterer "Stressbehandlungen" auf die MGMT-mRNA-Expression untersucht. Es zeigte sich, daß auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2), und Hitze zu einer deutlichen Induktion der MGMT-Expression führen (Abb. 32). Demgegenüber haben Schwermetalle eine nur sehr schwache, die Basenanaloga 6-Thioguanin und 5-Azacytidin keine induktionsauslösende Wirkung (Abb. 32). Aufgrund von bei der densitometrischen Auswertung sich ergebenden Fehlermöglichkeiten sowie möglicher Versuchsschwankungen werden im folgenden erst Induktionsfaktoren von größer als 1,5 als signifikant angesehen.

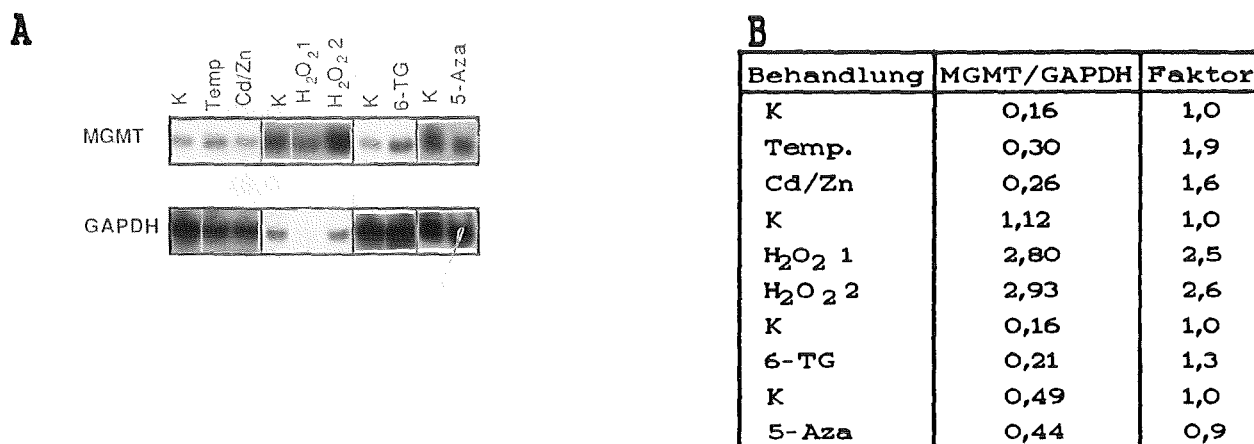


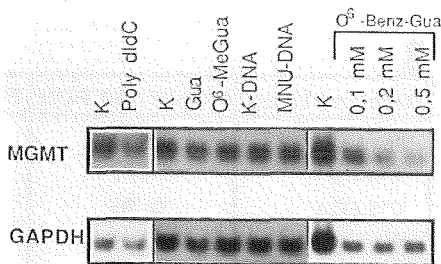
Abb. 32: Northern-Analyse zum Nachweis der MGMT-Induktion in H4-Zellen nach verschiedenen Behandlungsbedingungen.

Folgende Behandlungsbedingungen wurden gewählt: Hitzeschock: $42^\circ C$, 45 min; H_2O_2 : 0,001 % (1) und 0,0003 % (2); Cd/Zn: 20 μM /70 μM ; 6-TG: 0,5 $\mu g/ml$; 5-Azacytidin: 1 μM . Die Präparation von Gesamtrna erfolgte 24 h nach Behandlung. Die gelektrophoretische Auftrennung der RNA (20 μg) erfolgte über ein 1,2 % Agarose Gel, die Hybridisierung mit der gesamten ^{32}P -markierten MGMT-cDNA. K = unbehandelte Kontrolle.

B: Quantitative Auswertung von A.

Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint die Induktion der MGMT-Expression unabhängig von der Art der eingesetzten DNA-schädigenden Behandlung zu sein. Dies deutet darauf hin, daß eine durch Alkylierung inaktivierte Säuger-MGMT, im Gegensatz zum bakteriellen Ada-Protein, keine autoregulatorische Funktion haben dürfte. Bestätigt werden konnte diese Annahme durch die Verwendung von O^6 -Benzylguanin und O^6 -Methylguanin, die beide als Substrate der Säuger-MGMT wirksam sind (Pegg, 1990; Dolan et al., 1991). Eine durch Zugabe dieser Substanzen bewirkte Depletion des MGMT-Pools in H4-Zellen führte nicht zu einer signifikanten Erhöhung der MGMT- mRNA Expression (Abb. 33). Auch das Einbringen von MNU-alkylierter DNA, oder Poly dIdC in H4- Zellen hatte keine erhöhte MGMT-mRNA Expression zur Folge (Abb. 33).

A



B Quantitative Auswertung von A

Behandlung	MGMT/GAPDH	Faktor
K	1,14	1,0
Poly dIdC	1,08	1,0
K	0,74	1,0
Gua	0,95	1,3
O^6 -MeGua	0,64	0,9
K-DNA	0,81	1,1
MNU-DNA	0,74	1,0
K	0,60	1,0
0,1 mM } O^6 -	0,93	1,5
0,2 mM } Benz	0,51	0,9
0,5 mM } Gua	0,33	0,6

Abb. 33: Einfluß von *in vitro* geschädigter DNA auf die Induktion des MGMT-Gens in H4-Zellen.

Die Präparation der Gesamt RNA erfolgte 24 h nach Behandlung. Aufgetrennt wurde die RNA (20 µg) über ein 1,2 % Agarose -Gel. Die Hybridisierung erfolgte mit der ^{32}P -markierten MGMT-cDNA. 20 µg *in vitro* MNU-alkylierte Kalbsthymus DNA wurde nach Hae III-Verdau mittels Calciumphosphat-Tranfektion in die Zellen eingebracht. Gua, O^6 -Methylguanin (O^6 -MeGua) und O^6 -Benzylguanin-Nukleotide (O^6 -Benz-Gua) wurden in Konzentrationen von 0,1 mM bzw. 0,1- 0,5 mM, Poly dIdC in einer Konzentration von 50 µg/ml dem Medium zugesetzt. K= Kontrolle.

Eine Gemeinsamkeit aller DNA-schädigenden Behandlungen besteht unter anderem darin, daß sie zu einem transienten DNA-Replikationsblock führen. Eine Bestimmung der Replikationshemmung nach MNNG-Behandlung ergab die in Abb. 34 dargestellte Kurve. Beim Vergleich dieser Kurve mit der Konzentrationsabhängigkeit der MGMT-Induktion (Abb. 25) fällt auf, daß die gefundene Replikationshemmung umgekehrt proportional zur Induktion der MGMT-Expression verläuft.

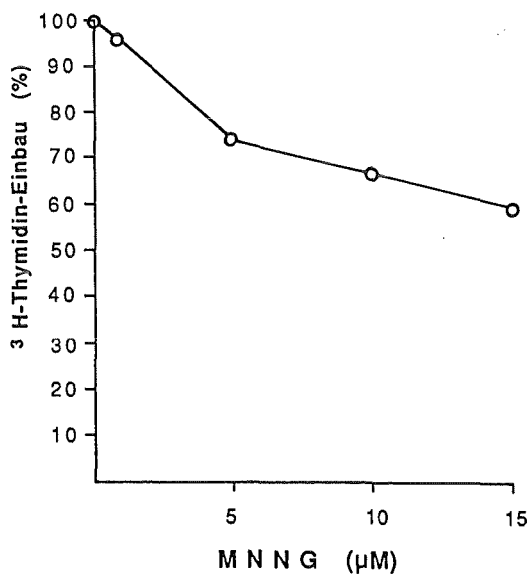


Abb. 34: ³H-Thymidin-Einbau in H4-Zellen nach MNNG-Behandlung. Gemessen wurde der ³H-Thymidin-Einbau 2 h nach MNNG-Behandlung (5 µCi/ml; 30 min). Die Inkorporation von ³H-Thymidin in die unbehandelte Kontrolle wurde 100 % gesetzt.

Außer DNA-schädigenden Behandlungen können natürlich auch Konfluenz oder Serumentzug zum Replikationsstop führen. In der Literatur ist eine Gruppe von Genen beschrieben worden, die nach wachstumsstoppenden Signalen induziert werden. Diese Gene wurden als "gadd"-Gene ("growth arrest and DNA-damage inducible genes") bezeichnet. Sie werden durch zum Replikationsstop führende Reize wie MMS-Behandlung, OH-Harnstoff-Behandlung, Serumentzug oder Konfluenz induziert (Fornace et al., 1989). Eine Zugehörigkeit des MGMT-Gens zu dieser Gruppe erscheint jedoch unwahrscheinlich. Obwohl es durch MMS- und auch OH-Harnstoff-Behandlung (Abb. 36) induzierbar ist, wird es jedoch nicht durch Serumentzug oder Konfluenz induziert. (Abb. 35 A). Die MGMT-Induktion durch OH-Harnstoff erfolgte mit ähnlicher Kinetik wie durch MNNG (Abb. 35 B, Abb. 25). Be-

dacht werden muß bei der Interpretation der Ergebnisse , daß OH-Harnstoff neben seiner replikationshemmenden Eigenschaft (durch Hemmung der Ribonucleotid Reductase) auch DNA- schädigende Wirkung hat (Kihlman u. Natarajan, 1987).

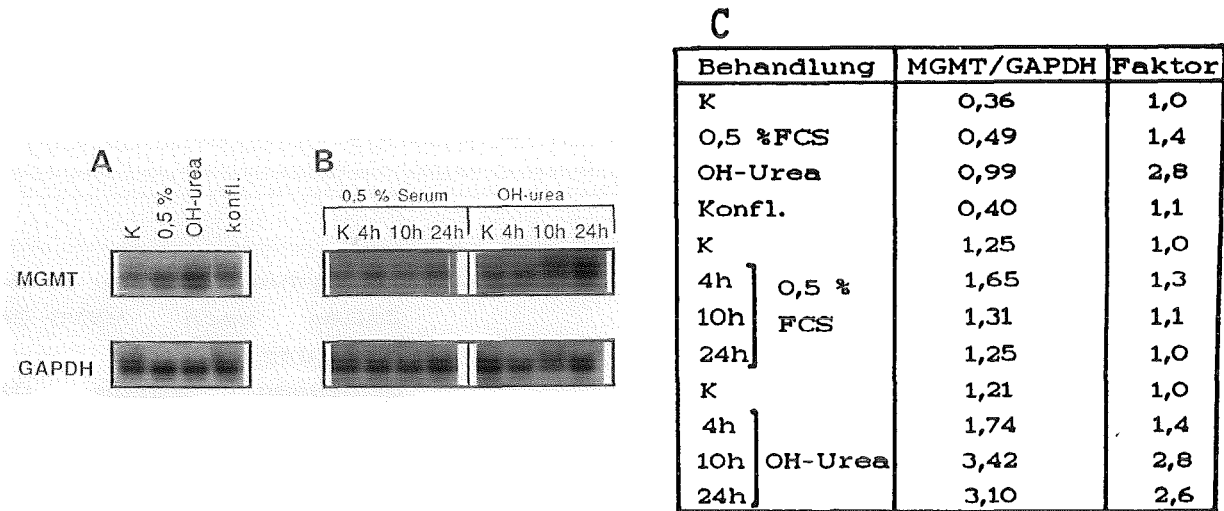


Abb. 35: Northern-Analyse zur Überprüfung der Induktion des MGMT-Gens in H4-Zellen durch wachstumsstoppende Behandlungen. 24 h nach Behandlung wurde Gesamt-RNA präpariert, mittels Formaldehyd denaturiert und über ein 1,2 % Agarose Gel aufgetrennt. Hybridisiert wurde mit der ³²P-markierten MGMT-cDNA.

A: Zum Erreichen der Konfluenz wurden 2x10⁶ Zellen / 2,5 cm Platte (Makrowell) eingesäht. Die RNA-Präparation erfolgte hier 48 h nach Einsaat. Serumdepletion erfolgte durch 24 stündiges Wachstum in Serum mit 0,5 % FCS. Hydroxy-Harnstoff (OH-Urea) wurde in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt. K = Kontrolle

B: Kinetische Untersuchungen zur MGMT-Expression verschiedene Zeiten nach Serumdepletion (0,5 % FCS) bzw. Hydroxy-Harnstoff (OH-Urea)-Behandlung (2 mM).

C: Quantitative Auswertung der Northern-Blots aus A und B

Die bisherigen Ergebnisse deuten an, daß es sich bei dem die MGMT-Induktion auslösenden Signal möglicherweise um einen plötzlich auftretenden starken Replikationsblock handelt, wie er durch DNA schädigende Agenzien, nicht aber durch langsamen Entzug von Wachstumsfaktoren verursacht wird.

Eine mögliche Ursache für einen derartigen plötzlichen Replikationsstop sind DNA-Strangbrüche, die bei Röntgen-Bestrahlung direkt, bei MNNG-Behandlung indirekt durch Wirkung von Reparatursystemen und/oder Replikation entstehen können. Auf eine mögliche Beteiligung von DNA-Strangbrüchen an der Induktion der MGMT-Expression wiesen erstmals Ergebnisse mit dem Ligase-Hemmstoff 3-Aminobenzamid hin. Während MNNG-Behandlung (10 μ M) alleine bekanntermaßen zu einer etwa 4 fachen Erhöhung der MGMT-Expression führte (vgl. Abb. 25), ergab der zusätzliche Einsatz von 3-Aminobenzamid (2 mM) einen Induktionsfaktor von 5,7. Wenn die oben geäußerte Hypothese, daß MNNG über die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen zur MGMT-Induktion führt, zutrifft, dann sollten langsamer replizierende Zellen nach MNNG-Behandlung veringerte Induktionsfaktoren zeigen.

Wie in Abb. 36A,B dargestellt, führte MNNG-Behandlung in konfluenten oder serumdepletierten H4-Zellen nur noch zu einer 1,5 bis 2 -fachen MGMT-Induktion. Die Verringerung der MNNG-Induktion der MGMT-Expression in konfluenten H4-Kulturen um ca. 50 % (auf den Faktor 2 im Vergleich zum Induktionsfaktor 4 bei logarithmisch wachsenden Zellen, vgl. Abb. 25) korreliert hierbei gut mit der Reduktion der Replikation (3 H-Thymidin-Einbau) in den konfluenten Kulturen um 40 % (keine vollständige Dichtehinhibition bei H4-Zellen möglich). Die Induktion der MGMT-Expression nach MNNG-Behandlung scheint also replikationsabhängig zu sein. Da MNNG ein S-Phase abhängiges Clastogen ist (Schwartz, 1989) unterstützt dieses Ergebniss die Hypothese, daß DNA-Strangbrüche der die MGMT-Induktion auslösende Schadenstyp ist. Im Gegensatz zu MNNG ist die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen nach Rö- Bestrahlung replikationsunabhängig. Tatsächlich war die MGMT-Induktion nach Rö-Bestrahlung in konfluenten H4-Kulturen im Vergleich zu exponentiell wachsenden Zellen (vgl. Abb. 29) nicht beeinträchtigt (Abb. 37B).

Ein weiterer starker Hinweis für DNA-Strangbrüche als möglicherweise auslösendes Signal für die Induktion der MGMT-Expression ergab sich auch durch das Einbringen von Restriktionsenzymen in H4-Zellen. 24 h nach Elektroporation des "blunt end" schneidenden Restriktionsenzym

PvuII in H4-Zellen war eine deutliche MGMT-Induktion des MGMT-Gens zu beobachten. Die Elektroporation von Eco RI (produziert "sticky ends") führte zu keiner signifikanten Erhöhung der MGMT-Expression (Abb. 36C). Dieses Ergebnis stellt einen Hinweis für eine mögliche Abhängigkeit der MGMT-Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen dar. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß unterschiedliche Geschwindigkeiten bei der Reparatur von DNA-Einzelstrang- bzw. Doppelstrangbrüchen ursächlich an diesem Ergebnis mit beteiligt sind.

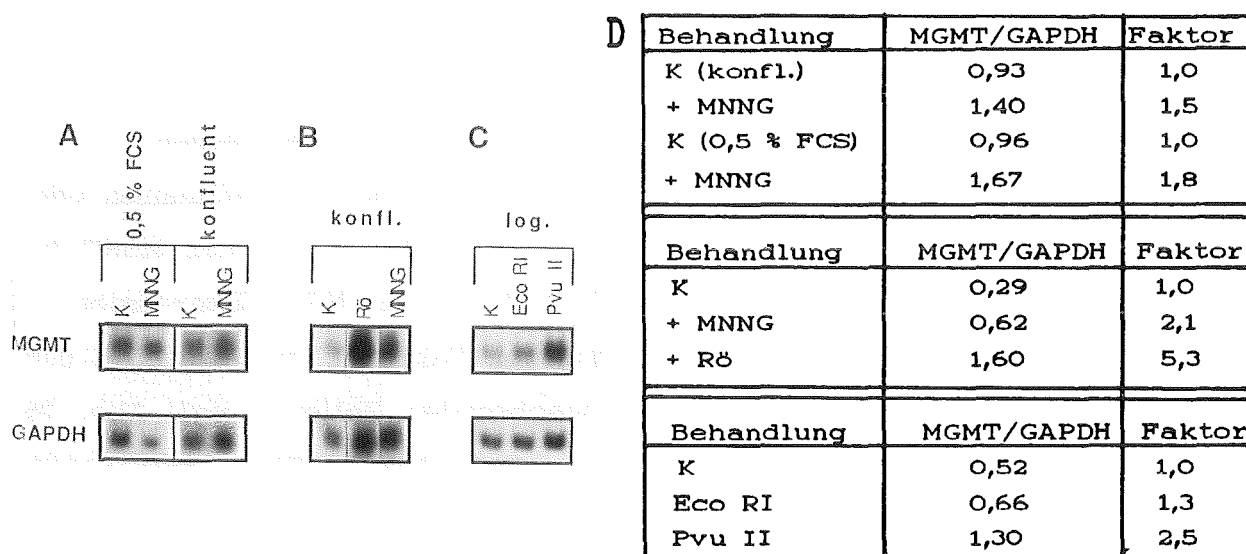


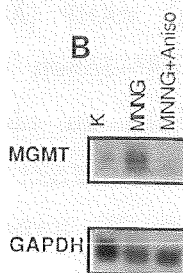
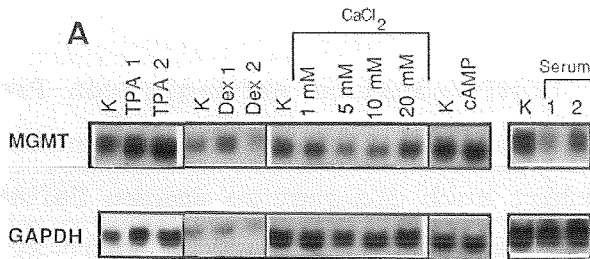
Abb. 36: Northern-Analysen zum Nachweis der Abhängigkeit der MGMT-Induktion in H4-Zellen von DNA-Strangbrüchen. Die Präparation von Gesamt RNA erfolgte 24 h nach Behandlung. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte über ein 1,2 % Agarose Gel, die Hybridisierung mit ³²P-markierter MGMT-cDNA. Die quantitative Auswertung der Northern-Blots ist den jeweiligen Tabellen (D) zu entnehmen.
A: Induzierbarkeit der MGMT in 24 h serumdepletierten bzw. 48 h konfluenten H4-Zellen nach MNNG-Behandlung (15 µM).
B: Induzierbarkeit der MGMT nach MNNG (15 µM) bzw. Rø-Behandlung (300 RAD) in konfluenten H4-Zellen.
C: Induktion der MGMT nach Elektroporation von 40 U Restriktionsenzymen (PvuII; EcoRI) in logarithmisch wachsende H4-Zellen.
D: Quantitative Auswertung der Northern-Blot-Analysen aus A, B und C.

Nachdem DNA-Strangbrüche, möglicherweise Doppelstrangbrüche als der zur Induktion der MGMT-mRNA Expression auslösende DNA-Schaden erkannt wurden, stellt sich nun die Frage, welche Signalmechanismen von der Schadenserkenkung zur erhöhten MGMT-mRNA Expression führen.

Wie aus Abb. 37B hervorgeht, ist die MGMT-Induktion abhängig von Proteinbiosynthese. Die Notwendigkeit der Biosynthese eines an der Induktionsvermittlung beteiligten Faktors erklärt auch die erst zu späten Zeiten (12h nach MNNG-Behandlung; vgl. Abb. 26) nachweisbare erhöhte MGMT-Expression. Der Einsatz von als sekundären Botenstoffen ("Second messenger") wirksamen Substanzen wie Hormone (Dexamethason), cAMP (Aktivator der cAMP-abhängigen Kinase (Proteinkinase A)) oder Ca^{2+} -Ionen (Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulin-abh. Proteinkinase) führten nicht zu einer erhöhten basalen Expression des MGMT-Gens (Abb. 37A). Auch Serumfaktoren oder der Tumorpromotor TPA (Aktivatoren der Proteinkinase C), haben keine die MGMT-mRNA Expression beeinflussende Wirkung (Abb. 37A).

Aus diesem Grunde erscheint die Beteiligung von Proteinkinasen (Proteinkinase C, Proteinkinase A, Ca^{2+} -Calmodulin-abh. Kinase) bei der Induktion der MGMT-mRNA Expression als unwahrscheinlich.

C



Behandlung	MGMT/GAPDH	Faktor
K	1,02	1,0
TPA1	0,95	0,9
TPA2	1,20	1,2
K	2,10	1,0
Dex1	2,73	1,3
Dex2	1,95	0,9
K	0,44	1,0
1 mM	0,42	1,0
5 mM	0,36	0,8
10 mM	0,36	0,8
20 mM	0,46	1,0
K	0,87	1,0
cAMP	0,95	1,1
K	0,32	1,0
Serum 1	0,22	0,7
Serum 2	0,24	0,7
<hr/>		
Behandlung	MGMT/GAPDH	Faktor
K	0,15	1,0
MNNG	0,75	5,0
MNNG+Aniso	0,13	0,9

Abb. 37: Northern-Analysen zur Aufklärung der zur Induktion der MGMT-Expression führenden Signalketten in H4-Zellen.

Präparation von Gesamt-RNA erfolgte 12 h (Anisomycin) bzw. 24 h nach Behandlung. Nach Formaldehyd-Denaturierung und gelelektrophoretischer Auftrennung (1,2 % Agarose Gel; 10-20 µg Gesamt-RNA) erfolgte die Hybridisierung mit der ³²-P-markierten MGMT-cDNA. Die quantitative Auswertung der Northern-Blots ist der Tabelle (C) zu entnehmen. K = unbehandelte Kontrolle.

A: Einfluß von Serumfaktoren bzw. sekundären Botenstoffen auf die MGMT-Expression. Serum: Steigerung der Serumkonzentration von 0,5 % FCS (1) bzw. 5 % FCS (2) auf 20 % FCS; TPA: 10⁻⁷ M (1), 2x10⁻⁷ M (2); Dexamethason (Dex): 10⁻⁷ M (1), 10⁻⁶ M (2); CaCl₂: 1-20 mM; cAMP: 1 mM.

B: Abhängigkeit der MGMT-Induktion von der Proteinbiosynthese. MNNG wurde in einer Konzentration von 15 µM, Anisomycin in einer Konzentration von 100 µM dem Medium zugesetzt.

C: Quantitative Auswertung der Northern-Blot Analysen aus A und B

Bei weiteren Untersuchungen bezüglich der Fragestellung, inwieweit Phosphorylierungen / Dephosphorylierungen an der Regulation der MGMT-Expression beteiligt sind, konnte festgestellt werden, daß Proteinkinase-Hemmstoffe wie H8 (Hemmstoff der cAMP abh. Kinase) oder H9 (Hemmstoff der Ca²⁺-Calmodulin abh. Kinase) allein bereits zu erhöhter basaler Expression des MGMT-Gens führten (Abb. 38A). Umgekehrt bewirkte die Hemmung von Phosphatasen durch Na-Vanadat den Verlust der MNNG-Induzierbarkeit des MGMT-Gens (Abb. 38B). Insgesamt gesehen zeigen diese Daten, daß Mechanismen der Phosphorylierung/Dephosphorylierung eine wesentliche Rolle bei der Regulation der MGMT-Expression/Induktion spielen.

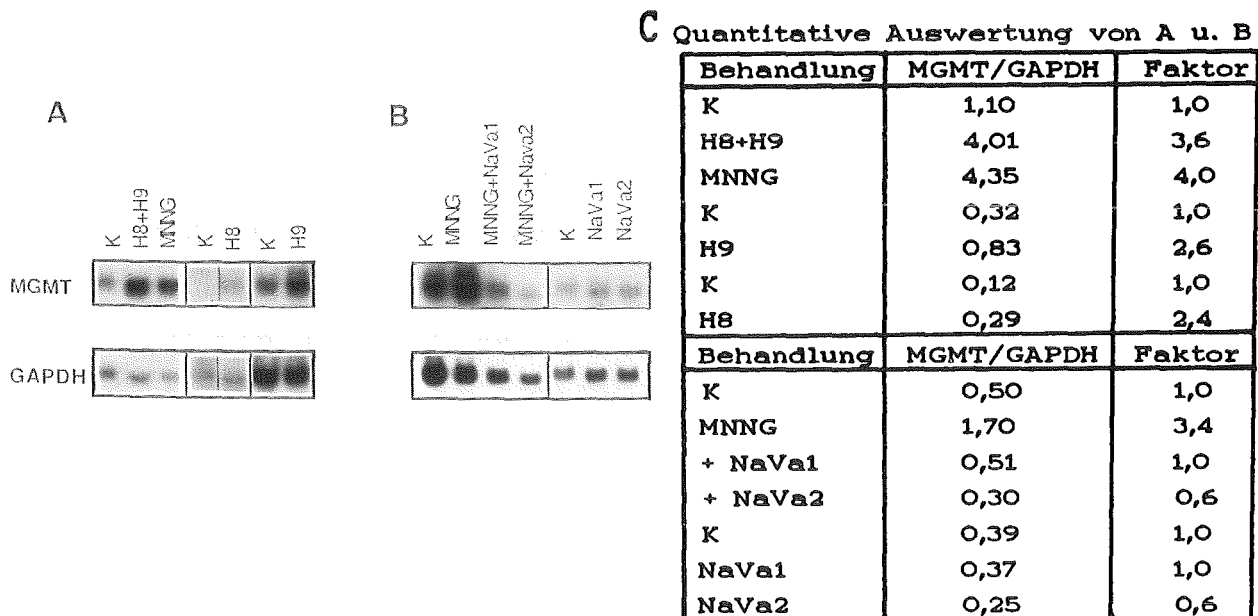


Abb. 38: Einfluß von Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsereignissen auf die Expression und die Induzierbarkeit des MGMT-Gens in H4-Zellen.

Die Gesamt-RNA-Präparation erfolgte 24 h nach Behandlung der Zellen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Formaldehyd denaturierten RNA (10-20 µg) erfolgte über ein 1,2 % Agarose Gel, die Hybrisierung mit der ³²P-markierten MGMT-cDNA.

K = unbehandelte Kontrolle.

A: Einfluß der Proteinkinase-Inhibitoren H8 und H9 (Endkonzentration: je 30 µM) auf die MGMT-Expression.

B: Einfluß der Inhibition von Phosphatasen auf die MNNG- Induzierbarkeit des MGMT - Gens (1: 1 mM NaVa; 2: 5 mM NaVa) .

Die MNNG-Behandlung erfolgte mit 10 µM.

5. Molekulare Analyse des Mex-Phänotyps

Mex⁻-Zellen zeichnen sich, wie bereits in der Einleitung erwähnt, durch das Fehlen der MGMT-Aktivität aus. Das Ziel der folgenden Arbeiten bestand darin, die molekularen Ursachen für diese Defizienz zu finden.

5.1. Unterscheidung von Mex⁺/Mex⁻-Zellen auf genomischer Ebene und Expressionsebene

Auf genomischer Ebene konnten nach Hind III-Verdau keine Unterschiede zwischen Mex⁺ und Mex⁻-Zelllinien festgestellt werden (Abb. 39). Beide Zelltypen wiesen in Southern-Analysen das gleiche Bandenmuster auf. Menschliche Zelllinien zeigten im Vergleich zu Hamsterzelllinien zusätzliche Hybridisierungsbanden. Dies ist möglicherweise auf eine unterschiedliche Genorganisation bei Hamster und Mensch, oder aber auf Spezies-spezifische Hybridisierungsunterschiede der menschlichen MGMT-Probe zurückzuführen. Ein ca. 8 kb großes, bei menschlichen Zellen und Hamsterzellen auftretendes Hybridisierungsfragment deutet jedoch auf teilweise homologe Regionen des menschlichen und Hamster-MGMT-Gens hin.

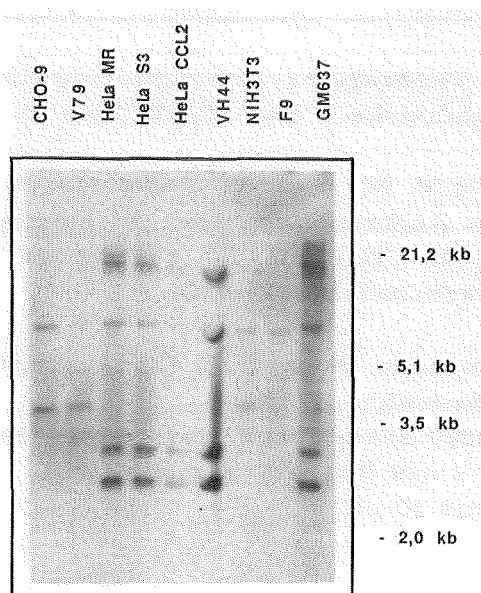


Abb. 39: Southern-Analyse zum Nachweis des MGMT-Gens in verschiedenen Mex⁺/ Mex⁻-Zelllinien.

Jeweils 10 µg genomischer DNA wurden für den Hind III-Restriktionsverdau eingesetzt. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte über ein 0,8 % Agarose Gel. Die Hybridisierung erfolgte mit der gesamten ³²P-markierten MGMT-cDNA.

Mex⁺: VH44; HeLa S3, HeLa CCL2, GM637, NIH3T3, F9;
Mex⁻: HeLa MR, CHO-9, V79

Der Mex⁻-Phänotyp ist der in Abb. 39 dargestellten Southern-Analyse zufolge nicht auf größere Deletionen im MGMT-Gen zurückzuführen.

Auf Expressionsebene wiesen Mex⁻-Zellen jedoch keine im Northern-Blot detektierbare MGMT- mRNA auf (Abb. 40A). Die molekulare Ursache für die MGMT-Defizienz der Mex⁻-Zellen liegt demnach in der fehlenden Expression des MGMT-Gens. Als Ursache für die in Mex⁻-Zellen fehlende MGMT-Expression kommen neben potentiellen Defekten im Regulatorbereich des Gens auch das Fehlen von Transkriptionsfaktoren in Frage. Allerdings scheinen die Mex⁻-Zelllinien HeLa MR und CHO-9 noch geringe Mengen an MGMT-mRNA zu exprimieren, wie anhand der sensitiveren PCR-Analyse gezeigt werden konnte (Abb. 40B). Im Vergleich zu HeLa S3 (Mex⁺) ist die MGMT-mRNA dieser Mex⁻-Zellen jedoch kürzer (Abb. 40B). Die MGMT-Aktivitäten der Mex⁺-Zelllinien korreliert mit der Menge an exprimierter MGMT-mRNA (MGMT-Aktivität (angegeben in fmol/mg Protein): F9: 84; GM637: 102; NIH3T3: 880; VH44: 1053; HeLa CCL2: 1120; HeLa S3: 1240).

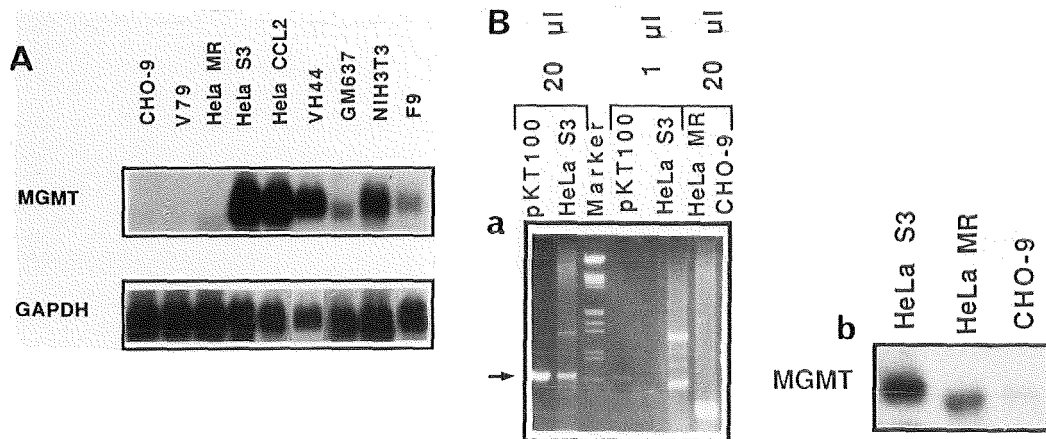


Abb. 40: MGMT-Expression in verschiedenen Mex⁺/Mex⁻-Zelllinien.

A: Northern-Analyse. Jeweils 5 μ g Poly(A)⁺- RNA wurden auf einem 1 % Agarose Gel nach Glyoxal/DMSO Denaturierung elektrophoretisch aufgetrennt und mit der MGMT-cDNA hybridisiert. Zur Zuordnung zum Mex-Phänotyp vgl. Abb 23.

B: Southern-Analyse nach PCR-Amplifikation von MGMT-mRNA Sequenzen (30 Cyclen; Hybridisierung 2 min, 60 °C; Denaturierung 1 min 94 °C; Polymerisation 3 min, 72 °C). Die Auftrennung der PCR-Produkte (1-20 μ l des Gesamtreaktionsvolumens (100 μ l)) erfolgte über ein 1 % Agarose-Gel. Als Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation spezifischer MGMT-mRNA Sequenzen wurden 24 mere von Position 100-124 sowie 673-697 der publizierten MGMT cDNA Sequenz (Tano et al., 1990) verwendet.

a: Ethidiumbromid gefärbtes Gel (\rightarrow = spezifische MGMT-Bande)

b: Southern-Hybridisierung

Um zu prüfen, ob in den Mex⁻-Zellen möglicherweise Punktmutationen oder im Southern-Blot von Abb. 39 nicht nachweisbare Deletionen im MGMT-Gen vorliegen, wurden RFLP-Analysen durchgeführt. Für HeLa MR (Mex⁻) konnte durch Vergleich mit verschiedenen menschlichen Mex⁺-Zelllinien ein spezifischer RFLP im Mbo I-Verdau festgestellt werden (Abb. 41A,B). Auch die Mex⁻-Zelllinien V79 und CHO-9 zeigten im Pvu II-Verdau unterschiedliche Hybridisierungsmuster (Abb. 41C). Da keine Mex⁺-Hamsterzelllinien existieren, war jedoch eine genaue vergleichende RFLP-Analyse zwischen Mex⁺ und Mex⁻-Hamsterzellen nicht möglich. Allerdings muß zumindest bei einer der untersuchten Mex⁻-Hamsterzelllinien (V79 oder CHO-9) eine Mutation im MGMT-Gen vorliegen. Ob die gefundenen Polymorphismen funktionell bedeutsam für den Mex⁻-Phänotyp sind, kann nicht beantwortet werden. Lediglich für 208F-Zellen (Rattenfibroblasten, Mex⁻) konnte die Ursache für den Mex⁻-Phänotyp eindeutig auf das völlige Fehlen (Deletion) des MGMT-Gens zurückgeführt werden (Abb. 41D).

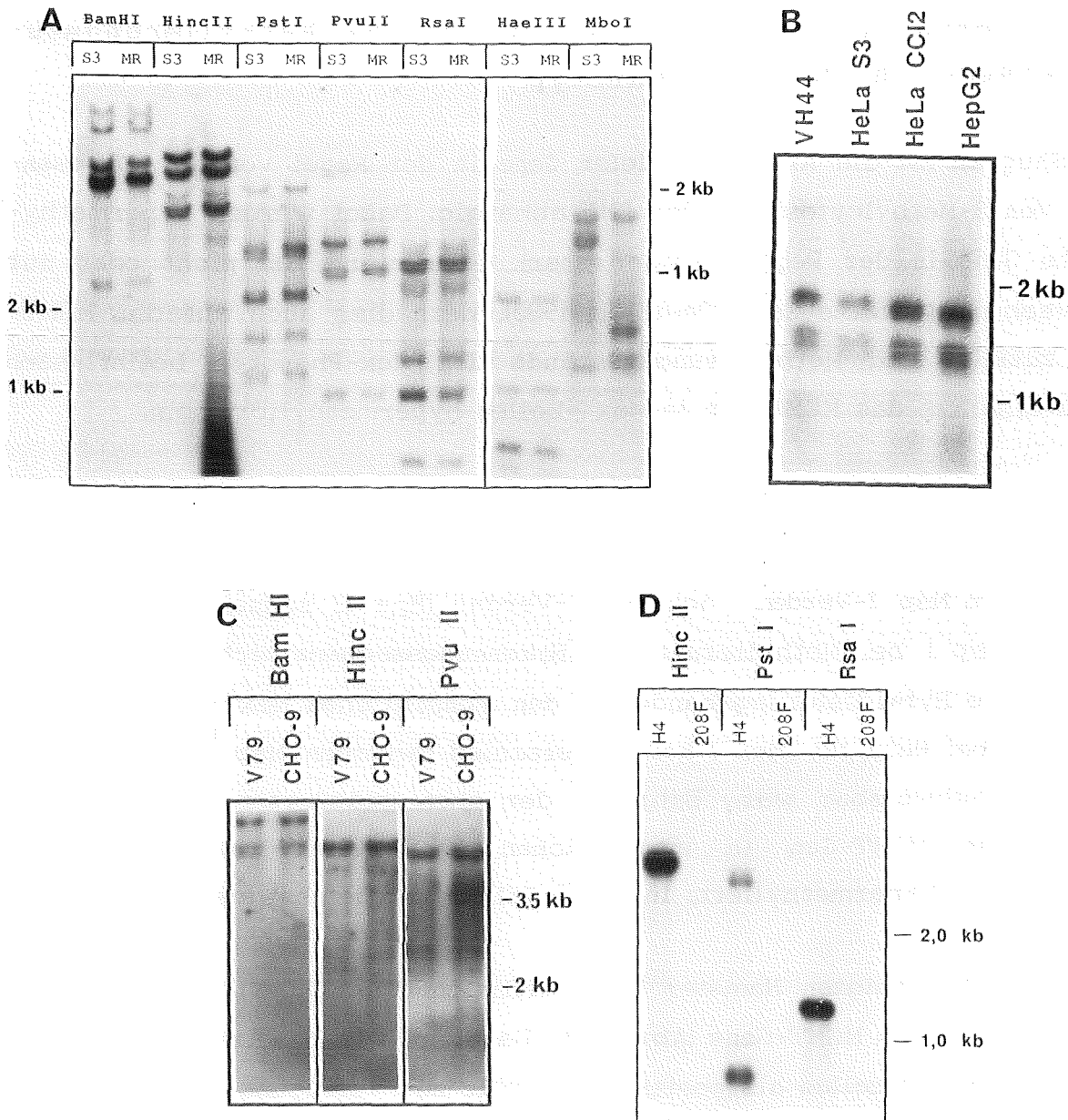


Abb. 41: RFLP-Analysen des MGMT-Gens in menschlichen Zelllinien, Hamster- und Rattenzelllinien.

Zum Restriktionsverdau wurden jeweils 10 µg genomische DNA eingesetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte über ein 0,8 % bzw. 1,2 % (MboI, HaeIII-Verdau) Gel. Die Hybridisierung erfolgte mit der gesamten MGMT cDNA (³²P-markiert).

A: Vergleichende Southern-Analyse zwischen HeLa S3 (Mex⁺) und HeLa MR (Mex⁻)

B: Vergleichende Southern-Analyse verschiedener menschlicher Mex⁺-Zelllinien im MboI-Verdau (0,8 %-Gel) .

C: Vergleich der Mex⁻-Hamsterzelllinien V79 und CHO-9.

D: Vergleich zwischen den Rattenzelllinien H4 (Mex⁺) und 208F (Mex⁻).

5.2. Untersuchungen zur Bedeutung von DNA-Methylierungszuständen für den Mex-Phänotyp

Bei Säugern ist die Aktivität vieler Gene in der Regel von der Anwesenheit von 5-Methylcytosin in der DNA abhängig. Dabei werden hypermethylierte Gene in der Regel weniger stark exprimiert, als nicht oder nur schwach methylierte Gene (Doerfler, 1983). Wenn dies auch auf das MGMT-Gen zutrifft und Methylierungszustände den Mex-Phänotyp beeinflussen würden, sollte das MGMT-Gen in Mex⁻-Zellen hypermethyliert sein.

Diese Hypothese konnte experimentell jedoch nicht bestätigt werden. Wie in den in Abb. 42A dargestellten Southern-Analysen gezeigt, traten im Vergleich zum Msp I-Verdau nach Hpa II-Verdau (Hpa II schneidet im Gegensatz zu Msp I bei Methylierung der Erkennungssequenz nicht mehr) hochmolekulare Hybridisierungsbanden in den menschlichen Mex⁺-Zelllinien auf, während bei HeLa MR (Mex⁻) kein Unterschied zwischen Msp I und Hpa II-Verdau nachweisbar war. Entgegen der oben geäußerten Hypothese ist somit das MGMT-Gen in menschlichen Mex⁺-Zellen relativ zu den Mex⁻-Zellen hypermethyliert, in Mex⁻-Zellen vergleichsweise hypomethyliert.

Demgegenüber zeigten Hamster Mex⁻-Zelllinien (V79, CHO-9) eine deutliche Methylierung des MGMT-Gens (Abb. 42B). Da aber, wie bereits erwähnt keine Mex⁺-Hamsterzellen als positive Kontrolle zur Verfügung stehen, ist eine abschließende Beurteilung dieses Ergebnisses nicht möglich.

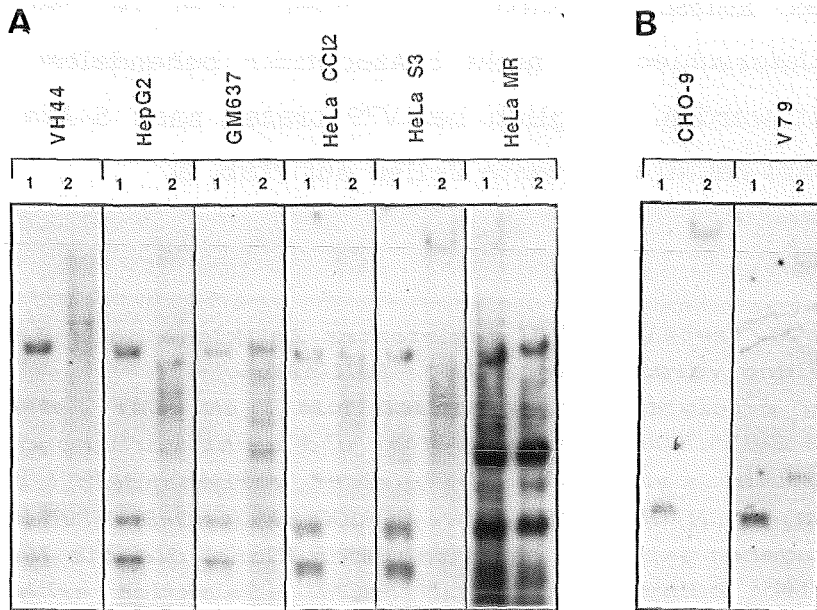


Abb. 42: Untersuchung des Methylierungszustandes des MGMT-Gens bei verschiedenen *Mex*⁺- bzw. *Mex*⁻-Zelllinien.

Zum RE-Verdau wurden 10 µg genomische DNA eingesetzt. *Msp I* und *Hpa II* erkennen gleiche Restriktionsschnittstellen, jedoch mit dem Unterschied, daß *Hpa II* bei Anwesenheit von 5-Methylcytosin in der Erkennungssequenz nicht mehr schneiden kann. Die Auftrennung des Restriktionsverdaus erfolgte über ein 0,8 % Agarose Gel. Als Hybridisierungsprobe wurde die vollständige, ³²P-markierte MGMT-cDNA eingesetzt. Die Zuordnung der Zelllinien zum *Mex*-Phänotyp vgl. Abb. 23. 1 = *Msp I*-Verdau; 2 = *Hpa II*-Verdau.

A: Vergleichende Analyse menschlicher *Mex*⁺-Zelllinien mit HeLa MR (*Mex*⁻).

B: Vergleich von *Mex*⁻-Hamsterzelllinien untereinander.

Um den Einfluß von 5-Methylcytosin-DNA-Methylierung auf den *Mex*-Phänotyp auch funktionell zu untersuchen, wurden HeLa S3 (*Mex*⁺), V79, CHO-9 und HeLa MR Zellen (alle *Mex*⁻) für 3 Wochen mit 1 µM 5-Azacytidin behandelt (3x pro Woche; bei der Passagierung zugesetzt). Es sollte so versucht

werden, durch Einbau dieses Basenanalogs den Methylierungsgrad des MGMT-Gens zu vermindern. Bei der nachfolgenden Behandlung mit HeCNU, welches spezifisch Mex⁺ Zellen selektioniert, konnten weder bei HeLa S3, MeLa MR noch CHO-9 Unterschiede zu nicht 5-Azacytidin behandelten Kontrollzellen festgestellt werden. Lediglich bei V79 traten nach 5-Azacytidin-Behandlung vermehrt HeCNU resistente Zellen auf (Tab. 3).

Tab. 3: Häufigkeit des Auftretens HeCNU resistenter Zellklone nach 5-Azacytidin-Behandlung verschiedener Mex⁻-Zelllinien. Die Behandlung erfolgte 3x wöchentlich mit 1 µM. Zur Selektion wurden gleiche Zellzahlen vorbehandelter und nicht vorbehandelter Zellen (5-Azacytidin vorbehandelt (+) ; nicht vorbehandelt (-)) mit einer Dosis von 40 µM (HeLa MR) bzw. 80-100 µM (CHO-9, V79) HeCNU behandelt. Angegeben ist die Gesamtzahl der Klone, die die HeCNU-Selektion überlebt haben. Nach 100 µM HeCNU -Selektion erhaltene Klone wurden auch auf MNNG-Resistenz und MGMT-Aktivität getestet.

	HeCNU selektionierte Zelllinien					
	HeLa MR		CHO-9		V79	
5-Azacytidin-Behandlung (1 µM)	+	-	+	-	+	-
Überlebende Klone (100 µM Selektion)	0	0	0	0	46(13)	3(0)
HeCNU-Resistenz	/	/	/	/	++	/
MNNG-Resistenz	/	/	/	/	-	/
MGMT-Aktivität	/	/	/	/	-	/

/ : entfällt
 - : negativ
 ++: starke Resistenz

Die auf diese Weise nach 5-Azacytidin-Behandlung isolierten V79 Zellklone waren stabil HeCNU-resistent, wiesen jedoch keine erhöhte MNNG-Resistenz auf (Abb. 43). Dies war insofern überraschend, als daß in den bisherigen Untersuchungen immer eine Kreuzresistenz zwischen MNNG und HeCNU gefunden worden war (vgl. Abb. 18,19). Da diese V79-Zellklone zudem keine

MGMT-Aktivität aufzeigten (Tab. 3), handelt es sich um Zellen, die durch 5-Azacytidin-Behandlung HeCNU-Resistenz erworben haben, wobei diese jedoch auf der Induktion anderer Schadensabwehrmechanismen als der MGMT beruhen muß.

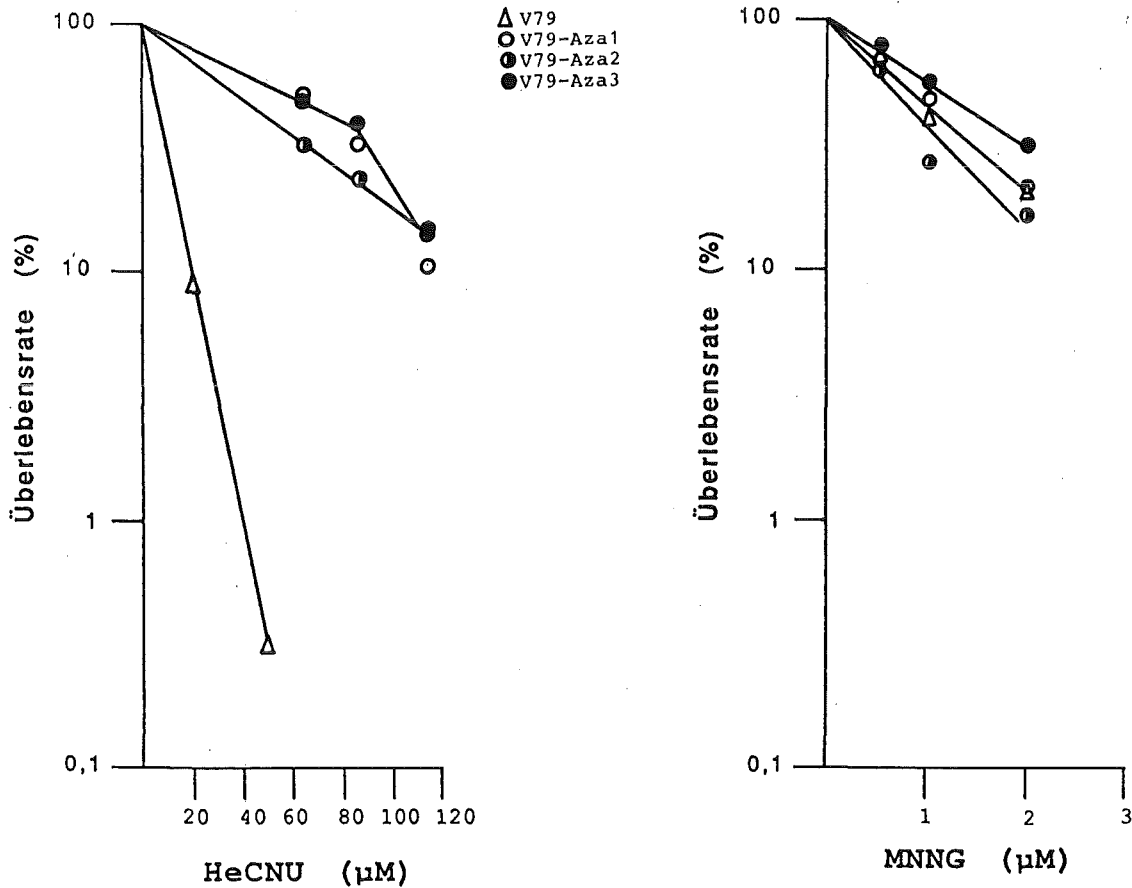


Abb. 43: Überlebensrate nach 5-Azacytidin-Behandlung und HeCNU-Selektion erhaltener V79 Zellklone .
Die Mutagenbehandlung erfolgte nach Einsaat von 500 Zellen/5 cm Platte für 1 h bei 37 °C.

Diskussion

1. UNTERSUCHUNGEN ZUR MMS-HYPERSENSITIVITÄT VON 27-1

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Hamster-Zelllinie 27-1 gehört zur CHO-Komplementationsgruppe 3 (Kaina et al., 1991a) und ist eine gegenüber UV und den monofunktionellen Alkylantien MNNG und MMS hypersensitive Mutante der Zelllinie CHO-9 (Zdzienicka u. Simons, 1986; Kaina, 1987). Die Komplementation des UV-Defektes von 27-1 durch Transfektion mit genomischer DNA führte zur Klonierung des ERCC3-Gens (Weeda et al., 1990a). Die Tatsache, daß ERCC3 nur die UV-Hypersensitivität, nicht aber die Alkylantien-Hypersensitivität von 27-1 korrigiert zeigt, daß es sich bei 27-1 um eine Doppelmutante handelt. Der von Weeda et al. (1990a) für 27-1 beschriebene Inzisionsdefekt nach UV-Bestrahlung kann durch ERCC3 korrigiert werden.

Nach MNNG-Behandlung zeigt die 27-1 Zelllinie weder eine im Vergleich zum CHO-9-Wildtyp veränderte DNA-Alkylierungsrate, noch eine veränderte Exzision von DNA-Alkylierungsprodukten (7-Methylguanin, 3-Methyladenin, O⁶-Methylguanin; Kaina et al., 1990b). Allerdings erwies sich die DNA-Reparatursynthese von 27-1 Zellen gegenüber CHO-9 Zellen leicht erhöht (Kaina et al., 1990b). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist ein im Rahmen der Exzisionsreparatur verzögerter Ligationsschritt.

Es ist bekannt, daß an der Exzisionsreparatur beteiligte Enzyme durch Ribosylierung modifiziert werden können. Hierbei wird die Aktivität der Exonuklease durch Ribosylierung wahrscheinlich gehemmt, die der Ligase II stimuliert (Durcacz et al., 1980; Creissen u. Shall, 1982; Shall et al., 1982; Cleaver et al., 1983; Althaus et al., 1985). Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die ADPRT-abhängige Ribosylierung in 27-1-Zellen verändert ist und möglicherweise als Ursache für die Alkylantienhypersensitivität dieser Mutante in Frage kommt.

Es zeigte sich, daß 27-1 Zellen zwar eine geringere ADPRT-mRNA Expression sowie ADPRT-Enzymaktivität aufwiesen als CHO-9-Zellen, doch dürfte nach den hier vorliegenden Ergebnissen dieser Unterschied nicht für die zu beobachtenden starken Differenzen in der MMS-Resistenz zwischen Mutante und Wildtyp verantwortlich sein. Gezeigt werden konnte dies anhand von mit einem ADPRT-Expressionskonstrukt stabil transfizierten 27-1 Zellen. Obwohl 27-1-Transfektanten im Vergleich zu CHO-9 eine höhere ADPRT-Expression aufwiesen, so erreichten diese bei weitem nicht das MMS-Resistenzniveau des CHO-9-"Wildtyps". Es ist daher unwahrscheinlich, daß die zwischen CHO-9 und 27-1 auf RNA- und Protein-Ebene beobachteten ADPRT-Unterschiede von entscheidender ursächlicher Bedeutung für den Alkylantien-hypersensitiven Phänotyp von 27-1 sind. Erstmalig konnte hier allerdings durch die Versuche mit 27-1- und CHO-9-ADPRT-Transfektanten direkt nachgewiesen werden, daß ADPRT an der Vermittlung von MMS- und UV-Resistenz beteiligt ist. Das Ausmaß dieser Resistenzvermittlung ist jedoch sehr gering; dies entspricht Literaturdaten, wo u.a. versucht wurde, den Einfluß der Ribosylierung an der Resistenzvermittlung durch Einsatz von Ribosylierungshemmstoffen (3-Aminobenzamid) zu bestimmen (Shall et al., 1982; Bhatia et al., 1990; Mac Laren et al., 1990).

Eine weitere Hypothese zur Erklärung der 27-1 Alkylantien-Hypersensitivität, die in der vorliegenden Arbeit verfolgt wurde, beruht auf der Annahme einer verringerten oder fehlenden Replikationshemmung nach Alkylantienbehandlung. Ein solcher Defekt hätte eine verkürzte Zeitspanne zur Folge, in der die Zellen induzierte DNA-Schäden reparieren könnten, wodurch die Zahl der durch Replikation manifestierten prätoxischen Schäden erhöht würde. Das Phänomen einer verringerten DNA-Replikationshemmung wurde bei Ataxia telangiectasia Zellen nach Einwirkung von Röntgenstrahlen und Bleomycin beobachtet und als Ursache für die Röntgen-Hypersensitivität dieser Zellen diskutiert (De Wit et al., 1981; Jaspers et al., 1982).

In den hier durchgeführten Untersuchungen konnten allerdings keine Unterschiede im Ausmaß der MMS induzierten Replikationshemmung zwischen CHO-9- und 27-1- Zellen gefunden werden. Insgesamt gesehen ist also bisher nicht klar, welche Ursache der Alkylantien-Hypersensitivität der 27-1 Zellen zugrunde liegt. In Betracht gezogen werden muß auch, daß der Phänotyp der 27-1 Zellen möglicherweise nicht direkt auf einen im Vergleich zum CHO-9 "Wildtyp" veränderten DNA-Reparaturmechanismus beruht, sondern daß an Wachstum und Replikation beteiligte Faktoren, wie Helicasen, Topoisomerasen, Polymerasen oder Kinasen indirekt am Phänotyp "Resistenz" beteiligt sein könnten. So ist beispielsweise die Beteiligung einer Kinase an der UV-Resistenzvermittlung bei XP-B-Zellen beschrieben worden (Teitz et al., 1990).

2. KOMPLEMENTATION DER ALKYLANTIEN-HYPERSENSITIVITÄT VON 27-1 ZELLEN DURCH GENOMISCHE UND cDNA TRANSFEKTION

Wie oben ausgeführt, konnten Untersuchungen von DNA-Reparaturfunktionen bei 27-1-Zellen deren Alkylantien-Hypersensitivität nicht zufriedenstellend erklären. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht, über Transfektionsexperimente mit genomischer menschlicher DNA und anschließender Selektion mit toxischen Dosen von MMS die MMS-Hypersensitivität von 27-1 zu komplementieren. Ziel war die Isolierung des komplementierenden Gens.

Durch die in Abb. 3 skizzierte Vorgehensweise konnte ein MMS-Resistenz vermittelndes Gen kloniert werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, handelt es sich bei der als C-81 bezeichneten cDNA aller Wahrscheinlichkeit nach um das gleiche Gen, das in unabhängigen Transfektionsversuchen von Kaina (1989) auch als MNNG-Resistenz vermittelndes Gen isoliert wurde. Da die isolierte genomische DNA (Cosmide) bzw. die C-81 cDNA sowohl MMS-, MNNG als auch 6-TG-Resistenz in 27-1- und CHO-9-Zellen bewirkt, erscheint es unwahrscheinlich, daß es sich hierbei um den spezi-

fisch 27-1-Zellen fehlenden und deren Hypersensitivität verursachenden Faktor handelt.

Das Ergebnis der Sequenzanalyse zeigte, daß die klonierte C-81 cDNA aufgrund ihrer hohen Homologie mit dem menschlichen lysosomalen Glykoprotein Lamp 2 (Fukuda et al., 1988) höchstwahrscheinlich ebenfalls für ein Membranglykoprotein codiert. Da C-81 jedoch nicht völlig identisch mit Lamp 2 ist (starke Unterschiede insbesondere im C-terminalen Bereich des Proteins), muß es sich bei der hier isolierten C-81 cDNA entweder um das Produkt eines neuen Gens oder um eine Splicevariante von lamp 2 handeln.

Bis auf ihre Schutzfunktion vor der abbauenden Wirkung lysosomaler Verdauungsenzyme ist bisher keine weitere Funktion lysosomaler Membranproteine beschrieben worden. Dies macht auch eine Beurteilung der C-81 Funktion bei der Resistenzvermittlung schwierig. Da allerdings bekannt ist, daß ca. 5 % der lysosomalen Glykoproteine an der Cytoplasmamembran lokalisiert sind (Steinman et al., 1983; Lippincott-Schwarz u. Fambrough, 1987), wäre eine Rezeptorfunktion an der Cytoplasmamembran lokalisierter, ursprünglich aber lysosomaler Membranproteine nicht auszuschließen.

Dem Mechanismus der Resistenzvermittlung durch C-81 zugrunde liegt möglicherweise ein Einfluß dieses Genprodukts auf den Zellzyklus. Sowohl die von mir isolierten Cosmidtransfektanten, wie auch die von Kaina (1987,1989) isolierten primären und sekundären Transfektanten T38, T60, T70 wiesen längere Generationszeiten auf, als die jeweilige Parentalzelllinie. Außerdem zeigte sich eine verstärkte Expression der C-81 mRNA in konfluenten menschlichen Zellen. Eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit mit entsprechend verlängerter Zeit zur Reparatur wäre eine Erklärungsmöglichkeit für den Mechanismus der Resistenzvermittlung durch C-81.

Die von mir aus der T60-Cosmidbank isolierten Cosmide zeigten in den Massentransfektionen eine im Vergleich zu Kontrolltransfektanten zwar

deutliche, insgesamt aber relativ geringe Frequenz der Resistenzvermittlung. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß in den Cosmiden das C-81 Gen unter Kontrolle des endogenen Promotors steht, und die Effizienz der Resistenzvermittlung aufgrund der Mutagenselektionen der primären (T38) und sekundären (T60) Transfektante möglicherweise auch durch Mutationen im C-81-Gen beeinträchtigt worden ist. Erstaunlicherweise vermittelt jedoch auch die in einen eukaryontischen Expressionsvektor klonierte C-81 cDNA ebenfalls nur mit relativ geringer Frequenz MMS- bzw. MNNG-Resistenz. Für diese Beobachtung gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten:

- a: Die klonierte C-81 cDNA könnte unvollständig oder im Verlauf der Klonierung mutiert sein.
- b: Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß die beobachtete geringe Frequenz der Resistenzvermittlung auf ein Expressionsproblem des pSVT7-Konstrukts zurückgeht (nur geringe konstitutive Expression von C-81).
- c: Zur effektiven Resistenzvermittlung sind alle in den Northern-Blot Analysen mit der C-81-Probe hybridisierenden mRNA's (mehrere Splicevarianten eines Gens ?) nötig.
- d: Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre der negative Selektionsdruck, der nach Überexpression eines wachstumshemmenden Proteins in den Zellen entstehen würde. Die Konsequenz wäre ein Überwachsen der Transfektanten durch C-81 nicht exprimierende Zellen und im Endeffekt ein völliger Verlust positiver C-81 Transfektanten.

Diese letztgenannte Hypothese wird dadurch unterstützt, daß während der hier durchgeführten Klonierungsarbeiten eine deutliche Instabilität der Transfektanten hinsichtlich ihres Phanotyps beobachtet werden konnte. Die gleiche Beobachtung wurde auch von Kaina (1989) gemacht. Auch die nur geringfügig höheren C-81 Expressionsraten in den primären und sekundären Transfektanten deuten auf diese Möglichkeit hin. Ob der Effekt einer verstärkten Alkylantienresistenz auf die beobachtete geringfügig erhöhte C-81 Expression in den Transfektanten zurückzuführen ist, oder ob

die bei den Parentalzelllinien CHO-9 und 27-1 exprimierte C-81 mRNA möglicherweise Mutationen trägt und in den Transfektanten durch Transfektion intakte C-81-mRNA exprimiert wird, kann gegenwärtig nicht beantwortet werden.

Da die hier isolierte C-81 Sequenz auch Resistenz gegenüber 6-TG vermittelt, ist es wahrscheinlich, daß die isolierte cDNA auch für beschriebene Kreuzresistenzen zwischen MNU und 6-TG (Aquilina et al., 1989, 1990) verantwortlich ist.

Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen, daß ein Membranprotein bei der Vermittlung von Alkylantienresistenz involviert ist, könnte auch eine Erklärung für die von Kaina (1989) gemachte Beobachtung sein, daß sowohl die primären und sekundären 27-1 bzw. CHO-9-Transfektanten (T38, T60, T70), als auch Cosmidtransfektanten (Cosmide aus T70) tumorsupprimiert sind, d.h. nach Injektion in Nacktmäusen keine, oder aber bedeutend langsamer wachsende Tumore ausbilden, als die Parentalzellen.

Eine Abklärung der Wirkungsweise des isolierten Gens muß zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben. Voraussetzung hierzu ist u.a. die Herstellung C-81 spezifischer Antikörper sowie die Klonierung aller C-81-mRNA Varianten und des kompletten intakten Gens. Dadurch könnten Fragen bezüglich der Lokalisation des C-81 Proteins sowie Fragen nach dem Einfluß der verschiedenen C-81-mRNA Varianten auf das zelluläre Resistenz- bzw. Wachstumsverhalten untersucht werden.

3. DIE BEDEUTUNG DER MGMT ALS ANTI-GENOTOXISCHE DNA-REPARATURFUNKTION NACH ALKYLIERUNG

Alkylierende Agenzien spielen sowohl als Tumorchemotherapeutika als auch als Umweltschadstoffe eine bedeutende Rolle (Farmer, 1985; Malpas, 1986; Ruddon, 1987; Archer, 1989; Tricker et al., 1989). Während N-Alkylierungsprodukte wie N³-Methyladenin durch Replikationshemmung toxisch wirken können (Larson et al., 1985), haben die quantitativ selteneren O-Alkylierungsprodukte aufgrund ihrer Fehlpaarungseigenschaften mutagene Wirkung (Bartsch et al., 1983; Loechler et al., 1984; Saffhill et al., 1985, Pegg, 1990). Da O⁶-Methylguanin mit einem Anteil von 8 % der Gesamtalkylierungen nach MNU-Behandlung von Zellen die häufigste O-Alkylierung darstellt (Beranek, 1990), ist sie gleichzeitig die wichtigste prämutagene Läsion. Dementsprechend wird der O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (MGMT) aufgrund ihrer Reparaturfunktion eine wichtige antimutagene und auch anticarcinogene Wirkung zugesprochen (Yarosh et al., 1985; Pegg, 1990). Erste Hinweise für eine möglicherweise auch toxische Wirkung von O⁶-Alkyguanin ergaben sich aus der Beobachtung, daß menschliche Tumorzelllinien, denen die MGMT-Reparaturfunktion fehlte (Mex⁻), hypersensitiv gegenüber MNNG waren (Day III et al., 1980; Yarosh et al., 1983). Da es sich bei den untersuchten Zelllinien jedoch nicht um isogene Zellstämme handelte, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß noch andere Veränderungen als die MGMT-Defizienz ursächlich an der MNNG-Sensitivität beteiligt sind. Weitere Hinweise für eine toxische Wirkung von O⁶-Alkylguanin ergaben sich aus der Untersuchung von mit dem bakteriellen ada-Gen transfizierten Zellen (Brennan u. Margison, 1986; Ishizaki et al., 1986; Kataoka et al., 1986; Samson et al., 1986). Da das bakterielle Ada-Protein im Vergleich zur menschlichen MGMT jedoch zusätzlich noch O⁴-Alkylthymin- und Phosphotriester-Reparaturaktivität besitzt (Yarosh et al., 1985; Lindahl et al., 1988), ermöglichten jedoch auch die Ergebnisse dieser Untersuchungen keine eindeutige Aussage bezüglich der Toxizität der O⁶-Alkyguanin-Läsion.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Mex⁻- Zelllinie (CHO-9) mit der menschlichen, spezifisch nur O⁶-Alkylguanin reparierenden Alkyltransferase stabil komplementiert. Durch die Verwendung etablierter isogener Zellstämme, die sich lediglich bezüglich ihrer MGMT-Aktivität unterscheiden, war es möglich, alle nach Alkylierung dieser Zellen zu beobachtenden Effekte auf diese Reparaturaktivität zurückzuführen. Durch diese Arbeiten konnte die O⁶-Methylguanin-Läsion eindeutig sowohl als die hauptmutagene und -toxische, als auch als eine SCE-induzierende und clastogene Läsion identifiziert werden.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, besteht nach MNNG-Behandlung von Zellen eine umgekehrte Korrelation zwischen Mutationsfrequenz und MGMT-Aktivität. Bei einer MNNG-Dosis von 1 µM können 95 % der induzierten HGPRT-Mutationen auf O⁶-Methylguanin zurückgeführt werden. Nach MNNG-Exposition von Zellen stellt O⁶-Methylguanin somit die entscheidende prämutagene Läsion dar. Da GC→AT-Transitionen auch im durch Alkylierung aktivierten zellulären H-ras Protoonkogen gefunden wurden (Sukumar et al., 1983; Mitra et al., 1989) stellt O⁶-Methylguanin sehr wahrscheinlich auch eine wichtige präkarzinogene Läsion dar. In Korrelationsanalysen konnte auch eine umgekehrte Korrelation zwischen MGMT-Aktivität und Induktion von SCE's bzw. Aberrationen nachgewiesen werden (Kaina et al., 1991b).

Da O⁶-Alkylguanin die nach Alkylierung dominierende prämutagene Läsion darstellt, und die MGMT-Aktivität gleichzeitig eine große interindividuelle Variation aufweist (Grafstrom et al., 1983; Myrnes et al., 1983), kann folglich bei Personen mit geringeren MGMT-Aktivitäten eine Prädisposition zu Alkylantien induzierten Mutationen und damit zur Initiation der Tumorbildung vermutet werden. Diese Hypothese einer erblichen Prädisposition zu alkylantien-induzierter Tumorbildung erscheint insbesondere für die Entstehung von Magen-Darm-Tumoren attraktiv, da in den betreffenden Organen bis zu 40 fache interindividuelle Variationen in der MGMT-Aktivität gefunden wurden und im Magen-Darm-Trakt aufgrund endogener Nitro-

saminbildung auch hohe Alkylantienbelastungen der umgebenden Zellen zu erwarten sind (Kobori et al., 1988; Kyrotopoulos et al., 1989, 1990; Leaf et al., 1989; Rowland et al., 1991). Unterschiedliche MGMT-Aktivitäten zwischen gesunden Personen (höhere MGMT-Aktivitäten) und Patienten mit Lymphomen (geringere MGMT-Aktivitäten), sowie geringere MGMT-Aktivitäten in Lungenzellen von Patienten mit Lungentumoren unterstützen die Hypothese einer höheren Tumorinzidenz bei Personen mit relativ geringen MGMT-Aktivitäten (Rüdiger et al., 1989; Sagher et al., 1989). Erbliche Aspekte bei der Tumorentstehung aufgrund von individuell unterschiedlichen DNA-Reparaturaktivitäten wurden auch von Harris (1989) diskutiert.

Weiterhin ergaben die Arbeiten, daß O^6 -Alkylguanin auch eine wichtige toxische Läsion darstellt. Das Ausmaß der anti-toxischen Wirkung der MGMT hängt im wesentlichen von der Zahl der MGMT Moleküle pro Zelle, der Mutagendosis und dem verwendeten Alkylanz ab. Die protektive Wirkung von MGMT gegenüber MNNG verläuft in einem weiten Bereich linear; erst bei sehr hohen MNNG-Dosen (über $5 \mu\text{M}$) übt das MGMT-Protein nicht mehr die von einer linearen Funktion zu erwartende protektive Funktion aus. Der Grund hierfür ist möglicherweise, daß andere Reparaturmechanismen (z.B. Exzisionsreparatur) bei hoher Alkylantienbelastung abgesättigt sind und damit andere Läsionen als O^6 -Methylguanin bzw. O^6 -Chlorethylguanin zum entscheidenden toxischen Schadenstyp werden. Bei niedrigen bis mittleren MNNG-Dosen ist die MGMT-Reparaturfunktion jedoch der wichtigste, das zelluläre Überleben determinierende Faktor. Im allgemeinen nimmt die Schutzwirkung des MGMT-Proteins mit der Zahl der O-Alkylierungen, die das jeweilige Agens verursacht, ab. Die Ausnahme hierzu stellt ENU dar. Obwohl ca. 10 % der durch ENU bewirkten Alkylierungen der DNA an der O^6 -Position des Guanins stattfinden, wirkt das MGMT-Protein nicht protektiv bezüglich der toxischen Wirkung von ENU; wohl aber reduziert die MGMT die ENU induzierten Mutationsfrequenzen. Durch ENU induziertes O^6 -Ethylguanin stellt folglich zwar eine prämutagene, nicht aber prätoxische Läsion dar. Eine mögliche Erklärung für dieses unerwartete Phänomen wäre, daß die von ENU in großer Zahl indu-

zierten Phosphotriester (60-70 % der Gesamtalkylierung ausmachend, Bera- nek, 1990) eine wichtige, bisher noch unbekannte Rolle beim Überleben der Zellen spielen.

Über die Art und Weise, wie die O⁶-Alkylguanin-Läsion seine toxische Wir- kung entfaltet, gibt es bisher keine klaren Hinweise; es ist lediglich be- kannt, daß diese Läsion nicht replikationsblockend wirkt (Larson et al., 1985). Eine Möglichkeit der toxischen Wirkung besteht in der Akkumulation von Punktmutationen und dadurch bedingtem Funktionsverlust wichtiger Enzymfunktionen. Dies ist aber insofern unwahrscheinlich, als daß, bei Einsatz äquitoxischer Dosen, ENU bedeutend mutagener wirkt als MNNG. Ei- ne weitere Möglichkeit besteht darin, daß die toxische Wirkung von O⁶-Methylguanin indirekt über die Bildung von SCE's und Aberrationen verläuft; an deren Entstehung ist die O⁶-Alkylguanin-Läsion, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, auch beteiligt.

Um der Frage der zellzyklusabhängigen Toxizität des O⁶-Methylguanins nachzugehen, wurde ein induzierbarer MGMT-Expressionsvektor hergestellt und nach dessen Transfektion in HeLa MR-Zellen (Mex⁻) ein transgener Zellklon isoliert, bei dem die Methyltransferasefunktion beliebig durch Dexamethason induziert werden kann. Auf diese Weise konnte gezeigt wer- den, daß nach MNNG-Behandlung die O⁶-Methylguanin -Läsion erst nach mehr als einem Zellzyklus eine toxische Wirkung ausübt.

Demgegenüber muß zum wirkungsvollen Schutz vor der toxischen Wirkung chlorethylierender Agenzien (HeCNU) die MGMT-Reparaturfunktion zum Zeit- punkt der Alkylierung bereits in den Zellen vorliegen. Der Grund hierfür liegt darin, daß es nach O⁶-Chlorethylierung am Guanin relativ schnell zur Ausbildung von DNA-"cross-links" kommt, die von der Methyltransfera- se nicht mehr repariert werden können (Ludlum, 1990). Die in der MGMT induzierbaren Transfektante anhand der Zeitabhängigkeit der MGMT-Schutz- wirkung gegenüber HeCNU feststellbare Halbwertszeit der Ausbildung von

"cross-lins" beträgt 4 h. Dieses Ergebnis stimmt gut überein mit in vitro Halbwertszeitbestimmungen von O⁶-Chlorethylguanin durch Brent u. Remack (1988).

Zusammengefaßt lassen sich die Ergebnisse dahingehend deuten, daß O⁶-Chlorethylguanin seine toxische Wirkung innerhalb des ersten Zellzyklus nach Induktion, O⁶-Methylguanin aber erst im 2. Zellzyklus nach Induktion entfaltet. Da gezeigt wurde, daß sekundäre Läsionen bei der Ausbildung von SCE's involviert sind (Kaina u. Aurich, 1985) erscheint es möglich, daß O⁶-Methylguanin seine toxische Wirkung auch erst über die Bildung solcher Sekundärläsionen ausübt. Die Frage nach dem Mechanismus der Ausbildung und der Art von Sekundärläsionen kann gegenwärtig noch nicht beantwortet werden. Mit der Verfügbarkeit der etablierten CHO-9-MGMT-Transfektanten sowie der induzierbaren HeLa MR-MGMT-Transfektante sind jedoch die Voraussetzungen für eine experimentelle Untersuchung dieser Fragestellungen geschaffen worden.

4. REGULATION DER MGMT-EXPRESSION: URSACHEN FÜR DEN MEX⁻-PHÄNOTYP

Obwohl der Mex (Mer)-Phänotyp, insbesondere durch Vergleich der Reparaturaktivitäten von tumorigenen und nicht tumorigenen menschlichen Zellen, intensiv untersucht wurde, sind die molekularen Ursachen der Umwandlung des Mex⁺ zum Mex⁻-Phänotyp unbekannt. Die Klonierung der menschlichen MGMT cDNA (Tano et al., 1990) machte es möglich, diese Thematik näher zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Mex⁻-Zellen keine in Northern-Blot Analysen detektierbare MGMT-mRNA aufweisen; fehlende bzw. stark reduzierte Expression des MGMT-Gens sind also die Ursache für die MGMT-Defizienz der hier untersuchten Mex⁻-Zelllinien (CHO-9; V79; HeLa MR).

Das gleiche Phänomen in Northern-Blot Analysen nicht nachweisbarer MGMT-Expression wurde auch in anderen Mex⁻-Zelllinien beobachtet (Fornace et al., 1990; Rydberg et al., 1990, Tano et al., 1990) . Eigene und von Pieper et al. (1991) unter Verwendung der PCR-Technik durchgeführte Expressionsanalysen deuten jedoch darauf hin, daß manche Mex⁻-Zellen nicht völlig defekt bezüglich der MGMT-Expression sind, sondern daß noch eine sehr geringe basale Expression des MGMT-Gens vorliegt .

Prinzipiell kommen folgende Ursachen für die Auslöschung des Mex⁺-Phänotyps in Betracht:

- a: Völlige Deletion des MGMT-Gens .
- b: Punktmutationen oder kurze Deletionen in regulatorisch und funktionell wichtigen Bereichen des MGMT-Gens .
- c: Inaktivierung des MGMT-Gens durch Methylierung (Hyper- bzw. Hypomethylierung).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, sind mehrere der oben aufgeführten Möglichkeiten bei Mex⁻-Zellen vorzufinden. So konnte nachgewiesen werden, daß Ratten 208F Zellen eine völlige Deletion des MGMT-Gens aufweisen. Neben der von Tano et al. (1990) beschriebenen HeLa M Zelllinie sind 208F Zellen damit die einzigen Mex⁻-Zellen, denen das komplette MGMT-Gen fehlt. Wie in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Thomale et al. (1990) beurteilt werden müssen, die nach CNU-Selektion von 208F Zellen Methyltransferase - positive Zellklone erhielten, bleibt unklar. Da die Autoren in ihren Untersuchungen lediglich Methyltransferase-Aktivitäten gemessen haben, jedoch keinen Nachweis des Vorhandenseins und der Expression des MGMT-Gens durch Southern- oder Northern-Blot-Analysen erbrachten, kann in Verbindung mit den eigenen Ergebnissen die Existenz einer zweiten, bisher unbekanntem Methyltransferase-Reparaturfunktion nicht ausgeschlossen werden.

Auch das Auftreten von Punktmutationen bzw. kleinen Deletionen in Mex⁻-Zellen konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Im Vergleich zu menschlichen Mex⁺-Zelllinien wiesen MGMT defiziente HeLa MR einen RFLP nach Mbo I-Verdau auf. Auch zwischen Hamster Mex⁻-Zelllinien (V79, CHO-9) konnte ein RFLP gefunden werden. Diese Ergebnisse einer Mutation im MGMT-Gen von Mex⁻-Zellen stellt einen Hinweis dafür dar, daß Mutationen an der Inaktivierung des MGMT-Gens funktionell beteiligt sein könnten. Insbesondere für die Entwicklung von Tumoren in vivo wäre denkbar, daß Zellen durch Mutationsereignisse MGMT defizient und infolgedessen anfälliger für die carcinogene Wirkung von Alkylantien werden. Unterstützt wird diese Hypothese der klonalen Entwicklung eines Tumors aus einer Mex⁻-Zelle durch Ergebnisse von Isowa et al. (1991), die in einer Reihe von menschlichen Lebertumoren keine MGMT-Aktivität mehr feststellen konnten. Die Befunde, daß jedoch ein großer Teil (20-30 %) menschlicher Zellen nach Transformation Mex⁻ werden (Day III et al., 1980; Green et al., 1990), sowie die Möglichkeit der Reversion von Mex⁻ zu Mex⁺ (Arita et al., 1990) sprechen allerdings dafür, daß auch noch andere Mechanismen außer Mutationen am Verlust des Mex⁺-Phänotyps beteiligt sind.

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung von Genaktivitäten ist die der CpG-Methylierung. Im allgemeinen besteht eine inverse Korrelation zwischen transkriptioneller Aktivität eines Gens und seinem Methylierungsstatus (Doerfler, 1983). Um den Einfluß von 5-Methylcytosin auf den Mex-Phänotyp zu untersuchen, wurden vergleichende Southern-Analysen zwischen menschlichen Mex⁺-Zelllinien und HeLa MR (menschliche Mex⁻-Zelllinie) durchgeführt. Falls Methylierungszustände einen Einfluß auf den Mex-Phänotyp haben, sollten Mex⁻-Zellen erwartungsgemäß eine MGMT-Hypermethylierung aufweisen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben überraschenderweise jedoch eine Hypomethylierung des MGMT-Gens in den HeLa MR-Zellen, während alle getesteten menschlichen Mex⁺-Zellen eine deutliche Hypermethylierung aufwiesen. Aufgrund dieses Ergebnisses erscheint es möglich, daß der Mex⁻-Phänotyp von HeLa MR durch eine Hypomethylierung des MGMT-Gens bedingt ist. Eine daraus zu folgernde Hy-

permethylierung des MGMT-Gens als Voraussetzung für dessen Expression wäre denkbar, da solche, wenn auch ungewöhnlichen Phänomene bereits beschrieben worden sind (Gerber-Huber et al., 1983; Kelley et al., 1988).

Für MGMT defiziente Mauszellen ist nach 5-Azacytidin-Behandlung eine Reversion des Mex⁻-Phänotyps zum Mex⁺-Phänotyp beschrieben worden (Mitani et al., 1989). Danach erscheint es möglich, daß im Gegensatz zu menschlichen Zellen das MGMT-Gen in Nagerzellen durch Hypermethylierung, d.h. den oben geäußerten Erwartungen entsprechend, inaktiviert ist. Zwar konnte auch in der vorliegenden Arbeit in Southern-Analysen eine Methylierung des MGMT-Gens von V79 und CHO-9 nachgewiesen werden, ein Vergleich mit Mex⁺-Zellen war aber nicht möglich, da keine Mex⁺-Hamsterzelllinien zur Verfügung standen. Aus diesem Grund wurde versucht, durch 5-Azacytidin-Behandlung und anschließende HeCNU-Selektion Mex⁺-Revertanten aus CHO-9 und V79 zu isolieren. Während bei CHO-9 auf diese Weise keine HeCNU resistenten Zellklone isoliert werden konnten, zeigten 5-Azacytidin behandelte V79-Zellen nach HeCNU-Behandlung eine deutlich höhere Überlebensfrequenz als nicht vorbehandelte Zellen. Allerdings wiesen die so isolierten HeCNU resistenten V79 Klone weder eine erhöhte MNNG-Resistenz, noch MGMT-Aktivität auf. Damit stellen diese HeCNU resistenten, Mex⁻ V79 Klone einen neuen, bisher nicht beschriebenen Phänotyp dar. Erwähnt werden soll, daß die oben erwähnte Arbeit von Mitani et al. (1989) auch von anderen Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden konnte (mündliche Mitteilungen).

Zusammenfassend deuten die eigenen, sowie die aus der Literatur bekannten Ergebnisse darauf hin, daß der Verlust des Mex⁺-Phänotyps auf verschiedene molekulare Ursachen zurückgeführt werden kann.

5. INDUZIERBARKEIT DES MGMT-GENS

In Anbetracht der Induzierbarkeit des ada-Gens von *E. coli* und im Hinblick auf Beobachtungen, die auf eine adaptive Antwort auch in Säugerkzellen hindeuten (Samson u. Schwarz, 1980; Kaina, 1983; Goth-Goldstein, 1987) stellte sich die Frage, ob die MGMT-mRNA Expression in Säugerkzellen induzierbar ist. Die Frage nach der Induzierbarkeit zellulärer Reparaturmechanismen wie der MGMT ist in zweifacher Hinsicht von praktischer Bedeutung. Einerseits sind Reparaturfunktionen aufgrund der zunehmenden Exposition des Menschen gegenüber Umweltcarcinogenen von besonderem Interesse für die menschliche Gesundheit, zum anderen kann auch die Tumorchemotherapie von solchen Ergebnissen positiv beeinflusst werden. Da alkylierende Agenzien (z.B. Chlornitrosoharnstoffe) ein breites Anwendungsgebiet in der Tumorchemotherapie haben, kann durch die Induktion von Mechanismen, die zur Resistenz der Zellen führen (z.B. die Induktion der MGMT) die Effizienz der jeweiligen Chemotherapie beeinträchtigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeiten zur Regulation der O⁶-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase konnte erstmals die Induzierbarkeit einer definierten DNA-Reparaturfunktion bei Säugern auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden (Fritz et al., 1991). Es zeigte sich, daß die Induktion der MGMT-mRNA Expression zellinienspezifisch, möglicherweise spezifisch für Leberzellen ist. Lediglich in Rattenhepatomzellen (H4, FTO-2B) konnte nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien 3-5 fach erhöhte MGMT-mRNA Mengen nachgewiesen werden. Die auf RNA-Ebene gefundene MGMT-Induktion korreliert dabei mit den auf Proteinebene (Aktivitätsmessungen) nach Mutagenbehandlung nachgewiesenen MGMT-Induktionsfaktoren. Es zeigte sich außerdem, daß die Induktion der MGMT-Expression nach MNNG-Behandlung zeit- und dosisabhängig ist. Erst 12 h nach Mutagenbehandlung konnten erhöhte MGMT-mRNA-Mengen nachgewiesen werden. Die bereits zur Induktion füh-

renden MNNG-Dosen (ab 3 μM) wiesen lediglich eine relativ geringe Toxizität auf (über 70 % der Zellen überlebten diese Dosis im Koloniebildungstest). Damit sind die zur Induktion führenden Dosen noch als "physiologisch" zu bezeichnen.

Im Gegensatz zu *E. coli* ist die MGMT-Induktion in H4 Zellen nicht alkylantenspezifisch; auch UV- oder Röntgen-Strahlung, Hitze und Wasserstoffperoxid führten zu einer Induktion der MGMT-mRNA Expression. Erhöhte MGMT-Aktivitäten in H4-Zellen sowie anderen Leberzelllinien nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien wurden auch von Laval (1990) beschrieben. In Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Daten konnten andere Arbeitsgruppen auf Proteinebene in menschlichen Zellen ebenfalls keine Induktion der MGMT-Expression nach MNNG-Behandlung beobachten (Foote u. Mitra, 1982; Karran et al., 1982a; Wani et al., 1988). Die in der vorliegenden Arbeit auf Expressionsebene in H4-Zellen erhaltenen Befunde korrelieren auch mit *in vivo* Daten. So wurde auf Proteinebene ein Anstieg der MGMT-Aktivität nach Bestrahlung, Acetylaminofluorene- und chronischer Dialkylnitrosamin-Behandlung von Ratten in Leberextrakten gemessen (Pegg u. Perry, 1981; Cooper et al., 1982; Margison et al., 1985; Den Engelse et al., 1986). Nach Klonierung der Ratten MGMT-cDNA wurden mittlerweile auch auf RNA-Ebene 10 fach erhöhte MGMT-mRNA-Mengen in der Leber von Acetylaminofluorene behandelten Ratten nachgewiesen (Potter et al., 1991). Untersuchungen zu einer Induzierbarkeit der MGMT-Aktivität beim Menschen durch Vergleich der MGMT-Aktivitäten in Lymphozyten von Rauchern und Nichtrauchern ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Vähäkangas et al., 1991). Insgesamt sprechen die bislang vorliegenden Daten für eine Hepatozyten-spezifische Induzierbarkeit der MGMT-Expression.

Obwohl die MGMT spezifisch O⁶-Alkylierungsschäden repariert, wird sie dennoch, wie oben erwähnt, durch nicht alkylierend wirkende DNA schädigende Behandlungen induziert. Dieses auf den ersten Blick biologisch nicht sinnvolle Phänomen kann jedoch dadurch erklärt werden, daß die MGMT möglicherweise zu einer Gruppe von DNA-Reparaturgenen gehört, die nach DNA-Schädigung koordiniert reguliert werden. Da die basale Expression der MGMT-Reparaturfunktion relativ hoch ist (200 000 Moleküle / Zelle in der Leber (Myrnes et al., 1983)), ist eine Induktion nur nach hohen Schadensbelastungen notwendig; die in einer Art Notfallreaktion erfolgende Induktion einer Gruppe von Reparaturmechanismen wäre damit unter "ökonomischen" Gesichtspunkten sinnvoll für die Zelle. Eine koordinierte Induktion von Genen ist beispielsweise bekannt für die Gruppe der "gadd"-Gene, die durch eine ganze Reihe von zum Wachstumsstop führende Behandlungen (z.B. MMS, Serumentzug) induziert werden können (Fornace et al., 1989) und für die Gruppe der nach TPA und Serum induzierbaren "early inducible" Gene (Almendral et al., 1988; Bücher et al., 1988; König et al., 1989; Rahmsdorf u. Herrlich, 1990).

Bei der Untersuchung des Mechanismus, der zur Induktion der MGMT-Expression führt, stellte sich heraus, daß alkylierte DNA per se kein induzierendes Signal darstellt. Ein autoregulatorischer Mechanismus, wie er beim bakteriellen ada-Gen vorliegt, konnte hier ebenfalls ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich sind DNA-Strangbrüche das primäre auslösende Signal zur MGMT-Induktion. Den stärksten Hinweis hierfür lieferte die Induzierbarkeit der MGMT-Expression nach Einbringen des Restriktionsenzym Pvu II in H4 Zellen. Diese Hypothese würde auch erklären, warum alle in der vorliegenden Arbeit getesteten DNA-schädigenden Behandlungen eine erhöhte MGMT-Expression bewirkten. Jedes der verwendeten DNA-schädigenden Agenzien führt direkt (z.B. Röntgen-Strahlung), oder indirekt durch die Wirkung von Reparaturmechanismen (z.B. UV-Strahlung) und/oder Replikation (Alkylantien) zu DNA-Strangbrüchen. Da solche Läsionen gleich-

zeitig auch replikationshemmend wirken, kann die sekundäre Beteiligung eines Replikationsblocks an der MGMT-Induktion nicht völlig ausgeschlossen werden. Eine Zugehörigkeit der MGMT zur Gruppe der oben erwähnten "gadd"-Gene liegt jedoch nicht vor, da die MGMT nicht durch Serumentzug induzierbar ist.

Bezüglich der Signalketten, die von dem hypothetisch angenommenen DNA-Strangbruch zur MGMT-Induktion führen, kann aufgrund der hier vorliegenden Daten die Beteiligung eines neu zu synthetisierenden Faktors, sowie die Beteiligung von Phosphatasen postuliert werden. Diese Aussage begründet sich darauf, daß die durch MNNG bewirkte Induktion der MGMT-Expression sowohl durch den Einsatz eines Proteinbiosynthesehemmstoffes (Anisomycin), als auch durch Hemmung von Phosphatasen (durch Natriumvanadat verhindert werden kann. Die Notwendigkeit der Biosynthese eines neuen Proteinfaktors könnte auch erklären, weshalb die MGMT-Induktion erst zu erst relativ späten Zeiten (12 h) nach Mutagenbehandlung nachweisbar ist. TPA, cAMP oder Serumfaktoren, die als Aktivatoren von Proteinkinase C bzw. Proteinkinase A bekannt sind und auch zur Induktion von c-fos führen (Bücher et al., 1988), bewirkten keine erhöhte MGMT-Expression. Die Befunde, daß die Hemmung von Kinase-Aktivitäten zu einer erhöhten MGMT-Expression führten, deuten im Gegenteil eine Beteiligung von Kinasen bei der Repression der MGMT-Expression an.

Ausgehend von den diskutierten Befunden zeigt Abb. 44 ein Modell der Regulation der MGMT-Expression in Säugerzellen und deren biologischer Konsequenz.

Eine genauere Untersuchung der zur Induktion der MGMT-Expression beitragenden Mechanismen und Signalwege ist auf die Verfügbarkeit des MGMT-Gens, bzw. dessen regulatorischen Bereiches angewiesen. Diese Sequenzen sind zur Zeit allerdings noch nicht verfügbar, so daß weitere Untersuchungen bezüglich der Regulation der MGMT-Expression der Zukunft vorbehalten bleiben müssen.

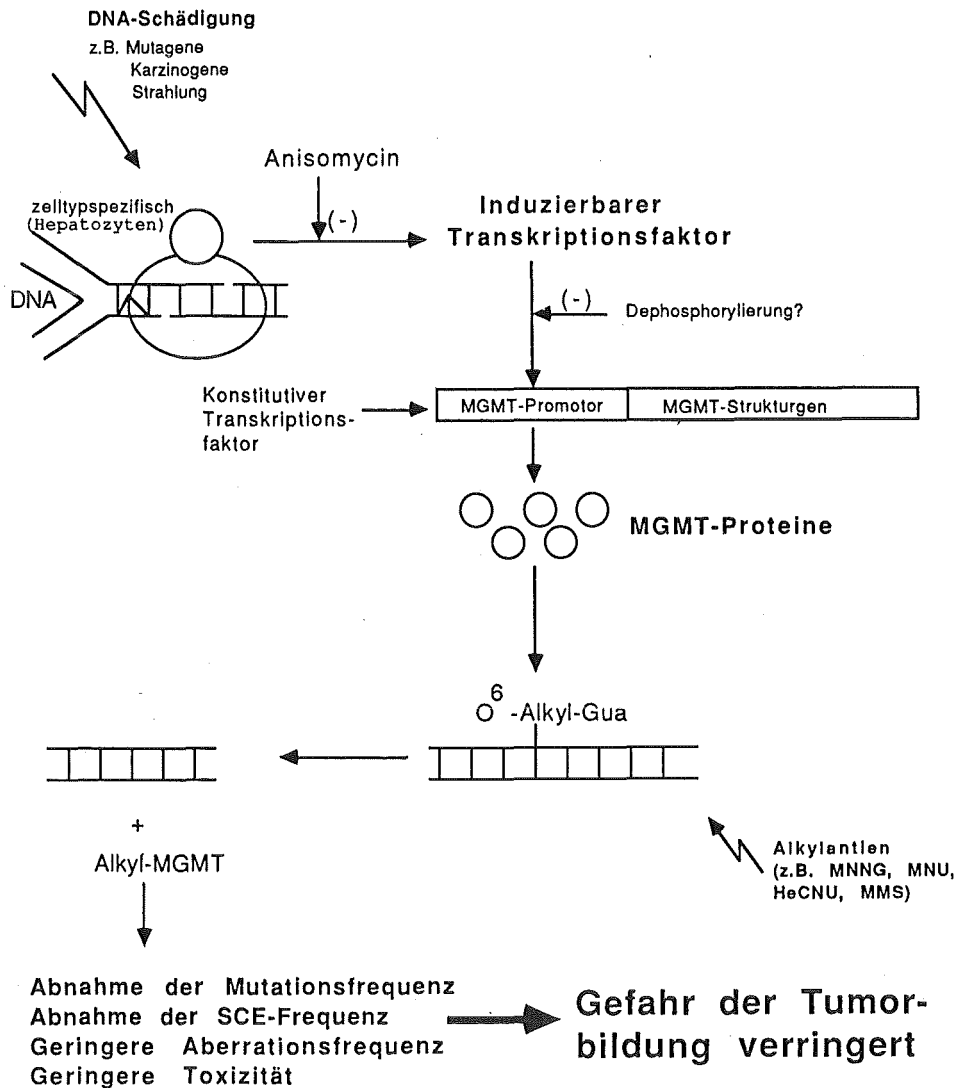


Abb. 44: Modell zur Regulation und Funktion der O^6 -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase nach Behandlung von Zellen mit DNA-schädigenden Agenzien.

Nach Einwirkung von DNA schädigenden Agenzien, die direkt oder indirekt zu DNA-Strangbrüchen führen, kommt es über die Biosynthese eines Transkriptionfaktors zur Induktion des MGMT-Gens. Diese Induktion kann durch Phosphatase-Hemmung unterbunden werden (-). Die konstitutiv oder nach Induktion vermehrt gebildeten MGMT-Proteine führen dazu, daß die Zelle vor verschiedenen genotoxischen Wirkungen von Alkylantien geschützt ist.

LITERATUR

- Almendral, J. M., Sommer, D., MacDonald-Bravo, H., Burckhardt, J., Perera, J. J., Bravo, R. (1988): Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2140-2148
- Althaus, F. R., Hilz, H., Shall, S. (1985): ADP-Ribosylation of proteins. Springer Verlag
- Angel, P., Bhattari, K., Smeal, T., Karin, M. (1988): The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product Jun/AP-1. *Cell* 55: 875-885
- Angel, P., Pötting, A., Mallick, U., Rahmsdorf, H. J., Schorpp, M., Herrlich, P. (1986): Induction of methallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 6: 1760-1766
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., Karin, M. (1987): Phorbol ester inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49: 729-739
- Aquilina, G., Frosina, G., Zijno, A., Di Muccio, A., Dogliotti, E., Abbondandolo, A., Bignami, M. (1988): Isolation of clones displaying enhanced resistance to methylating agents in O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase-proficient CHO cells. *Carcinogenesis* 9: 1217-1222
- Aquilina, G., Zijno, A., Moscufo, N., Dogliotti, E., Bignami, M. (1989): Tolerance to methylnitrosurea-induced DNA damage is associated with 6-thioguanine resistance in CHO cells. *Carcinogenesis* 10: 1219-1223
- Aquilina, G., Giammarioli, A. M., Zijno, A., Di Muccio, A., Dogliotti, E., Bignami, M. (1990): Tolerance to O⁶-Methylguanine and 6-Thioguanine cytotoxic effects: A cross-resistant phenotype in N-methylnitrosurea-resistant Chinese Hamster Ovary cells. *Cancer Res.* 50: 4248-4235
- Archer, M. C. (1989): Mechanism of action of N-nitroso compounds. In: "Cancer Surveys: Nitrate, nitrite and Nitroso-compounds in human cancer" (Forman, D. and Shuker, D., Ed.), Vol 8, Oxford University Press
- Arita, I., Tatsumi, K., Tachibana, A., Toyoda, M., Takebe, H. (1988): Instability of Mex- phenotype in human lymphoblastoid cell lines. *Mut. Res.* 208: 167-172
- Arita, I., Fujimori, A., Takebe, H., Tatsumi, K. (1990): Evidence for spontaneous conversion of Mex- to Mex+ in human lymphoblastoid cells. *Carcinogenesis* 11: 1733-1738

- Bartsch, H., Terracine, B., Mallaveille, C., Tomatis, L., Wahrendorf, J., Brun, G., Dodet, B. (1983): Quantitative comparison of carcinogenicity, mutagenicity and elektrophilicity of 10 direct-acting agents and of the initial O⁶:N⁷-alkylguanine ratio in DNA with carcinogenic pathway on rodents. *Mut. Res.* 110: 181-219
- Bartsch, H., Montsano, R. (1984): Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis* 5: 1381-1393
- Baeuerle, P. A., Baltimore, D. (1988): Activation of DNA binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF κ B transcription factor. *Cell* 53: 211-217
- Bhattacharyya, D., Boulden, A. M., Foote, R. S., Mitra, S. (1988): Effect of polyvalent metal ions on the reactivity of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *Carcinogenesis* 9: 683-685
- Berank, D. T. (1990): Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mut. Res.* 231: 11-30
- Berdal, K. G., Bjoras, M., Bjelland, S., Seeberg, E. (1990): Cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene for an alkylbase DNA glycosylase from *Saccharomyces cerevisiae*; a homologue to the bacterial alka gene. *Embo J.* 9: 4563-4568
- Bhatia, K., Pommier, Y., Giri, C., Fornace, A. J., Imaizumi, M., Breitman, T. R., Cherney, B. W., Smulson, M. E. (1990): Expression of the poly(ADP-ribose)polymerase gene following natural and induced DNA strand breakage and effect of hyperexpression on DNA repair. *Carcinogenesis* 11: 123-128
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brdar, B., Matulic, M. (1988): Induction of plasminogen activator by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in mer⁺ and mer⁻ human tumour cell strains. *Carcinogenesis* 9: 2191-2195
- Brennand, J., Margison, G. P. (1986): Reduction of the toxicity and mutagenicity of alkylating agents in mammalian cells harboring the *Escherichia coli* alkyltransferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 6292-6296
- Brent, R., Ptashne, M. (1980): The *lexA* gene product represses its own promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 1932-1936

- Brent, T. P., Remack, J. S. (1988): Formation of covalent complexes between human O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase and BCNU-treated defined length synthetic oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acid Res.* 14: 6779-6788
- Brent, T. P., Von Wronski, W., Pegram, D. N., Bigner, D. D. (1990): Immunoaffinity purification of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase using newly developed monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 50: 58-61
- Bridges, B., Lehmann, A. (1982): Inducible responses to DNA damage. *Nature*, 298: 118-119
- Büscher, M., Rahmsdorf, H. J., Litfin, M., Karin, M., Herrlich, P. (1988): Activation of the c-fos gene by UV and phorbol esters: different signal transduction pathways converge to the same enhancer element. *Oncogene* 3: 301-311
- Chakravarti, D., Ibeanu, G. C., Tano, K., Mitra, S. (1991): Cloning and expression in *Escherichia coli* of a human cDNA encoding the DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* 266: 15710-15715
- Chen, J., Derfler, B., Maskati, A., Samson, L. (1989): Cloning a eukaryotic DNA glycosylase repair gene by the suppression of a DNA repair defect in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 7961-7965
- Chen, J., Derfler, B., Samson, L. (1990): *Saccharomyces cerevisiae* 3-methyladenine DNA glycosylase has homology to the alkA glycosylase of *E. coli* and is induced in response to DNA alkylation damage. *Embo J.* 9: 4569-4575
- Chiu, R., Boyle, W. J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T., Karin, M. (1988): The c-fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54: 541-552
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159
- Chou, P. Y., Fasman, G. D. (1974): Prediction of protein conformation. *Biochem.* 132: 222-244
- Chung, C. T., Niemela, S. H., Miller, R. H. (1989): One step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 2172-2175
- Cleaver, J. E., Morgan, W. F. (1985): Poly(ADP-ribose) synthesis is involved in the toxic effects of alkylating agents but does not regulate DNA repair. *Mut. Res.* 150: 69-76

- Cooper, D. P., O'Connor, P. J., Margison, G. P. (1982): Effect of acute doses of 2-acetylaminofluorene on the capacity of rat liver to repair methylated purines in DNA in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 42: 4203-4209
- Creissen, D., Shall, S. (1982): Regulation of DNA ligase activity by poly (ADP-ribose). *Nature* 296: 271-296
- Day III, R. S., Ziolkowski, C. H. J., Scudiero, D. A., Meyer, S. A., Lubiniecki, A. S., Girardi, A. J., Galloway, S. M., Bynum, G. D. (1980): Defective repair of alkylated DNA by human tumours and SV40-transformed human cell strains. *Nature* 288: 724-727
- De Witt, J., Jaspers, N. G. J., Bootsma, D. (1981): The rate of DNA synthesis in normal human and Ataxia telangiectasia cells after exposure to X-irradiation. *Mut. Res.* 80: 221-226
- Demple, B., Sedgwick, B., Robins P., Totty, N., Waterfield, M. D., Lindahl, T. (1985): Active site and complete sequence of the suicidal methyltransferase that counters alkylation mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 2688-2692
- Den Engelse, L., Floot, B. G. J., Menkveld, G. J., Tates, A. D. (1986): Enhanced repair of O⁶-methylguanine in liver of rats pretreated with phenobarbital, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, ethionine, or N-alkyl-N-nitrosureas. *Carcinogenesis* 7: 1941-1947
- Dipple, A., Michejda, C. J., Weisburger, E. K. (1987): Metabolism of chemical carcinogens. In: "Mechanisms of cellular transformation by carcinogenic agents". (Grunberger, D. and Goff, S. P., Ed.), Pergamon Press
- Doerfler, W. (1983): DNA methylation and gene activity. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 93-124
- Dolan, M. E., Stine, L., Mitchell, R. B., Moschel, R. C., Pegg, A. E. (1990): Modulation of mammalian O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in vivo by O⁶-benzylguanine and its effect on the sensitivity of a human glioma tumor to 1-(2-chlorethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosurea. *Cancer Commun.* 2: 371-377
- Durkacz, B. W., Omidiji, O., Gray, D. A., Shall, S. (1980): (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature* 283: 593-596
- Durrant, L. G., Margison, G. P., Boyle, J. M. (1981): Pretreatment of chinese hamster V79 cells with MNU increases survival without affecting DNA repair or mutagenicity. *Carcinogenesis* 2: 55-60
- Evensen, G., Seeberg, E. (1982): Adaptation to alkylation resistance involves the induction of a DNA glycosylase. *Nature* 296: 773-775

- Farmer, P. B. (1985): Cancer Chemotherapy I: Design and mechanism of action of cytotoxic drugs. In: "The molecular basis of cancer". (Farmer, P.B and Walker J. M, Ed.), Croom Helm, London & Sydney
- Foote, R. S., Mitra, S. (1984): Lack of induction of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 5: 277-281
- Fornace, A. J., Nebert, D. W., Hollander, M. C., Luethy, J. D., Papathanasiou, M., Fargnoli, J., Holbrook, N. J. (1989): Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA damaging agents. *Mol. Cell. Biol.* 9: 4196-4203
- Fornace, A. J., Papathanasiou, M. A., Hollander, M. C., Yarosh, D. (1990): Expression of the O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase gene MGMT in Mer⁺ and Mer⁻ human tumor cells. *Cancer Res.* 50: 7908-7911
- Fornace, Jr., A. J., Schalch, H., Alamo, Jr., I. (1988): Coordinate induction of metallothioneins I and II in rodent cells by UV irradiation. *Mol. Cell. Biol.* 8: 4716-4720
- Friedberg, E. C. (1985): DNA Repair. W. H. Freeman and Company
- Fritz, G., Rahmsdorf, H. J., Kaina, B. (1990): Complementation of N-hydroxyethyl-N-chloroethylnitrosourea hypersensitivity to Mex⁻ cells by microinjection of mRNA from Mex⁺ cells. *Mut. Res.* 244: 49-53
- Fritz, G., Tano, K., Mitra, S., Kaina, B. (1991): Inducibility of the DNA repair gene encoding O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4660-4668
- Frosina, G., Laval, F. (1987): The O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase activity of rat hepatoma cells is increased after single exposure to alkylating agents. *Carcinogenesis* 8: 91-95
- Fujio, C., Chang, H. R., Tsujimura, T., Ishizaki, K., Kitamura, K., Ikenaga, H., (1989): Hypersensitivity of human tumor xenografts lacking O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase to the anti-tumor agent 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chlorethyl)-3-nitrosourea. *Carcinogenesis* 10: 351-356
- Fukuda, M., Viitala, J., Matteson, J., Carlsson, S. R. (1988): Cloning of cDNAs encoding human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. *J. Biol. Chem.* 263: 18920- 18928
- Gerber-Huber, S., May, F. B. E., Westley, B. R., Felber, B. K., Hosbach, H. A., Andres, A. C., Ryffel, G. U. (1983): In contrast to other *Xenopus* genes the estrogen-inducible vitellogenin genes are expressed when totally methylated. *Cell*, 33: 43-51

- Gerson, S. L., Trey, J. E., Miller, K., Berger, N. A. (1986): Comparison of O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis* 7: 745-749
- Gick, G., McCarthy Jr, K. S., McCarty Sr, K. S. (1981): The role of metallothionein synthesis in cadmium and zink resistant CHO-KIM cells. *Exp. Cell Res.* 132: 23-30
- Goth-Goldstein, R. (1987): MNNG- induced partial phenotypic reversion of Mer⁻ cells. *Carcinogenesis* 8: 1449-1453
- Goth-Goldstein, R., Hughes, M. (1987): Characterization of a CHO variant in respect to alkylating agent-induced biological effects and DNA repair. *Mut. Res.* 184: 139-146
- Grafstrom, R. C., Pegg, A. E., Trump, B. F., Harris, C. C. (1984): O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in normal tissues and cells. *Cancer Res.* 44: 2855-2857
- Green, M. H. L., Karran, P., Lowe, J. E., Priestly, A., Arlett, C. F., Mayne, L. (1990): Variation in the loss of O⁶-methylguanine -DNA methyltransferase during immortalization of human fibroblasts. *Carcinogenesis* 11: 185-187
- Green, M. H. L., Lowe, J. E., Petit-Frere, C., Karran, P., Hall, J., Kataoka, H. (1989): Properties of N-methyl-N-nitrosourea resistant, Mex derivatives of an SV40- immortalized human fibroblast cell line. *Carcinogenesis* 10: 893-898
- Guttenplan, J. B. (1990): Mutagenesis by N-nitroso compounds: relationships to DNA adducts, DNA repair, and mutational efficiencies. *Mut. Res.* 233: 177-187
- Hanahan, D. (1986): Techniques for the transformation of E. coli. In: "DNA cloning". (D. M. Glover, Ed.), Vol 1, IRL Press, Oxford
- Harris, C. C. (1989): Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis* 10: 1563-1566
- Harris, A. L., Karran, P., Lindahl, T. (1983): O⁶-methylguanine DNA methyltransferase of human lymphoid cells; Structural and kinetic properties and absence in repair deficient cells. *Cancer Res.* 43: 3247-3252
- Hayakawa, H., Koike, G., Sekiguchi, M. (1990): Expression and cloning of complementary DNA for a human enzyme that repairs O⁶-methylguanine in DNA. *J. Mol. Biol.* 213: 739-747

- Herrlich, P., Angel, P., Rahmsdorf, H. J., Mallick, U., Pötting, A., Hieber, L., Lücke-Huhle, C., Schorpp, M. (1986): The mammalian genetic stress response. In: "Advances in enzyme regulation" 25: 485-504. Pergamon Press, Oxford-New York-Toronto-Sydney-Frankfurt
- Hollander, M. C., Fornace, A. J. (1989): Induction of fos RNA by DNA-damaging agents. *Cancer Res.* 49: 1687-1692
- Ishizaki, K., Tsujimura, R., Yawata, H., Jujio, C., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., Ikenaga, M. (1986): Transfer of the *E. coli* O⁶-methylguanine methyltransferase gene into repair-deficient human cells and restoration of cellular resistance to N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanine. *Mut. Res.* 166: 135-141
- Isowa, G., Ishizaki, K., Sadamoto, T., Tanaka, K., Yamaoka, Y., Ozawa, K., Ikenaga, M. (1991): O⁶-Methylguanin-DNA methyltransferase activity in human liver tumors. *Carcinogenesis* 12: 1313-1317
- Jaspers, N. G. J., DeWit, J., Bootsma, D. (1982): The rate of DNA-synthesis in Ataxia telangiectasia fibroblasts after exposure to DNA-damaging agents. In: "Ataxia-telangiectasia-A cellular and molecular link between cancer, neuropathology and immune deficiency". John Wiley and Sons Ltd
- Kaina, B. (1983): Studies on adaptation of V79 chinese hamster cells to low doses of methylating agents. *Carcinogenesis* 4: 1437-1443
- Kaina, B. (1987): Correction of alkylation hypersensitivity of CHO-27-1 cells by transfection with human DNA. *Carcinogenesis* 8: 1935-1938
- Kaina, B. (1989): Identifizierung von Genen und Charakterisierung zellulärer Funktionen die Resistenz gegenüber der toxischen Wirkung von alkylierenden Agenzien in Säugerzellen vermitteln. Habilitationsschrift, Universität Karlsruhe
- Kaina, B., Aurich, O. (1985): Dependency of the yield of sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents on fixation time. Possible involvement of secondary lesions in sister-chromatid exchange induction. *Mut. Res.* 149: 451-461
- Kaina, B., Fritz, G., Coquerelle, T. (1991a): Identification of human genes involved in repair and tolerance of DNA damage. *Radiat. Environm. Biophys.* 30:1-19
- Kaina, B., Fritz, G., Mitra, S., Coquerelle, T. (1991b): Transfection of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis*, in press

- Kaina, B., Lohrer, H., Karin, M., Herrlich, P. (1990a): Overexpressed human metallothionein IIA gene protects Chinese hamster ovary cells from killing by alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2710-2724
- Kaina, B., Stein, B., Schöntal, A., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H., Herrlich, P. (1989): An update of the mammalian UV response: gene regulation and induction of a protective function. In: "DNA repair mechanism and their biological implications in mammalian cells". (M.W. Lambert et al., Ed.), Plenum Publ. Corp., New York, 149-165
- Kaina, B., Van Zeeland, A. A., De Groot, A., Natarajan, A. T. (1990b): DNA repair and chromosomal stability in the alkylating agent-hypersensitive Chinese hamster cell line 27-1. *Mut. Res.* 243: 219-224
- Kaina, B., Van Zeeland, A. A., Backendorf, C., Thielmann, H. W., Van de Putte, P. (1987): Transfer of human genes conferring resistance to methylating mutagens, but not to UV irradiation and cross-linking agent, into chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2024-2030
- Karran, P., Arlett, C. F., Broughton, B. C. (1982a): An adaptive response to the cytotoxic effects of N-methyl-N-nitrosourea is apparently absent in normal human fibroblasts. *Biochimie* 64: 717-721
- Karran, P., Hjelmgren, T., Lindahl, T. (1982b): Induction of a DNA glycosylase for N-methylated purines is part of the adaptive response to alkylating agents. *Nature* 296: 770-773
- Kataoka, H., Hall, J., Karran, P. (1986): Complementation of sensitivity to alkylating agents in *Escherichia coli* and Chinese hamster ovary cells by expression of cloned bacterial DNA repair gene. *Embo J.* 5: 3195-3200
- Kelley, D. E., Pollock, B. A., Atchison, M. L., Perry, R. P. (1988): The coupling between enhancer activity and hypomethylation of kappa immunoglobulin genes is developmentally regulated. *Mol. Cell. Biol.* 8: 930-937
- Kihlman, B. A., Natarajan, A. T. (1987): Potentiation of chromosomal aberrations by inhibitors of DNA repair. In: "DNA repair and its inhibition". (Collins et al., Ed.), *Nucleic Acid Symposium Series No 13*
- Kedar, P. S., Widen, S. G., Englander, E. W., Fornace, A. J., Wilson, S. H. (1991): The ATF/CREB transcription factor-binding site in the polymerase β promoter mediates the positive effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin on transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 3729-3722
- Kobori, O., Schmerold, I., Ludeke, B., Ohgaki, H., Kleihus, P. (1988): DNA methylation in rat stomach and duodenum following chronic exposure to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and the effect of dietary taurocholate. *Carcinogenesis* 9: 2271-2274

- König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, U., Büscher, M., Schöntal, A., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P. (1989): Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression. *Embo J.* 8: 2559-2566
- Krämer, M., Steon, B., Mai, S., Kunz, E., König, H., Loferer, H., Grunicke, H. H., Ponta, H., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J. (1990): Radiation-induced activation of transcription factors in mammalian cells. *Radiat. Environ. Biophys.* 29: 303-313
- Krokan, H., Haugen, A., Myrnes, B., Guddal, P. H. (1983): Repair of premutagenic DNA lesions in human fetal tissues: evidence for low levels of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and uracil-DNA glycosylase activity in some tissues. *Carcinogenesis* 4: 1559-1564
- Kyrtopoulos, S. A. (1989): N-nitroso compound formation in human gastric juice. In: "Cancer surveys: Nitrate, nitrite and nitroso compounds in human cancer". (Forman, D. and Shuker, D., Ed.) Vol 8, No 2; Oxford University Press.
- Lambert, M. E., Garrels, J. I. (1988): Inducible cellular response to DNA damage. *Cold Spring harbor*, 255-262
- Larson, K., Sahm, J., Shenkar, R., Strauss, B. (1985): Methylation-induced blocks to in vitro DNA replikation. *Mut. Res.* 150: 77-84
- Laval, F. (1990): Induction of proteins involved in the repair of alkylated bases in mammalian cells by DNA-damaging agents. *Mut. Res.* 233: 211-218
- Laval, F. (1991): Increase of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and N³-methyladenin glycosylase RNA transcripts in rat hepatoma cells treated with DNA-damaging agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 1086-1092
- Lavi, S. (1981): Carcinogen-mediated amplifikation of viral DNA sequences in simian virus 40-transformed Chinese hamster embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 6144-6148
- Leaf, C. D., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. (1989): Mechanisms of endogenous nitrosation. In: "Cancer Surveys: Nitrate, nitrite and nitroso compounds in human cancer". (Forman, D and Shuker, D.; Ed.), Vol 8 No 2, Oxford University Press
- Lefebvre, P., Laval, F. (1986): Enhancement of O⁶-Methylguanine- DNA-Methyltransferase activity induced by various treatments in mammalian cells. *Cancer Res.* 46: 5701-5705

- Lefebvre, P., Laval, F. (1989): Potentiation of N-Methyl-N'- Nitro-N-Nitroso-guanidine- induced O⁶-Methylguanine-DNA- Methyltransferase activity in a rat hepatoma cell line by poly (ADP-ribose) synthesis inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163: 599-604
- Little, J. W., Mount, D. W. (1982): The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 29: 11-22
- Lohrer, H., Robson, T. (1989): Overexpression of metallothionein in CHO cells and its effect on cell killing by ionizing radiation and alkylating agents. *Carcinogenesis* 10: 2279-2284
- Lindahl, T., Sedgewick, B. (1988): Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 133-157
- Lindahl, T., Sedgewick, B., Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y. (1988): Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 133-157
- Lippincott-Schwarz, J., Fambrough, D. M. (1987): Cycling of the integral membran glycoprotein LEP100 between plasma membran and lysosomes; kinetik and morphological analysis. *Cell* 49: 699-677
- Loechler, E. L., Green, C. L., Essigmann, J. M. (1984): In vivo mutagenesis by O⁶-methylguanine built into a unique site in a viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 6271-6275
- Ludlum, D. B. (1990): DNA alkylation by the haloethylnitrosureas: nature of modifications produced and their enzymatic repair removal. *Mut. Res.* 233: 117-126
- Lücke-Huhle, C., Pech, M., Herrlich, P. (1986): Selective gene amplification in mammalian cells after exposure to 60Co rays, 241Am particles, or UV-light. *Rad. Res.* 106: 345-355
- MacLaren, R. A., Witmer, M. V., Richardson, E., Stamato, T. D. (1990): Isolation of Chinese hamster ovary cells with reduced poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Mut. Res.* 231: 265-274
- Malpas, J. S. (1986): Chemotherapy. In: " Introduction to the cellular and molecular biology of cancer". (Franks, L. M. and Teichs, N. M; Ed.), Oxford University Press.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982): Molecular cloning. A laboratory manual Cold Spring Harbour Laboratory
- Margison, G. P., O'Connor, P. J. (1979): Nucleic acid modification by N-nitroso compounds. In: "Chemical Carcinogenesis and DNA". (Grover, P. C.; Ed.), Vol I, CRC Press

- Margison, G. P., Butler, J., Hoey, B. (1985): O⁶-methylguanine methyltransferase activity is increased in rat tissues by ionising radiation. *Carcinogenesis* 6: 1699-1702
- Mellon, I., Bohr, V. A., Smith, C. A., Hanawalt, P. C. (1986): Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 8878-8882
- Mellon, I., Hanawalt, P. C. (1989): Induction of the Escherichia coli lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* 342: 95-98
- Miskin, R., Ben-Ishai, R. (1981): Induction of plasminogen activator by UV light in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 6236-6240
- Mitra, G., Pauly, G. T., Kumar, R., Pei, G. K., Hughes, S. H., Moschel, R. C., Barbacid, M. (1989): Molecular analysis of O⁶-substituted guanine-induced mutagenesis of ras oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 8650-8654
- Mitani, H., Yagi, T., Leiler, C. Y. M., Takebe, H. (1989): 5-azacytidine-induced recovery of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in mouse Ha821 cells. *Carcinogenesis* 10: 1879-1882
- Montesano, R., Bresil, H., Planche-Martel, G., Margison, G. P., Pegg, A. E. (1980): Effect of chronic treatment of rats with dimethylnitrosamine on the removal of O⁶-methylguanine from DNA. *Cancer Res.* 40: 452-458
- Morimoto, K., Dolan, M. E., Scicchitano, D., Pegg, A. E. (1985): Repair of O⁶-propylguanine and O⁶-butylguanine in DNA by O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase from rat liver and E. Coli. *Carcinogenesis* 6: 1027-1031
- Myrnes, B., Giercksky, K. E., Krokan, H. (1983): Interindividual variation in the activity of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and uracil-DNA glycosylase in human organs. *Carcinogenesis* 4: 1565-1568
- Nakabeppu, Y., Kondo, H., Kawabata, S.-I., Iwanaga, S., Sekiguchi, M. (1985): Purification and structure of the intact ada regulatory protein of Escherichia coli K12, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 260: 7281- 7288
- Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M. (1986): Regulatory mechanisms for induction of synthesis of repair enzymes in response to alkylating agents: Ada protein acts as a transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 6297-6301

- Newbold, R. F., Warren, W., Medcalf, A. S. C., Amos, J. (1980): Mutagenicity of carcinogenic methylating agents is associated with a specific DNA modification. *Nature*, 283:596-598
- O'Connor, T. R., Laval, F. (1990): Isolation and structure of a cDNA expressing a mammalian 3-methyladenine-DNA glycosylase. *Embo J.* 9: 3337-3342
- Olsen, L. C., Aasland, R., Wittwer, C. U., Krokan, H. E., Helland, D. E. (1989): Molecular cloning of human uracil- DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. *Embo J.* 8: 3121-3125
- Painter, R. B., Young, B. R. (1980): Radiosensitivity in Ataxia telangiectasia: A new explanation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 7315-7317
- Pegg, A. E. (1990): Mammalian O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.* 50: 6119-6129
- Pegg, A. E., Perry, W. (1981): Stimulation of transfer of methyl groups from O⁶-methylguanine in DNA to protein by rat liver extracts in response to hepatotoxins. *Carcinogenesis* 2: 1195-1200
- Pegg, A. E., Wiest, L., Foote, R. S., Mitra, S., Perry, W. (1983): Purification and properties of O⁶-methylguanine- DNA transmethylase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 258: 2327-2333
- Pieper, R. O., Futscher, B. W., Dong, Q., Ellis, T. M., Erickson, L. C. (1990): Comparison of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) mRNA levels in Mer⁺ and Mer⁻ human tumor cell lines containing the MGMT gene by the polymerase chain reaction technique. *Cancer Commun.* 2: 13-20
- Potter, P. M., Kleibl, K., Cawkwell, L., Margison, G. P. (1989): Expression of the ogt gene in wild-type and ada mutants of *E. coli*. *Nuc. Acid Res.* 17: 8047-8053
- Potter, P. M., Rafferty, J. A., Cawkwell, L., Wilkinson, M. C., Cooper, D. P., O'Connor, P. J., Margison, G. P. (1991): Isolation and cDNA cloning of a rat O⁶-alkylguanine-DNA- alkyltransferase gene, molecular analysis of expression in rat liver. *Carcinogenesis* 12: 727-733
- Potter, P. M., Wilkinson, M. C., Fitton, J., Carr, F. J., Brennand, J., Cooper, D. P., Margison, G. P. (1987): Characterisation and nucleotide sequence of ogt, the O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene of *E. coli*. *Nucleic Acid Res.* 15: 9177-9193

- Radman, M. (1980): Is there SOS-induction in mammalian cells? *Photochem. and Photobiol.* 32: 823-830
- Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P. (1990): Regulation of gene expression by tumor promoters. *Pharmac. Ther.* 48: 151-188
- Rebeck, G. W., Coons, S., Carroll, P., Samson, L. (1988): A second DNA methyltransferase repair enzyme in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 3039-3043
- Ronai, Z. A., Lambert, M. E., Weinstein, I. B. (1990): Inducible cellular responses to ultraviolet light irradiation and other mediators of DNA damage in mammalian cells. *Cell Biol. and Toxicol.* 6: 105-126
- Rowland, I. R., Granli, T., Bockman, O. C., Key, P. E., Massey, R. C. (1991): Endogenous N-nitrosation in man assessed by measurement of apparent total N-nitroso compounds in faeces. *Carcinogenesis* 12:1395-1401
- Ruddon, R. W. (1987): *Cancer Biology*. Oxford University Press
- Rüdiger, H. W., Schwarz, U., Serrand, E., Stief, M., Krause, T., Nowak, D., Doerjer, G., Lehnert, G. (1989): Reduced O⁶-Methylguanine repair in fibroblast cultures from patients with lung cancer. *Cancer Res.* 49: 5623-5626
- Rydberg, B., Spurr, N., Karran, P. (1990): cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O⁶-methylguanine DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 265: 9563-9569
- Saffhill, R., Margison, G. P., O'Connor, P. J. (1985): Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biochem. Biophys. Acta.* 823: 111-145
- Sagher, D., Karrison, T., Schwartz, J. L., Larson, R. A., Strauss, B. (1989): Heterogeneity of O⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase activity in peripheral blood lymphocytes: Relationship between this activity in lymphocytes and in lymphoblastoid lines from normal controls and from patients with Hodgkin's disease or Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Res.* 49: 5339-5344
- Samson, L., Derfler, B., Waldstein, E. A. (1986): Suppression of human DNA alkylating- repair defects by *Escherichia coli* DNA-repair genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 5607-5610
- Samson, L., Schwartz, J. L. (1980): Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. *Nature* 287: 861-863

- Samson, L., Thomale, J., Rajewski, M. F. (1988): Alternative pathways for the in vivo repair of O⁶-alkylguanine and O⁴-alkylthymine in Escherichia coli: the adaptive response and nucleotide excision repair. *Embo J.* 7: 2261-2267
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467
- Sassanfar, M., Dosanjh, M. K., Essigmann, J. M., Samson, L. (1991): Relative efficiencies of the bacterial, yeast, and human DNA methyltransferases for the repair of O⁶-Methylguanine and O⁴-Methylthymine. *J. Biol. Chem.* 266: 2767-2771
- Schorpp, M., Mallick, U., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P. (1984): UV-induced extracellular factor from human fibroblasts communicates the UV-response to nonirradiated cells. *Cell* 37: 861-868
- Schwartz, J. L. (1989): Monofunctional alkylating agents-induced S-phase dependent DNA damage. *Mut. Res* 216: 111-118
- Sedgwick, B. (1983): Molecular cloning of a gene which regulates the adaptive response to alkylating agents in Escherichia coli. *Mol. Gen. Genet.* 191: 466-472
- Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y. (1987): Adaptive response: induced synthesis of DNA repair enzymes by alkylating agents. *TIG* 3: 51-54
- Shall, S. (1987): Inhibition of DNA repair by inhibitors of nuclear ADP-ribosyl transferase. In: "DNA repair and its inhibition". (Collins et al., Ed.), Nucleic Acids Symposium Series No. 13.
- Shall, S., Durkacz, B. W., Gray, D. A., Irwin, J., Lewis, P. J., Perera, M., Tavassoli, M. (1982): (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. In: "Symposia on molecular and cellular biology", Vol 2, UCLA
- Singer, B. (1986): O-Alkyl pyrimidines in mutagenesis and carcinogenesis: occurrence and significance. *Cancer Res.* 46: 4879-4885
- Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Steffen, A., Litfin, M., Herrlich, P. (1989a): UV induced DNA damage is an intermediate in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type I, collagenase, c-fos and metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* 9: 5169-5181
- Stein, B., Krämer, M., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H., Herrlich, P. (1989b): UV-induced transcription from the human immunodeficiency virus type I (HIV-1) long terminal repeat and UV-induced secretion of an extracellular factor that induces HIV-1 transcription in nonirradiated cells. *J. Virol.* 63: 4540-4544

- Steinman, R. M., Mellman, I. S., Muller, W. A., Cohn, Z. A. (1983): Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell Biol.* 96: 1-27
- Sukumar, S., Notario, V., Martin-Zanca, D., Barbacid, M. (1983): Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methyl-urea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature* 306: 658-661
- Tano, K., Bhattacharyya, D., Foote, R. S., Mural, R. J., Mitra, S. (1989): Site-directed mutation of the *Escherichia coli* *ada* gene: effects of substitution of methyl acceptor cysteine-321 by histidine in *ada* protein. *J. Bact.* 171: 1535-1543
- Tano, K., Shiota, S., Collier, J., Foote, R. S., Mitra, S. (1990): Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O⁶-alkylguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 686-690
- Teitz, T., Eli, D., Penner, M., Bakhanashvili, M., Naiman, T., Timme, T. L., Wood, C. M., Moses, R. E., Canaani, D. (1990): Expression of the cDNA for the beta subunit of human casein kinase II confers partial resistance on xeroderma pigmentosum cells. *Mut. Res.* 236: 85-97
- Teo, I., Sedgwick, B., Demple, B., Li, B., Lindahl, T. (1984): Induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*: the *ada*⁺ gene product serves both as a regulatory protein and as an enzyme for repair of mutagenic damage. *Embo J.* 3: 2151-2157
- Teo, I., Sedgwick, B., Kilpatrick, M. W., McCarthy, T. V., Lindahl, T. (1986): The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*. *Cell* 45: 315-324
- Thomale, J., Huh, N.-H., Nehls, P., Eberle, G., Rajewsky, M. F. (1990): Repair of O⁶-ethylguanine in DNA protects rat 208F cells from tumorigenic conversion by N-ethyl-N-nitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 9883-9887
- Thompson, L. H., Brookman, K. W., Jones, N. J., Allen, S. A., Carrano, A. V. (1990): Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and Sister chromatid exchange. *Mol. Cell. Biol.* 10: 6160-6171
- Tricker, A. R., Spiegelhalder, B., Preussman, R. (1989): Environmental exposure to preformed nitroso compounds. In: "Cancer Surveys: Nitrate, nitrite and nitroso compounds in human cancer". (Forman, D. and Shuker, D., Ed.), Vol 8, No 2, Oxford University Press

- Thornally P. J., Vasak, M. (1985): Possible role for metallothionein in protection against radiation induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochem. Biophys. Acta* 827: 36-44
- Vähäkangas, K., Trivers, G. E., Plummer, S., Hayes, r. B., Krokan, H., Rowe, M., Swartz, R. P., Yeager, H., Harris, C. C. (1991): O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase and uracil DNA glycosylase in human broncho-alveolar lavage cells and peripheral blood nononuclear cells from tobacco smokers and non smokers. *Carcinogenesis* 12: 1389-1394
- Van den Berg, S., Kaina, B., Rahmsdorf, H.J., Ponta, H., Herrlich, P. (1991): Involvement of fos in spontaneous and ultraviolet light induced genetic change. *Mol. Carcinogenesis*, in press
- Van Duin, M., De Wit, J., Odijk, H., Westerveld, A., Yasui, A., Koken, M. H. M., Hoeijmakers, J. H. J., Bootsma, D. (1986): Molecular characterization of the human excision repair gene ERCC-1: cDNA cloning and amino acid homology with the yeast DNA repair gene RAD10. *Cell* 44: 913-923
- Von Wronski, M. A., Shiota, S., Tano, T., Mitra, S., Bigner, D. D., Brent, T. P. (1991): Structural and immunological comparison fo indigenous human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase with that encoded by a cloned cDNA. *J. Biol. Chem.* 266: 1064-1070
- Wani, G., Wani, A. A., Gibson-D'Ambrosio, R., Samuel, M., Lowder, E., D'Ambrosio, S. M. (1989): Absence of DNA damage-mediated induction of human methyltransferase specific for precarcinogenic O⁶- methylguanine. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 11: 21-26
- Weber, C. A., Salazar, E. P., Stewart, S. A., Thompson, L. H. (1990): ERCC2: cDNA cloning and molecular characterization of a human nucleotide excision repair gene with high homology to yeast RAD3. *EMBO J.* 9: 1437-1447
- Weeda, G., Van Ham, R. C. A., Masurel, R., Westerveld, A., Odijk, H., De Wit, J., Bootsma, D., Van Der Eb, A. J., Hoeijmakers, J. H. J. (1990a): Molecular cloning and biological characterization of the human excision repair gene ERCC-3. *Mol. Cell. Biol.* 10: 2570-2581
- Weeda, G., van Ham, R. C. A., Vermeulen, W., Bootsma, D., Van Der Eb, A. J., Hoeijmakers, J. H. J. (1990b): A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders Xeroderma pigmentosum and Cockayne's Syndrom. *Cell* 62: 777-791

- White, G. R. M., Ockey, C. H., Brennand, J., Margison, G. P. (1986): Chinese hamster cells harbouring the *Escherichia coli* O⁶-alkylguanine alkyltransferase gene are less susceptible to sister chromatid exchange induction and chromosome damage by methylating agents. *Carcinogenesis* 7: 2077-2080
- Xiao, W., Derfler, B., Chen, J., Samson, L. (1991): Primary sequence and biological functions of a *Saccharomyces cerevisiae* O⁶-methylguanine/O⁴-methylthymine DNA repair methyltransferase gene. *Embo J.* 10: 2179-2186
- Yalkinoglu, Ö., Heilbronn, R., Bürkle, A., Schlehofer, J. R., Zur Hausen, H. (1988): DNA amplification of Adeno-associated virus as a response to cellular genotoxic stress. *Cancer Res.* 48: 3123-3129
- Yarosh, D. B. (1985): The role of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis. *Mut. Res.* 145: 1-16
- Yarosh, D. B., Foote, R. S., Mitra, S., Day, R. S. (1983): Repair of O⁶-methylguanine in DNA by demethylation is lacking in Mer human tumor cell strains. *Carcinogenesis* , 199- 205
- Yarosh, D. B., Fornace, A. J., Day III, R. D. (1985): Human O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase fails to repair O⁴- methylthymine and methyl phosphotriesters in DNA as efficiently as does the alkyltransferase from *Escherichia coli*. *Carcinogenesis* 6: 949-953
- Zdzienicka, M. Z., Simons, J. W. J. M. (1986): Analysis of repair process by the determination of the induction of cell killing and mutations in two repair deficient Chinese hamster ovary cells. *Mut. Res.* 166: 59-69