

KfK 5003
Februar 1992

Onkogen-induzierte Mutagenese

S. van den Berg-Stein
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik
und für Toxikologie von Spaltstoffen

KfK 5003

Onkogen-induzierte Mutagenese

Susanne van den Berg-Stein

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

Onkogen-induzierte Mutagenese

Zusammenfassung

Proto-Onkogene übernehmen während der Proliferation oder der Differenzierung von Zellen wichtige, regulatorische Funktionen; werden sie jedoch mutiert oder fehlreguliert, können sie zu der Entstehung von Tumoren beitragen. Da die Progression von Zellen zu einem Tumor oftmals mit der Zunahme an chromosomalen Aberrationen einhergeht und viele Tumorzellen genetisch instabil sind, wird angenommen, daß auch die chromosomale Instabilität ein bedeutender Faktor bei der Tumorbildung ist. In der vorliegenden Arbeit ist getestet worden, ob diese beiden Ereignisse direkt miteinander verknüpft sind, d.h. ob Überexpression von Onkogenen einen Einfluß auf die chromosomale Stabilität von Zellen hat. Dazu wurden NIH-3T3-Fibroblasten mit den Onkogenen c-fos, c-Ha-ras oder v-mos stabil transfiziert. Die Onkogene waren in drei unterschiedlich induzierbare Expressionsvektoren kloniert worden. Die Expression der Onkogene war induzierbar durch (1) den Glukokortikoid-induzierbaren "Long Terminal Repeat (LTR)"-Promotor des Maus-Mamma-Tumor-Virus (MMTV), (2) den Cadmium-induzierbaren menschlichen Metallothionein (MT) IIA-Promotor oder (3) den Hitzeschock-induzierbaren menschlichen Hitzeschock Protein 70 (HSP70)-Promotor. Die Überexpression von c-Fos, c-Ha-Ras oder v-Mos führte zu einem zwei- bis dreifachen Anstieg in der Frequenz chromosomaler Aberrationen. Auch die Genmutationsfrequenz war nach c-Fos-Überexpression um das zwei- bis siebenfache erhöht. Die Induktion chromosomaler Aberrationen durch Überexpression von c-Ha-Ras oder v-Mos konnte durch Zugabe von Antisense-fos-Oligodesoxynukleotiden zu den induzierten Zellen verringert werden. Dies spricht dafür, daß überexprimiertes c-Ha-Ras oder v-Mos durch c-Fos, das sie induzieren, Aberrationen erzeugen. Suramin verringerte über einen noch nicht verstandenen Mechanismus die UV-Induktion von c-fos-mRNA. Gleichzeitig verringerte es die Zahl UV-induzierter, chromosomaler Aberrationen. Weil auch Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide diesen Effekt zeigen, sprechen diese Experimente dafür, daß Suramin durch die Inhibierung der UV-induzierter DNA-Synthese wirkt und daß c-Fos nicht nur an der Ras- und Mos-induzierten Mutagenese, sondern auch an der Induktion von chromosomalen Aberrationen durch Umwelt-Mutagene, wie UV, beteiligt ist. Darüberhinaus wurde gezeigt, daß Zellen, die ein Indikatorplasmid für homologe Rekombination enthalten, nach transienter oder stabiler Transfektion mit einem c-Fos-exprimierenden Plasmid eine zweifach höhere Rekombinationsfrequenz zeigen, verglichen mit Zellen, die mit einem Kontrollplasmid transfiziert wurden. Zusammenfassend verweisen alle Ergebnisse auf eine entscheidende Bedeutung von c-Fos bei der Kontrolle der genomischen Stabilität in Säugerzellen.

Oncogene-induced mutagenesis

Abstract

Protooncogenes exert important regulatory functions during the proliferation or the differentiation of cells; however when mutated or deregulated, they may contribute to the generation of tumors. Since the progression of cells to a tumor often goes along with an increase in chromosomal aberrations and since the majority of tumor cells are genetically instable, it is believed that chromosomal instability is an important factor in the formation of tumors. In the present work it has been examined, whether these two events are directly linked to each other, i.e. whether overexpression of oncogenes influence the chromosomal stability of cells. To this end NIH 3T3 fibroblasts were stably transfected with the oncogenes *c-fos*, *c-Ha-ras* or *v-mos*. The oncogenes had been cloned into three different inducible expression vectors. The expression of the oncogenes was inducible by (i) the glucocorticoid inducible "long terminal repeat (LTR) promoter of the mouse mammary tumor virus (MMTV), (ii) the cadmium inducible human metallothionein (MT) IIA promoter or (iii) the heat shock inducible human heat shock protein 70 (HSP 70) promoter. The overexpression of *c-Fos*, *c-Ha-Ras* or *v-Mos* led to a two- to threefold increase in the frequency of chromosomal aberrations. Also the frequency of gene mutations after *c-Fos* overexpression was increased two- to sevenfold. The induction of chromosomal aberrations by overexpression of *c-Ha-Ras* or *v-Mos* could be decreased by adding antisense *fos* oligodeoxynucleotides to the induced cells. This suggests that overexpressed *c-Ha-Ras* or *v-Mos* generate aberrations through *c-Fos*, which they induce. Suramin decreased the UV-induction of *c-fos* mRNA by a yet unknown mechanism. At the same time it reduced the number of UV-induced chromosomal aberrations. Since also antisense *fos* oligodeoxynucleotides exert this effect, these experiments suggest that suramin acts through the inhibition of UV-induced *c-Fos* synthesis and that *c-Fos* is not only involved in *Ras* and *Mos* induced mutagenesis, but also in the induction of chromosomal aberrations by environmental carcinogens, such as UV. Furthermore it was shown that cells, which contain an indicator plasmid for homologous recombination show a twofold higher recombination frequency after transient or stable transfection with a *c-Fos* expressing plasmid, as compared to cells, which had been transfected with a control plasmid. In summary all experiments point to a decisive role of *c-Fos* in the control of genomic stability in mammalian cells.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

Einleitung 1

Materialien

- 1) Bezugsquellen 9
- 2) Radiochemikalien 11
- 3) Zellen, Plasmide und Bakterien 11
- 4) Kulturmedien 12
- 5) Puffer 13
- 6) Antikörper 14
- 7) Oligodesoxynukleotide 14
- 8) UV-Bestrahlungsquellen 14

Methoden 15

- 1) Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration 15
- 2) Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform 15
- 3) Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol 15
- 4) Schneiden von DNA durch Restriktionsendonukleasen 16
- 5) Plasmid-DNA-Präparation 16
 - Methode nach Birnboim und Doly 16
 - Methode mit Quiagen-Säulen 17
 - Methode nach Hirt 18
- 6) Auftrennen von DNA-Fragmenten 18
- 7) Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen 19
- 8) Markierung von DNA mit α -³²P-dCTP 19
- 9) Gelfiltration über Sephadex G50 19
- 10) Herstellung kompetenter Bakterien 20
 - Methode nach Hanahan 20
 - Methode nach Cohen et al. 20
- 11) Transformation von kompetenten Bakterien 21
 - Methode nach Hanahan 21
 - Methode nach Cohen et al. 21

12) Herstellung von Selektiv-Agarplatten	21
13) Zellkultur	22
Trypsin-Behandlung	22
Einfrieren und Auftauen von Zellen	22
14) Transfektion in Säugerzellen	23
Methode nach Graham und van der Eb	23
Methode nach Chen und Okayama	23
Methode nach Kawai und Nishizawa	24
15) Bestimmung der Genmutationsfrequenz	25
am Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-Lokus (Ouabain-Selektion)	25
am HGPRT-Lokus (6-Thioguanin-Selektion)	25
16) Bestimmung der Rekombinationsfrequenz	26
am Tk-Lokus (CHAT-Selektion)	26
17) UV-Bestrahlung und Suramin-Behandlung von Zellen	26
18) Poly A ⁺ -RNA-Präparation	26
19) Northern-Blotting-Analyse und Hybridisierung	27
20) Anfertigung von Chromosomenpräparaten	28
21) Immunfluoreszenz	29
22) Statistik	30

Ergebnisse 32

1) Expression von c-Fos, c-Ha-Ras oder v-Mos von Dexamethason-induzierbaren Genkonstrukten erhöht die chromosomale Instabilität in NIH 3T3 Zellen	32
2) Expression von c-Fos von Cadmium-induzierbaren Genkonstrukten erhöht die chromosomale Instabilität in NIH 3T3 Zellen	41
3) Expression von c-Ha-Ras von Hitzeschock-induzierbaren Genkonstrukten erhöht die chromosomale Instabilität in NIH 3T3 Zellen	45
4) Analyse chromosomaler Aberrationen nach Überexpression von c-Fos in menschlichen Cervix-Karzinom Zellen (Hela tk ⁻) und in Zellen des chinesischen Hamsters (CHO-K1-2)	48
5) Überexpression von c-Fos, c-Ha-Ras, bzw. v-Mos induziert keine Verschiebungen im Zellzyklus von NIH 3T3 Fibroblasten	51

6) Überexpression von c-Fos bewirkt einen Anstieg in der Mutationsfrequenz des Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-Gens und des HGPRT-Gens	54
6.1) Mutationsfrequenz am Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-Lokus	54
6.2) Mutationsfrequenz am HGPRT-Lokus	55
7) Überexpression von c-Fos erhöht die Mutationsfrequenz in dem "Shuttlevektor"-Plasmid pS189	57
8) Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide hemmen die Aberrations-Induktion durch überexprimiertes c-Ha-Ras oder v-Mos in NIH 3T3 Fibroblasten	60
9) Serum-Induktion erhöht trotz der Induktion von c-fos-mRNA nicht die Frequenz chromosomaler Aberrationen in NIH 3T3 Zellen	64
10) Suramin verringert die Menge UV-induzierter c-fos-mRNA und die Menge UV-induzierter chromosomaler Aberrationen in NIH 3T3 Zellen und in CHO-9 Zellen	66
11) Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide reduzieren die Zahl der durch UV-Strahlung induzierten Aberrationen in NIH 3T3 Fibroblasten	71
12) Überexpression von c-Fos erhöht die Rekombinationsfrequenz in der menschlichen Osteosarkom-abgeleiteten Zelllinie 143 tk-	72
Tabellen	77
Diskussion	87
Literaturverzeichnis	94

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivator-Protein-1
ATP	Adenosintriphosphat
Bq	Becquerel
BES	N, N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-Aminoethansulfonsäure
BSA	Rinderserum-Albumin
bp	Basenpaar
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
c-Fos	zelluläres Fos-Protein
c-fos	zelluläres fos-Gen
cpm	counts per minute
CTP	Cytidintriphosphat
d	Tage
DEAE-	Diethylaminoethyl-
Dex	Dexamethason
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
FRITC	Fluorescein-Rhodamin-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G 418	Geneticin-Sulphat
h	Stunden
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
hph	Hygromycin B-Phosphotransferase
HSP	Hitze Schock Protein
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-Thiogalaktopyranosid
kb	1000 Basenpaare
LTR	Long Terminal Repeat
MES	2-Morpholino-Ethansulfonsäure

MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MMTV	Maus-Mamma-Tumorvirus
MT	Metallothionein
min	Minuten
nm	Nanometer (10^{-9}m)
OD	optische Dichte
Oligo	Oligodesoxynukleotid
P/S	Penicillin/Streptomycin
PKC	Proteinkinase C
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulphat
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
6-Tg	6-Thioguanin
Tk	Thymidinkinase
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
mRNA	messenger-RNA
tRNA	transfer-RNA
U	Einheiten
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
v-Fos	virales Fos-Protein
v-fos	virales fos-Gen
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-Indonyl- β -D-Galaktopyranosid

Einleitung

In jeder Zelle eines Organismus läuft eine enorme Vielfalt komplexer Prozesse ab. Ein geordneter Ablauf dieser Prozesse ist nur dann gewährleistet, wenn die Zelle Regulationssysteme aufweist, die diese Vorgänge steuern, und Reparatursysteme, die auftretende Störungen beseitigen. Sobald diese Systeme versagen, kommt es in der Zelle zu irregulären Vorgängen, wie z.B. zur malignen Transformation.

Zellen, die sich der Wachstumskontrolle entziehen, zeigen anomale Wachstumseigenschaften. Dazu gehören Substrat- und Serumunabhängigkeit, das Fehlen der Kontaktinhibition und die Fähigkeit zur Tumorbildung in immun-defizienten Mäusen. Solche Zellen werden als transformiert bezeichnet. Viele Faktoren sind bekannt, die dazu beitragen, eine normale Zelle in eine transformierte Zelle zu verwandeln, beispielsweise die Behandlung mit ultravioletter (UV-) Strahlung oder DNA-schädigenden Chemikalien (Singer, 1979; Mai et al., 1989). Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind noch unbekannt. Es steht jedoch fest, daß die Entwicklung eines Tumors ein Viel-Stadien-Prozeß ist, in dem die Zelle Veränderungen erfährt, die ihr einen Wachstumsvorteil verschaffen und sie zu einer unkontrolliert proliferierenden Tumorzelle machen (Foulds, 1958; Nowell, 1976, 1986). Dieser Viel-Stadien-Prozeß wurde anhand der Entstehung von Karzinomen auf der Haut bestimmter Mausstämme experimentell untersucht und in die übergreifenden Stadien der Initiation, der Promotion und der Progression unterteilt (Übersicht, siehe Kaina, 1989). Bei der Initiation, der Auslösung des Tumors, wird der Genotyp verändert. Wird z.B. die DNA durch Behandlung mit N-Methyl-N'-Nitro-N'-Nitroso-Guanidin (MNNG) methyliert, so führt dies zu Fehlpaarungen und schließlich zur Entstehung von Punktmutationen (Schendel und Michaeli, 1984). Die Initiation ist irreversibel. Nach der Behandlung mit einer subkarzinogenen Dosis eines Initiators sind derartig genetisch veränderte Zellen vorhanden; sie können jedoch nicht auswachsen und keine Tumore erzeugen. Erst durch die Zugabe eines Tumorpromotors erfahren die initiierten Zellen Veränderungen, die ihr Wachstum so beschleunigen, daß sie sich zu einem Tumor entwickeln können. Aber auch Tumorpromotoren können DNA-schädigend wirken, so daß die Unterscheidung zwischen Initiator und Promotor nicht absolut ist. Es ist beispielsweise gezeigt worden, daß der Tumorpromoter 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) an der Induktion chromoso-

maler Aberrationen beteiligt ist (Petruševska et al., 1988; Färber et al., 1989). Diese Wirkung von TPA beruht vermutlich darauf, daß TPA die Proteinkinase (PKC) aktiviert und dadurch den Arachidonsäureabbau stimuliert (Nishizuka, 1984), in dessen Verlauf es zur Bildung von Sauerstoffradikalen kommen kann, die Chromosomenschäden verursachen (Emeritt et al., 1983). Die Aktivierung der PKC durch TPA kann durch die strukturelle Ähnlichkeit dieser Substanz mit dem natürlichen Aktivator der PKC, dem Diacylglycerol, erklärt werden. Bei der Progression entwickelt sich aus einem benignen ein maligner Tumor. Charakteristisch für einen malignen Tumor ist die Fähigkeit der Tumorzellen zur autonomen Zellteilung und zum Einwandern in das umliegende Gewebe.

Ein weiterer Hinweis dafür, daß es sich bei der Tumorentstehung um einen Viel-Stadien-Prozeß handelt, wurde bei der Untersuchung von Colonkarzinomen erhalten. Bei einer Vielzahl unterschiedlicher Colonkarzinome wurden mindestens vier verschiedene genetische Veränderungen gefunden: die Aktivierung des ras-Onkogens und die Inaktivierung von drei Tumorsuppressorgenen durch Mutationen (Fearon und Vogelstein, 1990). Dabei bedingt nicht die zeitliche Reihenfolge, in der die Veränderungen entstehen, sondern ihre Akkumulation die Progression des Tumors.

Zu einem molekularen Verständnis der Faktoren, die für die Tumorentwicklung notwendig sind, trug die Entdeckung der Proto-Onkogene entscheidend bei. Proto-Onkogene sind zelluläre Gene, die durch Viren oder durch Karzinogene dereguliert und so zu krebs-erregenden Onkogenen aktiviert werden können. Sie wurden durch ihre Homologie zu viralen Onkogenen (Stehelin et al., 1976) und durch Transfektionsexperimente (Shih et al., 1979) entdeckt. Sie sind essentiell für die Proliferation oder Differenzierung von Zellen. In vielen Fällen konnten ihre Genprodukte identifiziert und ihre Funktion bestimmt werden: Proto-Onkogene kodieren für Proteinkinasen (Collett und Erikson, 1978), für Wachstumsfaktoren (Doolittle et al., 1983; Baldwin, 1985; ; Goustin et al., 1986; Salomon und Perrotean, 1986), für Rezeptoren von Wachstumsfaktoren und von Hormonen (Downward et al., 1984; Sherr et al., 1985; Weinberger et al., 1986; Yarden et al., 1986), für GTP-bindende Proteine (Gibbs et al., 1984) und für Transkriptionsfaktoren (Lewin, 1991). Wenn Wachstumsfaktoren in einer Zelle konstitutiv exprimiert werden oder wenn das intrazelluläre Signalsystem fehlreguliert wird, ist es vorstellbar, daß die Initiation der DNA-Synthese und Zellteilung

unkontrolliert abläuft und die Zelle ein autonomes Wachstum zeigt (Heldin und Westermark, 1984).

Auch wenn dominante Onkogene ursprünglich als Gene definiert waren, die nicht-transformierte Zellen transformieren können, stellte sich bald heraus, daß ein Onkogen allein nicht ausreicht, um eine primäre Zelle zu transformieren:

Die beiden zellulären Onkogene c-ras und c-myc sind allein nicht zur vollständigen Transformation von embryonalen Rattenfibroblasten imstande. Sie transformieren erst dann, wenn sie gemeinsam transfiziert werden (Land et al., 1983).

Weiterhin zeigen Experimente mit transgenen Tieren, daß die Aktivierung eines Onkogens allein nicht ausreicht, um primäre Zellen zu transformieren (Palmiter und Brinster, 1986; Hanahan, 1988), denn wenn allein die Onkogenexpression für die Transformation ausreichend wäre, müßten als Folge der gezielten Expression eines Onkogens alle betroffenen Zellen Tumore bilden. Da aber nur aus einigen Zellen Tumore entstehen, müssen der Onkogenexpression anscheinend ein zweiter oder mehrere Schritte folgen, was nicht in allen Zellen geschieht.

Neben der Deregulierung von Onkogenen weisen Tumorzellen vielfach eine erhöhte genomische Instabilität auf (Nicolson, 1987; Pathak, 1989; Hill, 1990). Diese Instabilität kann die Anzahl oder die Struktur der Chromosomen betreffen. Chromosomale Veränderungen entstehen in erster Linie durch Fehler in der Wiedervereinigung nach einem Bruchereignis und beinhalten vornehmlich Translokationen, daneben aber auch Deletionen und Inversionen (Rieger und Michaelis, 1967). Die meisten Aberrationen scheinen das Genom zufällig zu betreffen, in vielen Fällen sind jedoch spezifische Veränderungen an einzelnen Chromosomen beschrieben worden (Oshimura et al., 1985; Nowell, 1986). Zu den bekanntesten Beispielen für den engen Zusammenhang zwischen einer Krebserkrankung und chromosomalen Aberrationen gehören u.a. 1) die chronische, myeloische Leukämie, 2) das Burkitt Lymphom und 3) das Retinoblastom.

1) Bei der chronischen, myeloischen Leukämie kommt es nach der reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22, welche das c-abl-Proto-Onkogen einbezieht, zu der Entstehung des "Philadelphia-Chromosoms" (Nowell und Hungerford, 1960; Rowley, 1973). Durch zwei Chromosomenbruchereignisse wird hierbei die 5' Hälfte des "bcr"("breakpoint cluster region")-Gens mit dem 5' Bereich des c-abl-Gens verbunden. Das c-abl-Proto-Onkogen kodiert für ein Protein mit Tyrosinkinase-Aktivität, welche durch die Fusion verstärkt wird.

2) Bei dem Burkitt Lymphom wird das c-myc-Proto-Onkogen reziprok von Chromosom 8 auf Chromosom 14, in die Nähe des genetischen Ortes, der für die schwere Immunglobulin-Kette kodiert, transloziert. Man vermutet, daß entweder das c-myc-Gen an seinem ursprünglichen Locus einer negativ regulierenden Region ausgesetzt ist, welche durch die Translokation verloren geht oder, daß der Immunglobulin-Locus ein transkriptionelles Verstärkerelement liefert, welches die c-myc-Expression verstärkt (Corcoran et al., 1985).

3) Bei dem Retinoblastom treten Veränderungen in der Bande 14 des Chromosoms 13 auf. Es resultiert aus einer rezessiven Mutation im Retinoblastom (Rb)-Locus (Cavanee et al., 1983), wobei vermutlich ein Gen, welches das Zellwachstum negativ reguliert, entfernt oder verändert wird.

Mit der Progression des Tumors nimmt auch die genetische Instabilität zu (German, 1983; Ling et al., 1985), d.h. eine Zelle, die schon mehrere Stadien in der Tumorentwicklung durchlaufen hat, ist für weitere Veränderungen, wie z.B. Chromosomenbrüche, empfänglicher als eine Zelle eines früheren Stadiums oder eine normale Zelle. Hierfür spricht auch die Beobachtung, daß eine Zelle während ihrer Veränderung zu einer Tumorzelle genomische Veränderungen akkumuliert: Vergleicht man ein frühes Tumorstadium mit einem fortgeschrittenen, stellt man fest, daß der Grad der Malignität mit der Menge an chromosomalen Veränderungen korreliert ist (Oksala und Therman, 1979). Ferner zeigen metastasierende Zellen eine höhere Mutationsrate als nicht metastasierende, die aus demselben Tumor stammen; dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß sich die Zellen erst durch die erhöhte genomische Instabilität von benignen in maligne Zellen verwandeln (Cifone und Fidler, 1981).

Wie kommt es dazu, daß in einer Zelle, die ein aktiviertes Onkogen trägt, genetische Veränderungen ablaufen, die schließlich zur vollständigen Transformation der Zelle führen? Wäre es möglich, daß die Expression eines Onkogens die Bereitschaft der Zelle zu mutieren heraufsetzt?

Es ist bereits gezeigt worden, daß die Transformation von Zellen durch DNA-Tumoviren, wie z.B. "Simian Virus 40" (SV40), die Mutationsfrequenz am Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT)-Locus erhöht (Theile und Strauss, 1977; Strauss et al., 1989). Weiterhin zeigen Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe, daß nach der Übertragung der Onkogene pl1 des Polyoma Virus oder v-myc des MC29 Virus in FR 3T3 Rattenfibroblasten eine

erhöhte Zahl von Schwesterchromatid-Austauschen (SCEs) und ein veränderter Karyotyp ausgeprägt werden (Cerni et al., 1987). Die Autoren schließen aus ihren Experimenten, daß die Expression des *plt*- und des *v-myc* Onkogens einen destabilisierenden Effekt auf das zelluläre Genom zu einem frühen Zeitpunkt im tumorigenen Prozeß ausübt.

Bei diesen Beispielen weiß man jedoch nicht sicher, ob das Virus, bzw. das Onkogen oder allein die Insertion des Virus, bzw. die Selektion auf den transformierten Phänotyp nach Transfer des Onkogens für die erhöhte Mutabilität, bzw. erhöhte, chromosomale Instabilität verantwortlich ist.

Um diese Frage zu beantworten, wurden in der vorliegenden Arbeit Zellen verwendet, in denen die Onkogene *c-fos*, *c-Ha-ras* oder *v-mos* induzierbar exprimiert werden konnten. Dies erlaubte, die Onkogene nach Belieben anzuschalten und direkt danach ihre Wirkung auf die chromosomale Stabilität zu untersuchen.

Die Produkte der genannten Onkogene werden in drei verschiedenen Bereichen der Zelle exprimiert: das zelluläre Fos-Genprodukt kommt im Zellkern vor, das zelluläre Ha-Ras-Genprodukt an der Plasmamembran und das zelluläre Mos-Genprodukt, dessen virales Gegenstück verwendet wurde, im Zytoplasma.

Das zelluläre Fos-Protein wurde durch seine Homologie zu den Onkogenen der murinen Osteosarcomviren FBJ-MSV und FBR-MSV entdeckt (Finkel et al., 1966; Curran und Teich, 1982; Curran et al., 1982). Die erhöhte Expression dieses Proteins führt zu Tumoren *in vivo* und zur Transformation von Zellen *in vitro* (Miller et al., 1984; Jenuwein et al., 1985). Das *c-fos*-Gen kodiert für ein 55 kD großes, nukleäres Protein. In den meisten Geweben ist seine Expression niedrig, sie kann jedoch z.B. durch Wachstumsfaktoren schnell und transient induziert werden (Curran, 1988). Das *c-Fos*-Protein wird in hohen Konzentrationen entwicklungspezifisch bei der Differenzierung von Makrophagen (Müller et al., 1985) und in Zellen der fötalen Membranen, der Plazenta (Müller et al., 1983), des Knochenmarks (Müller et al., 1984), und der frühen, fötalen Leber (Gonda und Metcalf, 1984) exprimiert. Dies spricht für eine wichtige Funktion des *c-Fos*-Proteins bei zellulären Differenzierungsprozessen. Daneben übernimmt das *c-Fos*-Protein auch eine essentielle Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation: Zellen, die mit induzierbaren Antisense-*fos*-Konstrukten transfiziert worden sind, zeigen nach Induktion der Antisense-*fos*-Transkription eine Hemmung der Proliferation (Holt et al., 1986; Nishikura und Murray, 1987). Ebenso kann durch Mikroinjektion von Antikörpern, die spezifisch gegen das

c-Fos-Protein gerichtet sind, die Zellproliferation in Fibroblasten verhindert werden (Riabowol et al., 1988). Gemeinsam mit dem c-Jun-Protein aktiviert das c-Fos-Protein als Transkriptionsfaktor AP-1 (Distel et al., 1987; Chiu et al., 1988; Franza Jr. et al., 1988; Lucibello et al., 1988) die Transkription von Genen, die das "TPA-responsive element" (TRE) tragen, wie z.B. das Transin-Gen (Kerr et al., 1988) und das Kollagenase-Gen (Schönthal et al., 1988). Weiterhin ist gezeigt worden, daß die Behandlung von Zellen mit Hitzeschock, UV-Strahlung oder anderen DNA-schädigenden Agenzien die Menge an c-fos-mRNA in Fibroblasten erhöht (Angel et al., 1985; Andrews et al., 1987; Büscher et al., 1988; Hollander und Fornace, 1989). Dies spricht für eine Rolle von c-Fos bei der Reaktion von Zellen auf Streßfaktoren.

Das virale mos-Gen ist das transformierende Gen des Maus Moloney Sarkom Virus (van Beveren et al., 1981; Papkoff et al., 1982, 1983). Das zelluläre Gegenstück des v-mos-Onkogens war eines der ersten Proto-Onkogene, die charakterisiert werden konnten. Das c-Mos-Protein hat eine Größe von 39 kD (Sagata et al., 1988) und besitzt eine Serin/Threonin spezifische Proteinkinase-Aktivität. Es kommt in geringen Mengen im Zytoplasma aller Gewebstypen vor (Herzog et al., 1989); nur in den Gonaden (Probst und Vande Woude, 1985; Paules et al., 1988; Sagata et al., 1988; Schmidt et al., 1988), speziell in den Keimzellen (Probst et al., 1987; Goldmann et al., 1987; Mutter und Wolgemuth, 1987; Keshet et al., 1988), wird es sehr stark exprimiert. Untersuchungen an *Xenopus*-Oozyten haben gezeigt, daß das c-Mos-Genprodukt eine zweifache Funktion hat: Es hebt die Teilungshemmung vor der ersten meiotischen Prophase auf, indem es zur Aktivierung des reifungsfördernden Faktors ("Maturation-promoting-factor, MPF) führt (Sagata et al., 1989a). Der MPF wurde erstmalig als ein Faktor beschrieben, der nach Mikroinjektion in Oozyten, die in der G₂-Phase arretiert sind, diese zum Eintritt in die Mitosephase veranlassen kann (Übersicht, siehe Murray und Kirschner, 1989). Er stellt einen Komplex aus den Proteinen p34^{cdc2} und Cyclin dar (Booher et al., 1989; Draetta et al., 1989). Nach der Teilungshemmung vor der ersten meiotischen Prophase werden die Zellen ein zweites Mal beim Übergang in die zweite meiotische Metaphase arretiert; diese Arretierung wird natürlicherweise durch die Befruchtung des Eies aufgehoben und geht mit dem Verschwinden von c-Mos aus der befruchteten Eizelle einher. Aus dem Befund, daß die Injektion von c-Mos zu einer Teilungshemmung der Embryonen führt, während Verarmung an c-Mos (ohne Befruchtung) die Teilungshemmung in der zweiten meiotischen Metaphase aufhebt, kann man schließen, daß c-Mos hier als

zytostatischer Faktor wirkt (Sagata et al., 1989b). Man nimmt an, daß die transformierende Aktivität des c-Mos Proteins darauf beruht, daß Zellen zu einem falschen Zeitpunkt in die Mitose gebracht werden (Sagata et al., 1988; Sagata et al., 1989b; Paules et al., 1989). Das virale Ha-ras-Gen ist für die transformierende Aktivität des Harvey Maus Sarcoma Virus verantwortlich (Willingham et al., 1980; Dhar et al., 1982; Capon et al., 1983; Lautenberger et al., 1983). Das 21 kD große c-Ha-ras-Genprodukt ist auf der inneren Oberfläche der Plasmamembran konzentriert (Willingham et al., 1980). Es wird ubiquitär in allen Zelltypen exprimiert. Die Ursache dafür liegt vermutlich in seiner Promotorsequenz, die der von konstitutiv exprimierten Haushalts ("housekeeping")-Genen ähnelt. Zelluläre Ha-Ras-Proteine sind GTP-bindende Proteine, die GTPase-Aktivität aufweisen, welche von den Proteinen GAP (GTPase-aktivierendes Protein) (Trahey und McCormick, 1987) und NF1 (Neurofibromatose-1-Protein) (Viskochil et al., 1990; Wallace et al., 1990) reguliert wird. Sie gehören in die Gruppe der G-Proteine, welche an der Vermittlung von Proliferationssignalen zwischen einem Rezeptor und dem Zellinneren durch zelluläre Membranen beteiligt sind (Übersicht, siehe Balmain und Brown, 1988). Der Mechanismus, über den c-Ha-Ras-Onkoproteine in die Übertragung von Wachstumssignalen eingebunden sind, ist weitgehend unbekannt. Man kann sich jedoch vorstellen, daß eine Mutation im c-Ha-ras Gen die DNA-Synthese von einer Mitogenaktivität entkoppelt, so daß konstitutiv, d.h. ohne daß ein Mitogen vorhanden sein muß, Proliferationssignale in die Zelle abgegeben werden und die Zelle dadurch ungehemmt proliferiert (Marshall, 1991). In der vorliegenden Arbeit wurde nicht das normale, sondern das aktivierte c-Ha-ras-Gen verwendet, welches eine Punktmutation im 12. Codon aufweist (Übersicht, Bos, 1988).

Die Entstehung eines Tumors ist -wie oben dargelegt- ein Viel-Stadien-Prozeß, in dem die Aktivierung oder die Überexpression von Onkogenen eine entscheidende Rolle spielt (Bishop, 1983; Slamon et al., 1984): Im Falle des ras-Gens kann die Transformation durch das c-Ras-Genprodukt entweder über Aktivierung mittels Mutation des c-ras-Gens oder durch die Überexpression des normalen c-Ras-Genprodukts geschehen. Transfiziert man NIH 3T3 Fibroblasten mit einem chimären Plasmid, in dem das c-Ha-ras-Gen hinter den konstitutiv exprimierenden Harvey Maus Sarcoma Virus (Ha-MuSV) LTR-Promoter kloniert wurde, so steigt die Menge an c-Ha-ras-mRNA, sowie an c-Ha-Ras-Genprodukt stark an und die Zellen bilden Foci, d.h. sie zeigen eine Eigenschaft transformierter Zellen (Chang et al., 1982). Ebenso transformieren Zellen, die mit Moloney-Sarcoma-

Virus (M-MSV)-LTR-c-mos-Hybridmolekülen transfiziert wurden (Blair et al., 1981). Die Transformation durch das c-fos-Gen benötigt die Anbindung des c-fos-Gens an einen starken Promotor, wie z.B. den viralen LTR-Promotor, wodurch die Transkription erhöht wird, und zusätzlich die Entfernung von c-fos mRNA-destabilisierenden Elementen in der 3' untranslatierten Region (Raymond et al., 1989).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Antwort auf die Frage gesucht, wodurch die Akkumulation genetischer Veränderungen während der Kanzerogenese bedingt ist. Die oben aufgezeigten Funktionen aktivierter oder überexprimierter Onkogene bei der Transformation von Zellen lassen vermuten, daß sie möglicherweise an der Erzeugung von Chromosomen- oder Genmutationen beteiligt sind. Deshalb wurde untersucht, ob die Überexpression von Onkogenen einen Einfluß auf die chromosomale Stabilität von Zellen hat. Ein solcher Onkogen-vermittelter Mutagenese-prozeß könnte im Prozeß der Tumorentwicklung einen entscheidenden Beitrag leisten.

Materialien

1) Bezugsquellen

Acridinorange	Sigma, München
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Aminopterin	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxidsulfat	Bio Rad Laboratories, München
Ampicillin	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit
Bakterienplatten	Greiner, Nürtingen
BES	Sigma, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Serva, Heidelberg
Cadmiumchlorid	Merck, Darmstadt
Caesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Colcemid	CIBA AG, Wehr/Baden
Desoxycytidin	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulphoxid	Fluka, Neu-Ulm
DMEM	Gibco, Eggenstein bei Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Fötales Kälberserum	Gibco, Eggenstein bei Karlsruhe
F12-Medium	Gibco, Eggenstein bei Karlsruhe
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenstein bei Karlsruhe
Giensa-Lösung	Merck, Darmstadt
Glasplättchen	Bender & Hobein, Karlsruhe
Glycergel	Dako Diagnostika, Hamburg
Glycerin	BRL Inc., Neu-Isenburg
Glyoxal	Sigma, Deisenhofen
Hepes	Sigma, Deisenhofen

Hybond N+ Filter	Amersham-Buchler, Braunschweig
Hybridisierungsproben	Dianova, Hamburg
Hygromycin	Boehringer, Mannheim
Hypoxanthin	Sigma, Deisenhofen
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Lysozym	Boehringer, Mannheim
MOPS	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Serva, Heidelberg
Objektträger	Bender & Hobein, Karlsruhe
Oligo-dT-Cellulose Typ VII	Collaborative Research Inc.
Ouabain	Calbiochem, Frankfurt
para-Formaldehyd	Sigma, München
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein bei Karlsruhe
Polybren	Serva, Heidelberg
Prime-it Kit	Stratagene GmbH, Heidelberg
Proteinase K (Lyophilisat)	Merck, Darmstadt
Quiagen-tip 500 Säulen	Diagen, Düsseldorf
Restriktions-Endonukleasen	Biolabs, Schwabach
RNase A	Sigma, München
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	Amersham-Buchler, Braunschweig
Salmon-Sperm-DNA Typ III	Sigma, München
Sephadex G50	Pharmacia, Freiburg
silanierte Glasfaserwatte	Macherey-Nagel, Düren
Suramin (Germanin)	Bayer, Leverkusen
T7-Polymerase	Amersham-Buchler, Braunschweig
TEMED	Bio Rad Laboratories, München
6-Thioguanin	Sigma, Deisenhofen
TPA	Sigma, München
transfer-RNA (aus Kalbsleber)	Boehringer, Mannheim
Triton X-100	Bio Rad Laboratories, München
Tris-HCl; Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
UV-Lampe	Vetter, Wiesloch
Whatman 3MM-Papier	Bender & Hobein, Karlsruhe
X-Gal	Biomol, Hamburg
Zellkulturflaschen u.-platten	Greiner, Nürtingen

2) Radiochemikalien

α -³²P-dCTP Amersham-Buchler, Braunschweig
(370 MBq/ml, 110 TBq/mmol)

3) Zellen, Plasmide und Bakterien

Zellen:

143 tk- menschliche Osteosarkom-abgeleitete Zellen,
erhalten von Veronica Maher, Michigan (U.S.A.)
CHO-9 Ovarzellen des chinesischen Hamsters,
erhalten von Bernd Kaina, Karlsruhe
CHO-K1-2 von CHO-9 abgeleitete chinesische Hamster-Ovarien
Zellen, erhalten von Bernd Kaina, Karlsruhe
Hela tk- menschliche Cervix-Karzinom-Zellen,
erhalten von Dr. Yung-Chi-Chung, Durham
NIH 3T3 embryonale Mausfibroblasten,
erhalten von Peter Gruss, Heidelberg
LTR-c-Ha-ras-, LTR-v-mos- und HSP70-c-Ha-ras (QRA16)-stabil
transfizierte NIH 3T3 Klone, erhalten von Rolf Jaggi, Bern
LTR-c-fos- und LTR-c-Δ-fos-transfizierte NIH 3T3 Klone, erhalten von
Axel Schönthal, Karlsruhe

Plasmide (Referenzen)

pSV-neo (Southern und Berg, 1982)
phph (Gritz und Davies, 1983)
pS 189 (Seidman, 1989)
pRSV-neo (Gorman et al., 1982)
pRSV-c-fos (Offringa et al., 1990)
pRSV-v-fos (Jenuwein und Müller, 1987)
pLTR-c-fos (Schönthal et al., 1988)
pLTR-c-Δ-fos (Schönthal, 1988)
pMT-c-fos (Rüther et al., 1985)
pMT-c-Δ-fos (c-fos Insert von p19/1 (Rüther et al., 1985) ersetzt
durch c-Δfos aus pLTR c-Δ-fos (Schönthal, 1988), erhalten von Axel
Schönthal, Karlsruhe)

Bakterien

- E. coli DH5 α F⁻-L-recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻,m_k⁺), Δ (lacZYA-argF)U169
80dlacZ Δ M15, supE44, thi-1, gyrA96
- MBM 7070 F⁻ lacZamCA7020, lacY1, hsdR⁻, hsdM⁺, araD139,
 Δ (araABC-leu)7679, galU, galK, rpsL, thi
(Derivat von MC1061)

4) Kulturmedien

L-Broth:

0.5% Bacto-Hefeextrakt, 1% NaCl, 2% Bacto-Trypton

SOB:

0.5% Bacto-Hefeextrakt, 2% Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl,
10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄

SOC:

SOB mit 20 mM Glucose

Bakterien-Selektionsmedium:

L-Broth mit 50 μ g/ml Kanamycin (für pJS-3 transformierte Bakterien)

L-Broth mit 100 μ g/ml Ampicillin (für alle nicht mit pJS-3 trans-
formierten Bakterien)

Einfrier-Medium (für Bakterien):

90% L-Broth, 10% DMSO

Kulturmedium für NIH 3T3, HeLa tk⁻ und 143tk⁻ Zellen:

DMEM mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin

Kulturmedium für CHO-9 und CHO-K1-2 Zellen:

DMEM:F12 (1:1) mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml
Streptomycin

Einfriermedium (für Säugerzellen):

80% Medium, 10% Serum, 10% DMSO

5) Puffer

BBS (2x)	50 mM BES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 6,95
DEAE-Elutions-Puffer	1 M NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.5
Denaturierungspuffer	50 µl 20xPB, 500 µl DMSO, 195 µl deionisiertes Glyoxal, 255 µl H ₂ O
Glycerin-Ladepuffer	10 mM EDTA pH 8.0, 10% Glycerin, 0.1% SDS, 0.02% Bromphenolblau
Hepes (2x)	283 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7.1, 15 mM Na ₂ HPO ₄
HSB-Puffer	0.3 M NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA pH 7.8, 0,1% SDS
Ladepuffer (1x)	1xPB, 10% Glycerin, 0.02% Bromphenolblau
Lysis-Puffer	0.6% SDS, 10 mM EDTA pH 7.5
PB-Puffer (1x)	3.9 mM Na ₂ HPO ₄ , 6.1 mM Na ₂ HPO ₄
PBS-Puffer	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.7 mM CaCl ₂ , 0.6 mM MgCl ₂ , 6.5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄
QB-Puffer	0.75 M NaCl; 50 mM MOPS; 15 % Ethanol; pH 7.0
QC-Puffer	1 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% Ethanol; pH 7.0
QF-Puffer	1.2 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% Ethanol; pH 8.0
STE-Puffer	100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA
TBE-Puffer(1x)	90 mM Tris pH 8.3, 90 mM krist. Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.0
TE-Puffer	10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 7.5
TFB-Puffer	0.1 M KCl, 45 mM MnCl ₂ ·4H ₂ O, 10 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 3 mM HAcOCl ₃ , 10 mM K-MES; pH 6.3
TNE-Puffer (1x)	100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8.0

6) Antikörper

Polyklonale Antikörper (Kaninchen) gegen das Fos-Protein wurden von der Firma Medac, Hamburg bezogen (Fos-Antikörper 455, Verrier et al. 1986).

Für die Immunfluoreszenz wurden als sekundäre Antikörper Rhodamin-gekoppelte (FRITC) Schwein-anti-Kaninchen Antikörper der Firma Dako Diagnostika, Hamburg, verwendet.

7) Oligodesoxynukleotide

Es wurde ein einzelsträngiges Antisense-fos-Oligodesoxynukleotid mit einer Sequenz, die komplementär zu den Positionen +260 bis +300 der c-fos-RNA, einschließlich des ATG-Initiationscodons ist, verwendet. Das Oligodesoxynukleotid wurde in der Endkonzentration von 30 μM eingesetzt. Als Kontrolle diente ein Oligodesoxynukleotid gleicher Länge mit willkürlich gewählter Sequenz.

Die Sequenz des Antisense-fos-Oligodesoxynukleotids war:
5'ACCCGAGAACATCATGGTCGAAGTTTGGGGAAAGCCCGGC3'.

Die Sequenz des Kontroll-Oligodesoxynukleotids war:
5'GTATACCGAGTGACATTCGGACTAAGCCTTAGATGGAATC3'

8) UV-Bestrahlungsquellen

Für die Bestrahlungen bei 20 J/m^2 wurde eine 15 Watt Hg-Lampe der Wellenlänge 254 nm benutzt. Die abgestrahlte Dosis betrug bei 30 sek Bestrahlung 21 J/m^2 . Für die Bestrahlungen bei 3 J/m^2 , 5 J/m^2 und 8 J/m^2 wurde eine institutseigene UV-Lampe der Wellenlänge 254 nm verwendet. Die abgestrahlte Dosis betrug bei 7 sek Bestrahlung 1.68 J/m^2 .

Methoden

1) Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration der Nukleinsäuren (DNA oder RNA) in wässriger Lösung wurde spektroskopisch durch die Messung ihrer Extinktion bei 260 und bei 280 nm gemessen. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zu der Extinktion bei 280 nm sollte bei DNA 1.8:1 und bei RNA 2:1 betragen. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder 20 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA.

2) Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform

Zur Trennung der Nukleinsäuren von Proteinen wurde in einem Extraktionsvolumen von mindestens 100 µl die Nukleinsäure-Lösung mit gleichem Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (das Phenol wurde mit TNE (1x) gesättigt; es wurde 1:1 mit der Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)-Lösung gemischt) zusammengegeben, gut gemischt und zur Phasentrennung kurz zentrifugiert. Die Nukleinsäure-haltige Oberphase wurde abgenommen und noch zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert.

3) Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol

Die Nukleinsäure-Lösung wurde mit 3 M Natriumacetat pH 4.8 auf eine Endkonzentration von 0.25-0.3 M gebracht. Bei kleinen Fragmenten wurden 1 bis 5 µg tRNA als Fällungshilfe zugesetzt. Nach der Zugabe eines 2.5fachen Volumens Ethanol wurden die Nukleinsäuren 30 min bei -80°C oder 2 h bei -20°C ausgefällt, 10 bis 30 min bei 13000xg abzentrifugiert, zur Entfernung von Salz in 80% Ethanol aufgenommen, nochmals 5 min bei 13000xg abzentrifugiert und anschließend getrocknet. Zur Fällung kann statt eines 2.5fachen Volumens Ethanol auch ein 0.5faches Volumen Isopropanol verwendet werden.

4) Schneiden von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Pro μg zu verdauender DNA wurden 2 bis 3 Restriktionsenzym-Einheiten eingesetzt. Eine Einheit einer Restriktionsendonuklease, 1 U, ist definiert als diejenige Menge an Enzym, die 1 μg Lambda-DNA in einer Stunde verdaut. Für den Restriktionsverdau wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen eingehalten.

5) Plasmid-DNA-Präparation

Methode nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979)

200 ml einer über Nacht bei 37°C in Bakterien-Selektionsmedium geschüttelten Bakteriensuspension wurden für 10 min bei 2650xg zentrifugiert, der Bakterien-Niederschlag in 10 ml Lysozym-Lösung (10 mM EDTA pH 7.8, 25 mM Tris pH 8, 50 mM Glucose, 2 mg/ml Lysozym) resuspendiert und für 30 min auf Eis gegeben. 20 ml alkalische SDS-Lösung (0.2 M NaOH, 1% SDS) wurden unter Schütteln vorsichtig hinzu pipettiert, für 5 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 15 ml 3M NaAcetat pH 4.8 für weitere 60 min auf Eis gestellt. Ausgefallenes Protein und genomische DNA wurden durch 20 min Zentrifugieren bei 16800xg bei 4°C abgetrennt und die Plasmid-DNA mit 2.5fachem Volumen Ethanol (-20°C) während 30 min bei -80°C gefällt. Die ausgefällte Plasmid-DNA wurde 10 min bei 16800xg bei 4°C abzentrifugiert, getrocknet, in 6 ml 0.1 M NaAcetat, 50 mM Tris pH 8 gelöst und mit 15 ml Ethanol für mindestens 30 min bei -80°C zum zweiten Mal gefällt. Nach der Fällung wurde der Niederschlag getrocknet, in 4.2 ml TE-Puffer gelöst und gemeinsam mit 4.5 g Caesiumchlorid und 40 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml) in ein VTi65-Zentrifugenröhrchen eingefüllt. Mit einer Lösung der gleichen obigen Konzentration wurde aufgefüllt. Die Röhrchen wurden zugeschweißt und 16 h lang im Beckman VTi65-Vertikalrotor bei 55000 U/min (20°C) zentrifugiert. Die entstehende "supercoiled" Plasmidbande wurde unter UV-Licht abgezogen, in ein neues VTi65-Zentrifugenröhrchen überführt und weitere 6 h bei 55000 U/min (20°C) zentrifugiert. Die "supercoiled" Plasmidbande wurde wieder abgezogen, das Ethidiumbromid mit wassergesättigtem 1-Butanol extrahiert und die DNA-Lösung mit Wasser auf 4 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von NaAcetat pH 4.8 (Endkonzentration 0.2 M) und 2.5fachem Volumen Ethanol wurde die Plasmid-DNA über

Nacht bei -20°C (oder mindestens 1 h bei -80°C) ausgefällt. Nach 30 min Zentrifugieren bei $16800\times g$ (4°C) wurde die DNA mit 80% Ethanol gewaschen, nochmals 10 min zentrifugiert, getrocknet und in einem entsprechenden Volumen Wasser aufgenommen. Die Menge an gewonnener Plasmid-DNA wurde durch Messung der OD bei 260 nm ermittelt.

Kurzprotokoll zur Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (Mini-Plasmid-DNA-Präparation)

Die Bakterien wurden in 1.5 ml L-Broth-Nährmedium aufgenommen und 5 min bei $4000\times g$ zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 100 μl Lysozym-Lösung (50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 7.8, 25 mM Tris pH 8.0, 2 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. 200 μl alkalische SDS-Lösung (0.2 M NaOH, 1% SDS) wurden zugegeben, gemischt und 10 min auf Eis gestellt, danach 150 μl 3 M NaAcetat pH 4.8 zugefügt und 45 min auf Eis gestellt. Nach der Phenol/Chloroform-Extraktion wurde der Überstand abgenommen, mit 2.5fachem Volumen Ethanol versetzt und 10 min auf Eis gegeben. Durch 10 min Zentrifugieren bei $13000\times g$ wurde die ausgefallene Plasmid-DNA abgetrennt, danach mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 μl Wasser aufgenommen.

Methode mit Quiagen-Säulen

200 ml einer über Nacht bei 37°C in Bakterien-Selektionsmedium geschüttelten Bakterien suspension wurden für 15 min bei $4000\times g$ zentrifugiert, der Bakterien-Niederschlag in 10 ml RNase-Lösung (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hitze-behandelte RNase A; pH 8) resuspendiert, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, 10 ml alkalische SDS-Lösung (0.2 M NaOH; 1% SDS) langsam zugegeben, 5 min inkubiert, 10 ml 2.55 M KAc pH 4.8 zugegeben und 30 min bei $16800\times g$ in 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QUIAGEN-tip 500 Säule geladen, die mit 5 ml QB-Puffer aequilibriert worden war. Die Säule wurde danach mit 20 ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 0.8fachem Volumen Isopropanol präzipitiert und 30 min bei $13000\times g$ in 4°C (oder RT) abzentrifugiert, in 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 400 μl Wasser aufgenommen.

Methode nach Hirt (Hirt, 1967)

Die HeLa tk⁻ Zellen wurden 48 h nach der Behandlung zweimal mit je 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach vollständigem Absaugen des PBS und der Zugabe von 1 ml Lysis-Puffer wurden die Zellen 10 bis 20 min bei RT inkubiert. Das viskose Lysat wurde in ein Greinerröhrchen abgeschabt, mit 5 M NaCl auf eine Endkonzentration von 1M gebracht und die Probe durch ca. 10maliges vorsichtiges Invertieren des Greinerröhrchens gemischt. Nach mindestens 8 h Inkubation bei 4°C wurde die Probe 30 min bei 17000xg und 4°C zentrifugiert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Nach Inkubation mit RNase (50 µg/ml) für 2 bis 3 h bei 37°C und mit SDS (0.1%) und Proteinase K (0.25 mg/ml) für weitere 2 bis 3 h bei 37°C erfolgte eine Phenol/Chloroform-Behandlung. Die Probe wurde mit 150 mM NaCl und 2.5fachem Volumen Ethanol gefällt. Nach 16 h wurde die DNA abzentrifugiert, gewaschen, getrocknet und in einem Volumen von 100 µl mit DpnI 3 h bei 37°C verdaut. Nach dem Verdau erfolgte eine Phenol/Chloroform-Behandlung. Die Plasmid-DNA wurde gefällt, gewaschen, getrocknet, in 10 µl autoklaviertem Wasser aufgenommen und für die Transformation eingesetzt.

6) Auftrennen von DNA-Fragmenten

Die DNA-Gelelektrophorese wurde in einer Minigel-Apparatur durchgeführt. Das Gelvolumen ist hierbei 50 ml, das Puffervolumen 100 ml und das Taschenvolumen 25 µl. 0.4 g Agarose Typ II wurden in 50 ml 1xTBE-Puffer gegeben und 5 min im Mikrowellenherd aufgeköcht. Nach Auffüllen auf das ursprüngliche Volumen wurde 1.5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben, die Gel-Lösung in die Minigel-Apparatur gegossen und der Probenkamm eingeführt. Nach ca. 30 min wurde der Kamm entfernt, das Gel mit dem Laufpuffer (1xTBE) bedeckt und die Proben in Glycerin-Ladepuffer aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V während einer Stunde. Die DNA-Banden werden unter UV-Licht sichtbar.

7) Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

20 µg Plasmid-DNA wurden mit 60 U Enzym in einem Reaktionsvolumen von 200 µl über Nacht bei 37°C verdaut und auf ein 0.8% Agarose-Gel geladen. Sobald ein deutlicher Abstand zwischen dem herausgeschnittenen Insert und dem Restvektor im Gel entstanden war, wurde ein DEAE-Papierstreifen unter die Insertbande in das Gel eingesetzt und die Elektrophorese fortgesetzt. Sobald die Insertbande auf den Streifen gelaufen war, wurde der Streifen aus dem Gel genommen, kurz im Laufpuffer geschwenkt um die anhaftende Agarose abzulösen und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Zur Elution der DNA wurde der Streifen mit 500 µl DEAE-Elutions-Puffer bedeckt und 30 min bei 65°C inkubiert. Die DNA-enhaltende Lösung wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C ausgefällt.

8) Markierung von DNA mit α -³²P-dCTP

Es wurde ein Kit der Firma Stratagene benutzt (Stratagene, "Prime-it"). 30 ng DNA wurden mit 10 µl "Primer" und autoklaviertem Wasser zu einem Reaktionsvolumen von 33 µl zusammenpipettiert. Nach 5 min Aufkochen bei 100°C wurde die Probe 2 min auf Eis gestellt und danach abzentrifugiert. Die Reaktions-Lösung wurde mit 10 µl 5x Primer-Puffer (0.1 mM dATP, dGTP, dTTP), 5 µl α -³²P-dCTP (1.85 MBq) und 2 µl T7 Polymerase (2 U/ml) versetzt und 10 bis 45 min bei 37°C inkubiert. Mittels Säulenzentrifugation wurden die nicht eingebauten Nukleotide von den in die DNA eingebauten Nukleotiden getrennt.

9) Säulenzentrifugation mit Sephadex G50

Das Säulenmaterial Sephadex G50 fraktioniert Moleküle von 1500 bis 30000 Dalton. Eine 1 ml-Spritze wurde mit silanisierter Glasfaserwatte abgedichtet, in ein Zentrifugengefäß gestellt und mit G50 Sephadex (gequollen in TE-Puffer) bis zum Rand luftblasenfrei aufgefüllt. Nach der Zentrifugation bei 300xg für 3 min wurde die Spritze abermals bis zum Rand aufgefüllt und nach dem Abzentrifugieren (3 min, 300xg) mit 50 µl TE-Puffer und der radioaktiv markierten Probe beschickt. Nach der Zentrifugation (3 min, 300xg)

wurde die Radioaktivität von 1 μ l der durch die Säule gelaufenen radioaktiv markierten Probe nach der Cerenkov-Methode gemessen.

10) Herstellung kompetenter Bakterien

Methode nach Hanahan (1986)

Diese Methode wurde für den Bakterienstamm DH5 α benutzt.

5 μ l einer eingefrorenen Bakterienkultur oder 1 Kolonie von einer mit Bakterien bewachsenen Platte wurden auf einer SOB-Platte (SOB mit 15 g/l Difco-Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 4 Kolonien von 2 mm Durchmesser wurden in 100 ml SOB-Medium gegeben und in einem 1 l Erlenmeyerkolben bis zu einer OD von 0.45 bis 0.55 bei 550 nm unter ständigem Schütteln kultiviert. Die Bakterien-Kultur wurde daraufhin auf zwei Zentrifugenbecher verteilt, 12 min auf Eis gestellt und danach 12 min bei 1300xg (4°C) zentrifugiert. Die Überstände wurden vollständig abgezogen, die beiden Bakterien-Niederschläge in je 17 ml TFB-Puffer resuspendiert und 12 min auf Eis gestellt. Nach 12 min Zentrifugieren bei 1300xg (4°C) wurden die beiden Niederschläge in 8 ml TFB-Puffer aufgenommen und zur Transformation eingesetzt.

Wird dem TFB-Puffer 15% Glycerin beigefügt, können die Bakterien in flüssigem Stickstoff eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt verwendet werden. Da eingefrorene, kompetente Bakterien jedoch eine geringere Transformationseffizienz aufweisen, wurden die Bakterien in der vorliegenden Arbeit generell frisch kompetent gemacht.

Methode nach Cohen et al. (1972)

Diese Methode wurde für den Bakterienstamm MBM7070 benutzt.

0.5 ml einer Übernachtskultur wurden in 100 ml L-Broth-Nährmedium gegeben und bei 37°C geschüttelt, bis die OD von 0.2 bis 0.3 bei 600 nm erreicht war. Die Bakterien-Kultur wurde auf zwei Zentrifugengefäße verteilt und 5 min bei 1300xg (RT) zentrifugiert. Die Überstände wurden vollständig abgezogen, die beiden Bakterien-Niederschläge in je 25 ml eiskalter, 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis gegeben. Nach 5 min Zentrifugieren bei 1300xg (4°C) wurden die beiden Niederschläge in 1 ml 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert, 10 min auf Eis gegeben und zur Transformation eingesetzt.

11) Transformation von kompetenten Bakterien

Methode nach Hanahan (1986)

Diese Methode wurde für den Bakterienstamm DH5 α benutzt. Pro Transformationsprobe wurden 200 μ l der kompetenten DH5 α Bakterien-Suspension in ein Greiner-Röhrchen gegeben, 7 μ l DnD (1 M DTT, 90% DMSO, 10 mM KAc), -das entspricht einem Endvolumen von 3.5%- zupipettiert, 10 min auf Eis inkubiert, erneut 7 μ l DnD zupipettiert (Endvolumen von 7%) und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die DNA, mit der die Bakterien transformiert werden sollten, wurde dazu gegeben, 30 min auf Eis gestellt und nach einem 90 sek Hitzeschock bei 42°C für 2 min auf Eis gestellt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 1300xg wurde der Bakterien-Niederschlag in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 45 min bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden auf Selektions-Agarplatten ausgestrichen.

Methode nach Cohen et al. (1972)

Diese Methode wurde für den Bakterienstamm MBM 7070 benutzt. Pro Ansatz wurden 200 μ l kompetenter Bakteriensuspension mit der DNA, mit der die Bakterien transformiert werden sollten, gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei 37°C. Danach wurden die Bakterien für 2 min auf Eis gestellt und nach Zugabe von 500 μ l SOC-Medium 30 bis 45 min lang bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (5 min bei 1000xg) wurden die Zellen je nach gewünschter Bakteriendichte in L-Broth-Medium aufgenommen und auf Selektions-Agarplatten ausgestrichen.

12) Herstellung von Selektions-Agarplatten

In einem 2 Liter Erlenmeyer-Kolben wurde eine Mischung, bestehend aus 0.5% Bacto-Hefeextrakt, 2% Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 15 g/l Agar in destilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf 45°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 μ g/ml zugegeben. Damit konnten etwa 30 Agar-Platten (9 cm Durchmesser) gegossen werden. Luftblasen wurden durch Überstreichen mit einer Bunsenbrennerflamme zum Platzen gebracht. Nach Erstarren des

Agars wurde das Kondenswasser aus dem Deckel herausgeschüttelt und die Platten bei 4°C gelagert.

Für die Selektion auf mutierte pS189 Plasmide wurden 100 µl einer 2% X-Gal-Lösung (angesetzt in Dimethylformamid) und 30 µl einer 2% IPTG-Lösung (angesetzt in Wasser) auf die Selektionsplatten gegeben und nach ca. 30 min die Bakterien darauf ausgestrichen.

13) Zellkultur

Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen bei 37°C, 6% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte in DMEM mit 10 % FCS und 1% P/S gezogen. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert und rekultiviert. Für die Zellkultur wurde generell 37°C-warmes Zellkultur-Medium verwendet.

Trypsin-Behandlung

Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und je nach Größe der Zellkulturflasche 1 bis 3 ml Trypsin (0.25% in Wasser) zugegeben. Die Flasche wurde leicht geschwenkt und nach Absaugen des Trypsins für ca. 5 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in warmem Zellkulturmedium aufgenommen und je nach Generationszeit der verwendeten Zellen in entsprechend hoher Verdünnung ausgesät. Für die Experimente wurden die Zellen 24 bis 48 h vor der Behandlung ausgesät.

Einfrieren und Auftauen der Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden trypsiniert und bei 330xg abzentrifugiert. Es wurden 2 bis 5x10⁶ Zellen pro ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Einfrierrohrchen gefüllt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen ca. 24 h bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37°C Wasserbad gestellt und nachfolgend in 5 ml Zellkulturmedium gegeben. Nach 3 min Zentrifugieren bei 330xg wurde der Zellenieder-schlag in Zellkulturmedium aufgenommen und ausplattiert.

14) Transfektion in Säugerzellen

Methode nach Graham und van der Eb (1973)

Diese Methode wurde für CHO-K1-2 und HeLa tk- Zellen benutzt. Bei der stabilen Transfektion wurden 5×10^5 Zellen pro 9 cm Petrischale eingesät. Nach 24 h wurden 10 μg des entsprechenden Plasmids und 1 μg pSVneo (Southern und Berg, 1982) mit CaCl_2 (Endkonzentration 0.25 M) mit autoklaviertem Wasser auf ein Volumen von 500 μl gebracht und mit 500 μl 2x HEPES unter kräftigem Schütteln vermischt. Dieses Gemisch wurde tropfenweise in das Medium der zu transfizierenden Zellen gegeben, die Platte leicht geschwenkt und bei 37 °C inkubiert. Nach 16 h wurde das Präzipitat abgesaugt, mit 10 ml PBS-Puffer (37°C) gewaschen und 10 ml frisches Zellkulturmedium aufgegeben. Nach 24 h wurden die Zellen hinsichtlich der Aufnahme von pSVneo selektiert: dazu wurde das Zellkulturmedium mit 0,6 mg/ml Geneticin (G418) versetzt. Das Plasmid pSV2neo enthält, hinter den SV40 "early region" Promotor kloniert, das Gen, welches für das Enzym Aminoglycosid-3'-phospho-Transferase kodiert. Dieses Enzym verleiht Resistenz gegen das toxische Antibiotikum Geneticin (G418). Die resistenten Klone wurden isoliert, hochgezogen und in der Northern-Blotting-Analyse auf die Expression der transfizierten DNA hin getestet.

Bei der transienten Transfektion der HeLa tk- Zellen wurden in 9 cm Petrischalen 2×10^5 Zellen eingesät. Nach 24 h wurden 10 μg des Plasmids pS189 mit CaCl_2 (Endkonzentration 0.25 M) und autoklaviertem Wasser auf ein Volumen von 500 μl gebracht und wie oben beschrieben weiterverfahen. Nach Absaugen des Präzipitats wurden die Zellen gewaschen und einer Cadmiumchlorid-Behandlung (10 μM CdCl_2) unterzogen. Das Medium wurde nach 10 h gewechselt und die Zellen 48 h nach CdCl_2 -Gabe geerntet.

Methode nach Chen und Okayama (1987)

Diese Methode wurde für NIH 3T3 Zellen benutzt. 5×10^5 NIH 3T3-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion pro 9 cm Petrischale eingesät. 10 μg des entsprechenden Plasmids und 1 μg pSVneo wurden mit CaCl_2 (Endkonzentration 0.25 M) und autoklaviertem Wasser auf ein Volumen von 500 μl gebracht und mit 500 μl 2xBBS unter kräftigem Schütteln vermischt. Dieses Gemisch wurde

20 min bei RT inkubiert, danach tropfenweise in das Medium der zu transfizierenden Zellen gegeben und die Petrischale leicht geschwenkt. Die Zellen wurden in einem Inkubator mit 3% CO₂ und 35°C inkubiert. Nach 12-16 h wurde das Präzipitat abgesaugt, mit 10 ml warmem PBS-Puffer gewaschen und 10 ml frisches Zellkulturmedium aufgegeben. Die Selektion erfolgte nach 24 h wie in der Methode nach Graham und van der Eb beschrieben.

Methode nach Kawai und Nishizawa (Kawai und Nishizawa, 1984)

Diese Methode wurde für 143 tk⁻ Zellen benutzt.

Bei der stabilen Transfektion wurden 5×10^5 143tk⁻-Zellen pro 9 cm Petrischale eingesät. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und eine Transfektions-Lösung, bestehend aus 10 µg des entsprechenden Plasmids, 1 µg hph-Plasmid (Gritz und Davies, 1983), 0,25 M CaCl₂ und 30 µg Polybren (10 mg/ml Stammlösung in autoklaviertem Wasser) in 3 ml Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Vor der Zugabe der Polybren-Lösung wurde die DNA mit dem Zellkulturmedium vermischt. Die Petrischalen wurden alle 90 min geschwenkt. Nach 6 h wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen 4 min mit einer 30% DMSO-Lösung in Zellkulturmedium (5 ml pro Petrischale) behandelt. Die DMSO-Lösung wurde abgesaugt, die Zellen mit 10 ml warmem, Serum-freiem Zellkulturmedium gewaschen und 10 ml Serum-enthaltendes Zellkulturmedium aufgegeben. Nach 24 h wurden die Zellen hinsichtlich der Aufnahme des hph-Plasmids selektioniert. Das hph-Gen kodiert für eine bakterielle Hygromycin B-Phosphotransferase, die Resistenz gegen das Aminocyclitol-Antibiotikum Hygromycin B verleiht. Zur Selektion wurde Zellkulturmedium mit 0,15 mg/ml Hygromycin B verwendet. Die resistenten Klone wurden isoliert, hochgezogen und in der Northern-Blotting-Analyse auf die Expression der transfizierten DNA hin getestet.

Bei der transienten Transfektion wurden 2×10^5 143tk⁻-Zellen pro 9 cm Petrischale eingesät. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und eine Transfektions-Lösung, bestehend aus 10 µg des entsprechenden Plasmids, 0,25 M CaCl₂ und 30 µg Polybren (10 mg/ml) in 3 ml Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben und bis zur Selektion, wie oben beschrieben, weiterbehandelt. Die UV-Behandlung (8 J/m²) erfolgte 2 h nach dem DMSO-Schock. Die CHAT-Selektion erfolgte 16 h nach dem DMSO-Schock.

15) Bestimmung der Genmutationsfrequenz

am Na⁺/K⁺-ATPase-Lokus (Ouabain-Selektion)

Für die Experimente wurde eine 3 mM Ouabainlösung angesetzt: 1.1 g Ouabain wurden in 450 ml Serum-freiem Zellkulturmedium bei 50°C gelöst, steril filtriert und mit 50 ml FCS und 5 ml P/S versetzt. Zur Selektion wurde diese 3 mM Lösung mit den zu selektionierenden Zellen in Zellkulturmedium auf die Endkonzentration von 1 mM verdünnt.

2×10^5 Zellen wurden 24 h nach der Einsaat mit 2×10^{-7} M Dexamethason behandelt, bzw. nicht behandelt und nach 3 d in Selektionsmedium ohne Dexamethason mit 1 mM Ouabain umgesetzt (10^6 Zellen/Platte). Parallel zur Selektion wurden zur Bestimmung der Plattierungseffizienz zwei Platten mit je 1000 Zellen eingesät. Nach 12 bis 14 d waren die resistenten Kolonien hochgewachsen. Die Kolonien wurden einmal mit 10 ml PBS gewaschen, 30 min mit Methanol fixiert, mit einer filtrierten Lösung aus 1 mg/ml Kristallviolett und 0.01 mg/ml NaCl in bidestilliertem Wasser angefärbt und ausgezählt.

Die Mutationsfrequenz berechnet sich nach der Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der mutierten Kolonien}}{\text{Plattierungseffizienz} \times \text{Zahl der eingesäten Zellen}}$$

am HGPRT-Lokus (6-Thioguanin-Selektion)

2×10^5 Zellen wurden 24 h nach der Einsaat mit 2×10^{-7} M Dexamethason behandelt, bzw. nicht behandelt, nach 3 d in Zellkulturmedium ohne Dexamethason umgesetzt und nach weiteren 4 d in Selektionsmedium mit 1 µg/ml 6-Tg gegeben (2×10^5 Zellen/Platte). Die weitere Behandlung erfolgte wie oben beschrieben.

Für die Experimente wurde eine 6-Tg-Stammlösung der Konzentration 6 mg/ml in 0.1 M NaOH angesetzt. Es wurde mit 1 µg/ml 6-Tg selektioniert.

16) Bestimmung der Rekombinationsfrequenz

am Tk-Lokus (CHAT-Selektion)

Die MT-c-fos-, bzw. MT-c- Δ fos-transfizierten 143 tk⁻ Zellen wurden 24 h nach der Einsaat mit 10 μ M CdCl₂ behandelt oder nicht behandelt. Nach 10 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen nach weiteren 16 h in die CHAT-Selektion gegeben (5x10⁵ Zellen pro Platte).

Die transient transfizierten 143 tk⁻ Zellen wurden 16 h nach dem DMSO-Schock in CHAT-Selektionsmedium gegeben. Dieses Medium enthält 2x10⁻⁵ M Desoxycytidin, 10⁻⁴ M Hypoxanthin, 4x10⁻⁷ M Aminopterin und 3x10⁻⁵ M Thymidin.

Die Färbung und Auswertung erfolgte wie in Punkt 14) beschrieben.

17) UV-Bestrahlung und Suramin-Behandlung von Zellen

Für die UV-Bestrahlung wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und nach Absaugen des PBS bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das abgenommene, konditionierte Medium wieder auf die Zellen gegeben.

Für jedes Experiment wurde eine 30mM Stammlösung von Suramin in Serum-freiem Medium frisch angesetzt und in das Medium der kultivierten Zellen in der Endkonzentration von 0.3 mM pipettiert.

18) PolyA⁺-RNA-Präparation (Aviv und Leder, 1972)

Etwa 5 bis 10x10⁶ Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, mit einem Gummischaber in 10 ml STE-Puffer abgeschabt und mit 0.5% SDS und 300 μ g/ml Proteinase K versetzt. Zur Zerkleinerung hochmolekularer DNA wurde das Zellysat mit dem Ultra-Turrax-Messerhomogenisator 30 sek bei 50% Leistung homogenisiert und danach bei 37°C für 30 min inkubiert. Durch anschließende Phenol/Chloroform-Extraktion wurden die Proteine entfernt. Die Nukleinsäure-Lösung wurde auf 0.5 M NaCl eingestellt und etwa 100 mg Oligo-dT-Cellulose, welche in HSB-Puffer resuspendiert waren, zugegeben. Die polyA⁺-RNA wurde durch Mischen auf einer Rotationsapparatur an die Oligo-dT-Cellulose adsorbiert. Nach 16 h wurden die Proben 2 min bei 800xg

zentrifugiert und dreimal mit je 10 ml HSB-Puffer gewaschen. Die Elution der mRNA erfolgte durch viermaliges Aufnehmen der Oligo-dT-Cellulose in je 1 ml autoklavierten Wassers, anschließendes Abzentrifugieren und Abtrennen des Sediments. Zur vollständigen Abtrennung der Oligo-dT-Cellulose wurden die 4 ml RNA-Lösung 5 min bei 3300xg zentrifugiert. Zur Konzentrationsmessung der RNA wurden 300 µl abgenommen und der Rest zur Ethanol-Fällung der mRNA eingesetzt.

Die Oligo-dT-Cellulose wurde durch dreimaliges Waschen mit 0.1 M NaOH, 5 mM EDTA pH 7.8, fünfmaliges Waschen mit autoklaviertem Wasser und zweimaliges Waschen mit HSB-Puffer regeneriert.

19) Northern-Blotting und Hybridisierung (Denhardt, 1966; Alwine et al., 1977)

6 µg RNA wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 µl Denaturierungspuffer resuspendiert. Nach 5 min Erhitzen bei 50°C wurden die RNA-Proben schnell auf Eis gestellt und mit 4 µl 5xLadepuffer versetzt. Die RNA-Proben wurden auf ein vertikales Agarose-Gel (1% Agarose in Laufpuffer 1xPB) geladen und bei 100 V und 4°C während 3 h aufgetrennt. Die RNA wurde durch 15 min Inkubieren des Gels in Acridin-Orange (30 µg/ml in 1xPB), gefolgt von dreimal 15 min Inkubieren in 1xPB sichtbar gemacht. Die RNAs wurden anschließend auf Nylon-Filter (Hybond N+ Filter) transferiert. Dazu wurde eine Plastikwanne mit 20xSSC (3 M NaCl, 0.3 M NaCitrat pH 6.5) gefüllt, ein Plastikständer in diese Wanne gestellt und darüber eine Glasplatte und 3 Lagen 3MM-Filterpapier gelegt, die mit 20xSSC getränkt waren und zu beiden Seiten in die 20xSSC-Lösung eintauchten. Das RNA-Gel wurde luftblasenfrei aufgelegt und an allen Seiten mit Parafilm umrandet, so daß die 20xSSC-Lösung nur durch das Gel hochsteigen konnte. Auf das Gel wurde luftblasenfrei ein Hybond N+ Filter gelegt und darüber ein 20xSSC-getränktes 3MM-Filterpapier und ein Pack Kleenex-Papiertaschentücher, der mit einer Glasplatte beschwert war, gestapelt. Der Filter wurde nach dem Blotten über Nacht zur Fixierung der RNA 5 min in 0.05 M NaOH-Lösung und danach zum Neutralisieren 2 min in 20xSSC geschwenkt.

Die Prähybridisierung dient der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Sie wurde in einem 250 ml-Meßzylinder durchgeführt, der durch einen Gummistopfen verschlossen und über eine

Kanüle belüftet wurde. Der Filter wurde in den Meßzylinder eingerollt und 15 ml auf 65°C vorgewärmte (Prä-)Hybridisierungs-Lösung [6xSSC, 5xDenhardt's (0.02%BSA, 0.02%Ficoll, 0.02% PVP), 0.5% SDS, 250 µg/ml denaturierte salmon-sperm-DNA, 250 µg/ml Hefe-RNA] zugegeben. Die Prähybridisierung erfolgte auf einer Rotationsapparatur bei 65°C während 6 h.

Für die Hybridisierung wurden 6 ml (Prä-)Hybridisierungs-Lösung und 20 ng radioaktiv markierte Probe (etwa 3×10^7 cpm) in den Meßzylinder gegeben. Die radioaktiv markierte Probe wurde zuvor durch 5 min Kochen bei 100°C denaturiert, kurz zentrifugiert und sofort danach auf Eis gestellt, um das Renaturieren zu verhindern. Die Hybridisierung erfolgte auf einer Rotationsapparatur bei 65°C über Nacht. Nach Beendigung der Hybridisierung wurde der Filter 10 min in 200 ml 2xSSC, 1% SDS bei 65°C und dann viermal je 30 min in 200 ml 0.5xSSC, 0.1% SDS gewaschen. Der Filter wurde feucht eingeschweißt und auf einem Hyperfilm MP, Amersham mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

Wenn ein Filter ein weiteres Mal für eine Hybridisierung verwendet werden sollte, wurde er 10 bis 15 min bei 100 °C in einer Lösung aus 0.1xSSC und 0.1% SDS inkubiert. Danach mußte er erneut prähybridisiert werden.

20) Anfertigung von Chromosomenpräparaten

Zur Arretierung der Metaphasen wurden dem Zellkulturmedium 50 ng/ml Colcemid (25 µg/ml Stammlösung in PBS) zugegeben. Colcemid (N-Desacetyl-N-methyl-colchicin) zerstört die Spindelfasern, so daß die Chromosomensätze nicht an entgegengesetzte Pole gezogen werden können, d.h. während der Mitose nicht in die Anaphase eingehen, sondern in der Metaphase liegenbleiben. Die Zellen wurden nach 2h Colcemid-Inkubation trypsiniert, in Medium aufgenommen und 7 min bei 500xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, der Zell-Niederschlag resuspendiert, mit 10 ml 0.075 M KCl Lösung versetzt und 7 min lang inkubiert. Diese Hypotonie-Behandlung läßt die Zellen aufquellen. Danach wurden die Zellen 7 min bei 500xg abzentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 2 ml abgezogen. 10 ml Fixans (Methanol:Eisessig, 3:1) wurden aufgegeben, 5 min inkubiert und abzentrifugiert (7 min, 500xg). Die Fixierung wurde zweimal wiederholt, wobei die Inkubationszeiten 10 min und 15 min betragen. Nach dem letzten Abzentrifugieren wurde der

Zellniederschlag in ca. 200 μ l Fixans aufgenommen und aus ca. 40 cm Höhe auf einen eiskalten, fettfreien Objektträger aufgetropft. Die Präparate wurden an der Luft getrocknet, mit 5% Giemsalösung (angesetzt in Sörensenpuffer) 5 min gefärbt und in Sörensenpuffer (0.067 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) und danach in Wasser entfärbt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit dem Ölimmersionsobjektiv bei einer 1000fachen Vergrößerung.

Es wurde mit Sörensenpuffer pH 7.2 gearbeitet. 100 ml davon bestehen aus 27.4 ml 0.067 M KH_2PO_4 und 72.6 ml 0.067 M Na_2HPO_4 . Vor der Verwendung wurden die Objektträger für ca. 24 h in HCl:Ethanol (1:1) gelegt, dann in Seifenlösung (7X-Lösung) gewaschen, mit Wasser nachgespült und in einem mit Wasser gefüllten Becherglas bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Sämtliche Experimente wurden verschlüsselt ausgewertet. Pro Experiment wurden 50 bis 100 Metaphasen analysiert.

21) Immunfluoreszens

4×10^4 NIH 3T3 Zellen wurden auf Glasplättchen (10 mm Durchmesser), die durch 20 min Bestrahlung unter der γ -Quelle sterilisiert worden sind, ausgesät. Nach der Behandlung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch 20 min Inkubation mit 3% p-Formaldehyd bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch 15 min Inkubation mit 1% Triton X-100 bei RT permeabilisiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Für die Antikörper-Inkubation wurden die Glasplättchen mit der zellbedeckten Seite nach unten in einen Antikörpertropfen (30 μ l, Antikörper-Verdünnung 1:30 in PBS) gelegt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen, für eine weitere Stunde -wie oben beschrieben- mit dem sekundären Antikörper (Antikörper-Verdünnung 1:30 in PBS) inkubiert und erneut fünfmal gewaschen. Die Glasplättchen wurden in einen Tropfen "Glycergel" auf einem Objektträger mit der zellbedeckten Seite nach unten eingebettet. Die mikroskopische Auswertung erfolgte unter UV-Anregung mit dem Ölimmersionsobjektiv bei einer 1000fachen Vergrößerung.

Die 3% p-Formaldehyd-Lösung und die 1% Triton X-100 Lösung wurden in PBS angesetzt.

22) Statistik

Experimente, die mindestens dreimal wiederholt worden sind, wurden nach dem Weir-Test (Fisher/Behrens-Problem) auf statistische Signifikanz überprüft (Weir, 1967). Bei diesem Test wird aus den Mittelwerten, den Standardabweichungen der zu vergleichenden Grundgesamtheiten und der Zahl der durchgeführten Experimente eine Prüfgröße errechnet. Diese Prüfgröße wird durch folgende Formel berechnet:

$$\frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{Q_1 + Q_2}{n_1 + n_2 - 4} \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]}} \geq 2$$

\bar{x} bezeichnet die Mittelwerte, n die Stichprobenumfänge und Q die Summe der Abweichungsquadrate [$Q = \sum (x - \bar{x})^2$]. Ist diese Prüfgröße größer oder gleich 2, so ist die Nullhypothese (H_0) abzulehnen, d.h. die Mittelwerte der beiden Grundgesamtheiten sind auf dem 5% Niveau statistisch voneinander verschieden.

Experimente, die zweimal wiederholt worden sind, wurden mit dem χ^2 -Test auf statistische Signifikanz überprüft. Die Berechnung von χ^2 erfolgte nach der Formel:

$$\chi^2 = \frac{(a \cdot d - b \cdot c - \frac{1}{2} n)^2 \cdot n}{(a+b) \cdot (a+c) \cdot (b+d) \cdot (c+d)}$$

Hierbei bedeuten a, b, c, d und n die absoluten Häufigkeiten der 2x2-Tafel

a	b	a+b
c	d	c+d
a+c	b+d	n=a+b+c+d

- Bsp. a, Gesamtzahl aberranter Zellen ohne Behandlung
b, Gesamtzahl nicht-aberranter Zellen ohne Behandlung
c, Gesamtzahl aberranter Zeller mit Behandlung
d, Gesamtzahl nicht-aberranter Zellen mit Behandlung

Wird ein gewisser Tabellenwert von χ^2 überschritten, so ist der beobachtete Unterschied signifikant. Ergibt der Test keinen signifikanten Unterschied, so liegt den beiden Behandlungen entweder kein realer Wirksamkeitsunterschied zugrunde oder aber die Stichprobenumfänge waren nicht umfangreich genug, um einen solchen Unterschied erkennen zu lassen.

ERGEBNISSE

Die Entstehung eines bösartigen Tumors beruht auf einem Viel-Stufen-Prozeß, in dem sukzessive mehrere Gene verändert werden. Es wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Expression eines aktivierten Onkogens derartige genetische Veränderungen beschleunigen kann. Hierzu wurden Experimente in folgender Reihenfolge durchgeführt:

In Zelllinien, die mit Onkogenen stabil transfiziert worden sind, welche jeweils unter der Kontrolle eines anderen induzierbaren Promotors standen, wurden nach Überexpression der Onkogenprodukte Chromosomenanalysen durchgeführt. Um den Einfluß der Überexpression der Onkogenprodukte auf die Mutationsfrequenz von Genen zu testen, wurden Genmutations-Studien angeschlossen. Die Funktion des c-Fos-Proteins als Vermittler der c-Ha-Ras-, v-Mos- und UV-induzierten genomischen Instabilität wurde durch Einsetzen von Antisense-fos-Oligodesoxynukleotiden in Chromosomenanalysen getestet. Auf der Suche nach einem möglichen Mechanismus der c-Fos-vermittelten Mutagenese wurde der Einfluß der c-Fos-Überexpression auf die Rekombinationsfrequenz analysiert.

1) Expression von c-Fos, c-Ha-Ras oder v-Mos von Dexamethason-induzierbaren Genkonstrukten erhöht die chromosomale Instabilität in NIH 3T3 Zellen

Um Onkogene nach Belieben überexprimieren zu können, wurden Zellen verwendet, in denen das Onkogen ohne seine regulierenden DNA-Sequenzen hinter den induzierbaren, viralen "Long Terminal Repeat (LTR)"-Promotor des Maus Mamma Tumor Virus (MMTV) kloniert worden ist. Dieser Promotor kann durch die Zugabe von Glukokortikoidhormonen angeschaltet werden (Groner et al., 1983; Hynes et al., 1983) und bewirkt eine schnelle und transiente Onkogenüberexpression. Für die Transkriptions-Induktion ist eine 143 Nukleotid lange Sequenz innerhalb des MMTV LTR-Promotors verantwortlich, welche die Bindungsstelle für den Glukokortikoidhormon-Rezeptor-Komplex enthält; die Sequenz wird als Hormon-induzierbare Region [Hormone responsive element (HRE)] bezeichnet (Ponta et al., 1985 a, b).

Bei den folgenden Experimenten wurden NIH 3T3 Zelllinien verwendet, die das LTR-c-fos-Gen (Schönthal et al., 1988), das LTR-v-mos-Gen (Jaggi et al., 1986) oder das LTR-c-Ha-ras-Gen (Jaggi et al., 1986) stabil transfiziert tragen. Bei dem LTR-c-Ha-

ras-Gen handelt es sich um das aktivierte c-Ha-ras-Gen [c-Ha-ras(A)] der Ratte mit einer Mutation in Codon 12. Das murine LTR-c-fos-Gen trägt eine Deletion im 3' untranslatierten Bereich, wodurch der Abbau der Transkripte von c-fos stark verlangsamt ist (Miller et al., 1984; Rahmsdorf al., 1987): während die Halblebenszeiten der nicht-modifizierten c-fos-Transkripte bei 12 Minuten liegen, liegen die Halblebenszeiten der modifizierten c-fos-Transkripte bei 2 Stunden (Schönthal, 1988). Als Kontrollen dienten untransfizierte NIH 3T3 Fibroblasten, sowie Zellen, die mit LTR-c- Δ fos transfiziert waren. Das c- Δ fos-Konstrukt weist eine Deletion im zweiten, dritten und vierten Exon der LTR-c-fos-Sequenz auf, so daß kein funktionsfähiges Protein synthetisiert werden kann. Da bei diesem Konstrukt im Gegensatz zu LTR-c-fos keine Deletion im 3' untranslatierten Bereich vorliegt, betragen die Halblebenszeiten der LTR-c- Δ fos Transkripte nur 14 Minuten (Abb.1).

Zellen, die mit LTR-c-fos, LTR-c- Δ fos, LTR-c-Ha-ras oder LTR-v-mos transfiziert worden sind, exprimieren nach Induktion mit dem synthetischen Glukokortikoidhormon Dexamethason (2×10^{-7} M) eine meßbare Menge an entsprechender mRNA (Abb.2). Die mRNA, die von dem c-fos-Gen transkribiert wird, ist in der Northern-Blotting-Analyse noch 8 Stunden nach Induktion nachweisbar, wohingegen die Transkripte des c- Δ fos-Gens 3 Stunden nach der Induktion nicht mehr gefunden werden. Die mRNAs, die von dem v-mos-, bzw. dem c-Ha-ras-Gen transkribiert werden, können 3, bzw. 8 Stunden nach Induktion noch nachgewiesen werden.

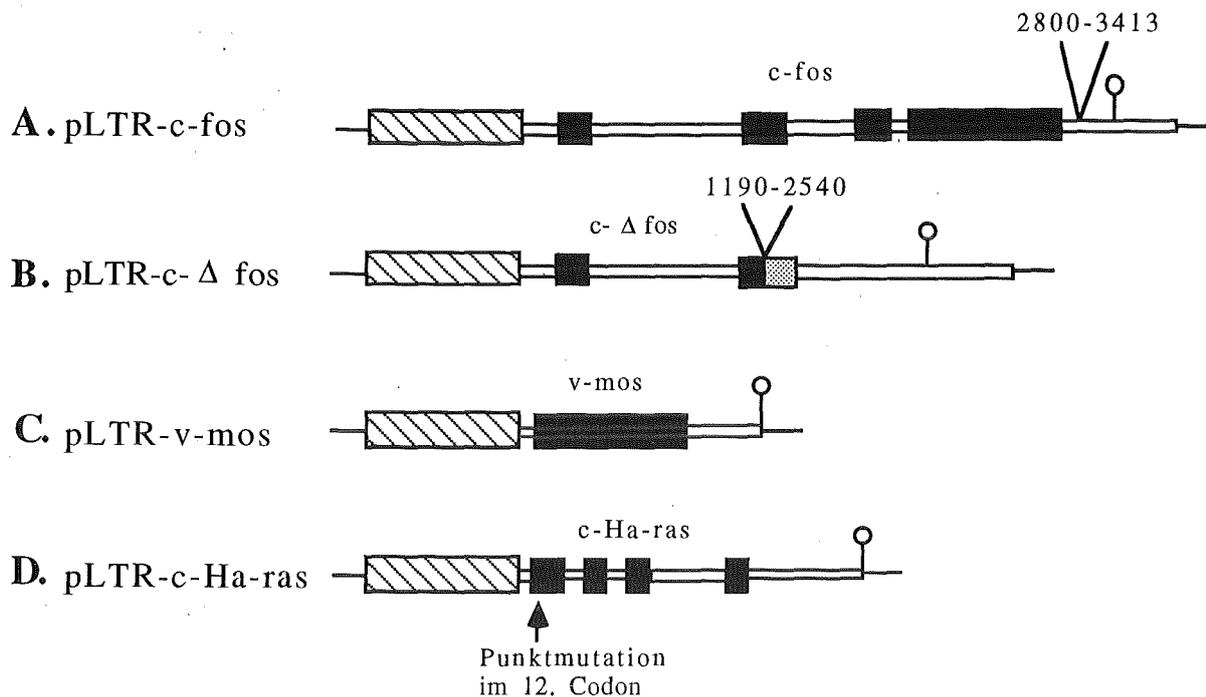


Abb.1 Dexamethason-induzierbare MMTV LTR-c-fos-, MMTV LTR-c- Δ -fos-, MMTV LTR-v-mos- und MMTV LTR-c-Ha-ras-Gen-Konstrukte

A: Das pLTR-c-fos-Konstrukt besteht aus der MMTV LTR-Promotorregion, den c-fos-Exons, den Introns und dem Polyadenylierungssignal. Es weist eine Deletion in der 3' nicht-translatierten Region der Wildtyp-Sequenz von Position 2800 (Sal I) bis 3413 (Mst II) auf. Der Begriff Wildtyp-Sequenz bezeichnet das unveränderte c-fos-Gen. B: Das pLTR-c- Δ -fos-Konstrukt weist eine Deletion der c-fos-Sequenz von Position 1190 (Bgl II) bis 2540 (BstE II) auf. Im Gegensatz zu pLTR-c-fos enthält dieses Plasmid in der 3' nicht-translatierten Region die Sequenzen 2800 bis 3413. C: Das pLTR-v-mos-Konstrukt besteht aus der MMTV LTR-Promotorregion, dem v-mos-Exon und dem Polyadenylierungssignal. D: Das pLTR-c-Ha-ras-Konstrukt besteht aus der MMTV LTR-Promotorregion, den c-Ha-ras-Exons, den Introns und dem Polyadenylierungssignal. Der MMTV LTR-Promotor ist jeweils durch ein schraffiertes Kästchen, die Exons sind durch schwarze Kästchen und die Introns durch weiße Balken dargestellt. Das schwarz-gepunktete Kästchen symbolisiert den Rest des vierten c-fos-Exons.

♀ Polyadenylierungssignal

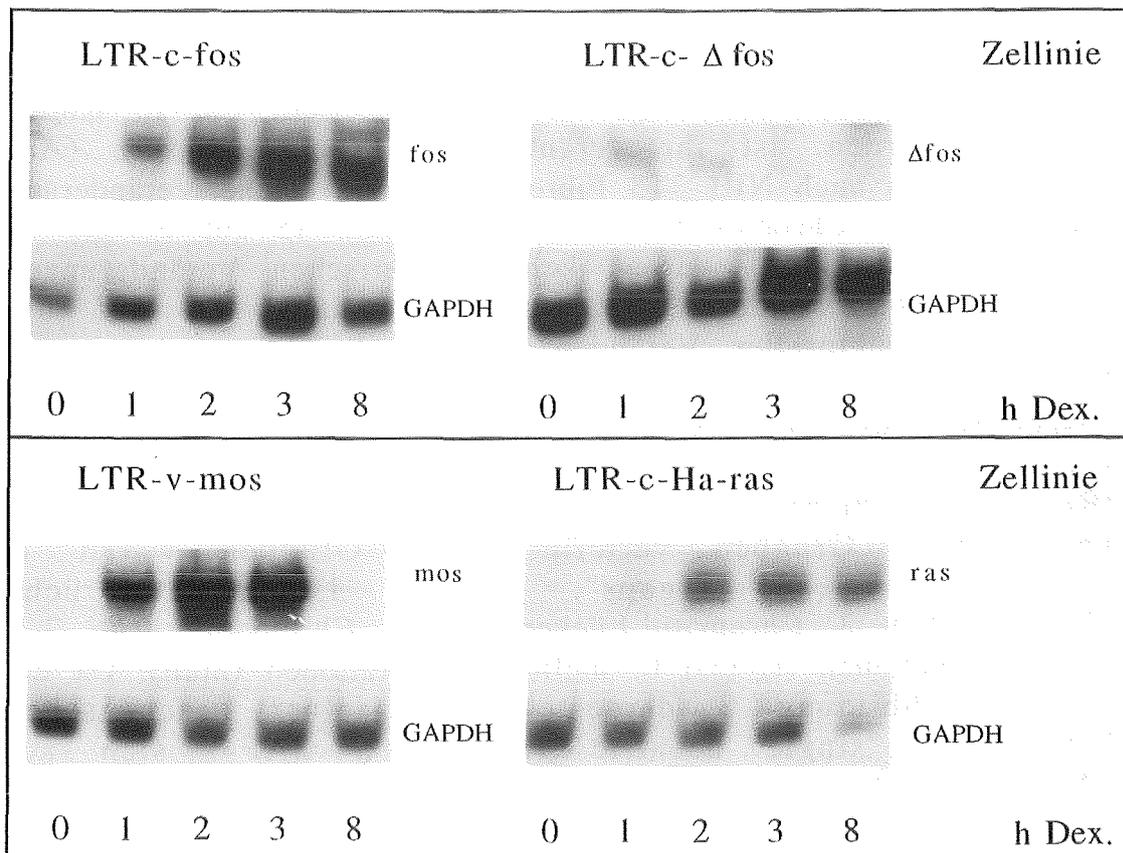


Abb. 2 Dexamethason-induzierbare Akkumulation von c-fos-, c-Δfos-, v-mos-, bzw. c-Ha-ras-mRNA in stabil mit LTR-c-fos-, LTR-c-Δfos-, LTR-v-mos-, bzw. LTR-c-Ha-ras-transfizierten NIH 3T3 Zellen

Logarithmisch wachsende mit LTR-c-fos, LTR-c-Δfos, LTR-v-mos oder LTR-c-Ha-ras transfizierte NIH 3T3 Zellen wurden mit 2×10^{-7} M Dexamethason behandelt, bzw. nicht behandelt und polyA⁺ RNA nach den angegebenen Zeiten präpariert. Je 6 μg RNA wurden der Größe nach auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und auf Hybond N+ Filter transferiert. Die Hybridisierungen erfolgten bei c-fos- und bei c-Δfos-polyA⁺ RNA mit einer radioaktiv markierten 1 kb PstI v-fos-Probe aus pfos-1 (Curran et al., 1982). Im Falle von v-mos-, bzw. c-Ha-ras-polyA⁺RNA wurde zur Hybridisierung eine radioaktiv markierte v-mos-, bzw. c-Ha-ras-Hybridisierungsprobe von Dianova verwendet. Sämtliche Filter wurden mit einer radioaktiv markierten 0.9 kb PstI GAPDH-Probe aus pRGAPDH-13 (Fort et al., 1985) nachhybridisiert, um zu kontrollieren, welche Mengen an polyA⁺ RNA aufgetragen worden sind. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm.

Um zu testen, ob die Überexpression der Onkoproteine c-Fos, c-Ha-Ras oder v-Mos die Frequenz von chromosomalen Aberrationen erhöht, wurden von untransfizierten NIH 3T3 Zellen und von LTR-c-fos-, LTR-c-Δfos-, LTR-v-mos-, bzw. LTR-c-Ha-ras-

transfizierten NIH 3T3 Zellen ohne Behandlung und nach Behandlung mit Dexamethason Chromosomenanalysen erstellt.

Eine häufig auftretende Eigenschaft von Zellen, die in Kultur gehalten werden, ist ihr veränderter Chromosomensatz (Aneuploidie). Da auch NIH 3T3 Fibroblasten eine solche Veränderung aufweisen -die Chromosomenzahl ist hier von 45 auf 60 bis 70 Chromosomen erhöht- wurden keine numerischen Veränderungen berücksichtigt, sondern die Chromosomenanalysen auf die Erfassung struktureller Veränderungen beschränkt.

Die Chromosomenpräparate wurden nach folgendem Schema ausgewertet: die einzelnen Aberrationen wurden in Aberrationen vom Chromosomentyp und in Aberrationen vom Chromatidtyp (Rieger und Michaelis, 1967) unterschieden (Abb.3) und auf 6 verschiedene Gruppen verteilt. Diese Gruppen waren 1. Isochromatid-Lücken ("gaps", g"), 2. Isochromatidbrüche ("breaks", b"), 3. Chromatid-Lücken (g'), 4. Chromatidbrüche (b'), 5. Translokationen (t) und 6. multiple Aberrationen (mult). Da die in der Abbildung 3 dargestellten einzelnen, azentrischen Fragmente ("single acentric fragments", SAFs) sich auf Chromatidbruchereignisse zurückführen lassen, wurden sie in die Gruppe der Chromatidbrüche (b') eingeordnet. Die doppelten, azentrischen Fragmente ("double acentric fragments", DAFs) wurden, gemeinsam mit den "Double Minutes" (DM), der Gruppe der Isochromatidbrüche (b'') zugeteilt, weil sie sich auf Chromosomenbruchereignisse zurückführen lassen. Die Quadriradiale und Triradiale wurden als Translokationen (t) in einer Gruppe vereinigt. Traten in einer Metaphase sehr viele kleine Chromatidfragmente auf, so wurden sie nicht einzeln gezählt, sondern in der Gruppe der multiplen Aberrationen (mult.) zusammengefaßt.

Chromosomentyp-Aberrationen

1. Isochromatid-Lücke (g'')
2. Isochromatid-Bruch (b'')

wenn die Fragmente disloziert sind → doppeltes azentrisches Fragment (DAF)
3. Austausch (Double Minutes, DM)

Chromatidtyp-Aberrationen

1. Chromatid-Lücke (g')
2. Chromatid-Bruch (b')

wenn das Fragment disloziert ist → einzelnes azentrisches Fragment (SAF)
3. Austausch [Translokationen (t)]
 - a. Interchange zwischen Chromosomen (Quadriradial)
 - b. Isochromatid/Chromatid Interchange (Triradial)

Abb.3 Aberrationstypen

Die Chromosomenanalysen, die 24 und 48 Stunden nach Induktion der Onkoprotein-Expression durch Dexamethasongabe vorgenommen wurden, ergaben bei jedem der getesteten Onkogene eine Steigerung in der Frequenz aberranter Metaphasen: So führte die Überexpression von c-Fos nach 24, wie auch nach 48 Stunden zu einem 1.9fachen Anstieg in der Frequenz aberranter Metaphasen. Die Überexpression von c-Ha-Ras steigerte die Frequenz aberranter Metaphasen nach 24 Stunden um das 1.9- und nach 48 Stunden um das 1.6fache, die Überexpression von v-Mos bewirkte nach 24 und nach 48 Stunden einen 1.6fachen Anstieg. Der Anstieg in der Aberrationsfrequenz nach Überexpression von c-Fos, c-Ha-Ras, bzw. v-Mos war statistisch signifikant ($P < 0.05$). Die Dexamethason-Behandlung von nicht-transfizierten NIH 3T3 Zellen und von Zellen, die mit dem deletierten c-fos-Gen, c- Δ -fos, transfiziert worden waren, wiesen nur einen marginalen Anstieg in der Frequenz aberranter Metaphasen auf. Dieser Anstieg war statistisch nicht signifikant ($P < 0.05$) (Abb.4). Analysiert man die Verteilung der Aberrationstypen, so findet man, daß in allen Fällen der Anstieg in der Zahl aberranter Zellen hauptsächlich durch eine Zunahme in der Zahl der Chromatidbrüche bedingt ist. Untransfizierte oder mit LTR-c- Δ fos transfizierte Zellen zeigen eine sehr schwache, bzw. keine Veränderung in der Häufigkeit der Chromatidbrüche nach Dexamethason-Behandlung (Tab.1, die Tabellen sind am Ende des Ergebnis-Teils zusammengestellt).

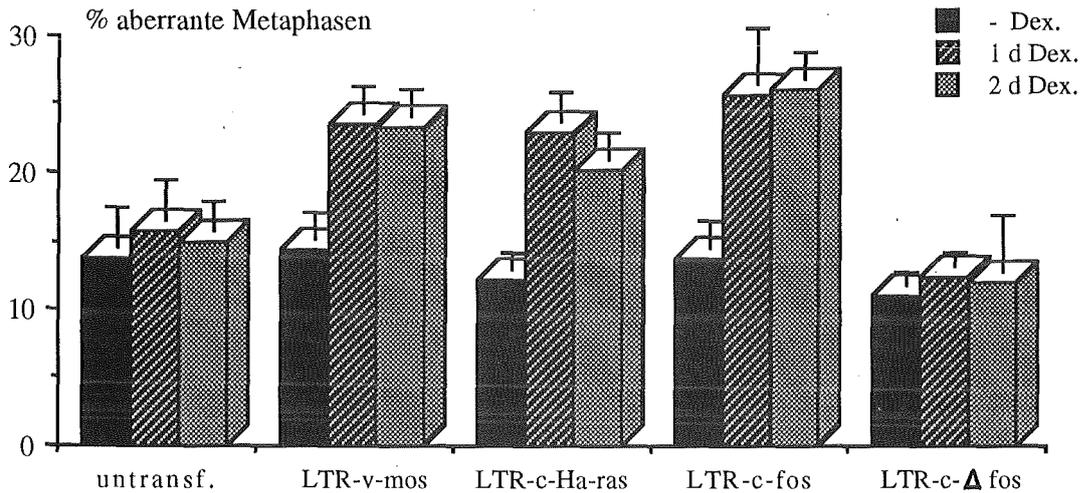


Abb. 4 Aberrations-Induktion nach Überexpression von v-Mos, c-Ha-Ras, bzw. c-Fos in stabil mit LTR-v-mos, LTR-c-Ha-ras, bzw. LTR-c-fos transfizierten NIH 3T3 Zellen

Untransfizierte NIH 3T3 Zellen und mit LTR-v-mos, LTR-c-Ha-ras, LTR-c-fos, bzw. LTR-c-Δfos transfizierte NIH 3T3 Zellen wurden 48 h nach der Einsaat mit 2×10^{-7} M Dexamethason behandelt, bzw. nicht behandelt und nach 24, bzw. 48 h Chromosomenpräparate angefertigt. Es wurde der Prozentsatz aberranter Metaphasen mit und ohne Dexamethason-Behandlung bestimmt. (100 aberrante Metaphasen in 100 ausgewerteten Metaphasen entsprechen 100%).

┴ Standardabweichung

Wie oben gezeigt, macht es keinen erheblichen Unterschied in der Aberrationsfrequenz, ob die Zellen 24 oder 48 Stunden mit Dexamethason behandelt worden sind, d.h. die Aberrationen häufen sich bei längeren Behandlungszeiten nicht an. Die am häufigsten auftretenden Aberrationen waren Chromatidbrüche (Abb.5). Triradiale und Quadriradiale -die typischen Chromosomenschäden nach UV-Bestrahlung oder Behandlung mit alkylierenden Agenzien- wurden nur sehr selten gefunden. Dieser Befund sowie der geringe Aberrations-Induktionsfaktor nach Onkoprotein-Expression zeigen, daß die verstärkte Transkription der getesteten Onkogene nur schwach clastogen ist.

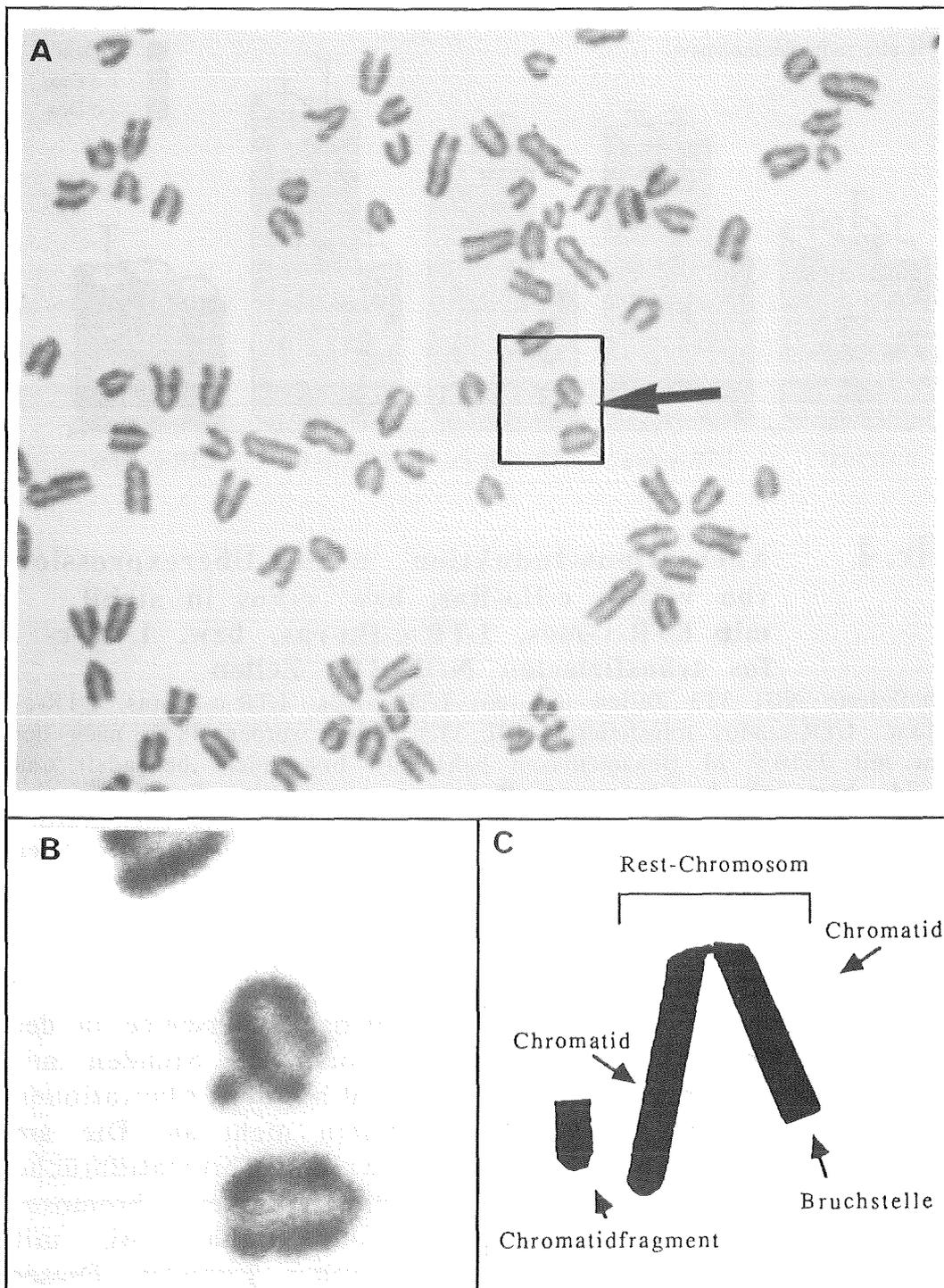


Abb.5 A. Der am häufigsten auftretende Aberrationstyp ist der Chromatidbruch (siehe Pfeil).
 B. Vergrößerung des angezeigten Ausschnitts in A.
 C. Schemazeichnung des oberen Chromosoms von B.

Um zumindest für eines der Onkogene, die in den oben beschriebenen Experimenten verwendet wurden, zeigen zu

können, daß der beobachtete Anstieg in der Aberrationsfrequenz keine klonale Variation widerspiegelt, wurden erneut NIH 3T3 Zellen mit LTR-c-fos-DNA stabil transfiziert und die positiven Klone hinsichtlich ihrer Aberrationsfrequenz nach Überexpression von c-Fos getestet.

Die NIH 3T3 Zellen wurden nach der Transfektionsmethode von Chen und Okayama (1987) mit LTR-c-fos- und als Kontrolle mit LTR-c- Δ fos-DNA stabil transfiziert und in der Northern-Blotting-Analyse auf Expression der c-fos-, bzw. c- Δ fos-mRNA nach Dexamethason-Induktion überprüft. Drei positive, unabhängige Klone wurden hinsichtlich ihrer chromosomalen Aberrationen nach der c-Fos-, bzw. c- Δ Fos-Überexpression getestet: Die Chromosomenanalyse ergab nur geringe Veränderungen in den Aberrationsfrequenzen, welche sich im χ^2 -Test als nicht signifikant erwiesen: der LTR-c-fos Klon C2 zeigte einen 1.3fachen und der LTR-c-fos Klon C4 einen 1.5fachen Anstieg in der Frequenz aberranter Metaphasen nach Dexamethason-Behandlung. Jedoch wies der Kontrollklon, LTR-c- Δ fos C1, keine Veränderung in der Basalfrequenz chromosomaler Aberrationen auf; der Induktionsfaktor war hier 0.9 (Tab.2). Die Erwartung, daß die Überexpression von c-Fos die Zahl der chromosomalen Aberrationen erhöht, wohingegen die Überexpression des nicht funktionellen c- Δ Fos keinen Anstieg in der Aberrationsfrequenz bewirkt, wurde hiermit bestätigt.

2) Expression von c-Fos von Cadmium-induzierbaren Genkonstrukten erhöht die chromosomale Instabilität in NIH 3T3 Zellen

Es ist gezeigt worden, daß der durch das synthetische Glukokortikoid Dexamethason aktivierte Glukokortikoid-Rezeptor mit dem DNA-gebundenen Transkriptionsfaktor AP-1 interagiert und dadurch die Transkription AP-1-abhängiger Gene reprimiert (Jonat et al., 1990). Man kann sich vorstellen, daß der Aberrations-induzierende Effekt des c-Fos-Proteins dadurch zustande kommt, daß das c-Fos-Protein als Teil des Transkriptionsfaktors AP-1 die Transkription von Genen induziert, deren Produkte an der Entstehung von Aberrationen beteiligt sind. Unter dieser Voraussetzung würde Dexamethason zwar die Überexpression von c-Fos durch Aktivierung des LTR-Promotors bewirken, jedoch gleichzeitig die Aberrations-induzierende Wirkung des c-Fos-Genproduktes verhindern. Dies könnte eine Erklärung für den nur ca. zweifachen Anstieg in der Aberrationsfrequenz im Fall der c-Fos-Überexpression sein. In der

Hoffnung, den Effekt von überexprimiertem c-Fos auf die Aberrationsfrequenz deutlicher zeigen zu können, wurde mit einem anderen Promotor, dem Metallothionein-IIA-Promotor, weitergearbeitet. Metallothioneine sind ubiquitäre Proteine mit geringem Molekulargewicht, die durch einen hohen Cysteingehalt gekennzeichnet und in der Lage sind, Schwermetalle zu binden. Vermutlich sind sie in der Kontrolle des normalen zellulären Stoffwechsels und in der zellulären Anpassung an verschiedene Arten von Streß involviert (Karin, 1985). Der Metallothionein-IIA-Promotor ist durch Cadmium, Zink, Kupfer oder Glukokortikoide induzierbar. In den folgenden Experimenten wurde ausschließlich Cadmiumchlorid (CdCl_2) in der Konzentration von $10 \mu\text{M}$ als Induktor verwendet.

Für die Chromosomen-Analysen wurden vier unabhängige, stabil mit Metallothionein-IIA-c-fos transfizierte Klone, 48/3I, 48/3II (zwei unabhängig erhaltene Klone, transfiziert mit p48/3), 76/21I und 76/21II (zwei unabhängig erhaltene Klone, transfiziert mit p76/21) (Rüther et al., 1985) (Abb.6) verwendet. Zuvor wurden die Klone in der Northern-Blotting-Analyse auf die Expression von c-fos-mRNA nach CdCl_2 -Induktion hin untersucht: In allen Klonen ist nach CdCl_2 -Behandlung c-fos-mRNA nachweisbar, es gibt keine CdCl_2 -induzierte fos-mRNA-Synthese in untransfizierten NIH 3T3 Zellen (Abb. 7).

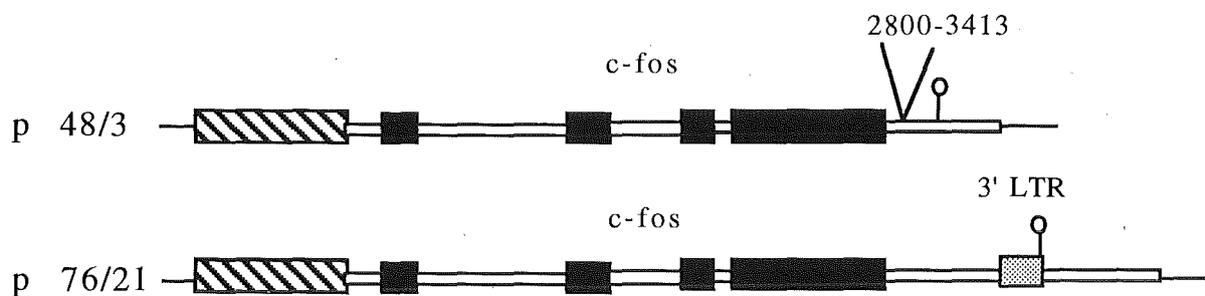


Abb.6 Cadmiumchlorid-induzierbare MT-IIA-c-fos Genkonstrukte

Das c-fos-Gen steht unter der Kontrolle des CdCl_2 -induzierbaren menschlichen Metallothionein-IIA-Promotors (Karin et al., 1984). Translationsstart, Stopcodon und das Polyadenylierungssignal sind natürliche c-fos-Sequenzen, d.h. das Konstrukt steuert die Synthese von natürlichem c-Fos-Protein. Um die c-fos-Expression zu steigern, wurden zwei Veränderungen gesetzt: Bei Konstrukt p48/3 wurden Sequenzen in der 3' nicht-translatierten Region des c-fos-Gens (2800-3413), welche die Stabilität der c-fos-mRNA vermindern, deletiert (Miller et al., 1984); bei Konstrukt p76/21 wurde ein "Long Terminal Repeat (LTR)" des FBJ murinen Osteosarkom Virus (FBJ-MuSV) 3' von der kodierenden Region inseriert

(gepunktetes Kästchen). Der MT-IIA-Promotor ist jeweils durch ein schraffiertes Kästchen, die Exons des c-fos-Gens sind durch schwarze Kästchen und die Introns durch weiße Balken dargestellt.

♀ Polyadenylierungssignal

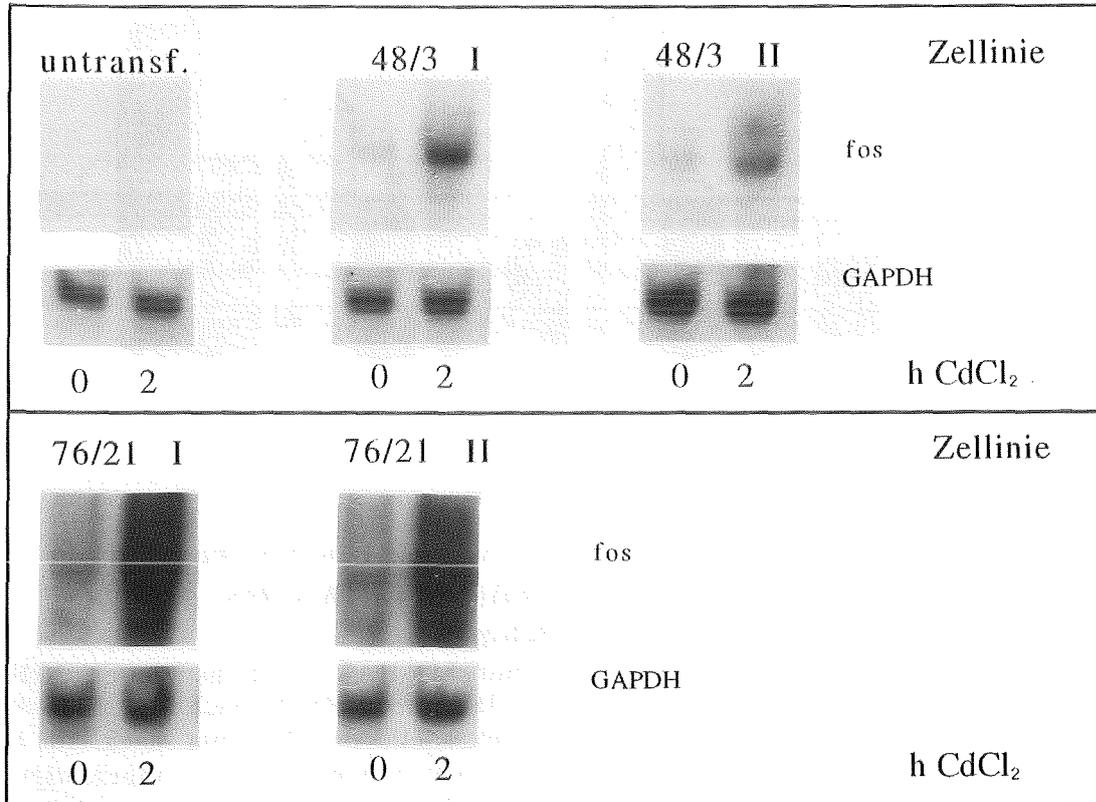


Abb. 7 Cadmiumchlorid-induzierte Akkumulation von c-fos-mRNA in den stabil mit MT-IIA-c-fos transfizierten NIH 3T3 Klonen 48/3I, 48/3II, 76/21I und 76/21II.

Logarithmisch wachsende untransfizierte Zellen sowie Zellen der mit MT-c-fos transfizierten Klone 48/3I, 48/3II, 76/21I und 76/21II wurden mit 10 μM CdCl_2 induziert, bzw. nicht induziert und polyA⁺ RNA nach 2 h präpariert. Je 6 μg RNA wurden der Größe nach auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und auf einen Hybond N+ Filter transferiert. Die Hybridisierung wurde mit einer radioaktiv markierten 1 kb PST I v-fos-Probe aus pfos-1 (Curran et. al., 1982) durchgeführt. Der Filter wurde mit einer radioaktiv markierten 0.9 kb PstI GAPDH-Probe aus pRGAPDH-13 (Fort et al., 1985) zur Ermittlung der eingesetzten polyA⁺ RNA-Menge nachhybridisiert. Es ist ein Autoradiogramm dargestellt.

Um zu testen, ob auch in diesen Klonen nach c-Fos-Überexpression die Frequenz chromosomaler Aberrationen erhöht ist und ob die Steigerung aufgrund des anderen Promotors stärker ausfällt, wurden von den Klonen -wie in Abschnitt 1) beschrieben- chromosomale Analysen erstellt (Abb. 8).

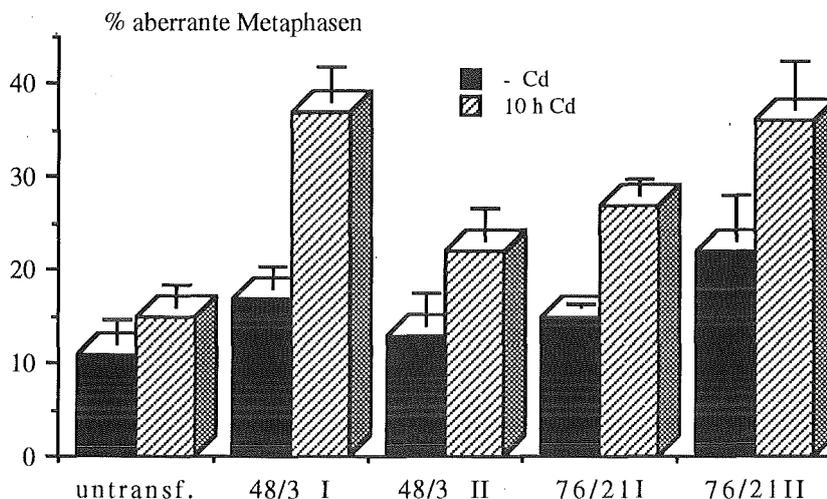


Abb. 8 Aberrations-Induktion nach Überexpression von c-Fos in stabil mit MT-IIA-c-fos transfizierten NIH 3T3 Klonen

Untransfizierte NIH 3T3 Zellen und die mit MT-IIA-c-fos transfizierten NIH 3T3 Klone 48/3I, 48/3II, 76/21I und 76/21II wurden 48 h nach der Einsaat mit 10 μ M CdCl₂ behandelt, bzw. nicht behandelt, das Medium nach 10 h gewechselt und 24 h nach CdCl₂-Gabe Chromosomenpräparate angefertigt. Es wurde der Prozentsatz aberranter Metaphasen mit und ohne CdCl₂-Behandlung bestimmt (100 aberrante Metaphasen in 100 ausgewerteten Metaphasen entsprechen 100%).

⊥ Standardabweichung

Die Analyse ergab, daß die Überexpression von c-Fos, wie in den vorangegangenen Experimenten, in denen der LTR-Promotor verwendet worden war, auch hier nur zu einem ca. zweifachen Anstieg in der Frequenz chromosomaler Aberrationen führt. Das mag daran liegen, daß das CdCl₂, wie zuvor Dexamethason, einen negativen Einfluß auf die Aberrations-induzierende Wirkung von c-Fos hat oder, daß in den gewählten Zelllinien die Überexpression von c-Fos nicht mehr als einen zweifachen Effekt leisten kann. Eine weitere Ursache für den geringen Effekt kann jedoch in der Natur des MT-Promotors liegen. Wie oben beschrieben, läßt er sich durch eine Reihe von Faktoren, wie Schwermetallionen und Glukokortikoide, induzieren, die auch als Spuren im Zellkulturmedium vorkommen können. So ist es möglich, daß diese Faktoren die Transkription von c-fos in einer Menge induzieren, welche in der Northern-Blotting-Analyse zwar kaum nachweisbar ist, aber

dennoch ausreicht, die basale Aberrationsfrequenz anzuheben, so daß sie durch zusätzliche CdCl₂-Induktion nur noch um das zweifache gesteigert werden kann. Tatsächlich war die Basalfrequenz an Aberrationen pro Zelle in allen vier MT-c-fos-transfizierten Klonen im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen deutlich erhöht. Wenn man diese Überlegung mit einbezieht, dann ist der Anstieg in der Aberrationsfrequenz, bezogen auf die unbehandelte, untransfizierte Kontrolle, ungefähr drei- bis vierfach (Tab.3).

Die CdCl₂-induzierte Überexpression von c-Fos bewirkte in Klon 48/3I einen 2.2fachen, in Klon 48/3II einen 1.9fachen, in Klon 76/21I einen 1.8fachen und in Klon 76/21II einen 1.7fachen Anstieg in der Aberrationsfrequenz, wohingegen in den untransfizierten NIH 3T3 Zellen die CdCl₂-Behandlung eine 1.4fache Änderung der Basalfrequenz ergab (Tab.3). Der Anstieg in der Frequenz aberranter Metaphasen nach CdCl₂-Behandlung war in den vier MT-c-fos-Transfektanten statistisch signifikant, nicht aber in den untransfizierten Zellen (P<0.05). Durch die CdCl₂-Behandlung stieg die Zahl der Chromatidbrüche, selbst in den untransfizierten Zellen, stark an. Die Häufung von Chromatidlücken, Isochromatidlücken und Translokationen nach CdCl₂-Behandlung scheint jedoch spezifisch für die MT-c-fos-transfizierten Klone zu sein.

Bei den LTR-c-fos-transfizierten Klonen traten -im Gegensatz zu den MT-c-fos-transfizierten Klonen- nach Überexpression von c-Fos nur sehr wenige Translokationen auf. Das liegt möglicherweise daran, daß in den MT-c-fos-transfizierten Klonen die c-Fos-Überexpression in Kombination mit der CdCl₂-Behandlung diesen Aberrationstyp besonders stark induziert.

3) Expression von c-Ha-Ras von Hitzeschock-induzierbaren Genkonstrukten erhöht die chromosomale Instabilität in NIH 3T3 Zellen

Wie oben beschrieben kann es bei der Verwendung des LTR-Promotors zu einer Interferenz zwischen dem Induktor Dexamethason und dem Transkriptionsfaktor AP-1 kommen, so daß der Aberrations-induzierende Effekt des c-Fos-Proteins vermindert wird. Der MT-Promotor hat seinerseits den Nachteil, daß er sich durch mehrere Faktoren induzieren läßt, von denen sich im Medium immer Spuren befinden können, so daß er nicht definiert an- und abschaltbar ist. Aufgrund dieser Nachteile in der kontrollierten An- und Abschaltbarkeit wurde nach einem weiteren induzierbaren Promotor gesucht. Neben dem LTR-Promotor und dem MT-Promotor wird für Experimente, in denen

induzierbare Genkonstrukte verwendet werden, auch sehr häufig der Hitzeschock Protein 70 (Heat Shock Protein 70, HSP70)-Promotor benutzt. Das hsp70-Gen gehört zu einer kleinen Familie von Genen, deren Expression auf Transkriptions- und Translationsniveau durch unterschiedliche Chemikalien und biologischen Streß, wie z.B. Hitzeschock, reguliert wird. Aber auch der HSP70-Promotor hat Nachteile: Zur Induktion des Promotors müssen die Zellen einer Hitzeschock-Behandlung ausgesetzt werden, welche möglicherweise Vorgänge in der Zelle induziert, die mit der Wirkung des überexprimierten Onkogens interferieren. Daneben kann auch dieser Promotor durch Schwermetallionen, die im Zellkulturmedium vorkommen können, induziert werden. Trotzdem wurde in den folgenden Experimenten der HSP70-Promotor verwendet, um an zusätzliche Informationen zu gelangen und in der Hoffnung, die individuellen Nachteile der einzelnen Promotoren ausgleichen zu können.

Die Experimente wurden mit dem NIH 3T3 Klon, QRA 16, durchgeführt. In diesem Klon ist das aktivierte c-Ha-ras-Gen [c-Ha-ras(A)] hinter den menschlichen Hitzeschock-induzierbaren HSP70-Promoter (Hunt und Morimoto, 1985) kloniert worden. Die c-Ha-ras-Transkription ist in Klon QRA 16 nach Hitzeschock (1 h bei 42°C) stark induziert (Abb. 9).

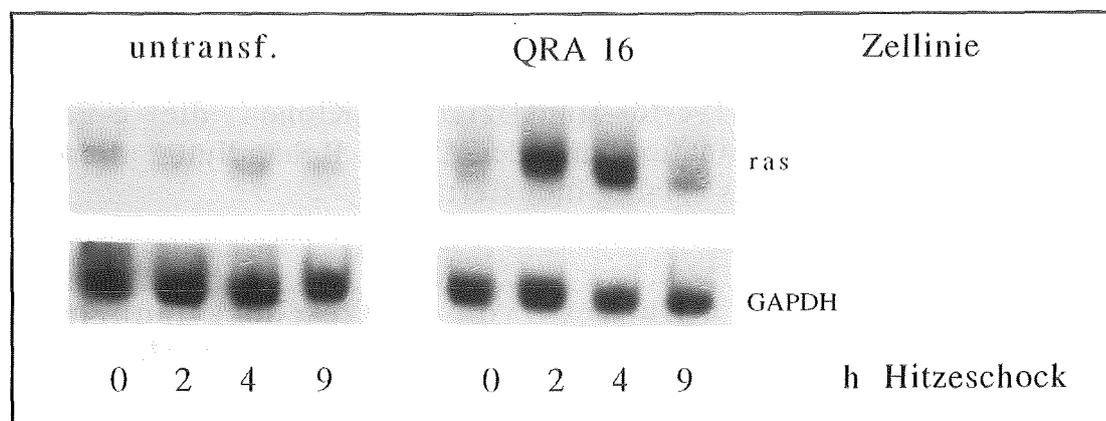


Abb.9 Hitzeschock-induzierte c-Ha-ras-mRNA Akkumulation in stabil mit HSP70-c-Ha-ras transfizierten NIH 3T3 Zellen

Logarithmisch wachsende untransfizierte NIH 3T3 Zellen und der HSP70-c-Ha-ras-transfizierte NIH 3T3 Zellklon QRA 16 wurden nicht behandelt oder mit Hitzeschock (1 h bei 42°C) behandelt und polyA⁺ RNA zu den angegebenen Zeiten nach Beginn des Hitzeschocks präpariert. Je 6 µg RNA wurden der Größe nach auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und auf einen Hybond N+ Filter transferiert. Die Hybridisierung wurde mit einer radioaktiv markierten c-Ha-ras-Hybridisierungsprobe von Dianova durchgeführt. Der Filter wurde zur Bestimmung der eingesetzten polyA⁺ RNA

Mengen mit einer radioaktiv markierten 0.9 kb PstI GAPDH-Probe aus pRGAPDH-13 (Fort et al., 1985) nachhybridisiert. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm.

Mit untransfizierten Zellen und dem HSP70-c-Ha-ras-transfizierten NIH 3T3 Klon QRA 16 wurde nach Hitzeschock-Behandlung eine Chromosomenanalyse durchgeführt. Das Experiment zeigte, daß die Hitzeschock-induzierte Überexpression von c-Ha-Ras die Frequenz chromosomaler Aberrationen um einen Faktor von 3.6 erhöht. Die Hitzeschock-Behandlung führte in den untransfizierten NIH 3T3 Zellen zu einem 1.4fachen Anstieg in der Aberrationsfrequenz (Abb.10, Tab.4). Der Anstieg in der Frequenz aberranter Metaphasen nach Hitzeschock-Behandlung war in dem Klon QRA 16, jedoch auch in den untransfizierten Zellen statistisch signifikant ($P < 0.05$). Verantwortlich für den starken Anstieg war eine Zunahme an Chromatid- und Isochromatidbrüchen. Da gezeigt worden ist, daß die Überexpression von c-Ha-Ras, wie auch die Hitzeschock-Behandlung die c-Fos-Synthese induzieren können (Schönthal et al., 1988; Hollander und Fornace, 1988) ist es vorstellbar, daß an der Erhöhung der Aberrationsfrequenz nach Hitzeschock-Behandlung in den untransfizierten Kontrollzellen auch eine erhöhte c-Fos-Proteinmenge beteiligt ist.

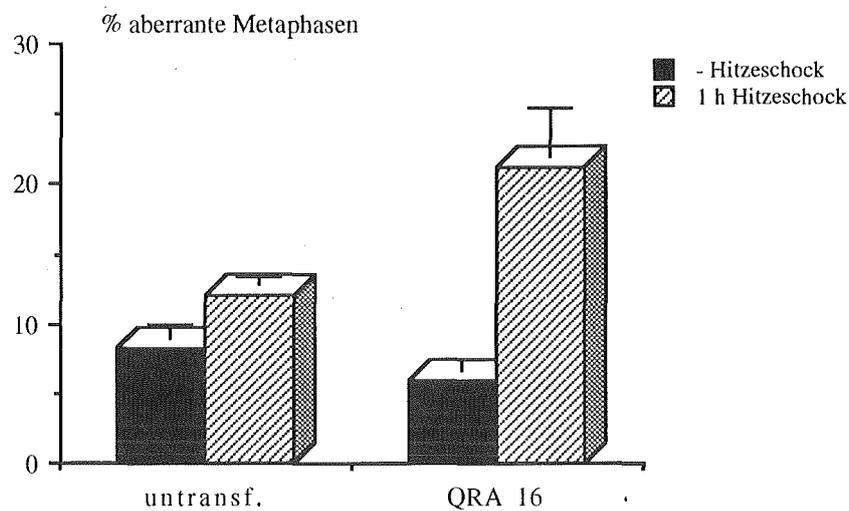


Abb.10 Aberrations-Induktion nach Überexpression von c-Ha-Ras in stabil mit HSP70-c-Ha-ras transfizierten NIH 3T3 Zellen

Untransfizierte NIH 3T3 Zellen und der mit HSP70-c-Ha-ras stabil transfizierte Klon QRA 16 wurden 48 h nach der Einsaat mit Hitzeschock (1 h bei 42°C) behandelt, bzw. nicht behandelt und nach 24 h Chromosomenpräparate angefertigt. Es wurde der Prozentsatz aberranter Metaphasen mit und ohne Hitzeschock-Behandlung bestimmt (100

aberrante Metaphasen in 100 ausgewerteten Metaphasen entsprechen 100%).

└ Standardabweichung

Zusammenfassend zeigen die geschilderten Experimente, daß in NIH 3T3 Zellen die Überexpression von Fos, Ras oder Mos die Zahl der Chromosomenaberrationen um etwa das zweifache erhöht. Dieser Induktionseffekt ist von der Wahl des verwendeten Promotors unabhängig; dies zeigt, daß Induktions-spezifische Einflüsse auf die Induktion der Aberrationen unwahrscheinlich sind.

4) Analyse chromosomaler Aberrationen nach Überexpression von c-Fos in HeLa tk⁻ Zellen und in CHO-K1-2 Zellen

Sämtliche bisher dargestellten Experimente wurden in Mausfibroblasten durchgeführt. Um zu testen, ob die Überexpression von c-Fos auch in anderen Säugetierzellen zu einer Erhöhung der chromosomalen Aberrationsfrequenz führt, wurden menschliche Cervix-Karzinomzellen (Hela tk⁻) mit MT-c-fos-DNA und Zellen des chinesischen Hamsters (CHO-K1-2) mit LTR-c-fos-, bzw. nur mit pSVneo-DNA stabil transfiziert. Die etablierten Klone wurden in der Northern-Blotting-Analyse auf Expression von c-fos-mRNA nach Induktion untersucht (Abb.11 und 12) und mit positiven Klonen eine Chromosomenanalyse durchgeführt.

Der humane HeLa tk⁻ Zellklon MT-c-fos C7 zeigte nach Überexpression von c-Fos nur einen schwachen Anstieg (1.2fach) in der chromosomalen Aberrationsfrequenz im Vergleich zu den untransfizierten Zellen (1.0fach) (Abb.13, Tab.5). Im χ^2 -Test erwies sich dieser Anstieg als statistisch nicht signifikant ($P < 0.05$). Jedoch war auch bei diesen Zellen, wie zuvor bei den mit MT-c-fos transfizierten Mausfibroblasten, die Aberrationsfrequenz bereits ohne Induktion erhöht. Bezieht man die Zahl aberranter Metaphasen in den CdCl₂-induzierten, mit MT-c-fos transfizierten Zellen auf den entsprechenden Wert in den nicht induzierten, untransfizierten Zellen, so ergibt sich ein Anstieg um das 1.6fache.

Von den Hamsterklonen zeigte der Klon LTR-c-fos 6C6 nach Überexpression von c-Fos eine Erhöhung der Aberrationsfrequenz um das 1.4fache, wohingegen der Klon LTR-c-fos 6C1 keinen Unterschied zum Basallevel aufwies (1.1fach) (Abb.14). Der Anstieg in der Frequenz aberranter Metaphasen nach c-Fos Überexpression erwies sich bei beiden Klonen im χ^2 -Test als

statistisch nicht signifikant. Die nur mit pSVneo transfizierten Zellen zeigten eine Veränderung des Basallevels von 0.9fach. Ein allgemein häufiger Aberrationstyp bei Hamsterzellen sind Chromatidlücken. Diese traten auch hier vornehmlich auf (Tab.6).

Die Experimente zeigten, daß HeLa tk⁻ und CHO-9 Zellen im Vergleich zu den NIH 3T3 Zellen einen sehr viel schwächeren oder keinen Anstieg in der Aberrationsfrequenz nach c-Fos-Überexpression aufweisen. Dies mag im Falle der CHO-9 Zellen darin begründet liegen, daß sie -vielleicht durch bessere Reparaturmechanismen- einen sehr viel stabileren Karyotyp als NIH 3T3 Zellen besitzen, so daß die alleinige Überexpression eines Onkogens die Frequenz an Aberrationen nicht deutlich verändern kann. HeLa tk⁻ Zellen zeigen einen ähnlich instabilen Karyotyp wie die NIH 3T3 Zellen, jedoch könnte hier die geringe Aberrationsfrequenz nach c-Fos-Überexpression darin begründet liegen, daß zusätzlich zur c-Fos-Expression andere Gene in der Expression verändert sind, deren Produkte die Zelle vor der Entstehung von Fos-induzierten DNA-Schädigungen schützen.

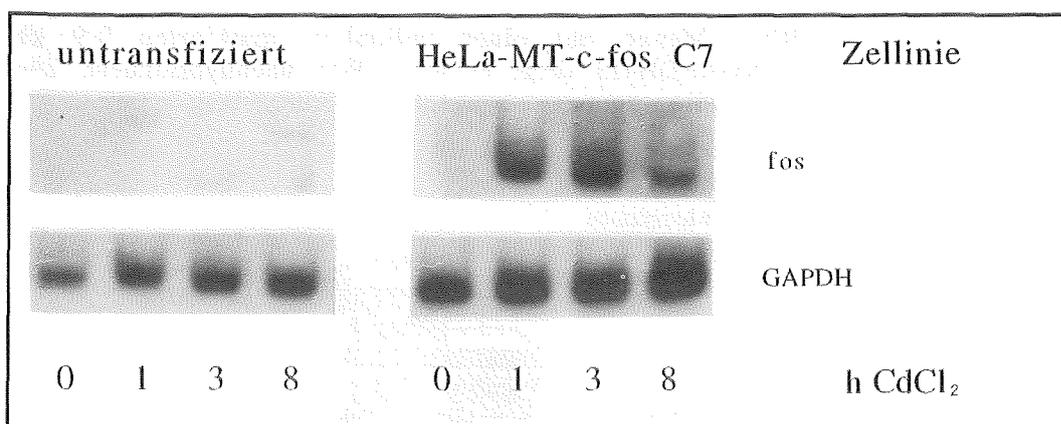


Abb. 11 Cadmiumchlorid-induzierte Akkumulation von c-fos-mRNA in stabil mit MTIIA-c-fos transfizierten HeLa tk⁻ Zellen.

Logarithmisch wachsende untransfizierte HeLa tk⁻ Zellen und der MT-c-fos-transfizierte HeLa tk⁻ Klon HeLa-MT-c-fos C7 wurden mit 10 µM Cadmiumchlorid behandelt, bzw. nicht behandelt und nach 1, 3 und 8 h polyA⁺ RNA präpariert. Je 6 µg RNA wurden der Größe nach auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und auf einen Hybond N+ Filter transferiert. Die Hybridisierung wurde mit einer radioaktiv markierten 1 kb PST I v-fos-Probe aus pfos-1 (Curran et. al., 1982) durchgeführt. Zur Kontrolle der aufgetragenen polyA⁺ RNA Menge wurde der Filter mit einer radioaktiven 0.9 kb PstI GAPDH-Probe aus pRGAPDH-13 (Fort et al., 1985) nachhybridisiert. Es ist ein Autoradiogramm gezeigt.

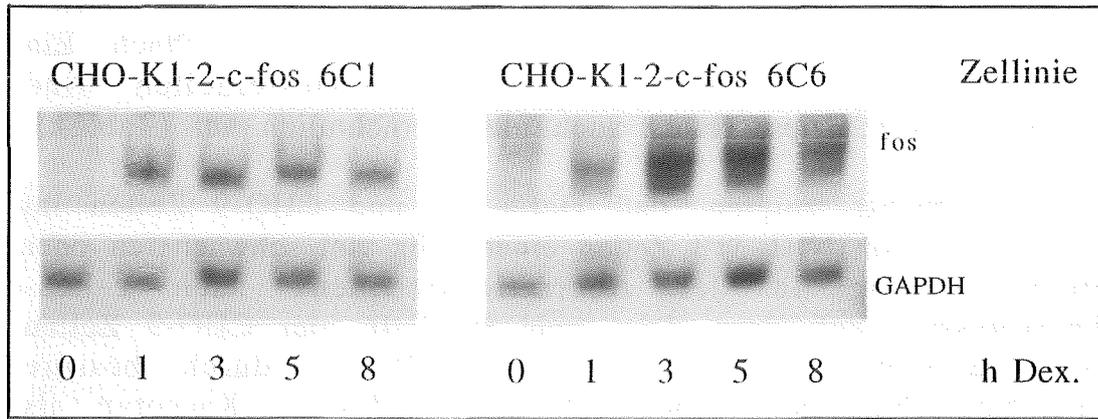


Abb. 12 Dexamethason-induzierte Akkumulation von c-fos-mRNA in zwei stabil mit LTR-c-fos transfizierten CHO-K1-2 Klonen.

Logarithmisch wachsende Zellen der LTR-c-fos-transfizierten CHO-9-K1-2 Klone LTR-c-fos 6C1 und LTR-c-fos 6C6 wurden mit 2×10^{-7} M Dexamethason behandelt, bzw. nicht behandelt und nach 1, 3, 5 und 8 h polyA⁺ RNA präpariert. Je 6 µg RNA wurden der Größe nach auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und auf Hybond N+ Filter transferiert. Die Hybridisierung wurde mit einer radioaktiv markierten 1 kb PST I v-fos Probe aus pfos-1 (Curran et al., 1982) durchgeführt. Der Filter wurde zur Ermittlung der eingesetzten polyA⁺ RNA Menge mit einer radioaktiv markierten 0.9 kb PstI GAPDH-Probe aus pRGAPDH-13 (Fort et al., 1985) nachhybridisiert. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm.

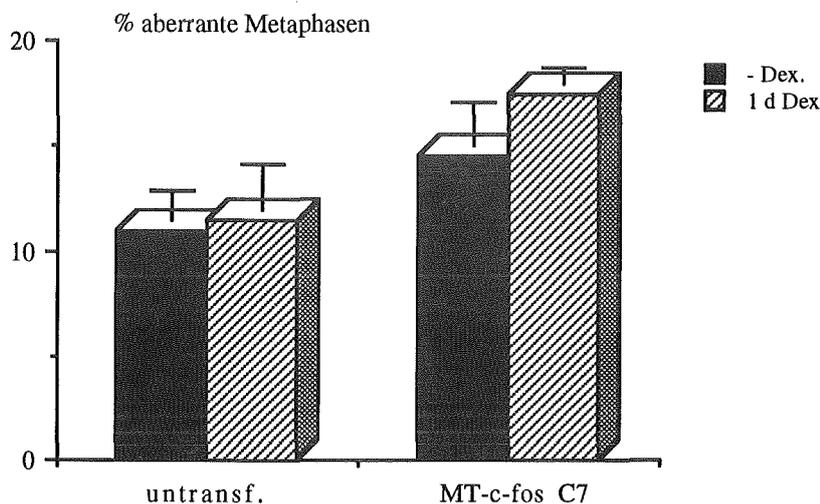


Abb. 13 Aberrations-Häufigkeiten nach CdCl₂-Behandlung in untransfizierten und in stabil mit MT-IIA-c-fos transfizierten HeLa tk⁻ Zellen.

Untransfizierte HeLa tk⁻ Zellen und der mit MT-c-fos transfizierte HeLa tk⁻ Klon MT-c-fos C7 wurden 48 h nach der Einsaat mit 10 µM CdCl₂ behandelt,

bzw. nicht behandelt, das Medium nach 10 h gewechselt und 24 h nach CdCl₂-Zugabe Chromosomenpräparate angefertigt. Es wurde der Prozentsatz aberranter Metaphasen mit und ohne CdCl₂-Behandlung bestimmt (100 aberrante Metaphasen in 100 ausgewerteten Metaphasen entsprechen 100%).

┆ Standardabweichung

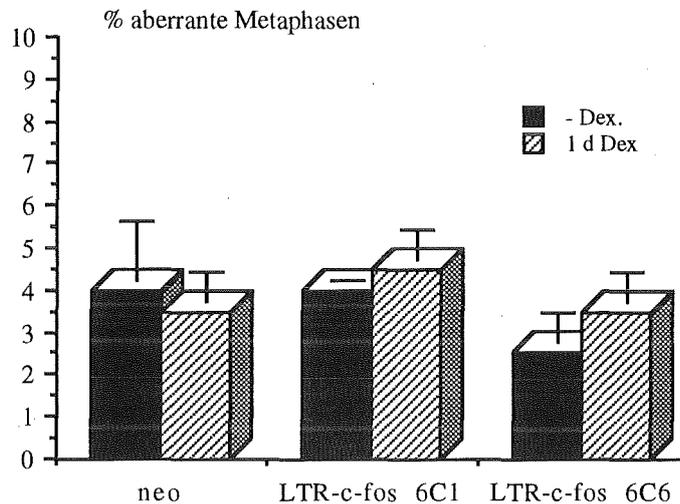


Abb. 14 Aberrations-Häufigkeiten nach Dexamethason-Behandlung in nur mit pSVneo- und in stabil mit LTR-c-fos transfizierten CHO-K1-2 Zellen.

Nur mit pSVneo transfizierte CHO-K1-2 Zellen und die mit LTR-c-fos stabil transfizierten Klone LTR-c-fos 6C1 und LTR-c-fos 6C6 wurden 48 h nach der Einsaat mit 2×10^{-7} M Dexamethason behandelt, bzw. nicht behandelt und nach 24 h Chromosomenpräparate angefertigt. Es wurde der Prozentsatz aberranter Metaphasen mit und ohne Dexamethason-Behandlung bestimmt (100 aberrante Metaphasen in 100 ausgewerteten Metaphasen entsprechen 100%).

┆ Standardabweichung

5) Überexpression von c-Fos, v-Mos, bzw. c-Ha-Ras induziert keine Verschiebungen im Zellzyklus

Es ist denkbar, daß der beobachtete Anstieg in der Aberrationsfrequenz nach Überexpression von c-Fos, v-Mos oder c-Ha-Ras auf ein beschleunigtes Wachstum der Zellen und damit auf ein Akkumulieren der Aberrationen aufgrund der Onkogen-Überexpression zurückzuführen ist. Ferner ist denkbar, daß die Induktoren Dexamethason, Cadmiumchlorid und Hitzeschock selbst den Zellzyklus beeinflussen. Um beide Möglichkeiten zu prüfen, wurde das Wachstumsverhalten von untransfizierten NIH 3T3 Zellen, von den LTR-c-fos-, LTR-c-Δfos-, LTR-v-mos-, LTR-c-

Ha-ras-transfizierten Klonen, sowie von dem HSP70-c-Ha-ras transfizierten Klon QRA 16 bestimmt. Stellvertretend für die vier MT-c-fos-transfizierten Klone wurde der Klon 76/21II überprüft. Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen mit Hilfe des Coulter Counters bestimmt (Abb.15).

Die Wachstumskurven zeigen, daß die Dexamethason- und die Hitzeschock-Behandlung keinen Einfluß auf das Wachstumsverhalten der NIH 3T3 Fibroblasten haben. Cadmiumchlorid-Behandlung verlangsamt das Wachstum sowohl der untransfizierten, wie auch der transfizierten Fibroblasten geringfügig. Die Onkogen-transfizierten Zellen unterscheiden sich in den Wachstumsgeschwindigkeiten nur wenig von den untransfizierten Zellen. So beträgt die Populations-Verdopplungszeit bei den LTR-c-Ha-ras-transfizierten Zellen 19 Stunden, bei den LTR-c-fos-, LTR-v-mos- und LTR-c- Δ fos transfizierten Zellen 18 Stunden und bei den untransfizierten Zellen 16 Stunden. Wenn überhaupt eine Tendenz sichtbar ist, dann wachsen die mit einem Onkogen transfizierten NIH 3T3 Zellen etwas langsamer als die nicht-transfizierten Zellen. Das bedeutet, daß Zellzyklusverschiebungen nicht als die Ursache der erhöhten Aberrationsfrequenzen angesehen werden können.

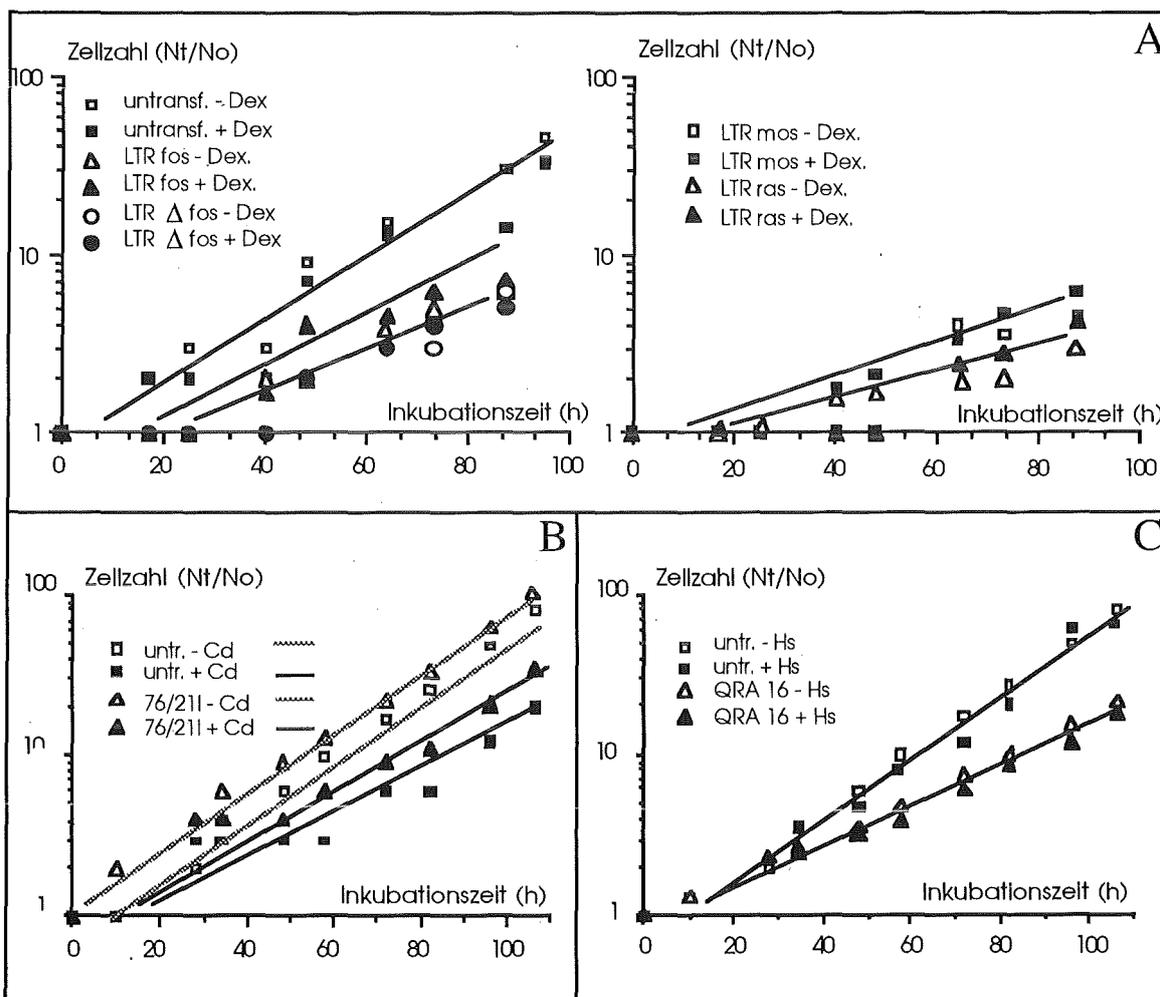


Abb. 15 Wachstumskurven von untransfizierten, LTR-c-fos-, LTR-c-Δfos-, LTR-c-Ha-ras-, LTR-v-mos-, sowie von MT-c-fos- und HSP70-c-Ha-ras-transfizierten NIH3T3 Fibroblasten mit, bzw. ohne Behandlung mit (A) Dexamethason, (B) Cadmiumchlorid oder (C) Hitzeschock

5×10^4 Zellen wurden pro 5 cm-Petrischale ausplattiert (Zeitpunkt 0) und nach 24 h (A) nicht behandelt oder mit 2×10^{-7} M Dexamethason behandelt, das während des gesamten Versuchs im Medium blieb, (B) nicht behandelt oder mit $10 \mu\text{M}$ Cadmiumchlorid behandelt, das nach 10 h durch einen Mediumwechsel entfernt wurde oder (C) einem Hitzeschock (1 h bei 42°C) ausgesetzt oder nicht ausgesetzt. Die Zellzahlen wurden mit dem Coulter Counter bestimmt. N_t = Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt t; N_0 = Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt 0.

6) Überexpression von c-Fos bewirkt einen Anstieg in der Mutationsfrequenz des Na⁺/K⁺-ATPase-Gens und des HGPRT-Gens in NIH 3T3 Zellen

Um zu testen, ob überexprimiertes c-Fos nicht nur chromosomale Aberrationen induzieren kann, sondern auch in der Lage ist, in spezifischen Genen Mutationen zu setzen, wurden zwei Gene, das Na⁺/K⁺-ATPase-Gen, sowie das Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT)-Gen auf ihre Mutationsfrequenz nach c-Fos-Überexpression hin untersucht.

6.1) Mutationsfrequenz am Na⁺/K⁺-ATPase-Lokus

Zellen benötigen zur Aufrechterhaltung der im Verhältnis zum äußeren Medium im Zell-Zytoplasma hohen K⁺- und niedrigen Na⁺-Ionenkonzentration die Na⁺/K⁺-Pumpe als Transportsystem. Die Energie für dieses System entsteht aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP). Diese Hydrolyse wird von der Na⁺/K⁺-abhängigen ATPase katalysiert, die integraler Bestandteil der Na⁺/K⁺-Pumpe ist. Das Steroid Ouabain kann an dieses Enzym binden und damit seine Fähigkeit zur Dephosphorylierung hemmen, so daß keine K⁺-Ionen mehr in die Zelle gelangen können. Ist jedoch das Na⁺/K⁺-ATPase-Gen in der Sequenz mutiert, die für die Ouabain-bindende Protein-Domäne kodiert, so bindet Ouabain nicht mehr und die Zellen überleben. Da diese Mutation, um die katalytische Funktion des Enzyms nicht zu beeinträchtigen, nur wenige Nukleotide betreffen darf, selektioniert man mit Ouabain im wesentlichen auf Basenaustausch-Mutationen (Baker et al., 1974).

Um die Wirkung der Überexpression von c-Fos auf die Mutationsfrequenz des Na⁺/K⁺-ATPase-Lokus zu testen, wurde in NIH 3T3 Zellen, die mit LTR-c-fos stabil transfiziert worden waren, c-Fos überexprimiert und in der anschließenden Ouabain-Selektion auf Mutationen im Na⁺/K⁺-ATPase-Gen getestet. Es wurde der in Abb.4 dargestellte LTR-c-fos-Zellklon verwendet.

Die Untersuchungen ergaben bei den untransfizierten NIH 3T3 Kontrollzellen eine spontane, basale Mutationsfrequenz von 9.4×10^{-8} . Dexamethason-Behandlung veränderte diesen Wert nur geringfügig, die Mutationsfrequenz betrug hier 8.6×10^{-8} . LTR-c-fos transfizierte NIH 3T3 Zellen wiesen spontan eine höhere Mutationsfrequenz als die Kontrollzellen (49.8×10^{-8}) auf. Dexamethason-induzierte Überexpression von c-Fos führte zu einem 6.7fachen Anstieg in der Mutationsfrequenz auf 331×10^{-8} (Tab.7).

Zelllinie	Dex. Behändlg.	Gesamtzahl der Platten	Plattierungs-effizienz (%)	Gesamtzahl mutierter Klone	Mutationsfrequenz ($\times 10^{-8}$)	Indukt. faktor
untransf.	-	31	34.1	1	9.4	1.0
	+	32	36.5	1	8.6	0.9
LTR-c-fos	-	48	41.8	10	49.8	1.0
	+	40	33.9	45	331.8	6.7

Tab.7 Überexpression von c-Fos erhöht die Mutationsfrequenz am Na^+/K^+ -ATPase-Lokus in LTR-c-fos-transfizierten NIH 3T3 Zellen.

Untransfizierte, sowie LTR-c-fos-transfizierte NIH 3T3 Fibroblasten wurden 24 h nach der Einsaat für 3 d mit 2×10^{-7} M Dexamethason behandelt, bzw. nicht behandelt; nach dieser Zeit wurden die Zellen in Selektionsmedium ohne Dexamethason mit 1 mM Ouabain umgesetzt (10^6 Zellen/Platte). Parallel zur Selektion wurden zur Bestimmung der Plattierungseffizienz Platten mit je 1000 Zellen eingesät. Nach 12 bis 14 d waren die resistenten Kolonien hochgewachsen und wurden gezählt. Jeder Wert faßt die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten zusammen.

6.2.) Mutationsfrequenz am HGPRT-Lokus

Es gibt zwei Reaktionswege um Purine zu synthetisieren: den "de-novo"-Purinbiosyntheseweg und den "salvage"- oder Wiederverwertungsweg. Bei dem Wiederverwertungsweg werden auf freie Purinbasen, die beim hydrolytischen Abbau von Nukleinsäuren und Nukleotiden entstehen, Ribosephosphate übertragen und so die entsprechenden Nukleotide gebildet. Dabei katalysiert das Enzym HGPRT die Umsetzung der Purinbasen Hypoxanthin und Guanin in die Nukleotide Inosit-Monophosphat (IMP) und Guanosin-Monophosphat (GMP). Mit dem Guanin-Analogen 6-Thioguanin (6-Tg) kann auf Zellen, die kein oder ein mutiertes HGPRT-Gen tragen, selektioniert werden, denn auf Grund der Toxizität von 6-Tg überleben nur die Zellen, die 6-Tg nicht verwerten können.

Wenn die Überexpression von c-Fos die spontane Mutationsfrequenz im HGPRT-Gen erhöhen würde, dann wäre zu erwarten, daß vermehrt Zellen entstehen, die das 6-Tg nicht verwerten können und somit eine größere Zahl von Zellen die 6-Tg-Selektion überlebt. Um diese Vermutung zu überprüfen wurde in LTR-c-fos-transfizierten Zellen c-Fos überexprimiert und in der

anschließenden 6-Tg-Selektion auf Klone mit mutiertem HGPRT-Gen getestet (Turner et al., 1985).

Das Experiment zeigt, daß untransfizierte NIH 3T3 Kontrollzellen eine spontane, basale Mutationsfrequenz von 1.8×10^{-6} aufweisen, die durch Dexamethason-Behandlung kaum verändert wird (1.4×10^{-6}). In LTR-c-fos-transfizierten NIH 3T3 Zellen liegt die basale Mutationsfrequenz um das 5.2fache höher, nämlich bei 7.3×10^{-6} . Überexpression von c-Fos, induziert durch Dexamethason-Behandlung, führt zu einem 1.7fachen Anstieg in der Mutationsfrequenz auf einen Wert von 12.5×10^{-6} (Tab.8).

Die Mutationsfrequenzen liegen am HGPRT-Lokus sehr viel höher als am Na^+/K^+ -ATPase-Lokus. Die Ursache dafür ist, daß sich am Na^+/K^+ -ATPase-Lokus im wesentlichen Basenaustausch-Mutationen ausprägen, wohingegen am HGPRT-Lokus neben diesen Mutationen alle weiteren Mutationen, die zur Inaktivierung des Enzyms führen, den mutierten Phänotyp verursachen können.

Zelllinie	Dex. behandlg. ($2 \times 10^{-7} \text{M}$)	Gesamtzahl Platten	Plattierungs-effizienz (%)	Gesamtzahl mutierter Klone	Mutationsfrequenz ($\times 10^{-6}$)	Indukt. faktor
untransf..	-	168	24.6	36	1.8	1.0
	+	159	25.7	28	1.4	0.7
LTR-c-fos	-	37	34.3	19	7.3	1.0
	+	34	33.4	29	12.5	1.7

Tab.8 Überexpression von c-Fos erhöht die Mutationsfrequenz am HGPRT-Lokus in NIH 3T3 Zellen.

Untransfizierte, sowie mit LTR-c-fos transfizierte NIH 3T3 Fibroblasten wurden 24 h nach der Einsaat mit $2 \times 10^{-7} \text{M}$ Dexamethason behandelt, bzw. nicht behandelt, nach 3 d in Zellkulturmedium ohne Dexamethason umgesetzt und nach weiteren 4 d in Selektionsmedium mit $1 \mu\text{M}$ 6-Thioguanin gegeben (2×10^5 Zellen/Platte). Parallel zur Selektion wurden zur Bestimmung der Plattierungseffizienz Platten mit je 1000 Zellen eingesät. Nach 7 bis 10 d waren die resistenten Kolonien hochgewachsen und wurden gezählt. Jeder Wert faßt die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten zusammen.

Aus diesen beiden Experimentenserien geht hervor, daß die Überexpression von c-Fos die Mutationsfrequenz in dem Na^+/K^+ -ATPase-Gen um etwa das siebenfache und in dem HGPRT-Gen um etwa das zweifache erhöht. Eine Erklärung für diesen Unterschied

in der Erhöhung der Mutationsfrequenz nach c-Fos Überexpression könnte darin bestehen, daß überexprimiertes c-Fos bevorzugt Basenaustausch-Mutationen und weniger häufig andere Mutationen induziert. Dadurch würde die Genmutationsfrequenz am Na⁺/K⁺-ATPase-Lokus stärker als am HGPRT-Lokus ansteigen.

7) Überexpression von c-Fos erhöht die Mutationsfrequenz in dem "Shuttlevektor"-Plasmid pS189

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluß der c-Fos-Überexpression auf die Frequenz von Genmutationen zu testen, ist durch das "Shuttlevektor"-Plasmid pZ189 gegeben (Seidman et al., 1985) (Abb.16). Dieses Plasmid ist konstruiert worden, um die Mutagenese in Säugerzellen untersuchen zu können. Als Zielsequenz für die Mutationsinduktion trägt das Plasmid das Gen, das für die 150 bp große bakterielle Suppressor-tRNA (SupF) kodiert. Das Plasmid kann in Säuger-Zellen, die permissiv für Simian Virus 40 sind und in dem Bakterium Escherichia coli replizieren. In letzterem wird auf Mutationen getestet. Als Indikatorstamm dient MBM 7070, der eine "amber" Mutation im β -Galaktosidase (Z)-Gen ausweist: Bakterien, die das nicht-mutierte Sup F-Gen enthalten, synthetisieren β -Galaktosidase und färben sich in Gegenwart eines Farbstoffes blau, Bakterien, die dagegen ein mutiertes Sup F-Gen enthalten, färben sich nicht an (siehe unten). Für die Untersuchungen wurde das Plasmid pS189, ein Derivat von pZ189, benutzt. In dem Plasmid pS189 ist eine Region von 167 bp zwischen dem SupF-Gen und dem Start des Amp-Resistenzgens (β -Lactamase), die für die Funktion des Plasmids irrelevant ist, entfernt worden. Durch diese Veränderung ist die Größe der Zielstellen für spontane und induzierte Mutationen um nahezu 50% verkleinert, wobei das Ziel für Punktmutationen, das SupF-Gen, dasselbe bleibt. Durch diese Veränderung verringert sich die spontane Mutationsfrequenz des Plasmids um das vier- bis fünffache (Seidman, 1989). Eine Erklärung für diesen Effekt könnte darin bestehen, daß die Wahrscheinlichkeit, daß Deletionen entstehen, die sich in das SupF-Gen erstrecken und lebensfähig sind, um so geringer ist, je näher das SupF-Gen mit den für das Überleben notwendigen Genen zusammenliegt.

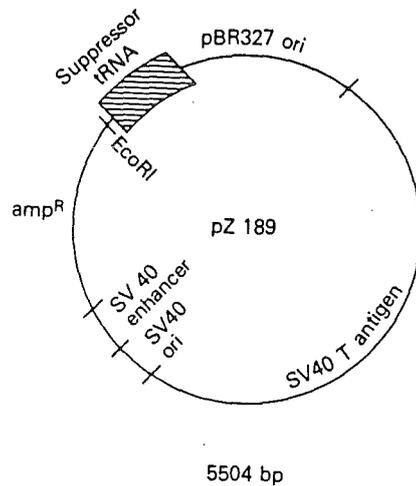


Abb. 16 Plasmidkarte des "Shuttlevektor"-Plasmids pZ 189

Mit diesem "Shuttlevektor" System kann die Rolle von c-Fos bei der Induktion von Punktmutationen überprüft werden. Das Plasmid pS189 wurde dabei in stabil mit MT-c-fos transfizierte HeLa tk⁻ Zellen transient transfiziert, die c-Fos-Synthese daraufhin durch Cadmiumchlorid-Induktion angeschaltet, das Plasmid nach der Methode von Hirt (1967) wiedergewonnen und mit DpnI verdaut. Der DpnI Verdau dient der Eliminierung von nicht-replizierter Plasmid-DNA, die noch das bakterielle Methylierungsmuster zeigt: bakterielle DNA weist im Gegensatz zu eukaryontischer DNA methylierte Adenine auf, die von DpnI erkannt und geschnitten werden (Peden et al., 1980). Mit dem Plasmid werden dann die Bakterien MBM 7070 transformiert. Sind nach Überexpression von c-Fos keine Mutationen in der SupF-Sequenz von pS189 gesetzt worden, so kann es die "amber"-Mutation im β -Galaktosidase-Gen von MBM 7070 supprimieren und die Bakterien erscheinen auf X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indonyl-b-D-galaktopyranosid)- und IPTG (Isopropylthiogalaktosid)-haltigem Selektions-Agar blau. Ist das SupF-Gen hingegen mutiert, z.B. weil es nach Überexpression von c-Fos Punktmutationen trägt, so kann die "amber" Mutation nicht supprimiert werden und die Bakterien erscheinen weiß. Da sich der Bakterienstamm MBM 7070 mit dem aus den HeLa tk⁻ Zellen gewonnenen Plasmid pS189 nur sehr schlecht transformieren ließ, wurde die Gesamtmenge an präpariertem Plasmid zunächst in den leicht zu transformierenden Bakterienstamm DH5 α gebracht und in diesen vermehrt. Aus den hochgewachsenen DH5 α -Bakterien wurde nach der Plasmid-Mini-Präparations-Methode die Plasmid-DNA isoliert. Für die Transformation in den MBM 7070-Bakterienstamm wurden 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt.

Die Untersuchungen ergaben, daß die Mutationsfrequenz in den untransfizierten Kontrollzellen nach CdCl₂-Behandlung fast unverändert bleibt: ohne CdCl₂ betrug die Mutationsfrequenz 1.5x10⁻³, mit CdCl₂ 1.6x10⁻³. Das basale Niveau an Mutationen war in den MT-c-fos-transfizierten Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollzellen deutlich erhöht (2.2fach). Nach CdCl₂-Induktion stieg hier die Mutationsfrequenz um das 1.7fache, von 3.3x10⁻³ auf 5.7x10⁻³, an. Wenn man davon ausgeht, daß die Mutationsfrequenz in den MT-c-fos-transfizierten Zellen dadurch, daß der MT-Promotor nicht still ist, bereits erhöht ist, und daher den Wert für die Mutationsfrequenz in MT-c-fos-transfizierten Zellen nach CdCl₂-Induktion auf den entsprechenden Wert von untransfizierten Zellen ohne Induktion bezieht, so ergibt sich ein Anstieg in der Mutationsfrequenz von 3.8fach (Tab.9).

Zelllinie	CdCl ₂ - induktion (10 µM)	Gesamtzahl der untersuchten Kolonien	Gesamtzahl der Kolonien mit mutier- ten Plasmiden	Mutations- frequenz (x10 ⁻³)	Indukt. faktoren	
					1	2
untransf.	-	91995	139	1.5	1.0	1.0
	+	85220	140	1.6	1.1	
MT-c-fos C7	-	94104	316	3.3	1.0	2.2
	+	83544	480	5.7	1.7	3.8

Tab. 9 Überexpression von c-Fos erhöht die Mutationsfrequenz in einem "Shuttlevektor"-System

2x10⁵ untransfizierte oder MT-c-fos C7 transfizierte Hela tk⁻ Zellen wurden pro 9 cm Petrischale eingesät und nach 24 h nach der Methode von Graham und van der Eb (1973) mit 10 µg pS189-Plasmid-DNA transient transfiziert. 16 h später erfolgte die CdCl₂-Induktion(10µM CdCl₂). Nach 10 h wurde das Medium gewechselt und 48 h später wurden die Plasmide nach der Methode von Hirt (1967) präpariert. Die aufgearbeiteten Plasmide wurden in DH5α-Bakterien transformiert, nach der Plasmid-Mini-Präparations-Methode isoliert, 100 ng in MBM 7070 Bakterien transformiert und auf Amp-, IPTG- und X-Gal-haltige Agarplatten ausplattiert. Der Induktionsfaktor 1 bezieht die Mutationsfrequenzen untransfizierter, bzw. MT-c-fos transfizierter Zellen mit Induktion auf die entsprechenden Mutationsfrequenzen ohne Induktion. Der Induktionsfaktor 2 bezieht die Mutationsfrequenzen MT-c-fos-transfizierter Zellen mit, bzw. ohne Induktion auf die Mutationsfrequenz untransfizierter Zellen ohne Induktion. Die Tabelle faßt die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten zusammen.

8) Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide hemmen die Aberrations-Induktion von überexprimiertem v-Mos und c-Ha-Ras in NIH 3T3 Fibroblasten

Es ist mehrfach in der Literatur beschrieben worden, daß die Überexpression von v-Mos oder c-Ha-Ras die Transkription des endogenen c-fos-Gens transient induzieren kann: Die Injektion von Ras-Proteinen führt zu einer Aktivierung des c-fos-Promotors (Stacey et al., 1987). Transfiziert man Zellen, die stabil mit LTR-v-mos-, bzw. LTR-c-Ha-ras-DNA transfiziert sind, transient mit dem Chloramphenicol-Transferase (CAT)-Gen, welches unter der Kontrolle des fos-Promotors steht, so findet man nach anschließender Dexamethason-Induktion einen Anstieg in der CAT-Aktivität um das drei- bis fünffache (Schönthal et al., 1988), d.h. das durch die Dexamethason-Gabe überexprimierte c-Ha-Ras-, bzw. v-Mos-Genprodukt aktiviert den fos-Promotor. In einer Northern-Blotting-Analyse konnte ich ebenfalls zeigen, daß nach Überexpression von c-Ha-Ras, bzw. v-Mos in LTR-c-Ha-ras-, bzw. LTR-v-mos-transfizierten NIH 3T3 Fibroblasten die Menge an c-fos-mRNA transient angehoben wird (Abb.17).

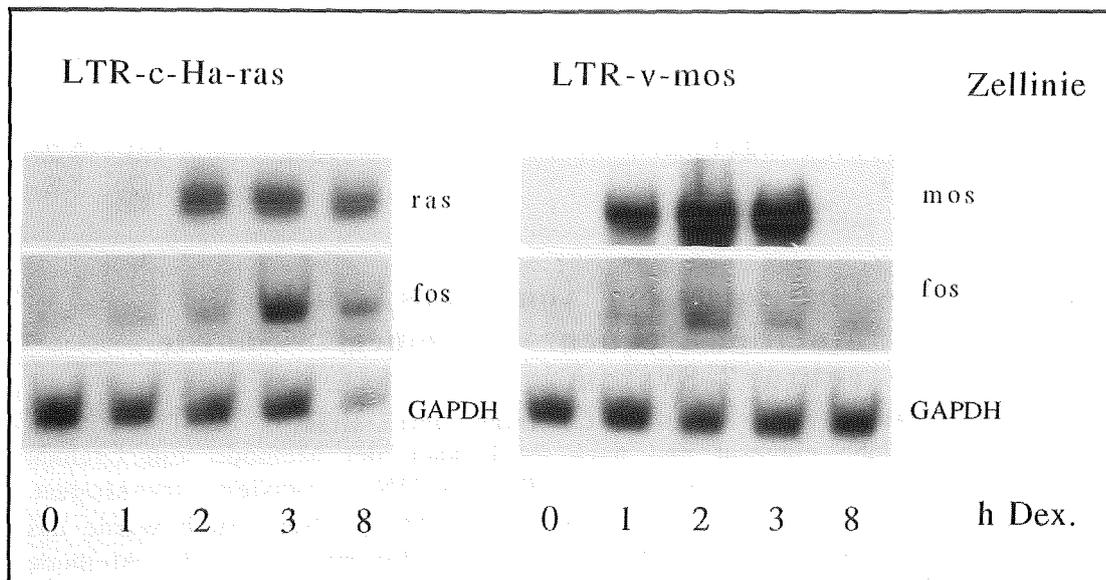


Abb.17 Akkumulation von c-Ha-ras- und c-fos-mRNA, bzw. v-mos- und c-fos-mRNA nach Überexpression von c-Ha-Ras, bzw. v-Mos in LTR-c-Ha-ras-, bzw. LTR-v-mos-transfizierten NIH 3T3 Fibroblasten.

Logarithmisch wachsende LTR-c-Ha-ras-, bzw. LTR-v-mos-transfizierte Zellen wurden mit 2×10^{-7} M Dexamethason behandelt, bzw. nicht behandelt und polyA⁺ RNA nach den angegebenen Zeiten präpariert. Je 6 µg RNA wurden der Größe nach auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und auf

einen Hybond N+ Filter transferiert. Die Hybridisierung wurde mit einer radioaktiv markierten 1 kb PST I v-fos-Probe aus pfos-1 (Curran et al., 1982) durchgeführt. Danach wurde der Filter zum Nachweis, daß c-Ha-ras-, bzw. v-mos-mRNA angeschaltet worden war mit einer radioaktiv markierten v-mos- bzw. c-Ha-ras-Probe von Dianova hybridisiert und zur Bestimmung der eingesetzten polyA⁺ RNA Menge mit einer radioaktiv markierten 0,9 kb PstI GAPDH-Probe aus pRGAPDH-13 (Fort et al., 1985) nachhybridisiert. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm.

Weiterhin ist gezeigt worden, daß die durch überexprimiertes c-Ha-Ras, bzw. v-Mos vermittelte Induktion der Kollagenase durch transient transfizierte Antisense-fos-DNA (pSV-sof) gehemmt wird (Schönthal et al., 1988). Wenn das c-fos-Gen durch Überexpression von c-Ha-Ras oder v-Mos induziert wird und als Vermittler zwischen diesen überexprimierten Genprodukten und der Expression anderer Gene (wie z.B. der Kollagenase) fungiert, ist es vorstellbar, daß auch die Induktion von Aberrationen nach c-Ha-Ras, bzw. v-Mos-Überexpression über c-Fos als Zwischenstufe läuft. Um diese Vermutung auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen wurde getestet, ob LTR-c-Ha-ras-, bzw. LTR-v-mos-transfizierte NIH 3T3 Zellen in Anwesenheit von Antisense-fos-Oligodesoxynukleotiden noch die Fähigkeit besitzen, nach Überexpression von Ras, bzw. Mos Chromosomenaberrationen zu induzieren.

Antisense-Oligodesoxynukleotide verhindern spezifisch die Expression von Genen, indem sie an die mRNA dieser Gene binden und dadurch deren Translation inhibieren (Vlassov et al., 1985; Stein und Cohen, 1988). Es ist vielfach gezeigt worden, daß die exogene Zugabe von Oligodesoxynukleotiden, die komplementär zu der mRNA des Myc-Genproduktes sind, ausreichend ist, die Expression des Myc-Genproduktes spezifisch zu verhindern (Heikkila et al., 1987; Harel-Bellan et al., 1988; Holt et al., 1988; Loke et al., 1988; Wickström et al., 1988). Also wurden die Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide ebenfalls exogen zugegeben, d.h. im Überschuß in das Zellkulturmedium pipettiert. Der Oligodesoxynukleotid-Transport in die Zelle läuft vermutlich über einen Endozytose-Mechanismus unter Einbeziehung spezifischer Rezeptorproteine (Loke et al., 1988, Yakubov et al., 1989).

Vor Beginn der Versuchsserie wurden die verwendeten Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide in einem Immunfluoreszenzverfahren daraufhin getestet, ob sie auch tatsächlich die c-fos-mRNA-Translation und damit die c-Fos-Proteinsynthese verhindern. Die Immunfluoreszenz-Auswertung zeigte, daß in unbehandelten Zellen, sowie in Zellen, die mit dem Kontroll-Oligodesoxynukleotid behandelt worden sind, die c-Fos Proteinsynthese nach Serum-Induktion unbeeinflusst bleibt. Hingegen war in Zellen, die mit Antisense-fos-Oligodesoxy-

nukleotiden vor der Serum-Induktion behandelt worden waren, kein c-Fos-Protein im Zellkern erkennbar (Abb.18).

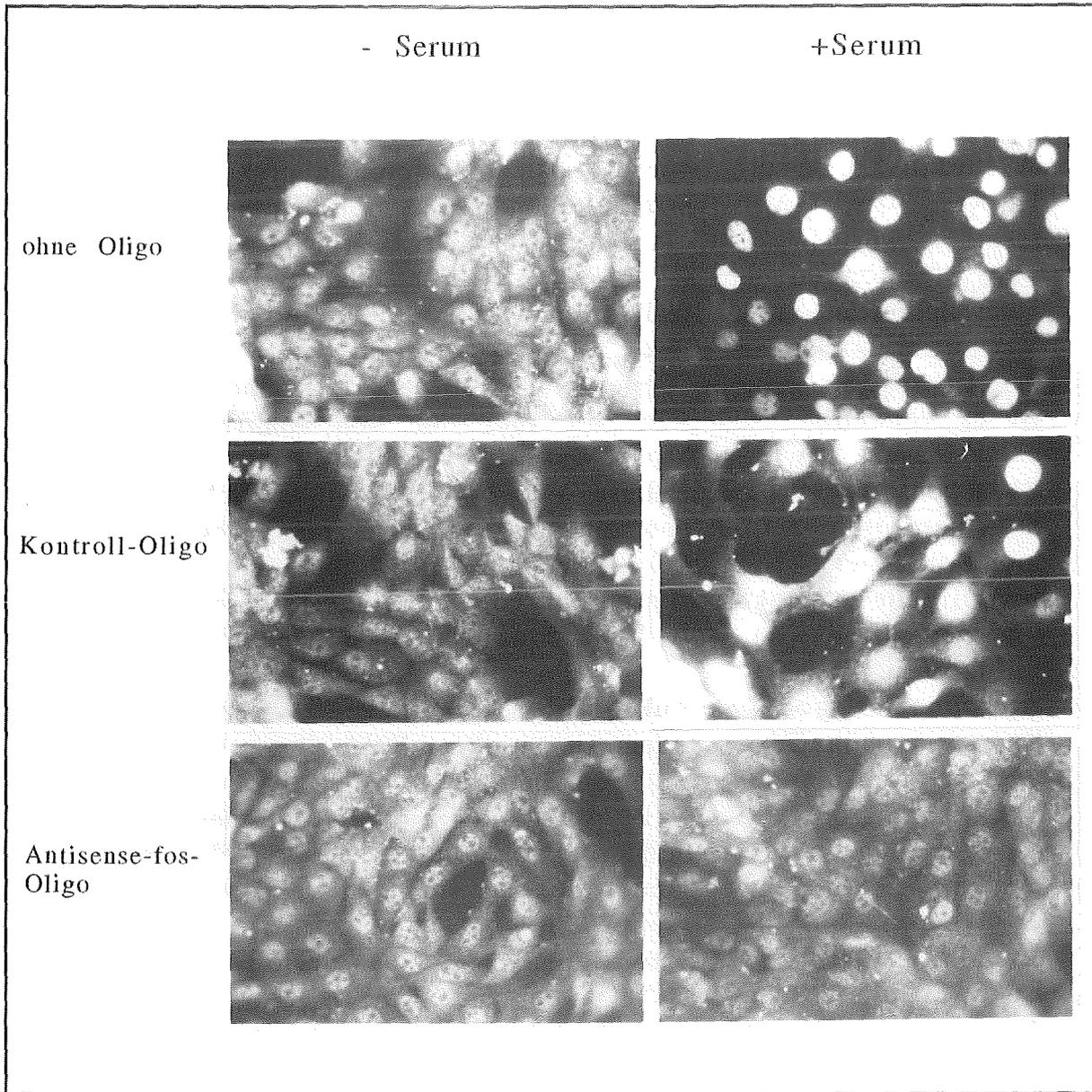


Abb.18 Immunfluoreszenz zur Funktionsüberprüfung der Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide

Das 10% Serum-enthaltende Medium von NIH 3T3 Fibroblasten wurde 24 h nach Einsaat durch 0.5% Serum-haltiges Medium ersetzt, die Zellen darin für 48 h gehungert, danach 30 μ M Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide, Kontroll-Oligodesoxynukleotide oder keine Oligodesoxynukleotide (Sequenzen, siehe Methoden-Teil) zugegeben und nach 10 min mit 20% Serum-enthaltendem Medium für 2 h inkubiert. (Hierbei wurde Serum zu dem Medium bis zu der Endkonzentration von 20% Serum zupipetiert.) Serum-Behandlung nach Hungern bewirkt die Synthese des endogenen Fos-Proteins. Nach der Induktion wurden die Zellen, wie im Methodenteil

beschrieben, fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern auf das Vorhandensein von Fos-Protein getestet.

Für die Chromosomenanalyse wurde den LTR-v-mos-, bzw. LTR-c-Ha-ras-transfizierten NIH 3T3 Zellen vor und nach der Induktion der Onkoprotein-Überexpression Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide zugegeben und 24 h später Chromosomenpräparate angefertigt.

Die Analyse ergab, daß der Anstieg in der Aberrationsfrequenz nach Überexpression von c-Ha-Ras, bzw. v-Mos durch Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide verhindert wird, nicht jedoch durch Kontroll-Oligodesoxynukleotide gleicher Länge mit willkürlich gewählter Sequenz (Abb.19): Die Dexamethason-induzierte Überexpression von v-Mos, bzw. c-Ha-Ras bewirkte den erwarteten, statistisch signifikanten Anstieg ($P < 0.05$) in der Frequenz chromosomaler Aberrationen. Auch in Anwesenheit der Kontroll-Oligodesoxynukleotide war dieser Anstieg statistisch signifikant ($P < 0.05$). Im Gegensatz dazu war der Anstieg in der Aberrationsfrequenz nach Überexpression von v-Mos, bzw. c-Ha-Ras bei Zugabe der Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide statistisch nicht signifikant ($P < 0.05$) (Tab.9). Die Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide senkten in den LTR-c-Ha-ras-transfizierten Zellen die Zahl induzierter Aberrationen (hauptsächlich Chromatid- und Isochromatidbrüche) vollständig auf den Basalwert, während sie in LTR-v-mos-transfizierten Zellen den Anstieg in der Aberrationsfrequenz (ebenfalls Chromatid- und Isochromatidbrüche) fast vollständig reduzierten (Tab.10).

Das Ergebnis zeigt, daß v-Mos und c-Ha-Ras signalerzeugende Komponenten sind, welche die Expression von c-Fos induzieren, wobei die Aberrationen als eine Konsequenz der erhöhten c-Fos-Expression angesehen werden können.

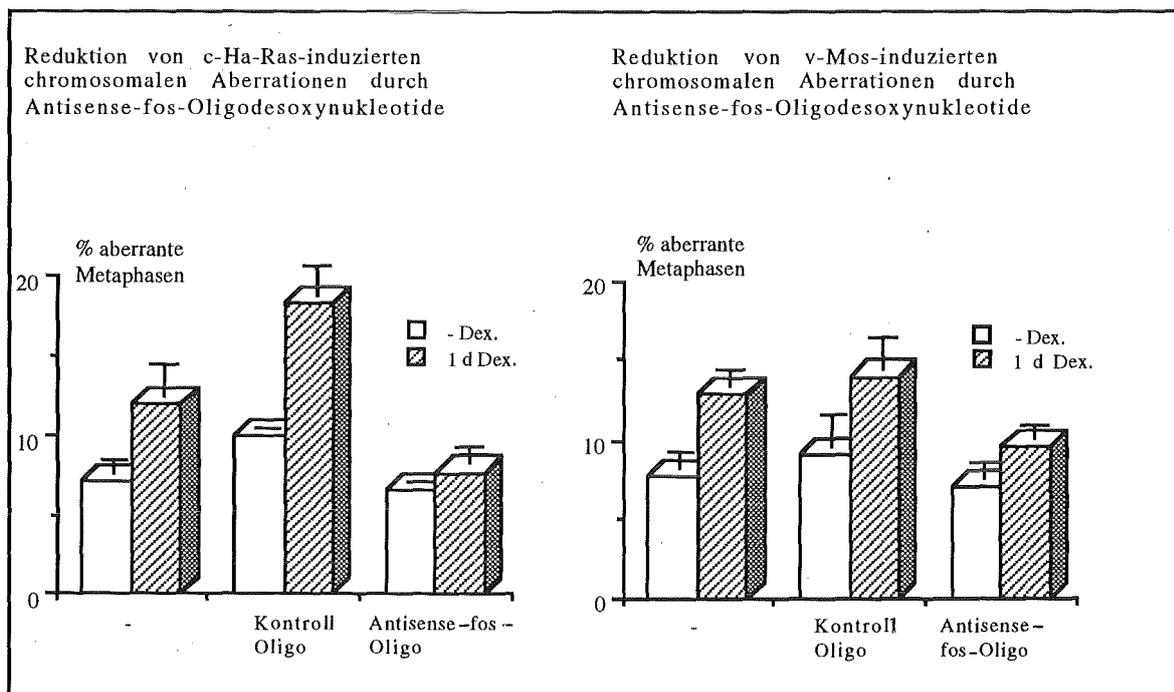


Abb.19 Der Anstieg in der Aberrationsfrequenz nach Überexpression von c-Ha-Ras, bzw. v-Mos wird durch Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide verringert.

Logarithmisch wachsende LTR-v-mos-, bzw. LTR-c-Ha-ras-transfizierte NIH 3T3 Zellen wurden 48 h nach der Einsaat nicht behandelt, mit 30µM Kontroll-Oligodesoxynukleotiden oder mit 30µM Antisense-fos-Oligodesoxynukleotiden inkubiert. Sofort danach wurde 2×10^{-7} M Dexamethason zugegeben, bzw. nicht zugegeben und nach 2 h erneut mit 30µM Oligodesoxynukleotiden behandelt. Nach 16 h wurden Chromosomenpräparate angefertigt. Es wurde der Prozentsatz aberranter Metaphasen ohne Behandlung und in Abhängigkeit von der Oligodesoxynukleotid-Zugabe und der Dexamethason-Behandlung bestimmt. (100 aberrante Metaphasen in 100 ausgewerteten Metaphasen entsprechen 100%).

┆ Standardabweichung

9) Serum-Behandlung erhöht trotz der Induktion von c-fos-mRNA-Akkumulation nicht die Frequenz chromosomaler Aberrationen in NIH 3T3 Zellen

Die c-fos-mRNA-Synthese wird durch eine Vielzahl von Faktoren induziert. Hierzu gehören nicht nur "unphysiologische" Faktoren, wie überexprimierte Onkogene oder der Tumorpromoter TPA, sondern auch "physiologische" Faktoren, wie Serum (Treismann,

1985; 1986). Nachdem im ersten Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt worden ist, daß die verstärkte Expression von c-Fos Aberrationen induzieren kann, stellt sich die Frage, ob eine erhöhte c-Fos-Menge auch dann DNA-schädigend wirkt, wenn sie von einem Faktor induziert wird, mit dem die Zelle beständig in Berührung kommt, wie z.B. Serum.

In den oben angeführten Veröffentlichungen von Treismann wurden die Zellen vor der Serum-Induktion gehungert. Nach Beginn des Hungerns teilen sich Zellen nur noch wenige Male und stellen ihre Teilungsaktivität dann ganz ein. Weil in chromosomalen Analysen nur Chromosomen ausgewertet werden können, die in die Metaphase der Mitose eingetreten sind, wurde nicht mit gehungerten, sondern mit logarithmisch wachsenden Zellen gearbeitet. Um zu zeigen, daß auch in logarithmisch wachsenden Zellen die Menge an c-fos-mRNA nach Serum-Induktion erhöht ist, wurde eine Northern-Blotting-Analyse durchgeführt (Abb.20).

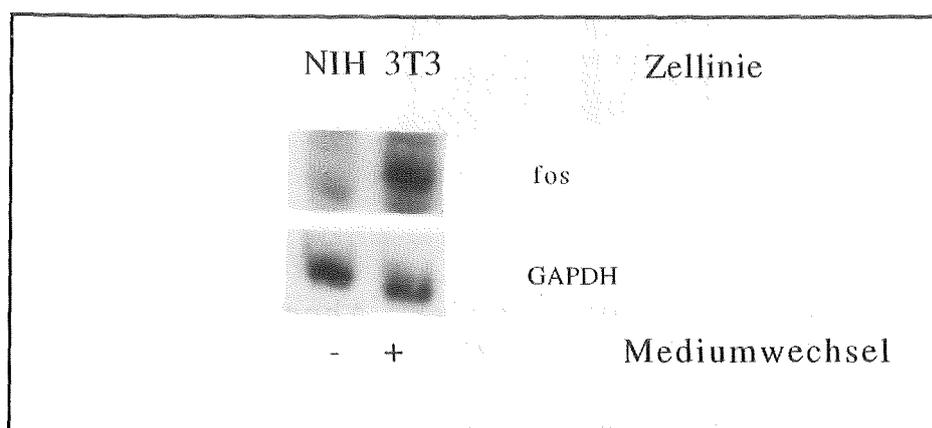


Abb.20 Mediumwechsel induziert die Akkumulation von c-fos-mRNA in untransfizierten NIH 3T3 Zellen.

Es wurden 2×10^6 Zellen pro 15 cm Petrischale eingesät. Nach 48 h wurde das 10% Serum-enthaltende Medium gegen frisches Medium mit demselben Prozentgehalt an Serum ausgetauscht, bzw. nicht ausgetauscht und nach 30 min polyA⁺ RNA präpariert. Je 6 µg RNA wurden der Größe nach auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und auf einen Hybond N+ Filter transferiert. Die Hybridisierung wurde mit einer radioaktiv markierten 1 kb PST I v-fos-Probe aus pfos-1 (Curran et. al., 1982) durchgeführt. Zur Bestimmung der eingesetzten Menge an polyA⁺ RNA wurde mit einer radioaktiv markierten 0.9 kb PstI GAPDH-Probe aus pRGAPDH-13 (Fort et al., 1985) nach-hybridisiert. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm.

Die Chromosomenanalyse zeigt, daß die Serum-Induktion die Häufigkeit chromosomaler Aberrationen nur marginal erhöht

(Abb.21, Tab.11). Der Unterschied in der Frequenz aberranter Metaphasen mit und ohne Serum-Induktion ist statistisch nicht signifikant ($P < 0.05$). Das bedeutet, daß nach Überexpression von exogenem c-Fos, von endogenem c-Fos nach c-Ha-Ras-, bzw. v-Mos-Überexpression oder -wie später gezeigt werden wird- von endogenem Fos nach UV-Bestrahlung ein Weg zur Induktion chromosomaler Aberrationen beschrieben wird, der allein nach Serum-Induktion nicht möglich ist.

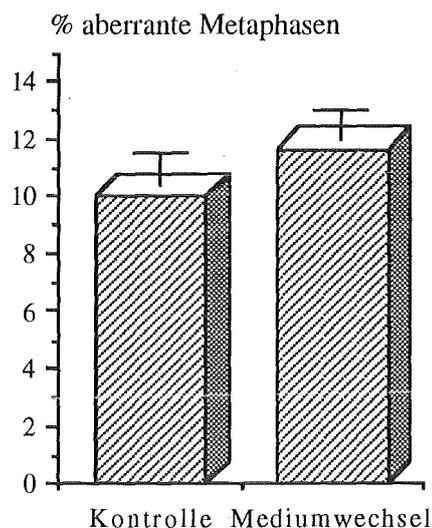


Abb.21 Frequenz chromosomaler Aberrationen nach Mediumwechsel in NIH 3T3 Fibroblasten.

Es wurden 2×10^5 Zellen pro 5 cm Petrischale eingesät. Nach 48 h wurde das 10% Serum-enthaltende Medium gegen frisches Medium mit demselben Prozentgehalt an Serum ausgetauscht, bzw. nicht ausgetauscht und nach 24 h Chromosomenpräparate angefertigt. Es wurde der Prozentsatz aberranter Metaphasen in unbehandelten und in behandelten Zellen bestimmt (100 aberrante Metaphasen in 100 ausgewerteten Metaphasen entsprechen 100%).

┐ Standardabweichung

10) Suramin verringert die Menge UV-induzierter fos-mRNA und die Menge UV-induzierter chromosomaler Aberrationen in NIH 3T3 und in CHO-9 Zellen

Es ist schon lange bekannt, daß UV-Strahlung Schäden in die DNA einführt (Chu, 1965), welche durch Absorption von Photonen durch die Basen in der DNA verursacht werden. Zwei Typen von DNA-Schäden, die in erster Linie für die lethalen und mutagenen Effekte von UV-Strahlung verantwortlich sind, stellen die

Mutationen eine Vielzahl anderer genetischer Veränderungen, wie z.B. DNA-Rekombination, Genamplifikation und die Änderung in der Expression von Genen durch UV-Bestrahlung induzieren. Zu den letztgenannten Genen gehören u.a. das menschliche Kollagenase-Gen (Angel et al., 1987), das Metallothionein-IIA-Gen (Angel et al., 1986; Fornace et al., 1988) und auch das c-fos-Gen (Angel et al., 1985; Büscher et al., 1988). Experimente mit Zellen, die nicht mehr imstande sind, ein UV-induziertes Signal zu den antwortenden Genen (z.B. dem Kollagenase-Gen) zu übertragen, weil sie durch künstlich eingebrachte Antisense-fos-RNA-Moleküle an Fos-Proteinen verarmt waren, legen den Schluß nahe, daß das Fos-Protein eine entscheidende Zwischenstufe bei der UV-Induktion von Genen darstellt.

Da aus Northern-Blotting-Analysen bekannt war, daß die polyanionische Substanz Suramin die Menge an c-fos-mRNA, die nach UV-Bestrahlung induziert wird, reduziert (Abb.23), wurde getestet, ob Suramin auch die Aberrations-Induktion nach UV-Bestrahlung verringert.

Suramin [Hexa-Natriumsalz der 8,8'-(carbonylbis(imino-3,1-phenylencarbonylimino 4-methyl-3, 1-phenylen) carbonylimino)] bis-1,3,5-naphtalentrifosulfonische Säure) (Abb.22) ist eine polyanionische Substanz, die bei der Behandlung der afrikanischen Trypanosomie und Onchocerciasis eingesetzt wird. Seit kurzem weiß man, daß Suramin auch eine Anti-Tumor-Wirkung bei Krebs in fortgeschrittenem Stadium hat (Stein et al., 1989; La Rocca et al., 1990). Diese Anti-Tumor-Wirkung drückt sich auch in der Fähigkeit von Suramin aus, einen transformierten Phänotyp in Fibroblasten, die mit Simian Sarcoma Viren infiziert wurden, zu revertieren. Man nimmt an, daß diese Reversion über die Neutralisierung eines externalisierten v-sis-Genprodukts läuft (Betsholtz et al., 1986). Außerdem kann Suramin die reverse Transkriptase tierischer Retroviren inhibieren (DeClercq, 1979) und T-Zellen vor Infektion und zellulären Veränderungen durch HTLV III schützen (Mitsuya et al., 1984). Neben zahlreichen weiteren Effekten verhindert Suramin die Bindung von Wachstumsfaktoren, wie z.B. des epidermalen Wachstumsfaktors ("Epidermal Growth Factor", EGF), des Plättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktors ("Platelet Derived Growth Factor", PDGF) und des Tumor-Wachstumsfaktors ("Tumor Growth Factor β ", TGF- β) an ihre Rezeptoren (Betsholtz et al., 1986; Coffey et al., 1987; Sjolund und Thyberg, 1989). Weiter ist gezeigt worden, daß Suramin die DNA-Synthese in kultivierten HeLa Zellen inhibiert. Die Autoren behaupten, daß diese Hemmung über die Bindung an die Polymerasen α und δ läuft (Jindahl et al., 1990).

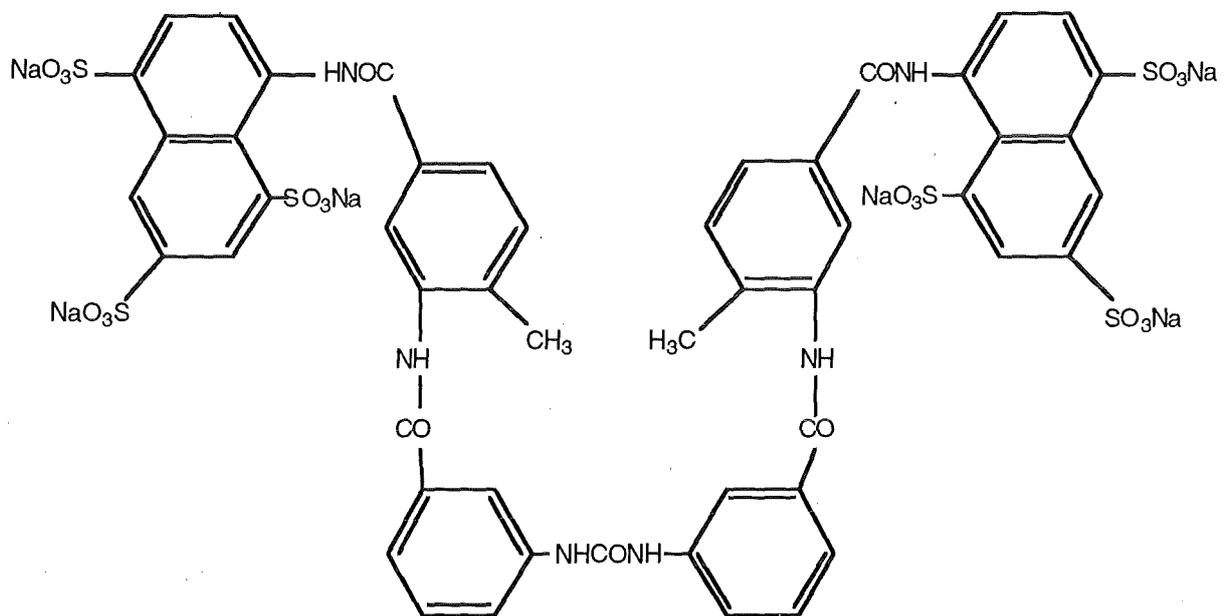


Abb.22 Struktur von Suramin

Wenn Suramin tatsächlich in der Lage wäre, nach Reprimieren der UV-induzierten c-fos-mRNA Menge, die Aberrations-Induktion nach UV-Bestrahlung zu verringern, wäre dies ein Hinweis dafür, daß c-Fos an der Entstehung chromosomaler Aberrationen durch DNA-schädigende Agenzien beteiligt ist. Um diese Vermutung zu überprüfen wurden NIH 3T3 und CHO-9 Zellen vor der UV-Bestrahlung mit Suramin behandelt und Chromosomenanalysen durchgeführt (Abb.24).

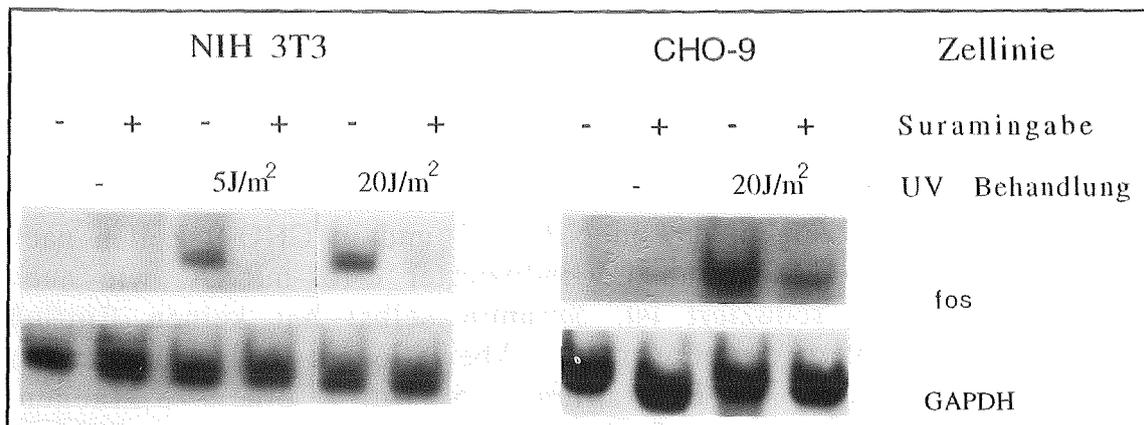


Abb. 23 Suramin reduziert die UV-induzierte c-fos-mRNA-Akkumulation in NIH 3T3 und CHO-9 Zellen

Logarithmisch wachsende NIH 3T3 Fibroblasten, bzw. CHO-9 Zellen wurden 24 h nach der Einsaat mit 300 μ M Suramin behandelt, nach 30 min mit 5 J/m², bzw. 20 J/m² bestrahlt und nach 30 min poly A⁺ RNA präpariert. Je 6 μ g RNA wurden der Größe nach auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und auf einen Hybond N+ Filter transferiert. Die Hybridisierung wurde mit einer radioaktiv markierten 1 kb PST I v-fos-Probe aus pfos-1 (Curran et al., 1982) durchgeführt. Zur Bestimmung der eingesetzten poly A⁺ RNA Menge wurde mit einer radioaktiv markierten 0.9 kb PstI GAPDH-Probe aus pRGAPDH-13 (Fort et al., 1985) nachhybridisiert. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm.

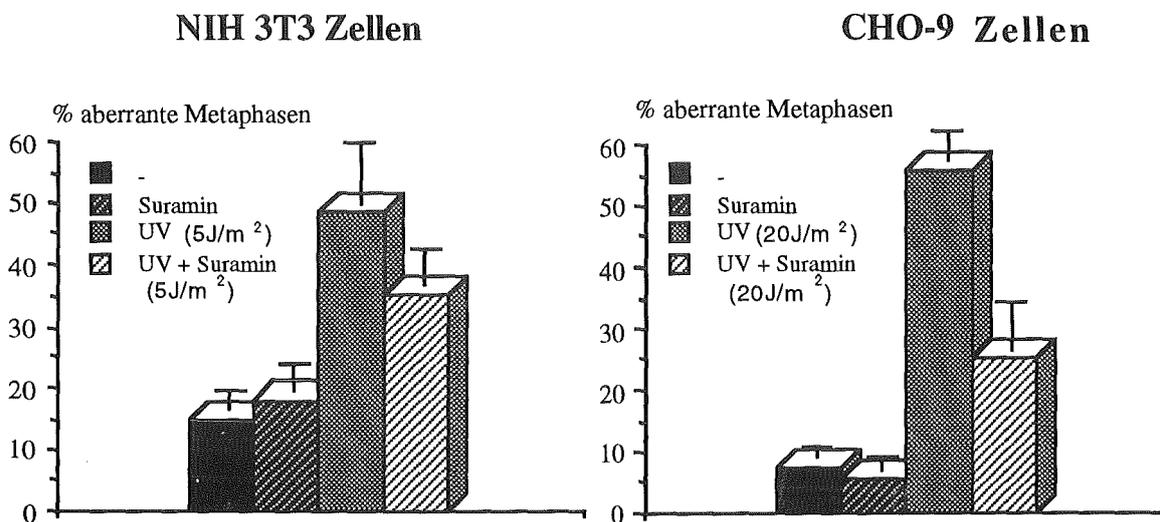


Abb. 24 Suramin reduziert die UV-induzierten Aberrationen in NIH 3T3 und CHO-9 Zellen

Logarithmisch wachsende NIH 3T3 Fibroblasten, bzw. CHO-9 Zellen wurden 24 h nach der Einsaat mit 300 μ M Suramin behandelt, nach 30 min mit 5 J/m², bzw. 20J/m² bestrahlt und nach 16 h Chromosomenpräparate erstellt. Es wurde der Prozentsatz aberranter Metaphasen ohne Behandlung und in

Abhängigkeit von der Suramin-Gabe, bzw. UV-Behandlung bestimmt. (100 aberrante Metaphasen in 100 ausgewerteten Metaphasen entsprechen 100%).

┆ Standardabweichung

Die Experimente zeigen, daß in NIH 3T3 und in CHO-9 Zellen nach Suramingabe die Menge an UV-induzierter c-fos-mRNA, wie auch an Aberrationen reduziert ist. Suramin selbst hat keinen Einfluß auf den Basalwert chromosomaler Aberrationen. NIH 3T3 Zellen zeigten nach der UV-Bestrahlung (5 J/m^2) einen 3.2fachen, statistisch signifikanten ($P < 0.05$) Anstieg in der Aberrationsfrequenz. Suramin-Behandlung reduzierte diesen Wert auf das 1.9fache. Von dieser Reduktion waren sämtliche Aberrationstypen betroffen. Bei CHO-9 Zellen führte die UV-Bestrahlung (20 J/m^2) zu einem statistisch signifikanten ($P < 0.05$) Anstieg in der Frequenz aberranter Metaphasen (7.6fach), welcher durch Zugabe von Suramin auf das 4.7fache gesenkt wurde. Bis auf die multiplen Aberrationen zeigten auch hier alle Aberrationstypen eine Verringerung nach Suramin-Behandlung (Tab.12). Die Verringerung UV-induzierter Aberrationen nach Suramingabe war sowohl in den NIH 3T3 Zellen, wie auch in den CHO-9 Zellen statistisch signifikant ($P < 0.05$).

Wie kann man sich diese Verringerung der Zahl UV-induzierter aberranter Metaphasen nach Suramin-Behandlung erklären?

Zunächst sollte erwähnt werden, daß Suramin UV-Licht absorbiert. Da Suramin den Zellen vor der UV-Behandlung verabreicht wurde, ist es vorstellbar, daß diese Verbindung, unter der Voraussetzung, daß sie an die Zelloberfläche gebunden hat oder in die Zelle aufgenommen wurde, die Zellen unspezifisch vor der Wirkung des UV-Lichts geschützt haben könnte. Nimmt man jedoch an, daß das Suramin durch den Waschvorgang vor der UV-Bestrahlung entfernt wurde, so hätte es während der UV-Behandlung keinen Schutz für die Zellen darstellen können. Für die letztgenannte Vermutung spricht, daß das Überleben der Zellen nach verschiedenen UV-Dosen (3, 5, bzw. 20 J/m^2) unbeeinflusst davon ist, ob Suramin den Zellen vor der Bestrahlung gegeben wurde oder nicht.

Wenn man also davon ausgeht, daß Suramin einen spezifischen Effekt hat und berücksichtigt, daß die Überexpression von c-Fos die Zahl chromosomaler Aberrationen erhöht, ist es vorstellbar, daß die Verringerung der Menge an c-fos-mRNA nach Suramin-Behandlung eine Verringerung der Zahl chromosomaler Aberrationen nach sich zieht. Wenn diese Überlegung richtig ist, so müßte die Zugabe von Antisense-fos-Oligodesoxynukleotiden nach UV-Behandlung ebenfalls die Zahl chromosomaler

Aberrationen verringern. Um dies zu testen wurde das folgende Experiment durchgeführt.

11) Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide reduzieren die durch ultraviolette (UV-) Strahlung induzierten Aberrationen in NIH 3T3 Fibroblasten

Um zu testen, ob ein Zusammenhang zwischen der UV-induzierten c-fos-mRNA-Synthese und UV-induzierten DNA-Schäden besteht, wurden NIH 3T3 Fibroblasten mit UV-Licht bestrahlt und vor und nach der UV-Bestrahlung mit Antisense-fos-Oligodesoxynukleotiden behandelt. Wenn die erhöhte Menge an c-fos-mRNA nach der UV-Bestrahlung an der Erhöhung der chromosomalen Aberrationsfrequenz beteiligt ist, dann ist zu erwarten, daß Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide die UV-induzierte Aberrationsfrequenz reduzieren. Diese Vermutung konnte tatsächlich in einer Chromosomenanalyse bestätigt werden.

Die Analyse zeigte, daß die Zellen nach Bestrahlung mit 3 J/m^2 einen 4.1fachen und nach Bestrahlung mit 5 J/m^2 einen 6.4fachen Anstieg in der Aberrationsfrequenz aufweisen. Fast genauso verhielten sich die Zellen, wenn Kontroll-Oligodesoxynukleotide zugegeben wurden. Der Anstieg war hier 4.3- bzw. 6.4fach. Wurden jedoch Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide auf die Zellen gegeben, so war der Anstieg in der Aberrationsfrequenz bei 3 J/m^2 nur noch 2.4fach, bzw. 3.5fach bei 5 J/m^2 (Abb.25, Tab.13). Der Anstieg in der Aberrationsfrequenz nach UV-Bestrahlung war ohne Oligodesoxynukleotid-Behandlung und mit Kontroll-Oligodesoxynukleotid-Behandlung statistisch signifikant ($P < 0.05$). Die Verringerung der UV-induzierten Aberrationsfrequenzen nach Antisense-fos-Oligodesoxynukleotid-Zugabe war hingegen nur nach UV-Bestrahlung mit 5 J/m^2 statistisch signifikant ($P < 0.05$). Aufgrund der starken Schwankungen der Einzelwerte ließ sich die Verringerung der Aberrationsfrequenzen nach UV-Bestrahlung mit 3 J/m^2 statistisch nicht absichern ($P < 0.05$).

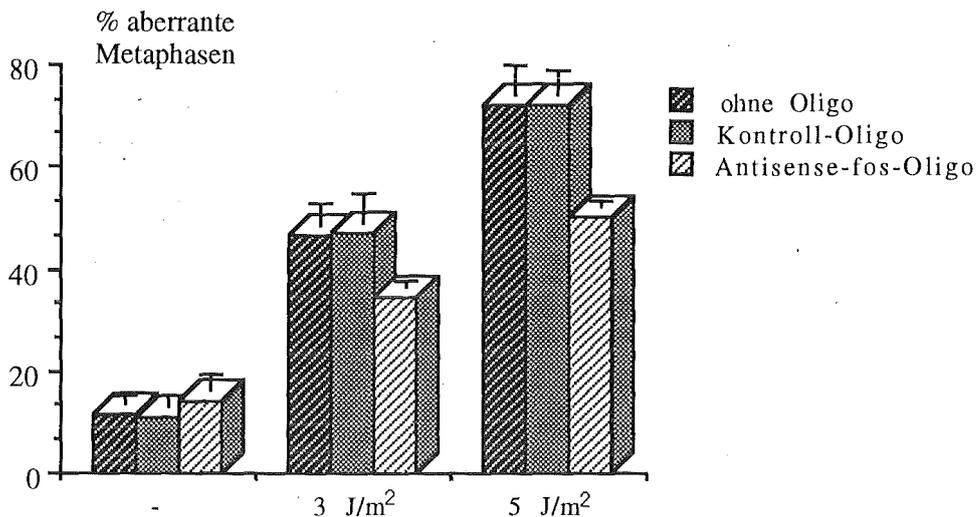


Abb. 25 Der Anstieg in der Aberrationsfrequenz nach UV-Bestrahlung wird durch Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide reduziert.

Logarithmisch wachsende NIH 3T3 Fibroblasten wurden 48 h nach der Einsaat mit 3, bzw. 5 J/m² bestrahlt und nach 16 h Chromosomenpräparate erstellt. 3 h und 0.5 h vor und 3, 6 und 9 h nach der UV-Bestrahlung wurden dem Medium Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide (30µM), bzw. Kontrolloligodesoxynukleotide zugegeben.

┆ Standardabweichung

12) Überexpression von c-Fos erhöht die Rekombinationsfrequenz in der menschlichen Osteosarkom-abgeleiteten Zelllinie 143tk-

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit ist gezeigt worden, daß die Überexpression von Onkogenen an der Induktion chromosomaler Aberrationen beteiligt ist. Über welchen Mechanismus könnte diese Aberrations-Induktion verlaufen? Es ist beschrieben worden, daß genetische Rekombination als ein Mechanismus bei der Entwicklung bestimmter Arten von Krebs, z.B. des Retinoblastoms (Cavanee et al., 1983) und des Burkitt Lymphoms (Leder et al., 1983), anzusehen ist. Um zu testen, ob Rekombinationsvorgänge auch eine Rolle bei der Aberrations- und Mutationsinduktion durch Onkogenüberexpression spielen, wurde mit dem Rekombinations-Testplasmid pJS-3 (Liskay et al., 1984) gearbeitet. Dieses Plasmid (Abb.26) trägt zwei Kopien des Herpes Thymidinkinase (Tk)-Gens, welche beide durch die Insertion eines 8 bp langen Xho-Linkers inaktiviert worden sind. Die Expression eines funktionellen Tk-Gens erfordert die Eliminierung des Linkers von zumindest einer der nicht funktionellen Tk-Gene. Untersuchungen haben gezeigt, daß nur homologe Rekombination

zwischen den beiden Tk-Sequenzen Tk-positive Zellen erzeugen kann. Auf Tk-positive Zellen wird mit CHAT-Medium selektioniert.

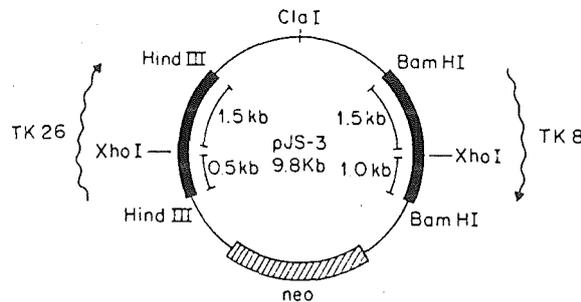


Abb. 26 Plasmidkarte von pJS-3

Um zu testen, ob die Überexpression von c-Fos einen Einfluß auf die Rekombinationsfrequenz der beiden inaktivierten Tk-Kopien hat, wurden menschliche 143 tk⁻ Zellen (Bhattacharyya et al., 1990), die stabil mit dem Plasmid pJS-3 transfiziert waren, transient mit dem konstitutiv exprimierenden RSV-fos-Plasmid, bzw. zur Kontrolle mit dem RSV-neo-Plasmid transfiziert und in CHAT-Medium auf Tk-positive Klone hin selektioniert. Im CHAT-Medium sind Desoxycytidin, Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthalten. Aminopterin hemmt im Pyrimidinstoffwechsel die Thymidinsynthetase, welche die Synthese von Thymidinmonophosphat (TMP) aus Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) katalysiert. Diese Hemmung kann durch die Zugabe von Thymidin umgangen werden, wenn die Zellen die Thymidinkinase besitzen, welche aus dem zugeführten Thymidin das TMP synthetisiert. Da Aminopterin im Purinstoffwechsel die Synthese von Inosylmonophosphat (IMP) aus Ribose hemmt, wird Hypoxanthin zugegeben. Hypoxanthin wird durch die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) zu IMP umgesetzt.

Um sicher zu stellen, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen die Rekombinationsfrequenzen überhaupt ansteigen können, wurde ein Teil der Zellen nach transienter Transfektion mit RSV-neo mit UV-Licht, von dem bekannt ist, daß es die Rekombinationsfrequenz erhöht, behandelt und ebenfalls auf Tk⁺-Klone hin getestet. Als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen mit Salmon-sperm-DNA (ss-DNA) transfiziert. Um zu testen, ob die Transfektion an sich einen Einfluß auf die Rekombinationsfrequenz hat, wurden die Zellen dem Transfektionsprozess ohne Zugabe von DNA unterzogen oder nicht transfiziert. Der Einfluß einer geringeren Menge an transfizierter RSV-c-fos-DNA wurde

durch Zugabe von nur 5 µg, anstelle von 10 µg, getestet. Neben zellulärer fos-DNA wurde auch virale fos-DNA (RSV-v-fos) in dem Rekombinationsexperiment eingesetzt.

Die Experimente zeigten, daß die Rekombinationsfrequenzen in den Kontrollen 0.8×10^{-4} (RSV-neo-transfizierte Zellen), 1.0×10^{-4} (ss-DNA-transfizierte Zellen), 1.2×10^{-4} (transfizierte Zellen ohne Einsatz von DNA) und 1.0×10^{-4} (untransfizierte Zellen) betragen. Die UV-Behandlung führte in RSV-neo-transfizierten Zellen zu einem Anstieg in der Rekombinationsfrequenz auf 1.3×10^{-4} . Nach der Transfektion von fos-DNA war die Rekombinationsfrequenz in allen Fällen erhöht: Sie betrug 1.3×10^{-4} bei den nur mit 5 µg RSV-c-fos-transfizierten Zellen, 1.5×10^{-4} bei den mit je 5 µg RSV-c-fos- und RSV-neo-transfizierten Zellen, 1.5×10^{-4} bei den mit 10 µg RSV-c-fos-transfizierten Zellen und 1.5×10^{-4} bei den mit RSV-v-fos-transfizierten Zellen (Tab.14). Bezogen auf die Rekombinationsfrequenzen der RSV-neo-transfizierten Zellen lagen die Induktionsfaktoren der fos-transfizierten Zellen zwischen 1.6 und 1.9. Die Experimente sprechen dafür, daß Fos an rekombinatorischen Prozessen beteiligt ist.

transf. DNA (10 µg)	UV-Behandlg. (8 J/m ²)	Gesamt zahl der Platten	Plattierungs-effizienz (%)	Gesamt-zahl von Tk ⁺ Kolonien	Rekombinat. frequenz (x 10 ⁻⁴)	Indukt. faktor
RSV-neo	-	15	18.9	112	0.8	1.0
ss-DNA	-	14	15.4	109	1.0	1.2
-DNA	-	19	17.6	221	1.2	1.5
ohne Transf.	-	16	17.1	156	1.0	1.2
RSV-neo	+	15	4.0	49	1.3	1.6
RSV-c-fos (5 µg)	-	14	20.5	184	1.3	1.6
RSV-c-fos + RSV-neo (je 5 µg)	-	15	16.9	196	1.5	1.9
RSV-c-fos	-	15	16.2	181	1.5	1.9
RSV-v-fos	-	10	8.8	66	1.5	1.9

Tab.14 RSV-fos erhöht nach transienter Transfektion die Rekombinationsfrequenz in 143 tk⁻ Zellen

143tk⁻ Zellen, die stabil mit dem Rekombinations-Testplasmid, pJS-3 transfiziert sind, wurden 24 h nach der Einsaat mittels der Methode nach Kawai und Nishizawa transient mit den oben angegebenen DNAs transfiziert, nach 6 h mit 30 % DMSO behandelt und nach 16 h der CHAT-Selektion unterworfen. Ein Teil der mit RSV-neo transfizierten Zellen wurde 2 h nach dem DMSO-Schock zusätzlich mit 8 J/m² UV bestrahlt. Nach 8 bis 10 d waren makroskopisch sichtbare Kolonien hochgewachsen und wurden

gezählt. Jeder Meßwert in der Tabelle faßt die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten zusammen.

Da bei einer transienten Transfektion nicht alle Zellen die transfizierte DNA aufnehmen und exprimieren, ist zu erwarten, daß der Anstieg in der Rekombinationsfrequenz durch überexprimiertes c-Fos deutlicher sichtbar wird, wenn 143 tk⁻ Zellen verwendet werden, die stabil mit einem induzierbaren c-fos-Gen transfiziert sind. Deshalb wurden 143tk⁻ Zellen nach der Methode von Kawai und Nishizawa (1984) stabil mit MT-c-fos-DNA und mit MT-c-Δfos-DNA als Kontrolle transfiziert und in der Northern-Blotting-Analyse auf die Expression der c-fos-, bzw. c-Δfos-mRNA nach CdCl₂-Induktion getestet: Nach CdCl₂-Induktion ist eine Akkumulation von c-fos-, bzw. c-Δfos-mRNA nachweisbar (Abb.26).

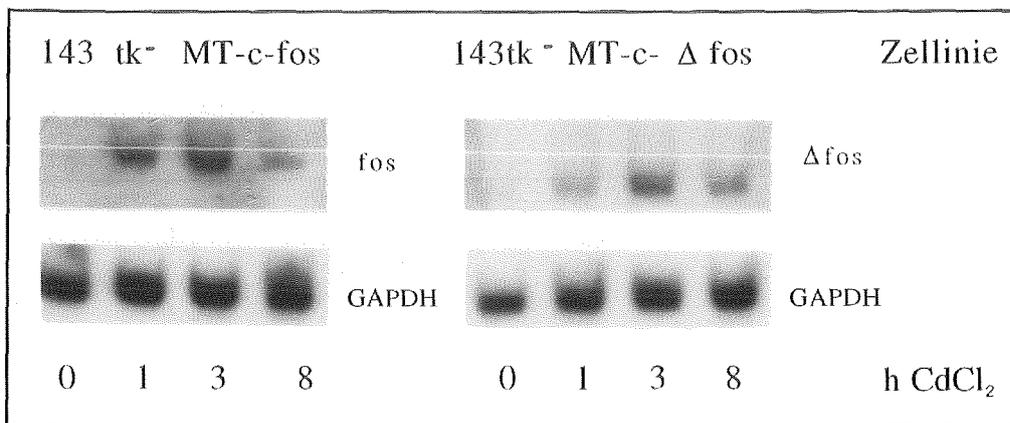


Abb.26 Akkumulation von c-fos, bzw. c-Δfos-mRNA nach Induktion mit Cadmiumchlorid in stabil mit MT-c-fos und pJS-3, bzw. MT-c-Δfos und pJS-3 transfizierten 143 tk⁻ Zellen

Logarithmisch wachsende mit MT-c-fos und pJS-3, bzw. mit MT-c-Δfos und pJS-3 transfizierte 143 tk⁻ Zellen wurden mit 10 μM CdCl₂ behandelt, bzw. nicht behandelt und polyA⁺ RNA nach 1, 3 und 8 h präpariert. Je 6 μg RNA wurden der Größe nach auf einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt und auf einen Hybond N+ Filter transferiert. Die Hybridisierung wurde mit einer radioaktiv markierten 1 kb PST I v-fos-Probe aus pfos-1 (Curran et. al., 1982) durchgeführt. Der Filter wurde mit einer radioaktiv markierten 0.9 kb PstI GAPDH-Probe aus pRGAPDH-13 (Fort et al., 1985) zur Ermittlung der eingesetzten mRNA Menge nachhybridisiert. Es ist ein Autoradiogramm dargestellt.

Die Untersuchungen der Rekombinationsfrequenzen zeigten, daß der mit MT-c-Δfos transfizierte 143 tk⁻ Klon eine Rekombinationsfrequenz von 1.0×10^{-4} aufweist. Die CdCl₂-Behandlung hob

diesen Wert leicht an, die Rekombinationsfrequenz betrug hier 1.1×10^{-4} . Nach UV-Bestrahlung (8 J/m^2) stieg dieser Wert auf 2.6×10^{-4} an. Der MT-c-fos-transfizierte 143 tk-Klon hingegen zeigte eine basale Rekombinationsfrequenz von 2.9×10^{-4} , d.h. einen 2.9fach höheren Wert als der MT-c- Δ fos Klon. Nach Überexpression von c-Fos durch CdCl₂-Behandlung stieg die Rekombinationsfrequenz um das 1.8fache an. Die Rekombinationsfrequenz betrug hier 5.3×10^{-4} . Die Behandlung mit UV (8 J/m^2) bewirkte einen Anstieg der Rekombinationsfrequenz um das 2.1fache, auf 6.2×10^{-4} (Tab.15). Bezieht man die Rekombinationsfrequenz der MT-c-fos-transfizierten Zellen nach der CdCl₂-Induktion auf die Rekombinationsfrequenz der MT-c- Δ fos transfizierten Zellen ohne Induktion, so ergibt sich ein Anstieg in der Rekombinationsfrequenz von 5.3fach.

Zell- linie	CdCl ₂ /UV- Behandlg.	Gesamt zahl der Platten	Plattierungs- effizienz (%)	Gesamt- zahl von Tk ⁺ Kolonien	Rekombinat. frequenz (x 10 ⁻⁴)	Indukt. faktor
MT-c- Δ fosC5	-/-	23	21.7	249	1.0	1.0
MT-c- Δ fosC5	+/-	22	19.6	249	1.1	1.1
MT-c- Δ fosC5	-/+	18	9.3	216	2.6	2.6
MT-c-fosC1	-/-	29	14.4	597	2.9	1.0
MT-c-fosC1	+/-	22	12.2	683	5.3	1.8
MT-c-fosC1	-/+	20	6.9	444	6.2	2.1

Tab.15 Überexpression von c-Fos erhöht die Rekombinationsfrequenz in stabil mit MT-c-fos und pJS-3 transfizierten 143 tk- Zellen

Die beiden 143 tk-Klone MT-c-fos C1 und MT-c- Δ fos C5 wurden 24 h nach der Einsaat mit $10 \mu\text{M}$ CdCl₂ behandelt, bzw. nicht behandelt. Nach 10h wurde das Medium gewechselt und die Zellen nach weiteren 16 h in die CHAT-Selektion gegeben (5×10^5 Zellen/Platte). Parallel zur Selektion wurden zur Bestimmung der Plattierungseffizienz Platten mit je 1000 Zellen eingesät. Nach 12 bis 14 d waren die resistenten Kolonien hochgewachsen und wurden gezählt.

Zellen	Dex. behandl. (d)	Gesamtzahl untersuchter Zellen	% aberrante Metaphasen	Gesamtzahl an Zellen mit Aberrationen	Gesamtzahl an Aberrationen	Aberrationen pro Zelle	g'	g''	b'	b''	t	mult.	Induktionsfaktor
untransf.	-	300	14.0	41	64	0.21	-	3	44	15	1	1	1.0
	1	300	16.0	47	78	0.26	1	2	59	14	-	2	1.1
	2	300	15.0	45	58	0.19	-	-	51	6	1	-	1.1
LTR-c-fos	-	400	13.7	55	89	0.22	-	-	70	17	-	2	1.0
	1	400	25.7	103	139	0.35	1	-	101	29	-	8	1.9
	2	300	26.0	77	108	0.36	2	-	94	8	2	2	1.9
LTR-c-Ha-ras	-	400	12.2	49	62	0.16	-	-	52	5	-	5	1.0
	1	300	23.0	69	89	0.30	1	1	75	9	-	3	1.9
	2	400	20.2	81	107	0.27	-	2	86	17	-	2	1.6
LTR-v-mos	-	400	14.2	57	89	0.22	2	2	62	11	1	11	1.0
	1	400	23.5	94	146	0.37	-	2	115	15	1	13	1.6
	2	400	23.2	93	145	0.36	-	4	107	22	1	11	1.6
LTR-c-Δfos	-	300	11.0	33	45	0.15	1	-	41	2	1	-	1.0
	1	300	12.3	37	49	0.16	1	2	41	5	-	-	1.1
	2	300	12.0	36	43	0.14	-	-	41	2	-	-	1.1

Tab.1 Aberrationsfrequenzen und Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen in untransfizierten NIH 3T3 Zellen und in LTR-c-fos, LTR-c-Ha-ras, LTR-v-mos und LTR-c-Δfos Transfektanten. Es wurden die Ergebnisse aus 3-4 unabhängigen Experimenten zusammengefaßt. Pro Experiment wurden 100 Metaphasen ausgewertet. g', Chromatidlücke; g'', Isochromatidlücke; b', Chromatidbruch; b'', Isochromatidbruch; t, Translokation; mult., multiple Aberrationen. Der Induktionsfaktor gibt den Prozentsatz aberranter Metaphasen in Dexamethason-behandelten Zellen im Verhältnis zu dem Prozentsatz aberranter Metaphasen in unbehandelten Zellen an. Die Unterschiede in den Aberrationsfrequenzen zwischen Dexamethason-behandelten und nicht-behandelten Zellen sind in den LTR-c-fos-, LTR-c-Ha-ras- und LTR-v-mos-transfizierten Zellen auf dem 5% Niveau statistisch signifikant, nicht aber in den untransfizierten oder in den LTR-c-Δfos-transfizierten NIH 3T3 Zellen (Test nach Weir).

Zellen	Dex. Behandl.	Gesamtzahl untersuchter Zellen	% aberrante Metaphasen	Gesamtzahl Zellen mit Aberrationen	an Gesamtzahl an Aberrationen	Aberrationen pro Zelle	g'	g''	b'	b''	t	mult.	Induktionsfaktor
LTR-c-fos C2	-	200	10.0	20	25	0.12	-	-	17	8	-	-	1.0
	+	200	13.0	26	31	0.15	-	-	18	13	-	-	1.3
LTR-c-fos C4	-	200	8.5	17	25	0.12	-	-	17	7	-	1	1.0
	+	200	13.0	26	34	0.17	-	-	19	15	-	-	1.5
LTR-c- Δ fos C1	-	200	12.5	25	25	0.12	-	-	13	12	-	-	1.0
	+	200	11.0	22	26	0.13	-	-	12	14	-	-	0.9

Tab.2 Aberrationsfrequenzen und Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen in den zwei stabil mit LTR-c-fos transfizierten Klonen LTR-c-fos C2, bzw. LTR-c-fos C4 und einem stabil mit LTR-c- Δ fos transfizierten NIH 3T3 Klon. Es wurden die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten zusammengefaßt. Pro Experiment wurden 100 Metaphasen ausgewertet. g', Chromatidlücke; g'', Isochromatidlücke; b', Chromatidbruch; b'', Isochromatidbruch; t, Translokation; mult., multiple Aberrationen. Der Induktionsfaktor gibt den Prozentsatz aberranter Metaphasen in Dexamethason-behandelten Zellen im Verhältnis zu dem Prozentsatz aberranter Metaphasen in unbehandelten Zellen an. Die Unterschiede in den Aberrationsfrequenzen zwischen Dexamethason-behandelten und nicht-behandelten Zellen sind in allen drei Klonen auf dem 5% Niveau statistisch nicht signifikant (χ^2 -Test).

Zellen	CdCl ₂ behandl. (10µM)	Gesamtzahl untersuchter Zellen	% aberrante Metaphasen	Gesamtzahl an Zellen mit Aberrationen	Gesamtzahl an Aberrationen	Aberrationen pro Zelle	g'	g''	b'	b''	t	mult.	Induktionsfaktor
untransf.	-	400	10.8	43	54	0.14	-	-	31	22	-	1	1.0
	+	400	15.0	60	92	0.23	-	-	68	18	2	4	1.4
48/3 I	-	300	17.0	51	62	0.21	-	-	36	18	-	8	1.0
	+	300	37.0	111	306	1.02	8	2	212	39	26	9	2.2.
48/3 II	-	400	13.3	53	100	0.25	-	-	39	58	-	2	1.0
	+	400	25.0	100	236	0.59	2	1	138	61	31	6	1.9
76/21 I	-	300	14.7	44	115	0.38	-	1	41	67	1	4	1.0
	+	300	27.3	82	168	0.56	1	7	98	36	17	8	1.8
76/21 II	-	400	22.0	88	131	0.33	-	-	61	61	-	6	1.0
	+	400	37.3	149	266	0.67	13	2	128	82	40	-	1.7

Tab.3 Aberrationsfrequenzen und Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen in untransfizierten NIH 3T3 Zellen und in den MT-c-fos-Transfektanten 48/3 I, 48/3 II, 76/21 I und 76/21 II. Es wurden die Ergebnisse aus 3-4 unabhängigen Experimenten zusammengefaßt. Pro Experiment wurden 100 Metaphasen ausgewertet. g', Chromatidlücke; g'', Isochromatidlücke; b', Chromatidbruch; b'', Isochromatidbruch; t, Translokation; mult., multiple Aberrationen. Der Induktionsfaktor gibt den Prozentsatz aberranter Metaphasen in Cadmiumchlorid-behandelten Zellen im Verhältnis zu dem Prozentsatz aberranter Metaphasen in unbehandelten Zellen an. Die Unterschiede in den Aberrationsfrequenzen zwischen Cadmiumchlorid-behandelten und nicht-behandelten Zellen sind in den MT-c-fos Transfektanten 48/3 I, 48/3 II, 76/21 I und 76/21 II auf dem 5 % Niveau statistisch signifikant, nicht aber in den untransfizierten NIH 3T3 Zellen. Die Unterschiede in den Induktionsfaktoren zwischen Cadmiumchlorid-behandelten NIH 3T3 Zellen und den Cadmiumchlorid-behandelten MT-c-fos Transfektanten 48/3 I, 48/3 II, 76/21 I und 76/21 II sind auf dem 5 % Niveau statistisch signifikant (Test nach Weir).

Zellen	Hitze- schock- behandl.	Gesamtzahl untersuchter Zellen	% aberrante Metaphasen	Gesamtzahl an Zellen mit Aberrationen	Gesamtzahl an Aberra- tionen	Aberrationen pro Zelle	g'	g''	b'	b''	t	mult.	Induktions- faktor.
untransf.	-	300	8.3	25	31	0.10	1	-	23	6	-	-	1.0
	+	300	12.0	36	68	0.23	-	-	52	14	1	1	1.4
QRA 16	-	300	6.0	18	26	0.09	-	-	16	9	-	1	1.0
	+	300	21.3	64	117	0.39	-	-	66	35	4	2	3.5

Tab. 4 Aberrationsfrequenzen und Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen in untransfizierten NIH 3T3 Zellen und in der HSP70-c-Ha-ras-Transfektante QRA 16. Es wurden die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten zusammengefaßt. Pro Experiment wurden 100 Metaphasen ausgewertet. g', Chromatidlücke; g'', Isochromatidlücke; b', Chromatidbruch; b'', Isochromatidbruch; t, Translokation; mult., multiple Aberrationen. Der Induktionsfaktor gibt den Prozentsatz aberranter Metaphasen in Hitzeschock-behandelten Zellen im Verhältnis zu dem Prozentsatz aberranter Metaphasen in unbehandelten Zellen an. Der Anstieg in der Aberrationsfrequenz nach Hitzeschock-Behandlung ist in dem Klon QRA 16, jedoch auch in den untransfizierten Zellen auf dem 5% Niveau statistisch signifikant (Test nach Weir).

Zellen	CdCl ₂ Behndl.	Gesamtzahl untersuchter Zellen	% aberrante Metaphasen	Gesamtzahl an Zellen mit Aberrationen	Gesamtzahl an Aberrationen	Aberrationen pro Zelle	g'	g''	b'	b''	t	mult.	Induktionsfaktor
untransf.	-	200	11.0	22	23	0.11	-	-	12	11	-	-	1.0
	+	200	11.5	23	26	0.13	-	-	11	13	-	2	1.0
MT-c-fos C7	-	200	14.5	29	40	0.20	-	-	33	7	-	-	1.0
	+	200	17.5	35	56	0.28	-	-	37	19	-	-	1.2

Tab.5 Aberrationsfrequenzen und Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen in untransfizierten HeLa tk-Zellen und einem stabil mit MT-c-fos transfizierten HeLa tk-Klon, MT-c-fos C7. Es wurden die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten zusammengefaßt. Pro Experiment wurden 100 Metaphasen ausgewertet. g', Chromatidlücke; g'', Isochromatidlücke; b', Chromatidbruch; b'', Isochromatidbruch; t, Translokation; mult., multiple Aberrationen. Der Induktionsfaktor gibt den Prozentsatz aberranter Metaphasen in Cadmiumchlorid-behandelten Zellen im Verhältnis zu dem Prozentsatz aberranter Metaphasen in unbehandelten Zellen an. Der Anstieg in der Aberrationsfrequenz nach der CdCl₂-Behandlung ist in dem Klon MT-c-fos C7 auf dem 5% Niveau statistisch nicht signifikant (χ^2 -Test).

Zellen	Dex. Behandl.	Gesamtzahl untersuchter Zellen	% aberrante Metaphasen	Gesamtzahl an Zellen mit Aberrationen	Gesamtzahl an Aberrationen	Aberrationen pro Zelle	g'	g''	b'	b''	t	mult.	Induktionsfaktor
neo	-	200	4.0	8	8	0.04	5	-	2	1	-	-	1.0
	+	200	3.5	7	8	0.04	4	-	2	1	-	1	0.9
LTR-c-fos 6C1	-	200	4.0	8	8	0.04	4	-	4	-	-	-	1.0
	+	200	4.5	9	9	0.04	3	-	1	3	-	2	1.1
LTR-c-fos 6C6	-	200	2.5	5	5	0.02	1	-	2	2	-	-	1.0
	+	200	3.5	7	7	0.03	4	-	2	1	-	-	1.4

Tab.6 Aberrationsfrequenzen und Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen in zwei stabil mit LTR-c-fos transfizierten CHO-K1-2 Klonen LTR-c-fos 6C1, bzw. LTR-c-fos 6C6 und einem nur mit pSVneo stabil transfizierten CHO-K-1-2 Klon. Es wurden die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten zusammengefaßt. Pro Experiment wurden 100 Metaphasen ausgewertet. g', Chromatidlücke; g'', Isochromatidlücke; b', Chromatidbruch; b'', Isochromatidbruch; t, Translokation; mult., multiple Aberrationen. Der Induktionsfaktor gibt den Prozentsatz aberranter Metaphasen in Dexamethason-behandelten Zellen im Verhältnis zu dem Prozentsatz aberranter Metaphasen in unbehandelten Zellen an. Die Unterschiede in den Aberrationsfrequenzen nach Dexamethason-Behandlung sind in allen Klonen auf dem 5% Niveau statistisch nicht signifikant (χ^2 -Test).

Zellen	Oligo/Dex. behandl.	Gesamtzahl untersuchter Zellen	% aberrante Metaphasen	Gesamtzahl Zellen mit Aberrationen	Gesamtzahl an Aberra- tionen	Aberrationen pro Zelle	g'	g''	b'	b''	t	mult.	Induktions- faktor	
LTR-Ha-ras	- / -	300	7.0	21	22	0.07	1	-	19	2	-	-	1.0	
	- / +	250	12.0	30	37	0.15	-	1	27	4	-	5	1.7	
	Kontroll. / -	250	10.0	25	34	0.14	-	-	22	8	-	4	1.0	
	Kontroll. / +	200	18.3	47	50	0.25	-	-	36	12	-	2	1.8	
	sof. / -	250	6.7	17	22	0.09	-	-	19	2	-	1	1.0	
	sof. / +	250	7.7	19	23	0.09	-	-	18	2	-	3	1.1	
	LTR-v-mos	- / -	400	7.7	31	35	0.08	-	-	24	-	-	11	1.0
	- / +	400	12.7	51	61	0.15	-	-	48	6	-	7	1.6	
LTR-v-mos	Kontroll. / -	400	8.7	35	38	0.09	-	1	23	5	-	9	1.0	
	Kontroll. / +	400	13.7	55	66	0.16	-	1	37	10	-	18	1.6	
	sof. / -	400	7.0	28	33	0.08	-	-	14	6	-	11	1.0	
	sof. / +	400	9.5	38	44	0.11	-	-	25	7	-	9	1.3	

Tab. 10 Aberrationsfrequenzen und Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen in stabil mit LTR-c-Ha-ras, bzw. LTR-v-mos transfizierten NIH 3T3 Zellen mit und ohne Behandlung mit Oligodeoxynukleotiden (Kontroll., Kontroll-Oligodeoxynukleotid; sof, Antisense-fos-Oligodeoxynukleotid), bzw. mit und ohne Dexamethason-Behandlung. Es wurden die Ergebnisse aus 3-4 unabhängigen Experimenten zusammengefaßt. Pro Experiment wurden 50, bzw. 100 Metaphasen ausgewertet. g', Chromatidlücke; g'', Isochromatidlücke; b', Chromatidbruch; b'', Isochromatidbruch; t, Translokation; mult., multiple Aberrationen. Der Induktionsfaktor gibt den Prozentsatz aberranter Metaphasen in Dexamethason behandelten Zellen im Verhältnis zu dem Prozentsatz aberranter Metaphasen in unbehandelten Zellen an. Die Unterschiede in den Aberrationsfrequenzen zwischen Dexamethason-behandelten und nicht-behandelten Zellen sind ohne Oligodeoxynukleotidgabe und bei Gabe des Kontroll-Oligodeoxy-nukleotids auf dem 5% Niveau statistisch signifikant Die Unterschiede in den Aberrationsfrequenzen zwischen behandelten und nicht-behandelten Zellen ist bei Zugabe des Antisense-fos-Oligodeoxy-nukleotid auf dem 5% Niveau statistisch nicht signifikant (Test nach Weir).

Zellen	Serum Behandl.	Gesamtzahl untersuchter Zellen	% aberrante Metaphasen	Gesamtzahl an Zellen mit Aberrationen	Gesamtzahl an Aberra- tionen	Aberrationen pro Zelle	g'	g''	b'	b''	t	mult.	Induktions- faktor
NIH 3T3	-	300	10.0	30	36	0.12	-	-	28	7	-	-	1.0
	+	300	11.7	35	46	0.15	-	-	36	10	-	2	1.2

Tab.11 Aberrationsfrequenzen und Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen in untransfizierten NIH 3T3 Zellen. Es wurden die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten zusammengefaßt. Pro Experiment wurden 100 Metaphasen ausgewertet. g', Chromatidlücke; g'', Isochromatidlücke; b', Chromatidbruch; b'', Isochromatidbruch; t, Translokation; mult., multiple Aberrationen. Der Induktionsfaktor gibt den Prozentsatz aberranter Metaphasen in Serum-behandelten Zellen im Verhältnis zu dem Prozentsatz aberranter Metaphasen in unbehandelten Zellen an. Der Unterschied in der Aberrationsfrequenz zwischen Serum-behandelten und unbehandelten Zellen ist auf dem 5% Niveau statistisch nicht signifikant (Test nach Weir).

Zellen	Sur./ UV	Gesamtzahl untersuchter Zellen	% aberrante Metaphasen	Gesamtzahl an Zellen mit Aberrationen	Gesamtzahl an Aberra- tionen	Aberrationen pro Zelle	g'	g''	b'	b''	t	mult.	Induktions- faktor
NIH 3T3	- / -	400	15.0	60	64	0.16	-	-	40	23	-	2	1.0
	+ / -	400	18.2	73	75	0.19	-	-	41	36	-	1	1.0
	- / +	400	48.5	194	323	0.81	22	2	148	70	62	9	3.2
	+ / +	400	35.2	141	182	0.45	5	-	102	34	36	5	1.9
CHO-9	- / -	300	7.3	22	25	0.08	7	4	4	9	-	2	1.0
	+ / -	300	5.3	16	18	0.06	4	1	9	4	-	1	1.0
	- / +	300	55.7	167	350	1.17	17	-	113	57	159	4	7.6
	+ / +	300	25.0	75	129	0.43	-	-	56	33	26	8	4.7

85

Tab.12 Aberrationsfrequenzen und Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen in untransfizierten NIH 3T3 Zellen mit und ohne Behandlung mit 0.3 mM Suramin (Sur.), bzw. mit und ohne UV-Behandlung. Die NIH 3T3 Zellen wurden mit 5 J/m², die CHO-9 Zellen mit 20 J/m² bestrahlt. Es wurden die Ergebnisse aus 3, bzw. 4 unabhängigen Experimenten zusammengefaßt. Pro Experiment wurden 100 Metaphasen ausgewertet. g', Chromatidlücke; g'', Isochromatidlücke; b', Chromatidbruch; b'', Isochromatidbruch; t, Translokation; mult., multiple Aberrationen. Der Induktionsfaktor gibt den Prozentsatz aberranter Metaphasen in UV-behandelten Zellen mit und ohne Suramingabe im Verhältnis zu dem Prozentsatz aberranter Metaphasen in unbehandelten Zellen mit und ohne Suramingabe an. Die Unterschiede in den Aberrationsfrequenzen zwischen UV-behandelten und nicht-behandelten Zellen sind auf dem 5% Niveau statistisch signifikant. Die Verringerung UV-induzierter chromosomaler Aberrationen nach Suramingabe ist auf dem 5% Niveau statistisch signifikant (Test nach Weir).

Zellen	Oligo/UV behandl.	Gesamtzahl untersuchter Zellen	% aberrante Metaphasen	Gesamtzahl an Zellen mit Aberrationen	Gesamtzahl an Aberra- tionen	Aberrationen pro Zelle	g'	g''	b'	b''	t	mult.	Induktions- faktor
NIH 3T3	- / -	300	11.3	34	51	0.17	-	-	30	17	-	4	1.0
	Kontroll. / -	300	11.0	33	47	0.16	-	-	29	15	-	3	1.0
	sof. / -	300	14.3	43	81	0.27	2	-	39	36	1	3	1.0
	- / 3 J/m ²	300	46.7	140	461	1.54	4	-	240	56	157	4	4.1
	Kontroll. / 3 J/m ²	300	47.0	141	561	1.87	-	2	300	60	195	4	4.3
	sof. / 3 J/m ²	300	34.3	103	276	0.92	-	-	144	23	108	1	2.4
	- / 5 J/m ²	300	72.3	217	1103	3.68	-	-	547	70	479	-	6.4
	Kontroll. / 5 J/m ²	300	72.0	216	892	2.97	10	2	444	69	367	-	6.5
	sof. / 5 J/m ²	300	50.3	151	559	1.86	5	-	267	45	242	-	3.5

Tab.13 Aberrationsfrequenzen und Verteilung der verschiedenen Aberrationstypen in untransfizierten NIH 3T3 Zellen mit und ohne Behandlung mit Oligodesoxynukleotiden (Kontroll., Kontroll-Oligodesoxynukleotid; sof, Antisense Fos Oligodesoxynukleotid), bzw. mit und ohne UV-Behandlung. Es wurden die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten zusammengefaßt. Pro Experiment wurden 100 Metaphasen ausgewertet. g', Chromatidlücke; g'', Isochromatidlücke; b', Chromatidbruch; b'', Isochromatidbruch; t, Translokation; mult., multiple Aberrationen. Der Induktionsfaktor gibt den Prozentsatz aberranter Metaphasen in UV behandelten Zellen im Verhältnis zu dem Prozentsatz aberranter Metaphasen in unbehandelten Zellen an. Die Unterschiede in den Aberrationsfrequenzen zwischen UV-behandelten und nicht-behandelten Zellen sind ohne Oligodesoxynukleotidgabe und bei Gabe des Kontroll-Oligodesoxynukleotids auf dem 5% Niveau statistisch signifikant. Die Unterschiede in den Aberrationsfrequenzen zwischen UV-behandelten und nicht-behandelten Zellen ist bei Zugabe des Antisense-fos-Oligodesoxynukleotid auf dem 5% Niveau statistisch nicht signifikant (Test nach Weir).

Diskussion

Maligne Tumorzellen haben mehrere genetische Veränderungen durchlaufen, wie z.B. die Aktivierung von dominanten Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Fearon und Vogelstein, 1990). Wie kann man sich die Entstehung von Zellen mit vielen genetischen Veränderungen vorstellen?

Die Mutationsfrequenz von Genen in Säugerzellen beträgt im Mittel 10^{-6} , d.h. unter 10^6 Nachkommen einer Zelle befindet sich eine Zelle, die eine Mutation in einem bestimmten Gen, z.B. in einem Onkogen, trägt. Wenn diese mutierte Zelle sich teilt, befindet sich unter 10^6 Zellen ihrer Nachkommenschaft eine Zelle, die zwei Mutationen trägt. Da sich auch die anderen, nicht mutierten Zellen teilen, beträgt die Gesamtzellpopulation 10^{12} Zellen. Teilt sich diese Zelle mit zwei Mutationen weiter, wird eine Zelle entstehen, die drei Mutationen trägt, u.s.w. Wenn man davon ausgeht, daß für die Entstehung einer malignen Tumorzelle drei Ereignisse notwendig sind, so benötigt man rein rechnerisch 10^{18} Zellen, um eine maligne Tumorzelle zu finden. Bei dieser Überlegung hat die Aktivierung eines Onkogens keinen Einfluß auf die Mutationsrate der Zellen, die ein aktiviertes Onkogen tragen. Man kann sich aber auch vorstellen, daß die Expression eines aktivierten Onkogens die Bereitschaft der Zellen zu mutieren heraufsetzt. Es würde dann weniger Zellgenerationen erfordern, um eine vollständig transformierte Zellen entstehen zu lassen. Da der menschliche Organismus nur ca. 10^{14} Zellen aufweist, wäre aus den oben genannten Berechnungen zu schlußfolgern, daß spontan nie Tumorzellen mit drei Mutationsereignissen entstehen können. Daß dies aber nicht der Fall ist, wäre ein Hinweis darauf, daß die spontane Tumorentstehung durch Ereignisse, wie beispielsweise die Expression eines aktivierten Onkogens, beschleunigt werden kann. Wie kann man das prüfen?

In NIH 3T3 Zelllinien, die aktivierte Onkogen-Konstrukte hinter induzierbaren Promotoren tragen, kann die Expression der Onkogene nach Belieben induziert werden. Da die Onkogen-Konstrukte stabil transfiziert sind, müssen sie zur Überexpression lediglich induziert werden. Somit sind Bedingungen gegeben, die dem Zustand in vivo, in dem die Zellen Onkogene als Antwort auf Streß überexprimieren, sehr stark ähneln. Mit einem solchen Testsystem kann untersucht werden, ob die Überexpression von Onkogenen die genomische Stabilität beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit ist mit Hilfe derartiger transgener Zelllinien gezeigt worden, daß die Onkogenüberexpression tatsächlich die chromosomale Stabilität beeinflusst: Nach Überexpression der c-

fos-, v-mos- oder c-Ha-ras-Onkoproteine stieg die Frequenz chromosomaler Aberrationen um das zwei-bis dreifache an. Die Frequenz von Genmutationen stieg nach Überexpression von c-Fos um das zwei- bis siebenfache und die Frequenz von Rekombinationsereignissen um das zweifache an. Eine andere Arbeitsgruppe fand kürzlich, daß die erhöhte Expression des Ras-Genprodukts, p21, mit einer Zunahme an abnormen Mitosen in Verbindung steht: Nach Überexpression von Ras durch Dexamethason-Induktion in LTR-ras-transfizierten Zellen traten veränderte Chromosomen in verschiedenen Mitosephasen auf. Außerdem war die Morphologie und die Feinstruktur der Zellen verändert. Diese mitotischen und strukturellen Veränderungen ließen sich durch Entfernen von Dexamethason revertieren. Die Gruppe schließt aus ihren Ergebnissen, daß p21 eine bedeutende Funktion während der Mitose und in frühen Stadien der neoplastischen Transformation übernimmt (Hagag et al., 1990). Die vorliegende Arbeit geht über diese Schlußfolgerung hinaus, indem für c-Ras-induzierte chromosomale Aberrationen eine Schlüsselstellung von c-Fos gezeigt wurde.

Das aktivierte Onkogen c-fos erhöht sowohl die Häufigkeit chromosomaler Aberrationen wie auch die Häufigkeit von Genmutationen und Rekombinationsereignissen. Ist es vorstellbar, daß c-Fos auch an Mutagen-induzierten genetischen Veränderungen, wie z.B. an der UV-induzierten Mutagenese beteiligt ist?

Die Bestrahlung mit UV-Licht induziert dosisabhängig chromosomale Aberrationen. Daneben führt UV-Bestrahlung zu einer deutlichen Akkumulation von c-fos-mRNA und c-Fos-Protein. Die Behandlung mit Suramin verringert die UV-induzierte Akkumulation von c-fos-mRNA und gleichzeitig die Häufigkeit UV-induzierter chromosomaler Aberrationen. Mit Hilfe von Antisense-fos-Oligodesoxynukleotiden konnte gezeigt werden, daß c-Fos zumindest für die Entstehung eines Teils der UV-induzierten Aberrationen verantwortlich ist: die Verarmung von NIH 3T3 Zellen an c-Fos-Protein durch Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide reduziert die Menge UV-induzierter Aberrationen um ca. 30%. Das c-Fos-Protein ist demnach nicht nur an der Erzeugung spontaner Aberrationen, sondern auch an der UV-induzierten Mutagenese beteiligt.

Sind c-fos, c-Ha-ras und v-mos die einzigen Onkogene, von denen bekannt ist, daß sie genetische Veränderungen induzieren?

Die Antwort auf diese Frage bedarf weiterer Untersuchungen. Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, konnte 1987 eine Arbeitsgruppe zeigen, daß die Onkogene v-myc oder Polyoma "large T-Antigen" zytogenetische Veränderungen, wie Schwester-

chromatidaustausche und abnorme Karyotypen induzieren (Cerni et al., 1987). Der Nachteil bei diesen Untersuchungen ist jedoch der, daß die verwendeten Zelllinien nach Transfer der Onkogene auf den transformierten Phänotyp hin selektioniert worden waren, so daß nicht klar war, ob die Erhöhung der chromosomalen Instabilität direkt auf die Expression der Onkogene zurückzuführen ist. In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen stabil mit induzierbaren Onkogenen transfizierte Zellen verwendet, wodurch die Wirkung der überexprimierten Onkogene direkt getestet werden konnte.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigen, daß c-Fos eine Schlüsselrolle bei der Induktion genetischer Veränderungen spielt. Wie sieht die Abhängigkeit der Aberrations-Induktion von der in der Zelle vorkommenden c-Fos-Menge aus? Einige meiner Daten sprechen dafür, daß schon geringfügige Änderungen im Niveau des c-Fos-Spiegels Aberrations-induzierend sein können:

Stabil mit LTR-c-fos, bzw. MT-c-fos transfizierte Zellen exprimierten nach Aktivierung des Promotors große Mengen an c-Fos über einen langen Zeitraum (mindestens 8 Stunden). Die individuell ausgetesteten Zellklone unterschieden sich aber in der absoluten Menge an synthetisierter c-fos-mRNA: die MT-c-fos transfizierten NIH 3T3 Klone 76/21 I und II exprimierten deutlich mehr c-fos-mRNA als die MT-c-fos-transfizierten NIH 3T3 Klone 48/3 I und II. Trotzdem zeigten alle Klone einen ähnlichen Anstieg in der Frequenz chromosomaler Aberrationen nach c-Fos-Induktion. Dies ist ein Hinweis darauf, daß schon die Klone 48/3 I und II sättigende c-Fos-Mengen enthalten.

Für die Induktion chromosomaler Aberrationen nach Überexpression der Onkogenprodukte c-Ha-Ras oder v-Mos ist keine übermäßige oder lang andauernde c-Fos-Expression erforderlich: die c-fos-mRNA-Akkumulation ist hier nur transient und nicht stärker als nach der Behandlung mit einem physiologischen Faktor, wie z.B. Serum. Das Verhindern der c-Fos-Expression durch Antisense-fos-Oligodesoxynukleotide hemmt die c-Ha-Ras- und v-Mos-induzierten Aberrationen fast vollständig. Bedeutet dies, daß die c-Fos-Induktion durch c-Ha-ras und v-Mos allein für die Erhöhung der chromosomalen Aberrationen verantwortlich ist oder liefern c-Ha-Ras und v-Mos einen bisher unbekanntem zweiten Beitrag? Hierzu gehört dann auch die Frage, warum Serum, das klassische Beispiel für ein c-Fos-induzierendes Substanzgemisch, nicht zur Induktion von Chromosomen-Aberrationen führt.

Die Antwort auf diese Fragen ist zum jetzigen Zeitpunkt zwangsläufig spekulativ. Führen v-Mos, c-Ha-Ras und Serum zu einer c-Fos-Akkumulation, die in der Kinetik, in der c-Fos Menge und in der post-translationalen Modifikation von c-Fos nicht

unterscheidbar ist, induzieren jedoch nur v-Mos und c-Ha-Ras, nicht aber Serum Aberrationen, dann gibt es zwei plausible, sich nicht ausschließende Erklärungen: (1) c-Ha-Ras, bzw. v-Mos induzieren ein zweites Ereignis, das mit c-Fos bei der Induktion von Chromosomen-Aberrationen kooperiert. Es würde sich hier dann um einen klassischen Fall von Onkogen-Kooperation handeln (Überblick, siehe Hunter, 1991). Soweit man heute weiß, liegen allerdings c-Ha-Ras, v-Mos und c-Fos auf ein und demselben Signalübertragungsweg, der an der Membran beginnt und im Zellkern mit der Aktivierung von c-Fos endet. Da aber heute noch nicht alle Querverbindungen zwischen den Signalen bekannt sind, ist die Möglichkeit einer Kooperation von c-Ha-Ras und v-Mos mit c-Fos bei der Induktion der Aberrationen nicht auszuschließen. (2) Serum induziert zusammen mit c-Fos einen inhibitorischen Faktor, der die Induktion von Aberrationen durch c-Fos hemmt. Weitere Experimente, in denen z.B. zum Zeitpunkt der v-Mos oder c-Ha-Ras Aktivierung eine Serum-Behandlung erfolgt, sind notwendig, um diese Fragen zu klären.

Ein weiterer Hinweis, daß schon geringe Mengen an c-Fos zur Induktion von genomischen Veränderungen führen können, ergibt sich aus einem anderen Befund meiner Arbeit:

Die spontane Frequenz von Rekombinationsereignissen und Genmutationen bei den mit c-fos transfizierten Zellen lag weitaus höher als bei den untransfizierten Kontrollzellen. Die Rekombinations-Untersuchungen wurden mit Zellen durchgeführt, in denen das c-fos-Gen durch den MT-Promotor kontrolliert wurde. Wahrscheinlich ist die im Medium vorhandene Schwermetallionenkonzentration ausreichend, den MT-Promotor zur Induktion der c-fos-Menge zu veranlassen, die für die Erhöhung der Rekombinationsfrequenz notwendig ist. Die Genmutations-Untersuchungen wurden mit LTR-c-fos-transfizierten Zellen durchgeführt. Auch hier ist es vorstellbar, daß der Promotor ohne Induktion nicht ganz still ist und eine Menge an c-fos mRNA konstitutiv synthetisiert wird, die zwar in der Northern-Blotting-Analyse nicht nachweisbar ist, jedoch die Zahl der Genmutationsereignisse anhebt.

Der Mechanismus, nach dem in Abhängigkeit von der c-Fos Expression Chromosomen- und Genmutationen entstehen, ist noch ungeklärt. Es ist denkbar, daß Prozesse, die mit der Synthese oder der Neuordnung von DNA zu tun haben, wie die Replikation oder die Rekombination eine Rolle spielen. Daneben könnten c-Fos-abhängige Proteine die Bildung von Radikalen, wie OH·, bewirken, welche chromosomale Schäden verursachen. Außerdem ist es vorstellbar, daß das Fos-Protein Reparaturprozesse in der Zelle behindert oder hemmt, so daß Schadensereignisse auf der DNA in Mutationen umgewandelt werden. Die Wirkungsweise des c-Fos Proteins bei a)

der Replikation, b) der Rekombination, c) der Radikalbildung und d) der Reparatur kann man sich folgendermaßen vorstellen:

a) Um während der Replikation die genetische Information präzise weitergeben zu können, haben prokaryontische und eukaryontische Zellen drei verschiedene Mechanismen entwickelt: die Selektion des korrekten Desoxynukleosidtriphosphats bei der Polymerisierungsreaktion (Basenselektion), das exonukleolytische Entfernen eines inkorrekt inserierten Desoxynukleosidmonophosphats vom Ende der wachsenden Kette ("Editing") und die postreplikative Exzision eines inkorrekt inserierten Desoxynukleosidmonophosphats nachdem die DNA-Polymerase die DNA-Kette verlängert hat ("Mismatch-Reparatur"). Es ist vorstellbar, daß die DNA-Polymerase (Loeb et al., 1974) oder andere Enzyme, die an den oben beschriebenen Mechanismen beteiligt sind, als Folge der c-Fos-Überexpression fehlerhaft arbeiten, so daß während der Replikation oder der Reparatur Basenfalschpaarungen entstehen, die in Mutationen umgewandelt werden können (Echols und Goodman, 1991).

b) Mitotische Rekombinationsereignisse können durch Agenzien, die die DNA schädigen oder mit der DNA-Synthese interferieren, wie ultraviolette oder ionisierende Strahlung, Methyl-Methansulfonat, Hydroxyharnstoff und Mitomycin C ausgelöst werden. Dabei scheint die Fähigkeit zur Exzisionsreparatur einen Einfluß auf die Rekombinationsfrequenz zu haben: Zellen, die nicht zur Exzisionsreparatur von Pyrimidindimeren befähigt sind, weisen eine höhere Frequenz von UV-induzierten Rekombinationsereignissen auf als Zellen, die diese Reparatur leisten können (Kunz und Haynes, 1981). Die mitotische Rekombination spielt wahrscheinlich auch eine Rolle in bestimmten menschlichen Tumoren: Mutationen im Retinoblastom (Rb)1-Lokus sind rezessiv, d.h. sie wirken sich nur bei der Inaktivierung des normalen Allels aus. Eine solche Inaktivierung kann durch Chromosomenfehlverteilungen ("Non-Disjunction") oder durch Rekombinationsereignisse während der Mitose entstehen (Cavane et al., 1983). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Überexpression des c-Fos-Genprodukts die Frequenz von Rekombinationsereignissen erhöht. Das c-Fos-Protein könnte über die Induktion von Rekombinationsereignissen die genomische Stabilität beeinflussen, indem es Proteine, die an dem Rekombinationsprozeß beteiligt sind, aktiviert. Dies könnte zu einem fehlerhaften Ablauf der Rekombination führen. Daneben ist es vorstellbar, daß das c-Fos Protein die Fähigkeit von Zellen zur Reparatur von DNA-Schäden herabsetzt. Als Folge beider Prozesse könnten Mutationen und/oder Chromosomenaberrationen entstehen.

c) Atmende Zellen können aus molekularem Sauerstoff freie Radikale erzeugen: Bei der Reduktion des Sauerstoffs entstehen nacheinander Superoxid Radikale (O_2^-), Hydrogen Peroxide (H_2O_2),

Hydroxyl Radikale ($\text{OH}\cdot$), und letztendlich Wasser. Diese Zwischenprodukte sind sehr reaktiv. Beispielsweise können Superoxid Radikale an einer Vielzahl biologisch wichtiger Moleküle Veränderungen durchführen. Hierzu gehören u.a. die Peroxidation von Lipiden, die Depolymerisierung von Polysacchariden und die Bildung von Strangbrüchen in der DNA. Unter physiologischen Bedingungen ist die Konzentration der Radikale sehr gering. Dies wird über eine Reihe zellulärer Enzyme erreicht, wie die Superoxid-Dismutase, die Katalase oder die Glutathion-Peroxidase, welche als Antioxidanzien wirken, indem sie die Entstehung von Radikalen verhindern oder sie in ungefährliche Produkte umwandeln. Die clastogene Wirkung des Tumorpromotors TPA kann von bestimmten Antioxidanzien unterdrückt werden (Emerit et al., 1983). Vermutlich ist TPA über den oxidativen Abbau der Arachidonsäure an der Induktion chromosomaler Aberrationen beteiligt. Dies spricht, gemeinsam mit dem Befund, daß TPA in einigen Zellsystemen eine unphysiologisch hohe Menge an Radikalen induziert, dafür, daß TPA indirekt über die Bildung von Radikalen die DNA schädigen kann. Da die Überexpression des c-Fos-Genproduktes ebenfalls chromosomale Aberrationen induziert und TPA-Behandlung die c-fos-mRNA-Synthese erhöht, ist vorstellbar, daß das c-Fos-Protein einen Teil der TPA-induzierten Schäden vermittelt. Diese Vermittlung könnte durch die Bildung von Radikalen oder durch die Inaktivierung von Enzymen, die an der Beseitigung der Radikale beteiligt sind, geschehen.

Ein Weg, über den c-Fos zur Bildung von Radikalen beitragen könnte, läuft möglicherweise über die Bildung von Wachstumsfaktoren, die ihrerseits durch Bindung an ihre Rezeptoren die Bildung von Radikalen induzieren und DNA-Schäden verursachen können. Auf diese Möglichkeit einer extrazellulären Schleife weisen Experimente hin, in denen gezeigt wurde, daß Suramin die UV-induzierte c-fos-Akkumulation und die UV-induzierten chromosomalen Aberrationen verringert. Da bekannt ist, daß Suramin die Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und Liganden blockiert, sind als Erklärung für diesen Effekt folgende Reaktionswege vorstellbar: UV-Licht induziert die c-fos-mRNA-Synthese, woraufhin Fos-abhängige Proteine, wie z.B. Wachstumsfaktoren, aktiviert werden. Diese können in einer extrazellulären Schleife aus der Zelle sekretiert werden und an eigene Rezeptoren oder an die Rezeptoren von Nachbarzellen binden, wodurch ein Signalübertragungsprozeß in den Zellen in Gang gesetzt wird, der letztendlich zu der Entstehung von Chromosomen- und Genmutationen führt. Die Bindung der Fos-abhängigen Proteine an Rezeptoren könnte durch Suramin blockiert werden. Zweitens besteht die Möglichkeit, daß Suramin in die Zelle eindringt und die intrazellulären Wechselwirkungen zwischen dem Fos-abhängigen Protein und einem intrazellulären

Rezeptor verringert. Solche autokrinen extra- und intrazellulären Schleifen sind in der Literatur bereits beschrieben worden (Yayon und Klagsbrun, 1990).

d) Der DNA-Reparaturprozeß ist von der Art der zu reparierenden DNA-Schäden abhängig. Bei der "Exzisionsreparatur" von Basenschäden unterscheidet man im wesentlichen drei Schritte: Zuerst wird durch DNA-Reparaturnukleasen der geschädigte DNA-Strang erkannt und hydrolytisch entfernt: Die veränderte Base wird durch eine DNA-Glykosylase entfernt. Danach wird die Phosphodiester-Bindung durch eine Endonuklease geöffnet und eine kurze Folge von Nukleotiden exonukleolytisch entfernt. Nach der Entfernung der geschädigten Nukleotide kopiert eine DNA-Polymerase die korrekte Information von dem intakten Schwesterstrang und eine DNA-Ligase verbindet das neu synthetisierte DNA-Fragment mit dem Rest-DNA-Molekül. Das c-Fos Protein könnte störend in diesen Prozeß eingreifen, indem es die Erkennung von DNA-Schäden durch Interaktion mit den DNA-Glykosylasen verhindert, so daß die Schäden nicht behoben werden. Daneben könnte das c-Fos-Protein -wie oben bei der Replikation beschrieben- die Genauigkeit der DNA-Polymerase vermindern und zu Falscheinbauten führen. Diese Falscheinbauten führen dann nach der nächsten Replikation zu Mutationen.

Die Diskussion dieser Arbeit zeigt, daß der von mir entdeckte, grundsätzliche Befund, nämlich, daß Onkogen-Überexpression zur Induktion chromosomaler Instabilität führt, eine große Zahl neuer Fragen aufwirft. Da diese Fragen aber experimentell zugänglich sind, hoffe ich, daß auch der zugrunde liegende Mechanismus in den nächsten Jahren aufgeklärt werden kann.

Literaturverzeichnis

Alwine, J.C., Kemp, D.J. und Stark, G.R. (1977)

Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxy-methyl paper and hybridization with DNA probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5350-5354

Andrews, G.K., Harding, M.A., Calvet, J.P. und Adamson, E.D. (1987)

The heat shock response in HeLa cells is accompanied by elevated expression of the c-fos proto-oncogene. Mol. Cell. Biol. 7: 3452-3458

Angel, P., Rahmsdorf, H.J., Pöting, A. und Herrlich, P. (1985)

c-fos mRNA levels in primary human fibroblasts after arrest in various stages of the cell cycle. Cancer Cells 3: 315-319

Angel, P., Pöting, A. Mallick, U., Rahmsdorf, H.J., Schorpp, M. und Herrlich, P. (1986)

Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. Mol. Cell. Biol. 6: 1760-1766

Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. (1987)

12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. Mol. Cell. Biol. 7: 2256-2266

Aviv, H. und Leder, P. (1972)

Purification of mouse immunoglobulin heavy chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408-1412

Baker, R.M., Brunette D.M., Mankovitz, R., Thompson, L.H., Whitmore, G.F., Siminovitch, L. und Till, J.E. (1974)

Ouabain-resistant mutants of mouse and hamster cells in culture. Cell 1: 9-21

Baldwin, G.S. (1985)

Epidermal growth factor precursor is related to the translation product of the Moloney sarcoma virus oncogene mos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1921-1925

Balmain, A. und Brown, K. (1988)
Oncogene activation in chemical carcinogenesis. *Advances in Cancer Research* 51: 147-182

Betsholtz, C., Johansson, A., Heldin, C.-H. und Westermark, B. (1986)

Efficient reversion of simian sarcoma virus-transformation and inhibition of growth factor-induced mitogenesis by suramin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6440-6444

Bhattacharyya, N.P., Maher, V.M. und McCormick, J.J. (1990)
Intrachromosomal homologous recombination in human cells which differ in nucleotide excision-repair capacity. *Mut.Res.* 234: 31-41

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523

Bishop, J.M. (1983)
Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 301-354

Blair, D.G., Oskarsson, M., Wood, T.G., McClements, W.L., Fischinger, P.J. und Vande Woude (1981)
Activation of the transforming potential of a normal cell sequence: a molecular model for oncogenesis. *Science* 212: 941-943

Booher, R.N., Alfa, C.E., Hyams, J.S. und Beach, D.H. (1989)
The fission yeast *cdc2/cdc13/suc1* protein kinase: Regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell* 58: 485-497

Bos, J.L. (1988)
The *ras* gene family and human carcinogenesis. *Mutation Res.* 195: 255-271

Büscher, M., Rahmsdorf, H.J., Litfin, M., Karin, M. und Herrlich, P. (1988)

Activation of the *c-fos* gene by UV and phorbol ester: different signal transduction pathways converge to the same enhancer element. *Oncogene* 3: 301-311

Capon, D.J., Chen, E.Y., Levinson, A.D., Seeburg, P.H. und Goeddel, D.V. (1983)

Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 303: 33-37

Cavane, W.K., Drya, T.P., Phillips, R.A., Benedict, W.F., Godbout, R., Gallie, B.L., Morphree, A.L., Strong, L.C. und White, R.L. (1983)
Expresion of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305: 779-784

Cerni C., Mougneau, E. und Cuzin, F. (1987)
Transfer of "Immortalizing" Oncogenes into rat fibroblasts induces both high rates of sister chromatid exchange and appearance of abnormal karyotypes. *Exp. Cell Res.* 168: 439-446

Chang, E.H., Furth, M.E., Scolnick und Lowy, D.R. (1982)
Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 297: 479-483

Chen, C. und Okayama, H. (1987)
High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2745-2752

Chiu, R., Boyle, W., Meek, W.J., Smeal, T., Hunter, T. und 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

Chu, E.H.Y. (1965)
Effects of ultraviolet radiations on mammalian cells. I. Induction of chromosome aberrations. *Mutation Res.* 2: 75-94

Cifone, M. und Fidler, I.J. (1981)
Increasing metastatic potential is associated with increasing instability of clones isolated from murine neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6949-6952

Coffey, R.J., Leaf, E.B., Shipley, G.D. und Moses, H.L. (1987)
Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells. *J. Cell. Physiol.* 132: 143-148

Cohen, S.N., Chang, A.C. und Hsu, L. (1972)
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2110-2114

Collett, M.S. und Erikson, R.L. (1978)
Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2021-2024

- Corcoran, L.M., Cory, S. und Adams, J.M. (1985)
Transposition of the immunoglobulin heavy chain enhancer to the myc oncogene in a murine plasmacytoma. *Cell* 40: 71-79
- Curran, T. und Teich, N.M. (1982)
Identification of a 39.000 dalton protein in cells transformed by the FBJ osteosarcoma virus. *Virology* 116: 221-235
- Curran, T., Peters, G., Van Beveren, C., Teich, N.M. and Verma, I.M. (1982)
FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *J. Virol.* 44: 674-682
- Curran, T. (1988)
The fos proto-oncogene. In the *Oncogene Handbook*, E.P. Reddy, A.M. Skalka and Curran, T., eds. (New York: Elsevier): 307-327
- DeClercq, E. (1979)
Suramin: a potent inhibitor of the reverse transcriptase of RNA tumor viruses. *Cancer Lett.* 8: 9-22
- Denhardt, D.T. (1966)
A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 23: 641-646
- Dhar, R., Ellis, Shih, T.Y., R.W., Oroszlan, S., Shapiro, B., Maizel, J., Lowy, D., Scolnick, E. (1982)
Nucleotide sequence of the p21 transforming protein of Harvey murine sarcoma virus. *Science* 217: 934-937
- Distel, R.J., Ro, H.-S., Rosen, B.S., Groves, D.L. und Spiegelmann, B.M. (1987)
Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of c-fos. *Cell* 49: 835-844
- Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, K.C., Aaronson, S.A. und Antoniades, H.N. (1983)
Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 221: 275-277
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scarce, G., Toft, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J. und Waterfield, M.D. (1984)
Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncoprotein sequences. *Nature* 307: 521-527

Draetta, G., Luca, F., Westendorf, J., Brizuela, L., Ruderman, J. und Beach, D. (1989)

cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: Evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 56: 829-838

Echols, H. und Goodman, M.F. (1991)

Fidelity mechanisms in DNA replication. *Ann. Rev. of Biochem.* 60: 477-511

Emerit, I., Levy, A. und Cerutti, P. (1983)

Suppression of tumor promoter phorbolmyristate acetate-induced chromosome breakage by antioxidants and inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Mutation Res.* 110: 327-335

Färber, B., Petrussevska, R.T., Fusenig, N.E. und Kinzel, V. (1989)

Cytogenic effects caused by phorbol ester tumor promoters in HeLa cells: mechanistic aspects. *Carcinogenesis* 10: 2345-2350

Fearon, E.R. und Vogelstein, B. (1990)

A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767

Finkel, M.P., Biskis, B.O. und Jinkins, P.B. (1966)

Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science* 151:698-701

Fornace, Jr. A.J., Schalch, H. und Alamo, Jr.I. (1988)

Coordinate induction of metallothioneins I and II in rodent cells by UV irradiation. *Mol. Cell. Biol.* 8: 4716-4720

Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., Elsabrouty, S., Dani, S., Jeanteur, P. und Blanchard, J.M. (1985)

Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* 13: 1431-1442

Foulds, L. (1958)

The natural history of cancer. *J. Chronic Dis.* 8: 2-37

Franza Jr., B.R., Rauscher III, F.J., Josephs, S.F. und Curran, T. (1988)

The fos complex and fos related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science* 239: 1150-1153

- German, J. (1983)
Chromosomal changes and the clonal evolution of cancer. In German, J. (ed.) Chromosome and Cancer. John Wiley & Sons, Inc., New York: 267-285
- Gibbs, J.M., Sigal, I.S., Poe, M und Scolnick, E.M. (1984)
Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5704-5708
- Goldmann, D.S., Kiessling, A.A., Millette, C.G. und Cooper, G.M. (1987)
Expression of c-mos RNA in germ cells of male and female mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4509-4513
- Gonda, T.J. und Metcalf, D. (1984)
Expression of myb, myc and fos proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukaemia. Nature 310: 249-251
- Gorman, C.M., Merlino, G.T., Willingham, M.C., Pastan, I. und Howard, B.H. (1982)
The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eucaryotic cells by DNA-mediated tranfection. Proc. Natl. Acad. USA 79: 6777-6781
- Goustin, A.S., Leof, E.B., Shipley, G.D. und Moses, H.L. (1986)
Growth factors and cancer. Cancer Res. 46: 1015-1029
- Graham, F.L. und van der Eb, A.J. (1973)
A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology 52: 456-467
- Gritz, L. und Davies, J. (1983)
Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae. Gene 25: 179-188
- Groner, B., Hynes, N.E., Rahmsdorf, U. und Ponta, H. (1983)
Transcription initiation of transfected mouse mammary tumor virus LTR DNA is regulated by glucocorticoid hormones. Nucleic Acids Res: 4713-4725
- Hagag, N., Diamond, L., Palermo, R. und Lyubsky, S. (1990)
High expression of p21 correlates with increased rate of abnormal mitosis in NIH 3T3 cells. Oncogene 5: 1481-1489

- Hanahan, D. (1986)
Techniques for the transformation of E.coli. In "DNA cloning". (D.M. Glover, Ed.) IRL Press, Oxford, 1: 109-135
- Hanahan, D. (1988)
Dissecting multistep tumorigenesis in transgenic mice. *Ann. Rev. Genet.* 22: 479-519
- Harel-Bellan, A. Ferris, D.K., Vinocour, M., Holt, J.T. und Farrar, W.L. (1988)
Specific inhibition of c-myc protein biosynthesis using an antisense synthetic deoxy-oligonucleotide in human T lymphocytes. *J. Immunol.* 140, 2431-2435
- Heikkila, R., Schwab, G., Wickstrom, E., Loke, S.L., Pluznik, D.H., Watt, R. und Neckers, L.M. (1987)
A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S-phase but not progress from G₀ to G₁. *Nature* 328: 445-449
- Heldin, C.-H. und Westermark, B. (1984)
Growth factors: Mechanism of action and relation to oncogenes. *Cell* 37: 9-20
- Herzog, N.K., Ramagli, L.S. und Arlinghaus, R.B. (1989)
Somatic cell expression of the c-mos protein. *Oncogene* 4: 1307-1315
- Hill, R.P. (1990)
Tumor progression: Potential role of unstable genomic changes. *Cancer Metastasis Rev.* 9: 137-147
- Hirt, B. (1967)
Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* 26: 365-369
- Hollander, M.C. und Fornace, Jr., A.J. (1989)
Induction of fos RNA by DNA-damaging agents. *Cancer Res.* 49: 1687-1692
- Holt, J.T., Gopal, T.V., Moulton, A.D. und Nienhus (1986)
Inducible production of c-fos anti-sense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4794-4798

Holt, J.T., Redner, R.L. und Nienhuis, A.W. (1988)
An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 8: 963-973

Hunt, C. und Morimoto, R.I. (1985)
Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6455-6459

Hunter, T. (1991)
Cooperation between oncogenes. *Cell* 64: 249-270

Hynes, N.E., van Ooyen, A., Kennedy, N., Herrlich, P., Ponta, H. und Groner, B. (1983)
Subfragments of the large terminal repeat cause glucocorticoid-responsive expression of mouse mammary tumor virus and of an adjacent gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3637-3641

Jaggi, R., Salmons, B., Muellener, D. und Groner, B. (1986)
The v-mos and H-ras oncogene expression represses glucocorticoid hormone-dependent transcription from the mouse mammary tumor virus LTR. *EMBO J.* 5: 2609-2616

Jenuwein, T., Müller, D., Curran, T. und Müller, R. (1985)
Extended life span and tumorigenicity of nonestablished mouse connective tissue cells transformed by the fos oncogene of FBR-MuSV. *Cell* 41: 629-637

Jenuwein, T. und Müller, R. (1987)
Structure-function analysis of Fos protein: a single amino acid change activates the immortalizing potential of v-fos. *Cell* 48: 647-657

Jindahl, H.K., Anderson, C.W., Davis, W.A. und Vishwanatha, J.K. (1990)
Suramin affects DNA synthesis in HeLa cells by inhibition of DNA polymerases. *Cancer Res.* 50: 7754-7757

Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.-K., Cato, A.C.B., Gebel, S., Ponta, H. und Herrlich, P. (1990)
Anti-tumor promotion and anti-inflammation: Downmodulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62: 1189-1204

Kaina, B. (1989)

Chromosomal aberrations as a contributing factor for tumor promotion in the mouse skin. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 9: 331-348

Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Richards, R.I., Krauter, P., Westphal, H.M. und Beato, M. (1984)

Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature* 308: 513-519

Karin, M. (1985)

Metalloproteins: Proteins in search of function. *Cell* 41: 9-10

Kawai, S. und Nishizawa, M. (1984)

New procedure for DNA transfection with polycation and dimethylsulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* 4: 1172-1174

Kerr, L.D., Holt, J.T. und Matrisian, L.M. (1988)

Growth factor regulate transin gene expression by c-fos dependent and c-fos independent pathways. *Science* 242: 1424-1427

Keshet, E., Rosenberg, M.P., Mercer J.A., Probst F., Vande Woude, G.F., Jenkins, N.A. und Copeland, N.G. (1988)

Developmental regulation of ovarian-specific Mos expression. *Oncogene* 2: 235-240

Kunz, B.A. und Haynes, R.H. (1981)

Phenomenology and genetic control of mitotic recombination in yeast. *Ann. Rev. Genet.* 15: 57-89

Land, H., Parada, L.F. und Weinberg, R.A. (1983)

Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304: 596-602

LaRocca, R.V., Meer, J., Gilliat, R.W., Stein, C.A., Cassidy, J., Myers, C.E. und Dalakas, M.C. (1990)

Suramin-induced polyneuropathy. *Neurology* 40: 954-960

Lautenberger, J.A., Ulsh, L., Shih, T. und Papas, T.S. (1983)

High-level expression in *Escherichia coli* of enzymatically active Harvey murine sarcoma virus p21 ras protein. *Science* 221: 858-860

Leder, P.J., Pattey, G., Lenoy, C., Moulding, W., Murphy, H., Potter, T., Stewart, T. und Taub, R. (1983)

Translocation among antibody in human cancer. *Science* 222: 765-771

Lewin, B. (1991)

Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors. *Cell* 64: 303-312

Ling, V., Chambers, A.F., Harris, J.F. und Hill, R.P. (1985)

Quantitative genetic analysis of tumor progression. *Cancer metastasis Rev.* 4: 173-194

Liskay, R.M., Stachelek, J.L. und Letsou, A. (1984)

Homologous recombination between repeated chromosomal sequences in mouse cells. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 49: 183-189

Loeb, L.A., Springgate C.F. und Battula, N. (1974)

Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. *Cancer research* 34: 2311-2321

Loke, S.L., Stein, C.A., Zhang, X.H., Mori, K., Nakanishi, M., Subasinghe, C., Cohen, J.S. und Neckers, L.M. (1988)

Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3474-3478

Lucibello, F.C., Neuberger, M., Hunter, J.B., Jenuwein, T., Schuermann, M., Wallich, R., Stein, B., Schönthal, A., Herrlich, P. und Müller, R. (1988)

Transactivation of gene expression by fos protein: Involvement of a binding site for the transcription factor AP-1. *Oncogene* 3: 43-51

Mai, S., Stein, B., van den Berg, S., Kaina, B., Lücke-Huhle, C., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J., Krämer, M., Gebel, S. und Herrlich, P. (1989)

Mechanisms of the ultraviolet response in mammalian cells. *J. Cell Science* 94: 609-615

Marshall C.J. (1991)

How does p21^{ras} transform cells? *TIG* 7: 91-95

Miller, A.D., Curran, T. und Verma, I.M. (1984)

C-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell* 36: 51-60

Mitsuya, H., Popvic, M., Yarchoan, R., Matsushita, S., Gallo, R.C. und Broder, S. (1984)

Suramin protection of T cells in vitro against infectivity and cytopathic effect of HTLV-III. *Science* 226: 172-174

Müller, R., Verma, I.M. und Adamson, E. (1983)

Expression of c-onc genes: c-fos transcripts accumulate to high levels during development of mouse placenta, yolk sac and amnion. *EMBO J.* 2: 679-684

Müller, R., Müller, D. und Guilbert, L. (1984)

Differential expression of c-fos in hematopoietic cells: correlation with differentiation of monomyelocytic cells in vitro. *EMBO J.* 3: 1887-1890

Müller, R., Curran, T., Müller, D. und Guilbert, L. (1985)

Induction of c-fos during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation. *Nature* 314: 546-548

Murray, A.W. und Kirschner, M.W. (1989)

Dominoes and clocks: The union of two views of the cell cycle. *Science* 246: 614-621

Mutter, G.L. und Wolgemuth, D.J. (1987)

Distinct developmental patterns of c-mos protooncogene expression in female and male mouse germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5301-5305

Nicolson, G.L. (1987)

Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype: From oncogene to oncofetal expression. *Cancer Res.* 47: 1473-1487

Nishikura, K. und Murray J.M. (1987)

Antisense RNA of proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 7: 639-549

Nishizuka, Y. (1984)

The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308: 693-698

Nowell, P.C. und Hungerford, D.A. (1960)

A minute chromosome in human granulocytic leucemia. *Science* 132: 125-132

Nowell, P.C. (1976)

The clonal evolution of tumor cell population. Acquired genetic lability permits stepwise selection of variant sublines and underlies tumor progression. *Science* 194: 23-28

Nowell, P.S. (1986)

Mechanism of tumor progression. *Cancer Res.* 46: 2203-2207

Offringa, R., Gebel, S., van Dam, H., Timmers, M., Smits., A., Zwart, R., Stein, B., Bos, J.L., van der Eb, A. und Herrlich, P. (1990)

A novel function of the transforming domain of E1A: repression of AP-1 activity. *Cell* 62: 527-538

Oksala, T. und Therman, E. (1979)

Mitotic abnormalities and cancer. In: German (ed.), *Chromosomes and Cancer*, 239-263. New York: John Wiley & Sons. Inc.

Oshimura, M., Gilmer, T.M. und Berraett, J.C. (1985)

Nonrandom loss of chromosome 15 in Syrian hamster tumours induced by v-Ha-ras plus v-myc oncogenes. *Nature* 316: 636-639

Palmiter R.D.und Brinster, R.L. (1986)

Germ line transformation of mice. *Ann. Rev. Genet.* 20: 465-499

Papkoff, J., Verma, I.M. und Hunter, T. (1982)

Detection of a transformed gene product in cells transformed by moloney murine sarcoma virus. *Cell* 29: 417-426

Papkoff, J., Nigg, E. und Hunter, T. (1983)

The transforming protein of Moloney Murine Sarcoma Virus is a soluble cytoplasmic protein. *Cell* 33: 161-172

Pathak, S. (1989)

Cytogenetic abnormalities in cancer: with special emphasis on tumor heterogeneity. *Cancer and Metastasis. Rev.* 8: 299-318

Paules, R.S., Probst, F., Dunn, K.J., Blair, D.G., Kaul, K., Palmer, A.E. und Vande Woude (1988)

Primate c-mos proto-oncogene structure and expression: transcription initiation both upstream and within the gene in a tissue-specific manner. *Oncogene* 3: 59-68

Paules, R.S., Buccione, R., Moschel, R.C., Vande Woude, G.F. und Eppig, J.J. (1989)

Mouse Mos protooncogene product is present and functions during oogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5395-5399

Peden, K.W.C., Pipas, J.M., Pearson-White, S. und Nathans, D. (1980)
Isolation of mutants of an animal virus in bacteria. *Science* 209:
1392-1396

Petrusevska, R.T., Fürstenberger, G., Marks, F. und Fusenig, N.
(1988)

Cytogenetic effects caused by phorbol ester tumor promoters in
primary mouse keratinocyte cultures: correlation with the
convertogenic activity of TPA in multistage skin carcinogenesis.
Carcinogenesis 9: 1207-1215

Ponta, H., Günzburg, W.H., Salmons, B., Groner, B. und Herrlich, P.
(1985a)

Mouse mammary tumor virus: a proviral gene contributes to the
understanding of eukaryotic gene expression and mammary
tumorigenesis. *J. Gen.Virol.* 64: 567-577

Ponta, H., Kennedy, N., Skroch, P., Hynes, N.E. und Groner, B.
(1985b)

Hormonal response region in the mouse mammary tumor virus
long terminal repeat can be dissociated from the proviral
promoter and has enhancer properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
82: 1020-1024

Probst, F. und Vande Woude, G.F. (1985)

Expression of c-mos proto-oncogene transcripts in mouse tissues.
Nature 315: 516-518

Probst, F., Rosenberg, M.P., Iyer, A., Kaul, K. und Vande Woude, G.F.
(1987)

C-mos proto-oncogene RNA transcripts in mouse tissues: structural
features, developmental regulation, and localization in specific cell
types. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1629-1637

Rahmsdorf, H.J., Schönthal, A., Angel, P., Litfin, M., Rütger, U. und
Herrlich, P. (1987)

Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA' expression. *Nucl.*
Acids Res. 15, 1643-1659

Raymond, V., Atwater, J.A. und Verma, I.M. (1989)

Removal of an mRNA destabilizing element correlates with the
increased oncogenicity of proto-oncogene fos. *Oncogene Res.* 5: 1-
12

Riabowol, K.T., Vosatka, R.J., Ziff, E.B., Lamb, N.J. und Feramisco, J.R. (1988)

Microinjection of Fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1670-1676

Rieger, R. und Michaelis, A. (1967)

Chromosomenmutationen. *Genetik-Grundlagen, Ergebnisse und Probleme in Einzeldarstellungen. Beitrag 6*, VEB Gustav-Fischer-Verlag, Jena

Rowley, J.D. (1973)

A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrinefluorescence and giemsa staining. *Nature* 243: 290-293

Rüther, U., Wagner, E.F. und Müller, R. (1985)

Analysis of the differentiation-promoting potential of inducible c-fos genes introduced into embryonal carcinoma cells.

EMBO J. 4: 1775-1781

Sagata, N., Oskarsson, M.K., Copeland, T., Brumbaugh, J. und Vande Woude F. (1988)

Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Nature* 335: 519-525

Sagata, N., Daar, I., Oskarsson, M., Showalter, S.D. und VandeWoude, G.F. (1989a)

The product of the mos proto-oncogene as a candidate "initiator" for oocyte maturation. *Science* 245: 643-646

Sagata, N., Nobumoto, W., Vande Woude G.F. und Ikawa, Y. (1989b)
The c-mos proto-oncogene is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342: 512-518

Salomon, D.S. und Perrotean, J. (1986)

Growth factors in cancer and their relationship to oncogenes. *Cancer Invest.* 4: 43-60

Schendel, P. F. und Michaeli, I. (1984)

A model for the mechanism of alkylation mutagenesis. *Mutation Res.* 125: 1-14

Schmidt, M., Oskarsson, M., Dunn, J.K., Blair, D.G., Hughes, S., Probst, F. und Vande Woude, G.F. (1988)

Chicken homolog of the mos proto-oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 8: 923-929

Schönthal, A. (1988)
Die Schlüsselrolle des nukleären fos-Onkogens im molekularen Signaltransfer. Dissertation. Universität Karlsruhe, F.R.G.

Schönthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H.J. und Ponta, H. (1988)
Requirement of fos expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* 54: 325-334

Seidman, M.M., Dixon, K., Razzaque, A., Zagursky, R und Bergman, M.L. (1985)
A shuttle vector plasmid for studying carcinogen-induced point mutations in mammalian cells. *Gene* 38: 233-237

Seidman, M. (1989)
The development of transient SV40 based shuttle vectors for mutagenesis studies: problems and solutions. *Mutation Res.* 220: 55-60

Sherr, C.J., Rettenmier, C.W., Sacca, R., Roussel, M.F., Look, A.T. und Stanley, E.R. (1985)
The c-fms protooncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell* 41: 665-676

Shih, C., Shilo, B.-Z., Goldfarb, M.P., Dannenberg, A. und Weinberg, R.A. (1979)
Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5714-5718

Singer, B. (1979)
N-Nitrosoalkylating agents: Formation and persistence of alkyl derivatives in mammalian nucleic acids as contributing factors in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 62: 1329-1339

Sjölund, M. und Thyberg, J. (1989)
Suramin inhibits binding and degradation of platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cells but does not interfere with the autocrine stimulation of DNA-synthesis. *Cell tissue Res.* 256: 35-43

Slamon, D.J., deKernion J.B., Verma, I.M. und Cline, M.J. (1984)
Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science* 224: 256-262

- Southern, P.J. und Berg, P. (1982)
Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under the control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genetics* 1: 327-341
- Stacey, D.W., Watson, T., Kung, H.-F und Curran, T. (1987)
Microinjection of transforming ras proteins induces c-fos expression. *Mol. Cell. Biol.* 7: 523-527
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. und Vogt, P.K. (1976)
DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260: 170-173
- Stein, C.A., LaRocca, R.V., Thomas, R., McAtee, T.N. und Myers, C.E. (1989)
Suramin: an anticancer drug with a unique mechanism of action. *J. Clin. Oncol.* 7: 499-508
- Stein, C.A. und Cohen, J.S. (1988)
Oligodeoxynucleotides as inhibitors of gene expression: a review. *Cancer Res.* 48: 2659-2668
- Strauss, M., Lübbe, L., Kiessling, U., Platzer, M. und Griffin, B.E. (1989)
The mutagenic and immortalizing potential of polyoma virus large T antigen. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 144: 129-134
- Theile, M. und Strauss, M. (1977)
Mutagenesis by simian virus 40. *Mutation Res.* 45: 111-123
- Trahey, M. und McCormick, F. (1987)
A cytoplasmatic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238: 542-545
- Treisman R. (1985)
Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos3' sequences. *Cell* 42: 889-902
- Treisman, R. (1986)
Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* 46: 567-574

Turner, D.R., Morley, A.A., Haliandros, M., Kutlaca, R. und Sanderson, B.J. (1985)

In vivo somatic mutations in human lymphocytes frequently result from major gene alterations. *Nature* 315: 343-345

Van Beveren, C., Van Straten, F., Galleshan, J.A. und Verma, I.M. (1981)

Nucleotide sequence of the genome of a murine sarcoma virus. *Cell* 27: 97-108

Verrier, B., Müller, D. und Müller, R. (1986)

Wounding a fibroblast monolayer results in the rapid induction of the c-fos proto-oncogene. *EMBO J.* 5: 913-917

Viskochil, D., Buchberg, A. M., Xu, G., Cawthon, R.M., Stevens, J., Wolff, R.K., Culver, M., Carey, J.C., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., White, R. und O'Connell, P. (1990)

Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 62: 187-192

Vlassov, V.V., Godovikov, A.A., Kobetz, N.D., RYTE, A.S., Yurchenko, L.V. und Bukrinskaya, A.G. (1985)

Nucleotide and oligonucleotide derivatives as enzyme and nucleic acid targeted irreversible inhibitors. *Biochemical aspects. Adv. Enzyme Regul.* 24, 301-320

Wallace, M.R., Marchuk, D.A., Andersen, L.B., Letcher, R., Odeh, H.M., Saulino, A.M., Fountain, J.W., Brereton, A., Nicholson, J., Mitchell, A.L., Brownstein, B.H. und Collins, F.S. (1990)

Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 249: 181-186

Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J. und Evans, R.M. (1986)

The c-erb A-gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324: 641-646

Weir, J.B. (1960)

Significance of the difference between two means when the population variances may be unequal. *Nature* 187: 438

Wickstrom, E.L., Bacon, E.L., Gonzalez, T.A., Freeman, D.L. Lyman, G.H. und Wickstrom, E. (1988)

Human promyelocytic leukemia HL-60 cell proliferation and c-myc protein expression are inhibited by an antisense pentadecadeoxynucleotide targeted against c-myc mRNA. Proc. Natl.Acad. Sci. USA 85: 1028-1032

Willingham, M.C., Pastan, I., Shih, T.Y. und Scolnick, E.M. (1980)

Localization of the src gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. Cell 19: 1005-1014

Yakubov, L.A., Deeva, E.A., Zarytova, V.F., Ivanova, E.M., Ryte, A.S., Yurchenko, L.V. und Vlassov, V.V. (1989)

Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: Involvement of specific receptors? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6454-6458

Yarden, Y., Escobedo, J.A., Knang, W.-J., Yang-Feng, T.L., Daniel, T.O., Tremble, P.M., Chen, E.Y., Ando, M.E., Harkins, R.N., Francke, U., Fried, V.A., Ullrich, A. und Williams, L.T. (1986)

Structure of the receptor of platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. Nature 323: 226-232

Yayon, A. und Klagsbrun, M. (1990)

Autocrine transformation by chimeric signal peptide-basic fibroblast growth factor: Reversal by suramin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5346-5350