



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5627B

**Reparatur von Methylierungs-
schäden der DNA:
Konstitutive Expression und
Induzierbarkeit der O⁶-Methyl-
guanin-DNA-Methyltransferase
und der N-Methylpurin-DNA-
Glykosylase in Säugerzellen**

Th. Grombacher
Institut für Genetik

Juli 1995

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5627 B

**Reparatur von Methylierungsschäden der DNA:
Konstitutive Expression und Induzierbarkeit der
O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase und der
N-Methylpurin-DNA-Glykosylase in Säugerzellen**

Thomas Grombacher
Institut für Genetik

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1995

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

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Alkylierende Agenzien sind potente Mutagene und Karzinogene. Sie sind in der Umwelt weit verbreitet und erlangten auch medizinische Bedeutung als Cytostatika in der Tumorthherapie. Ihre toxische und mutagene Wirkung entfalten sie durch Reaktion mit der DNA. Die Reparatur von durch Alkylantien induzierte DNA-Schäden wird maßgeblich durch zwei Proteine vermittelt: der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) und der N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG). Die MGMT entfernt Alkylgruppen von der O⁶-Position des Guanins, indem sie diese auf ein eigenes Cystein überträgt. Die MPG ist Teil des Exzisionsreparatursystems von modifizierten Basen und entfernt N-Methylpurine aus der DNA. Beide Reparaturproteine kommen bei Bakterien wie auch bei Säugern vor. Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen befaßten sich mit der konstitutiven Expression und Induzierbarkeit der MGMT und der MPG in Säugerzellen.

Durch vergleichende Experimente mit unterschiedlich differenzierten Ratten-Hepatomzelllinien (H5, H4IIE, H4IIEC3/T, H4IIEC3/G⁻ und Fao) und primären Ratten-Hepatozyten konnte gezeigt werden, daß die basale MGMT-Expression auf mRNA- und Aktivitätsebene mit der Expression des leberspezifischen Enzyms Tyrosin-Aminotransferase (TAT) korreliert. Für die MPG war eine solche Korrelation nicht nachzuweisen. In primären Hepatozyten und Zellen der differenzierten Zelllinie H4IIE wurde eine relativ starke (etwa 6-fache) Induktion der MGMT-Expression nach Mutagenbehandlung (Röntgenstrahlen, N-Methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidin kurz MNNG) beobachtet. In Zellen der dedifferenzierten Zelllinie H5 konnte keine MGMT-Induktion nachgewiesen werden. Für die anderen Zelllinien (H4IIEC3/T, H4IIEC3/G⁻ und Fao) wurde keine Korrelation zwischen TAT-Expression und der Höhe der MGMT-Induktion gefunden. Die im Vergleich zur H5- und H4IIEC3/T-Zelllinie differenzierteren Zelllinien H4IIEC3/G⁻ und Fao zeigten auf mRNA- und Proteinebene nur eine geringe MGMT-Induktion.

Die MPG wurde in allen untersuchten Hepatomzelllinien relativ gleichmäßig exprimiert. Die Expression der MPG in Zellen der dedifferenzierten Zelllinie H5 war ebenso hoch wie in der differenzierten Zelllinie H4IIE. In primären Hepatozyten wurde allerdings eine wesentlich höhere MPG-Aktivität beobachtet als in den untersuchten Hepatomzelllinien. Eine Induktion der MPG-Aktivität durch die o.g. Mutagene konnte nur in H4IIE-Zellen beobachtet werden.

In H4IIE-Zellen wurde die Induzierbarkeit der an der Exzisionsreparatur beteiligten Enzyme MPG, AP-Endonuklease, Polymerase β und Ligase sowie die der MGMT auf mRNA-Ebene

vergleichend untersucht. Die Induktion der MGMT-mRNA durch MNNG und Röntgenstrahlen erfolgte in diesen Zellen dosisabhängig, wobei die maximale Induktion durch Röntgenbestrahlung nach 24 Stunden, durch MNNG-Behandlung aber erst nach 72 Stunden beobachtet wurde. Die an der Basen-Exzisionsreparatur beteiligten Enzyme MPG, Polymerase β und Ligase zeigten auf mRNA-Ebene nach Behandlung der Zellen mit Mutagen-Dosen, die zu einer mehr als vierfachen MGMT-Induktion führten, keine Induktion. Bei der AP-Endonuklease allerdings wurde nach Röntgenbestrahlung eine etwa zweifach gesteigerte mRNA-Expression festgestellt. Durch das künstliche Glucocorticoidhormon Dexamethason ließ sich nicht nur die MGMT-mRNA-Expression, sondern auch die der AP-Endonuklease induzieren. Im Gegensatz dazu nahm die mRNA-Menge der MPG nach der Hormonbehandlung deutlich ab.

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit des menschlichen MGMT-Gens wurde erstmals der isolierte menschliche MGMT-Promotor (Harris et al., 1991) verwendet, der in Form eines Promotor-Reportergen-Konstrukts (MGMT-CAT) in H4IIE-Rattenzellen und in menschliche HeLa-Zellen transient transfiziert wurde. Die anschließenden Reportergenanalysen (Chloramphenicol-Acetyltransferase-Tests) zeigten, daß die Aktivität des menschlichen MGMT-Promotors durch Mutagene (MNNG, MMS, γ -Strahlen), durch den Tumorpromotor TPA, durch Forskolin, einem Aktivator der Adenylatcyclase, und durch Dexamethason induzierbar ist. In H4IIE-Zellen, deren endogenes MGMT-Gen durch Mutagene induziert wird und die somit offensichtlich die für die Induktion notwendigen Transkriptionsfaktoren exprimieren, fand eine Induktion der Promotoraktivität des menschlichen MGMT-Gens durch die o.g. Mutagene statt. Der menschliche MGMT-Promotor wurde in H4IIE- und HeLa-Zellen auch durch Dexamethason und in menschlichen HeLa-Zellen darüber hinaus durch TPA und Forskolin aktiviert. Möglicherweise werden nur in HeLa-Zellen die für die Induktion der Promotoraktivität durch TPA, einem Aktivator der Proteinkinase C, und Forskolin erforderliche(n) Transkriptionsfaktor(en) exprimiert, denn in H4IIE-Zellen konnte der menschliche MGMT-Promotor durch diese Substanzen nicht aktiviert werden.

Um die transkriptionelle Regulation des MPG-Gens der Ratte genauer zu untersuchen, wurde der Promotorbereich des MPG-Gens aus einer Cosmid-Genbank der Ratte mit Hilfe einer cDNA-Sonde isoliert. Die Sequenzanalyse ergab, daß der Promotor zur Klasse der GC-reichen Promotoren ohne „TATA-Box“ gerechnet werden kann. Seine GC-reiche Sequenz wird von einem 77 Basenpaare langen Adenin-reichen Bereich in zwei Hälften geteilt. Der Promotor besitzt potentielle Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren AP-2, AP-3, c-Myc, Ets-1, NF- κ B, PEA 3, Sp1 sowie eine potentielle Bindestelle für den Glucocorticoid-Rezeptor und eine

„CCAAT-Box“. Es wurden MPG-Promotor-CAT-Konstrukte hergestellt und bezüglich ihrer Promotoraktivität in H4IIE-Zellen getestet. Die Reporteranalysen ergaben eine Induktion der MPG-Promotoraktivität durch UV-Licht und TPA. Dagegen war der Promotor weder durch methylierende Agenzien (MNNG, MMS) noch durch ionisierende Strahlen aktivierbar. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß nicht nur DNA-schädigende Agenzien, sondern auch Behandlung der Zellen mit Tumorpromotoren und Hormonen eine Induktion von DNA-Reparaturgenen bewirken. Außer der MGMT sind auch die in der Exzisionsreparatur geschädigter Basen involvierten Enzyme MPG und AP-Endonuklease in Ratten-Leberzellen induzierbar.

Repair of methylation damages of the DNA:

Constitutive expression and inducibility of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and the N-methylpurine-DNA glycosylase in mammalian cells

Abstract

Alkylating agents are potent mutagens and carcinogens. They are widely distributed in the environment and also possess medical importance as cytostatics in tumor therapy. Their toxic and mutagenic effects are mediated through reactions with DNA. Mainly two proteins carry out the repair of DNA damages induced by alkylating agents: O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) and N-methylpurine-DNA-glycosylase (MPG). MGMT removes alkyl groups from the O⁶-position of guanine by transferring them to a cysteine group of its own. MPG removes N-methylpurines from DNA as part of the base-excision-repair pathway. Both repair proteins are found in bacteria and mammals. Investigations concerning constitutive expression and inducibility of MGMT and MPG in mammalian cells are subjects of the present thesis.

Constitutive mRNA expression and activity of MGMT in rat hepatoma cells exhibiting different status of differentiation (H5, H4IIE, H4IIEC3/T, H4IIEC3/G⁻, Fao) and primary rat hepatocytes correlated with the expression of the liver specific expressed tyrosine aminotransferase (TAT). MPG showed no such correlation. In primary hepatocytes and in well differentiated H4IIE hepatoma cells MGMT expression was comparatively strong inducible (6-fold) by mutagen treatment (X-ray, N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine = MNNG). No induction was found in dedifferentiated H5 cells. The induction level in the other cell lines investigated (H4IIEC3/T, H4IIEC3/G⁻, Fao) was not correlated with the TAT expression. Induction of MGMT-mRNA expression and MGMT-activity in the well differentiated cell lines H4IIEC3/G⁻ and Fao was weak and less than in the more dedifferentiated cell line H4IIEC3/T. Expression of MPG in all hepatoma cell lines showed only slight variations. Dedifferentiated H5 cells and differentiated H4IIE cells expressed MPG nearly to the same extent. However MPG activity was much higher in primary rat hepatocytes than in hepatoma cell lines. Induction of MPG activity through the mentioned mutagens was observed in H4IIE cells only.

In H4IIE cells inducibility of enzymes involved in the excision repair pathway, that are MPG, AP endonuclease, polymerase β and ligase, was compared with MGMT inducibility on mRNA level. Induction of MGMT mRNA expression by MNNG and X-rays was dose and time

dependent. Maximal induction was observed 24 h after X-ray treatment but not before 72 h after MNNG treatment. Mutagen treatment, that lead to a more than fourfold induction of MGMT expression, did not lead to induction of mRNA expression of MPG, polymerase β and ligase, that are involved in base excision repair. AP-endonuclease mRNA expression however was induced twofold by X-rays. Treatment with the synthetic glucocorticoid hormone dexamethason lead to an increase not only of MGMT mRNA expression but also of AP endonuclease expression. In contrast mRNA level of MPG was significantly reduced.

Inorder to investigate the inducibility of the human MGMT gene for the first time the isolated MGMT promoter (Harris et al., 1991) was used. It was transiently transfected in H4IIE rat cells and human HeLa cells as a promoter-reportergene-construct (MGMT-CAT). Reportergene analysis (chloramphenicol acetyltransferase assays) showed induction of the MGMT promoter activity after treatment with the mutagenes MNNG, MMS, X-ray, the tumorpromoter TPA, the adenylate cyclase activator forskolin and dexamethasone. In H4IIE rat cells, which show induction of endogenous MGMT expression after mutagene treatment and hence express transcription factors that are necessary for induction of the rat gene, the human MGMT promoter activity was induced by the above mentioned mutagens. In both H4IIE cells and HeLa cells promoter activity was also enhanced by dexamethasone and in human HeLa cells additionally by TPA and forskolin. Only in HeLa cells the protein kinase C activator TPA and forskolin lead to an increase of promoter activity whereas in H4IIE cells activity was not enhanced by these agents. Most likely only HeLa cells express transcription factor(s) necessary for induction by these agents whereas H4IIE cells do not.

For further investigations of the transcriptional regulation of the MPG gene the promoter region of the gene was isolated out of a rat cosmid library using a cDNA probe. Sequence analysis of the isolated promoter region revealed the absence of a TATA box and abundance of GC basepairs. The GC-rich promoter sequence is divided in two halves by a 77 basepairs long adenine-rich stretch. The MPG promoter has potential binding sites for the transcription factors AP-2, AP-3, c-Myc, Ets-1, NF- κ B, PEA 3, Sp1 and for the glucocorticoid receptor. It also has a putative CCAAT box. MPG-promoter-CAT-constructs were made and tested for their activity. The activity of the promoter was inducible by UV-light and TPA. In contrast promoter activity was not enhanced by methylating agents (MNNG, MMS) or ionizing radiation.

The data presented in this thesis for the first time showed induction of DNA repair genes by non DNA damaging agents like tumor promoters and hormones. Beside the repair protein MGMT the enzymes MPG and AP-endonuclease involved in excision repair of damaged bases are inducible in rat liver cells.

Abkürzungen

A	Adenin
AAAF	N-Acetoxy-2-acetylaminofluoren
abs.	absolut
AMP ^r	Ampizillin-Resistenz
AP	apurine/apyrimidinische
APE	apurine/apyrimidinische Endonuklease
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
β-Gal	β-Galactosidase
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Serumalbumin des Rinds)
C	Cytosin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie (Aktivität einer radioaktiven Substanz: 1 Ci = 3,7x10 ¹⁰ Zerfälle/Sekunde)
CIA	Chloroform/Isoamylalkohol (25:1)
CNU	Chlorethylnitrosourea (Chlorethylnitrosoharnstoff)
cpm	<i>counts per minute</i> (Zählwerte pro Minute)
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
DEN	N,N-Diethylnitrosamin
Dex	Dexamethason
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMN	N,N-Dimethylnitrosamin
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dpm	<i>disintegrations per minute</i> (radioaktive Zerfälle pro Minute)

dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamino-tetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
Fors	Forskolin
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i> (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie)
g	Erdbeschleunigung (9,8 m/s ²)
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GRE	<i>glucocorticoid responsive element</i> (Bindestelle des Glucocorticoid-Rezeptors)
Gy	Gray (Einheit der Energiedosis: 1 Gy = 1 J/kg)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IF	Induktionsfaktor
kb	Kilobasen
Lig	Ligase
LMP-Agarose	<i>low melting point</i> -Agarose (Agarose mit niederem Schmelzpunkt)
MeA	Methyladenin
MeG	Methylguanin
Mex ⁻	MGMT defizient
Mex ⁺	MGMT profizient
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MMS	Methylmethansulfonat
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MNU	Methylnitrosourea (Methylnitrosoharnstoff)
MPG	N-Methylpurin-DNA-Glykosylase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
NaAcetat	Natriumacetat
NaCitrat	Natriumcitrat
n.d.	nicht detektierbar
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm

PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PB	Phenobarbital
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
Pol β	Polymerase β
poly A	Polyadenylierungssignal
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RSV	Rous Sarkoma Virus
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natrium-Lauroylsulfat)
SV40	Simian Virus 40
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (thermophiles Bakterium)
TAT	Tyrosin-Aminotransferase
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N.N.N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i> (Transfer-Ribonukleinsäure)
U	units (Enzymaktivitätseinheit 1U = Enzymmenge, die 1 μg Substrat pro Minute umsetzt)
UV	Ultraviolette Strahlung
X-ray	Röntgenstrahlung

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Abstract

Abkürzungen

Einleitung 1

Material 13

Methoden 18

1. Kultivierung etablierter Zelllinien.....18

1.1. Behandlung von Zellen mit Alkylantien, TPA und Forskolin.....18

1.2. Bestrahlung von Zellen19

1.3. Dosis-Effekt-Versuche19

1.4. Transiente Transfektion durch Kalziumphosphat Kopräzipitation19

2. Kultivierung von primären Ratten-Hepatozyten als Sphäroide.....20

2.1. Isolierung von Ratten-Hepatozyten.....20

2.1.1. Perfusion der Rattenleber20

2.1.2. Anreicherung vitaler Hepatozyten21

2.2. Sphäroidbildung und Kultivierung22

2.3. Behandlung von Sphäroiden mit Alkylantien und Tumorpromotoren.....22

2.4. Bestrahlung von Sphäroiden mit Röntgenstrahlen22

3. Kultivierung von *E.coli*-Bakterien22

3.1. Transformation von *E.coli* Bakterien23

3.1.1. Elektroporation.....23

3.1.1.1. Präparation der Zellen23

3.1.1.2. Transformation23

3.1.2. Transformation mit Kalziumchlorid (verändert nach Maniatis et al., 1982).....23

3.1.2.1. Herstellung kompetenter Zellen.....23

3.1.2.2. Transformation23

4. Herstellung von Gesamtzellextrakt aus Säugerzellen.....24

5. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford24

6. Messung von Enzymaktivitäten24

6.1. O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase Aktivität.....24

6.2. Methylpurin-DNA-Glykosylase Aktivität25

6.3. Chloramphenicol-Acetyltransferase Aktivität26

6.4. β -Galaktosidase Aktivität27

7. Präparation von Nukleinsäuren	28
7.1. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	28
7.1.1. Präparation kleiner Mengen	28
7.1.2. Präparation großer Mengen.....	28
7.2. Präparation von RNA aus Säugerzellen.....	28
8. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
9. Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren	29
9.1. Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	29
9.1.1. DNA.....	29
9.1.2. RNA.....	29
9.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	30
10. Nachweis von Nukleinsäurefragmenten durch Blot- und Hybridisierungstechniken.....	30
10.1. Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen (Southern-, Northern-Blot).....	30
10.2. Herstellung radioaktiver DNA-Sonden.....	30
10.3. Hybridisierung von Nukleinsäuren und Autoradiographie	31
11. Isolierung von DNA-Sequenzen aus einer Cosmidgenbank durch „Kolonie-Hybridisierung“	32
12. Klonierung von DNA in E.coli.....	33
12.1. Restriktion von DNA.....	33
12.2. DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	33
12.3. Modifizierungen von fragmentierter DNA.....	33
12.3.1. Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	33
12.3.2. Herstellung von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden (<i>blunt ends</i>).....	34
12.4. Ligation.....	34
13. <i>In vitro</i> Synthese von DNA	35
13.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mittels Taq-Polymerase.....	35
13.2. Synthese durch Reverse Transkription	35
14. S1-Nuklease-Protektionsanalyse.....	36
15. Sequenzierung von DNA.....	36
Ergebnisse.....	38
1. Basale und induzierte Expression der MGMT und der MPG in Hepatomzelllinien und in primären Hepatozyten der Ratte	38
1.1. Basale Expression der MGMT und MPG in Ratten-Leberzellen	39
1.1.1. Basale MGMT- und MPG-Aktivität.....	39
1.1.2. Basale MGMT- und MPG-mRNA Expression.....	41
1.2. Expression der MGMT und der MPG nach Einwirkung DNA schädigender Agenzien.....	43
1.2.1. Induzierbarkeit der MGMT.....	44
1.2.2. Induzierbarkeit der N-Methylpurin-DNA-Glykosylase.....	46

1.3. Expression der MGMT und MPG nach Behandlung von primären Ratten-Hepatozyten mit dem Tumorpromotor Phenobarbital	47
1.4. Sensitivität der Ratten-Hepatoma-Zellen gegenüber der toxischen Wirkung von Alkylantien.....	48
2. Untersuchungen zur Induzierbarkeit von Genen der DNA-Exzisionsreparatur und des MGMT-Gens in H4IIE Ratten-Hepatoma-Zellen.....	52
2.1. Expression von DNA-Reparaturgenen in H4IIE-Zellen nach Behandlung mit Mutagenen.....	52
2.1.1. Abhängigkeit der MGMT- und MPG-mRNA-Expression von der Mutageninduktion	52
2.1.2. Expression von Reparaturgenen nach Einwirkung von Röntgenstrahlen.....	54
2.1.3. Expression von Reparaturgenen nach Behandlung mit MNNG	56
2.2. DNA-Reparaturgene sind in der Ratten-Hepatoma-Zelllinie H4IIE durch Dexamethason induzierbar	58
3. Analyse der Induzierbarkeit des menschlichen MGMT-Promotors	61
3.1. Aktivität des menschlichen MGMT-Promotors in der Ratten-Hepatoma-Zelllinie H4IIE nach Einwirkung DNA-schädigender Agenzien	63
3.1.1. Der menschliche MGMT-Promotor ist in H4IIE-Rattenzellen aktiv	63
3.1.2. Der menschliche MGMT-Promotor wird in H4IIE-Rattenzellen aktiviert	64
3.2. Die Promotoraktivität des humanen MGMT-Gens ist durch TPA, Forskolin und Dexamethason induzierbar	65
4. Isolierung und Charakterisierung des MPG-Promotors der Ratte.....	68
4.1. Isolierung eines genomischen Fragments des MPG-Gens aus einer Cosmid-Genbank der Ratte.....	68
4.2. Kartierung eines Cosmids mit genomischen MPG-Sequenzen.....	69
4.3. Sequenzierung des potentiellen Promotorbereichs des MPG-Gens der Ratte	71
4.4. Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes des MPG-Gens der Ratte.....	72
4.5. Funktionelle Charakterisierung des potentiellen Promotorbereichs des MPG-Gens der Ratte.....	75
4.5.1. Charakterisierung des MPG-Promotors durch Reportergen-Analysen.....	75
4.5.2. Potentielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen im MPG-Promotor	77
4.5.3. Die Aktivität des klonierten MPG-Promotors ist induzierbar	78
Diskussion	81
Literaturverzeichnis	98

Einleitung

Seit Charles Darwin wissen wir, daß Variationen innerhalb einer Art und Selektionsdruck durch die Lebensbedingungen Grundvoraussetzungen für evolutive Vorgänge sind. Die Variation der Merkmale einer Art geht u.a. auf Veränderungen (Mutationen) im Erbgut zurück. Träger der Erbinformation ist die Desoxyribonukleinsäure (DNA). Wenngleich also Mutationen der DNA eine der Voraussetzungen für evolutive Vorgänge sind, so haben sie doch in der Mehrzahl ungünstige Effekte. Das wird verständlich, wenn man sich die Komplexität eines Organismus vor Augen hält. Die DNA ist die Vorlage für die Synthese einer Vielzahl von Strukturproteinen und Enzymen, die den Bauplan und die Stoffwechselfvorgänge eines Organismus steuern. Die dabei ablaufenden komplexen Prozesse reagieren sehr anfällig auf Störungen, wie z.B. auf die veränderte Struktur der beteiligten Enzyme. Die Organismen können daher nur eine geringe Zahl an mutagenen Läsionen in kodierenden (oder regulatorischen) DNA-Bereichen ohne Gefahr für ihr Überleben oder das ihrer Nachkommen tolerieren

Alkylierende Agenzien sind toxisch, mutagen und karzinogen

Die DNA besitzt reaktive Stickstoff- und Sauerstoffatome, die mit elektrophilen Substanzen reagieren können. Zu ihnen gehören alkylierende Agenzien, die durch nukleophile Substitution ihre Alkylgruppe auf die DNA übertragen können. Es sind mehr als ein Dutzend verschiedene Reaktionsprodukte der DNA mit experimentell eingesetzten einfachen monofunktionellen Alkylantien (MNNG, MMS, MNU, EMS, DMS etc.) bekannt (Beranek, 1990). Die unterschiedliche Reaktivität der nukleophilen Zentren der DNA drückt sich in der Menge der mit alkylierenden Agenzien gebildeten Produkte aus (Beranek, 1990). Beispielfhaft sind in **Tabelle 1** die Mengen der Alkylierungsprodukte der DNA mit MNNG und MMS aufgeführt. Die biologische Relevanz dieser DNA-Schäden ist noch nicht vollständig bekannt, jedoch konnte die biologische Bedeutung einzelner Reaktionsprodukte aufgezeigt werden: Bereits 1969 fand Loveless eine Korrelation der mutagenen Wirkung von Alkylantien mit deren Fähigkeit, O⁶-Alkylguanin in der DNA zu induzieren (Loveless, 1969). Bei der weiteren Aufklärung der Bedeutung von O⁶-Alkylguanin für die biologischen Wirkungen von Alkylantien war die Existenz von Bakterien und Zelllinien mit einem Defekt der O⁶-Alkylguanin-Reparatur sehr hilfreich. So sind Bakterien mit einer defekten Reparatur von O⁶-Methylguanin sensitiver gegenüber der toxischen Wirkung von MNNG und zeigen eine erhöhte

Tabelle 1 Anteil der Methylierungsprodukte der DNA in Prozent der Gesamtmethylierung durch MMS und MNNG (nach Beranek, 1990)

Reaktionsprodukte mit der DNA	MMS	MNNG
N1-Adenin	1,9-3,8	1,0
N3-Adenin	10,4-11,3	12,0
N7-Adenin	1,8	-
N3-Cytosin	<1	2,0
N3-Guanin	0,6	-
O ⁶ -Guanin	0,3	7,0
N7-Guanin	81,0-83,0	67,0
N3-Thymidin	0,1	-
Phosphotriester	0,8	-

Mutationsrate nach Behandlung mit methylierenden Agenzien als „Wildtyp“-Bakterien (Lindahl et al., 1988; Rebeck und Samson, 1991). Zur Reparatur von O⁶-Methylguanin nicht befähigte Säugerzelllinien (Mex⁻-Phänotyp) zeigen ebenfalls eine erhöhte Sensitivität gegenüber alkylierenden Agenzien, die O⁶-Methylguanin induzieren, sowie eine erhöhte Mutationsrate nach Alkylierung verglichen mit Mex⁺-Zellen (Yarosh, 1985; Pegg und Byers, 1992). Diese erhöhte Sensitivität der Mex⁻-Zellen hinsichtlich der toxischen und mutagenen Wirkung von Alkylantien kann durch

Transfektion des bakteriellen *ada*-Gens, das für die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase kodiert, oder der cDNA, die für das entsprechende menschliche Protein kodiert, behoben werden (Ishizaki et al., 1986; Kataoka et al., 1986; Kaina et al., 1991; Wu et al., 1991; Hofe et al., 1992). Diese Untersuchungen haben den Beweis erbracht, daß O⁶-Alkylguanin sowohl an der toxischen als auch an der mutagenen Wirkung von alkylierenden Agenzien ursächlich beteiligt ist. Die mutagene Wirkung beruht auf der Fehlpaarung des O⁶-Alkylguanins mit Thymin während der DNA-Replikation, was eine GC → AT Transition zur Folge hat (Singer, 1985). Worauf die toxische Wirkung von O⁶-Alkylguanin beruht, ist noch nicht geklärt. Es wurde aber gezeigt, daß O⁶-Methylguanin seine toxische Wirkung erst im zweiten Zellzyklus nach seiner Induktion entfaltet (Fritz, 1992). Die Toxizität von O⁶-Methylguanin ist daher wahrscheinlich auf sekundäre Läsionen der DNA zurückzuführen (Fritz, 1992; Kaina et al., 1993). Ein weiterer prämutagener DNA-Schaden neben O⁶-Alkylguanin ist O⁴-Alkylthymin, das durch Fehlpaarung mit Guanin zu TA → CG Transitionen führt (Singer, 1985). O⁴-Methylthymin wird jedoch in viel geringerem Maße in der DNA induziert als O⁶-Methylguanin (Beranek, 1990) und spielt daher als prämutagener Schaden eine untergeordnete Rolle (Kaina, 1993).

N-Alkylpurine sind keine unmittelbar prämutagenen Läsionen, da sie nicht zu einer Fehlpaarung während der DNA-Replikation führen. Durch spontane Hydrolyse der alkylierten Basen oder durch ihre enzymatische Entfernung entstehen jedoch apurine Stellen (AP-Stellen)

in der DNA, die zur Blockierung der DNA-Replikation führen (Kaina, 1993). Während der Überwindung des Replikationsblocks können im Bereich der AP-Stelle „falsche Basen“ eingebaut werden (Randall et al., 1987). AP-Stellen sind somit potentielle prämutagene Läsionen, und N-Alkylpurine stellen eine der Vorstufen dieser prämutagenen AP-Stellen dar. Daß N3-Methylpurine prätoxische Läsionen sind, konnte an reparaturdefizienten *E.coli* Bakterien nachgewiesen werden (Evensen und Seeberg, 1982; Karren et al., 1982; zur Übersicht siehe Lindahl et al. 1988).

Zahlreich Untersuchungen der vergangenen Jahre befaßten sich mit den Ursachen der karzinogenen Wirkung von Alkylantien (zur Übersicht siehe Wogan, 1975; Mirvish, 1975; Fiddler, 1975; Lawley, 1984; Kaina, 1993). Ein wesentlicher Faktor bei der Tumorgenese ist die Induktion von Punktmutationen. Induzierte Basenaustausche nach Einwirkung von alkylierenden Karzinogenen (Sukumar et al., 1983) oder nach direkter Einführung einer O⁶-Methylguanin-Base in die DNA (Mitra et al., 1989; Kamiya et al., 1991, Pletsa et al., 1992) führen zur Aktivierung des Protoonkogens c-Ha-ras. Mutationen im zellulären ras-Gen wiederum können zur Transformation von Zellen führen (Tabin et al., 1982; Balmain und Pragmell, 1983; Yoakum et al., 1985). Mutierte ras-Gene wurden in einer Vielzahl von Tumoren der Maus, der Ratte und des Menschen nachgewiesen (zur Übersicht siehe Harris, 1991). Es ist daher nicht verwunderlich, daß die Reparatur von O⁶-Methylguanin ein wesentlicher protektiver Faktor bezüglich der transformierenden Wirkung bzw. der tumorinitiierenden Potenz alkylierender Agenzien ist (Pegg, 1990; Pegg und Byers, 1992). Dies wird eindrucksvoll dadurch unterstrichen, daß transgene Mäuse, die das MGMT-Gen exprimieren, deutlich verringerte Tumorzinidenzen (Lymphome) nach MNU-Behandlung aufweisen (Dumenco et al., 1993).

Alkylierende Agenzien sind nicht nur potentielle Umweltkarzinogene; sie werden aufgrund ihrer starken cytotoxischen Wirkung auch in der Tumorthherapie eingesetzt (Mitchell und Schein, 1992; Clamon, 1992). Besondere Bedeutung als Cytostatika haben heute chlorethylierende Agenzien. Die Reparatur von Alkylierungsschäden der DNA hat somit auch praktische medizinische Bedeutung (zur Übersicht siehe Pegg, 1990; Pegg und Byers, 1992; Kaina et al., 1995).

Reparatur von DNA-Alkylierungsschäden in Bakterien - die *Adaptive Antwort*

Die Reparatur von Alkylierungsschäden in der DNA ist eine Fähigkeit, die alle bisher untersuchten Organismen besitzen. Bei *E.coli*-Bakterien fand man, daß eine Behandlung mit MNNG sie resistenter gegenüber einer zweiten Behandlung mit MNNG macht. Außerdem akkumulieren Mutationen nur in der ersten Stunde nach der Behandlung, danach werden keine weiteren Mutationen mehr induziert (Samson und Cairns, 1977). Dieses als *Adaptive Antwort* auf alkylierende Agenzien bekannte Phänomen beruht auf der Induktion von vier Genen, dem *ada*-, *alkA*, *alkB* und *aidB*-Gen (zur Übersicht siehe Lindahl et al., 1988; Volkert, 1988). Die Produkte des *ada*- und des *alkA*-Gens katalysieren die Reparatur einer Vielzahl von alkylierten Basen in der DNA (N³-Methyladenin, N³-Methylguanin, O²-Methylthymine, O²-Methylcytosin, O⁶-Methylguanin, O⁴-Methylthymine) sowie von Methylphosphotriestern (Lindahl et al., 1988; Volkert, 1988). Eine Schlüsselfunktion bei der *Adaptiven Antwort* nimmt das Ada-Protein ein. Es handelt sich dabei um eine O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, die in einer nichtreversiblen „Selbstmordreaktion“ Methylierungen aus der O⁶-Position des Guanins und der O⁴-Position des Thymins sowie von Phosphatresten der DNA entfernt. Dabei werden die Methylgruppen auf zwei unterschiedliche Cysteine innerhalb des Proteins übertragen. Methylierung des mehr aminoterminal gelegenen Cysteins (Cys-69) durch Demethylierung von Methylphosphotriestern macht das Ada-Protein zu einem starken Aktivator der Transkription der Gene, die an der *Adaptiven Antwort* beteiligt sind (Teo et al., 1984 und 1986).

Das *alkA* Gen kodiert für eine N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (Nakabeppu et al., 1984). Diese entfernt N³-Methyladenin, N³-Methylguanin, O²-Methylcytosin, O²-Methylthymine und N⁷-Methylguanin aus der DNA. Dadurch werden AP-Stellen in der DNA induziert, die, wie bereits erwähnt, prämutagene Läsionen sind und replikationsblockierend wirken. Sie müssen daher umgehend aus der DNA entfernt werden. Dies geschieht durch Wirkung weiterer Enzyme, die zusammen mit der Glykosylase ein Basen-Exzisionsreparatur-System bilden (Barnes et al., 1993). Der Basen-Exzisionsreparaturweg umfaßt nach heutigem Kenntnisstand fünf Schritte (**Abbildung 1**):

1. Eine basenspezifische Glykosylase erkennt und entfernt veränderte Basen aus der DNA (in **Abbildung 1** ist eine methylierte Base angedeutete).
2. Die von der Glykosylase produzierte apurine/apyrimidinische (AP-) Stelle wird von einer AP-Endonuclease erkannt, die daraufhin einen Einschnitt in die DNA 5' von der AP-Stelle macht.
3. Eine DNA-Phosphodiesterase- (dRPase) oder 5'-Exonukleaseaktivität entfernt einen oder mehrere (nicht gezeigt) Desoxyribose-phosphatrest(e) (Dianov et al., 1992; Dianov und Lindahl, 1994; zur Übersicht siehe auch Barnes et al., 1993).
4. Die entstandene Lücke wird in *E.coli* durch die DNA-Polymerase I aufgefüllt (Barnes et al., 1993).
5. Die freien DNA-Enden werden schließlich durch eine DNA-Ligase verbunden.

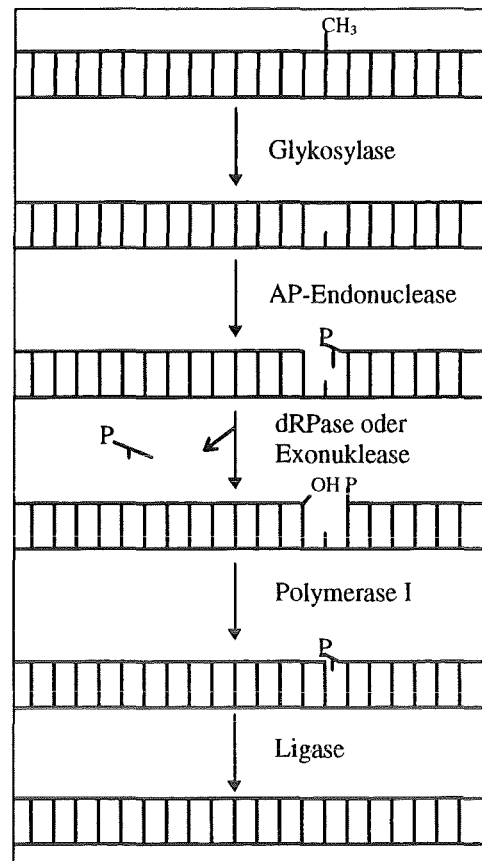


Abbildung 1 Schematisches Diagramm der Exzisionsreparatur einzelner Basen (verändert nach Barnes et al., 1993). Zur Beschreibung siehe Text.

Die Gene *alkB* und *aidB* sind bisher nur über den Phänotyp der entsprechenden *E.coli* Mutanten charakterisiert: *alkB*-Mutanten zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber MMS (Kataoka et al., 1983). *aidB*-Mutanten sind, in Abhängigkeit vom mutierten Allel, entweder resistenter gegenüber MNNG oder zeigen keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp (Volkert, 1988). Die *Adaptive Antwort* auf alkylierende Agenzien wurde außer bei *E.coli* noch bei 17 weiteren Mikroorganismen gefunden (Samson, 1992).

Das Bakterium *E.coli* besitzt neben den induzierbaren Genen *ada* und *alkA* auch konstitutiv exprimierte Gene für eine O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase und eine N-Methylpurin-DNA-Glykosylase, das *ogt*- (Potter et al., 1987) und das *tag*-Gen (Karran et al., 1982). Die Produkte der konstitutiv exprimierten Gene unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität von denen der induzierbaren Gene. Die durch das *ogt*-Gen kodierte Methyltransferase entfernt, wie das Ada-Protein, Methylgruppen aus der O⁶-Position des Guanins und der O⁴-Position des Thymins, nicht jedoch von Methylphosphotriestern (Rebeck et al., 1988). Die vom *tag*-Gen

kodierte Glykosylase hat eine, verglichen mit dem AlkA-Enzym, engere Substratspezifität und entfernt nur N3-Alkyladenin aus der DNA (Evensen und Seeberg, 1982; Karren et al., 1982). Die Bedeutung von konstitutiv exprimierten Reparaturgenen für Alkylierungsschäden der DNA, die man bisher in allen daraufhin untersuchten Mikroorganismen gefunden hat (Samson, 1992), wird dadurch verdeutlicht, daß *E.coli*-Mutanten, denen das Ada- wie auch das Ogt-Protein fehlt, eine erhöhte spontane Mutationsrate aufweisen (Rebeck und Samson, 1991). Die erhöhte spontane Mutationsrate der Doppelmutanten zeigt, daß auch intrazellulär alkylierende Agenzien gebildet werden, die mit der DNA reagieren und zu mutagenen Läsionen führen können. Als mögliche endogen methylierende Spezies sind S-Adenosylmethionin (Rydberg und Lindahl, 1982), Lipidperoxyde (Vaca et al., 1988) und intrazellulär gebildete Nitrosamine (Calmels et al., 1987; Tsimis und Yarosh, 1990) diskutiert worden.

O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase und N-Methylpurin-DNA-Glykosylase von Säugerzellen

Die Entdeckung einer induzierbaren Reparatur von Alkylierungsschäden der DNA in Bakterien (Samson und Cairns, 1977) führte zu einer intensiven Suche nach vergleichbaren Reparaturmechanismen in Säugerzellen. Bereits 1978 berichtete Pegg über eine enzymatische Entfernung von O⁶-Methylguanin durch Zellextrakte aus Säugerzellen (Pegg, 1978). Fünf Jahre später konnte eine entsprechende Enzymaktivität aus der Rattenleber gereinigt und charakterisiert werden (Pegg et al., 1983). Es zeigte sich, daß die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) aus Säugerzellen in einer irreversiblen Reaktion Methylgruppen von der DNA auf eigene Cysteinreste überträgt. Im Gegensatz zum bakteriellen Ada-Protein entfernt das Säugerenzym jedoch keine Methylgruppen von Methylphosphotriestern (zur Übersicht siehe Yarosh, 1985) und Methylgruppen von O⁴-Methylthyminen werden ebenfalls nur in sehr geringem Umfang entfernt (zur Übersicht siehe Pegg, 1990; Mitra und Kaina, 1993). Auch bei der Reparatur längerer Alkylgruppen zeigen das bakterielle und das Säugerprotein unterschiedliche Reaktionsraten. Beide Proteine entfernen auch die Ethylgruppe des O⁶-Ethylguanins. Während das Säugerprotein dies aber mit einer, im Vergleich zur Entfernung von Methylgruppen, nur dreifach reduzierten Effizienz tut, ist die Effizienz des Ada-Proteins vergleichsweise um das 100-fache reduziert (Pegg, 1990).

Die MGMT-Aktivität ist sowohl zwischen verschiedenen Spezies als auch in den verschiedenen Geweben einer Spezies unterschiedlich hoch. Innerhalb der Säuger besitzen menschliche Gewebe und Zellen die höchste MGMT-Aktivität (zur Übersicht siehe Yarosh,

1985; Pegg, 1990). Innerhalb eines Säugerorganismus ist die Leber das Organ mit der höchsten MGMT-Aktivität, gefolgt von der Lunge, der Niere und den Verdauungsorganen, wohingegen das Gehirn durchgehend eine geringe Aktivität zeigt (Chan et al., 1992; Wilson et al., 1993; zur Übersicht siehe Yarosh, 1985; Pegg und Byers, 1992).

Die Reparatur von N-Methylpurinen wird in Säugerzellen, wie bereits für Bakterien geschildert durch die N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG), eingeleitet. Die MPG der Säugerzellen ähnelt in ihrer breiten Substratspezifität für N3-Methyladenin, N3- und N7-Methylguanin dem induzierbaren alkA kodierten Protein von *E.coli* (Gallagher und Brent, 1984; O'Conner und Laval, 1990; Engelward et al., 1993). Ein Vergleich der MPG-Aktivität in Zellen verschiedener Spezies hat bisher keine großen Unterschiede aufgezeigt (Chakravarti et al., 1991; Hartenstein, 1992). Es wurde jedoch auch berichtet, daß die Aktivität der MPG in den Organen der Maus unterschiedlich ist: Magenzellen zeigten die höchste Aktivität gefolgt von Zellen der Niere, der Lunge, der Leber und des Gehirns (Washington et al., 1988). Die Prozessierung der durch die MPG induzierten AP-Stellen erfolgt - ebenfalls wie in Bakterien - durch Wirkung einer AP-Endonuklease, AP-Exonuklease, Polymerase und Ligase (vgl. **Abbildung 1**). Auch in Säugerzellen wird mitunter bei der Reparatur von AP-Stellen, die z.B. durch die Entfernung einer Uracil-Base durch die Uracil-DNA-Glykosylase entstanden sind, nur eine einzige Base entfernt (Dianov et al., 1992). Erst kürzlich konnte die Beteiligung der Polymerase β an der Exzisionsreparatur nachgewiesen werden (Singhal et al., 1995). Wenngleich alle Enzymaktivitäten, die zu dieser Basen-Exzisionsreparatur in Säugerzellen nötig sind, noch nicht vollständig charakterisiert wurden, so liegt doch offensichtlich ein im Prinzip gleicher Mechanismus wie bei den Bakterien zugrunde: Die Reparatur von AP-Stellen erfolgt über den Austausch einer Base oder kurzer DNA-Stücke (Barnes et al., 1993).

Induzierbarkeit der MGMT und MPG in Säugerzellen

1. Die Induzierbarkeit der MGMT

Eine Induktion der MGMT-Aktivität konnte bisher in Zellen und Geweben der Ratte und der Maus nachgewiesen werden (zur Übersicht siehe Pegg, 1990 und Fritz et al., 1991). Darüber hinaus gibt es auch Evidenzen für die Induzierbarkeit der MGMT-Aktivität in menschlichen Zellen (Laval, 1990; zur Übersicht siehe Frosina und Abbondandolo, 1985; Yarosh, 1985).

Die Induzierbarkeit der MGMT-Aktivität, wie auch ihre basale Stärke, ist in der Ratte und in der Maus in verschiedenen Geweben unterschiedlich hoch. In der Maus fand man nach γ -Bestrahlung eine Induktion der MGMT-Aktivität in der Leber, den Nieren, der Lunge und in der Milz, wobei die höchste Induktion (2,4-fach) in der Leber gefunden wurde (Wilson et al., 1993). In der Ratte fand man ebenfalls nach γ -Bestrahlung eine Induktion der MGMT-Aktivität in der Leber, den Nieren, der Milz und im Gehirn, wobei auch hier die höchste Induktion (17,6-fach) in der Leber gefunden wurde (Chan et al., 1990). In der Leber beider Spezies ist also, im Vergleich zu den anderen untersuchten Organen, nicht nur die basale MGMT-Aktivität am höchsten, sondern auch ihre Induzierbarkeit. Die Induktion der MGMT-Aktivität in der Leber findet nur in den Hepatozyten statt (Swenberg et al., 1982).

Schon 1981 fanden Pegg und Perry, daß nicht nur Behandlung mit den Alkylantien DMN und DEN, sondern auch mit Tetrachlorkohlenstoff, Thioacetamid und Acetylaminofluoren, die keine Alkylierung der DNA induzieren, sowie partielle Hepatektomie zu einer erhöhten Reparatur von O⁶-Methylguanin in der Rattenleber führt (Pegg und Perry, 1981). Sie zogen daraus den Schluß, daß die Zellproliferation in der regenerierenden Leber ein Grund für die MGMT-Induktion sein könnte. Weitere Experimente lieferten Argumente sowohl für als auch gegen diese Hypothese. So wurde in Extrakten aus hypertrophem Nierengewebe, das durch einseitige Nephrektomie oder Behandlung mit Folsäure induziert worden war, ebenfalls erhöhte MGMT-Aktivität im Vergleich zu Extrakten aus „normalem“ Nierengewebe festgestellt (Pegg und Wiest, 1983). Andererseits wurde in Leberextrakten neugeborener Ratten, deren Leber eine starke Zellproliferation aufweist, eine geringere MGMT-Aktivität als in erwachsenen Tieren gefunden (Pegg und Wiest, 1983).

Die Suche nach dem auslösenden Signal der MGMT-Induktion bekam eine neue Richtung, als man fand, daß ionisierende Strahlen zur Induktion der MGMT-Aktivität führen. Ganzkörperbestrahlung von Ratten bewirkt keine erhöhte Zellproliferation, sondern führt sogar zu einem transienten Proliferationsstop nach partieller Hepatektomie der Rattenleber (Margison et al., 1985). Durch Ganzkörperbestrahlung wird aber die MGMT-Aktivität in Leber-, Lungen- und Nierenzellen induziert (Margison et al., 1985; Schmerold und Wiestler, 1986).

Worauf beruht nun die Induktion der MGMT? Wie Schmerold und Wiestler zeigen konnten, ist die *de novo* Synthese von Proteinen eine Voraussetzung für die Induktion der MGMT-

Aktivität; denn Hemmung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid verhindert die MGMT-Induktion durch Röntgenstrahlen (Schmerold und Wiestler, 1986). Die Induktion der MGMT erfolgt auf Transkriptionsebene. Dies wurde daraus abgeleitet, daß eine Akkumulation der MGMT-mRNA in der Rattenleber nach Behandlung mit 2-Acetylaminofluoren (Potter et al., 1991) und γ -Strahlen (Chan et al., 1992) sowie in Ratten-Hepatomzellen nach einer Vielzahl unterschiedlicher Behandlungen, die auch die MGMT-Aktivität induzieren (Fritz et al., 1991; Fritz und Kaina, 1992; Fukuhara et al., 1992), erfolgte. Die mRNA-Akkumulation der MGMT konnte durch Actinomycin D, einem Hemmstoff der RNA-Synthese, verhindert werden (Fritz et al., 1991). Dieser Hinweis auf eine transkriptionelle Aktivierung des MGMT-Gens konnte schließlich durch *run on*-Experimente bestätigt werden (Chan et al., 1992).

Die Induktion der MGMT durch ionisierende Strahlen warf die Frage auf, ob DNA-Strangbrüche der Auslöser für die MGMT-Induktion sind. In Ratten-Hepatomzellen konnte die Aktivität wie auch die mRNA-Expression der MGMT durch eine Vielzahl verschiedener Behandlungen induziert werden (MNNG, MMS, EMS, γ -Strahlen, UV-Licht, Bleomycin, erhöhte Temperatur (42°C), H₂O₂, CNU) (Laval, 1990; Fritz et al., 1991). Durch Experimente mit diesem *in vitro* Zellsystem für die Induktion der MGMT konnten weitere Aufschlüsse über das auslösende Signal erhalten werden: Zum einen wurde in stationären Kulturen eine ebenso hohe MGMT-Induktion nach Exposition mit ionisierenden Strahlen wie in exponentiell wachsenden Kulturen gefunden, was gegen eine Beteiligung der Zellproliferation an der Induktion sprach (Fritz und Kaina, 1992). Zum anderen konnte eine Induktion der MGMT-Aktivität nicht durch direkte Methylierung des Proteins ausgelöst werden (Laval, 1990). Dies zeigte, daß Methylierung des MGMT-Proteins offensichtlich nicht - im Gegensatz zur Induktion der *Adaptiven Antwort* in *E.coli* - der Auslöser für die Induktion der MGMT-Aktivität ist. Es konnten darüber hinaus Hinweise für die Beteiligung von DNA-Doppelstrangbrüchen an der MGMT-Induktion erhalten werden: Einbringung (durch Elektroporation) von Restriktionsendonukleasen in die Zellen führte zu einem Anstieg der MGMT-Aktivität und ihrer mRNA-Menge, wobei insbesondere Endonukleasen, die glatte DNA-Enden produzieren (PvuII) die MGMT-Aktivität stärker induzieren als diejenigen, welche überhängende, religationsfähige DNA-Enden einführen (EcoRI, AluI) (Laval, 1990; Fritz und Kaina, 1992). Die von den Autoren aus den oben beschriebenen Versuchen abgeleitete Hypothese ist, daß Behandlungen, die direkt oder indirekt, *via* DNA-Exzisionsreparatur oder Blockierung der Replikation, zu DNA-Strangbrüchen führen, eine

Induktion der MGMT-Transkription bewirken und daß DNA-Strangbrüche dabei ein auslösendes Ereignis darstellen (Laval, 1990; Fritz und Kaina, 1992).

Bemerkenswert ist, daß die MGMT-Aktivität der Säugerzellen nicht nur durch exogene sondern auch durch endogene Stimuli wie Interferon (Bertini et al., 1990) und durch Hormone moduliert werden kann (Pegg und Wiest, 1983). Ratten, denen man die Hypophyse oder die Schilddrüse entfernte, zeigten eine Reduktion der MGMT-Aktivität, die durch Gabe von Wachstumshormon bzw. Thyroxin behoben werden konnte (Pegg und Wiest, 1983). Für eine hormonelle Beeinflussung der MGMT-Aktivität spricht auch die Tatsache, daß sie in der Leber und im Brustdrüsengewebe weiblicher Ratten und Mäusen in Abhängigkeit von der hormonellen Situation im Tier schwankt (Dutta-Choudhury et al., 1991; Chang et al., 1993). Die Expression der MGMT ist also nicht nur durch von außen induzierte Signale, sondern auch durch physiologische Vorgänge im Säugerorganismus beeinflussbar.

2. Die Induzierbarkeit der MPG

Eine Induktion der MPG-Aktivität in der Rattenleber wurde bereits 1982 von Cooper et al. nach Behandlung von Ratten mit 2-Acetylaminofluoren beschrieben. Dieser Befund ist bisher allerdings nicht bestätigt worden. Vielfach reproduziert dagegen ist die Induktion der MPG-Aktivität in der Ratten-Hepatomzelllinie H4 bzw. H4IIE *in vitro* (Laval, 1985; Laval, 1990; Hartenstein, 1992). Wie bei der MGMT wirken nicht nur Alkylantien wie MNNG, MMS und EMS, sondern auch γ -Strahlen und UV-Licht sowie H_2O_2 und erhöhte Temperatur (42°C) induzierend auf die Aktivität. Unklar ist die Frage einer Induktion der MPG-mRNA. Obwohl eine Akkumulation der mRNA nach Mutagen-Behandlung gefunden wurde (Laval, 1991; Hartenstein, 1992; Mitra und Kaina, 1993), konnte eine transkriptionelle Aktivierung des MPG-Gens bisher nicht überzeugend nachgewiesen werden.

Promotoren von DNA-Reparaturgenen aus Säugerzellen

Für eine Reihe von an der DNA-Reparatur beteiligter Gene wurde die Promotorregion kloniert. Dazu gehören die Promotorbereiche des menschlichen MGMT-Gens (Harris et al., 1991), des AP-Endonuklease- (Harrison et al., 1992, Robson et al., 1992, Akiyama et al., 1994) und Polymerase β -Gens (Widen et al., 1988). Bislang liegen jedoch nur zur

Aktivierbarkeit des Polymerase β -Promotors Erkenntnisse vor (Kedar et al., 1991): Der Promotor ist durch MNNG und H_2O_2 aktivierbar. Bindung des Transkriptionsfaktors ATF/CREB an den Polymerase β -Promotor ist notwendig zur Steigerung der transkriptionelle Aktivität nach MNNG-Behandlung (Kedar et al., 1991; Narayan et al., 1995).

Ziele der vorliegenden Arbeit

Wie dargestellt wurde, ist sowohl die basale MGMT-Aktivität als auch die Induktion der MGMT auf Protein- und mRNA-Ebene in der Leber verglichen mit anderen Organen der Säuger am höchsten. Eine MGMT-Induktion wurde darüber hinaus in Ratten-Hepatomazellen gefunden. Angesichts dessen stellte sich die Frage, ob die basale Expression wie auch die MGMT-Induktion von Faktoren abhängig ist, die zur leberspezifischen Differenzierung der Zellen führen. Bislang konnte auch eine Induktion der MPG nur in Ratten-Hepatomazellen nachgewiesen werden, was die Frage aufwarf, ob die MPG in einer der MGMT vergleichbaren Art und Weise in ihrer Expression von leberspezifischen Faktoren abhängig ist. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden sowohl die MGMT- und MPG-Aktivitäten als auch die entsprechenden mRNA-Mengen in Ratten-Hepatomazellen, die einen unterschiedlichen Grad an leberspezifischer Differenzierung aufweisen, sowie in primären Ratten-Hepatozyten nach Behandlung mit MNNG und Röntgenstrahlen bestimmt.

Bei der Exzisionsreparatur alkylierter Basen folgen, wie beschrieben, nach der Basenentfernung durch die MPG vier weitere Reaktionsschritte. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde versucht zu klären, ob die an der Exzisionsreparatur von Alkylierungsschäden der DNA beteiligten Gene, die für die MPG, AP-Endonuklease, Polymerase β und Ligase kodieren, eine koordinierte Expression nach Mutagen- und Hormonbehandlung in der Ratten-Hepatomazelllinie H4IIE zeigen und ob ein Zusammenhang mit der MGMT-Expression besteht.

Ein wichtiger experimenteller Ansatz zur Aufklärung der Regulation der DNA-Reparatur liegt in der Isolierung und Charakterisierung von Promotoren der Reparaturgene. Der bereits isolierte menschliche MGMT-Promotor verfügt über potentielle Bindestellen für aktivierbare Transkriptionsfaktoren (Harris et al., 1991). Induktionsversuche mit dem klonierten Promotorelement sind bisher nicht durchgeführt worden. Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher mit der Frage, ob der menschliche MGMT-Promotor aktivierbar ist. Zur Beantwortung

dieser Frage, wurde beabsichtigt, den Promotor in einem Reportergenkonstrukt in H4IIE-Ratten-Hepatomzellen und menschliche HeLa-Cervixkarzinomzellen transient zu transfizieren. In H4IIE-Zellen sollte dann seine Aktivität nach Mutagenbehandlungen untersucht werden, die die endogene MGMT-Transkription induzieren. Sowohl in HeLa- als auch in H4IIE-Zellen sollte außerdem die Wirkung nichtmutagener Induktoren (Hormone, Tumorpromotoren) der Transkription auf die Aktivität des Promotors geklärt werden.

Bisher liegen keine publizierten Daten vor, die Auskunft über eine transkriptionelle Aktivierbarkeit des MPG-Gens geben. Die Promotorregion des MPG-Gens ist bislang nicht kloniert worden. In einem vierten Teil der Arbeit wurde beabsichtigt den MPG-Promotor der Ratte mit Hilfe einer cDNA-Sonde aus einer Genbank zu isolieren. Mit anschließenden Sequenzanalysen und durch transiente Transfektion geeigneter Reportergenkonstrukts in H4IIE-Zellen sollte die Promotorregion näher charakterisiert werden. Diese Daten sollten Auskunft zur basalen Expression und Induzierbarkeit des MPG-Gens der Ratte geben.

Material

1. Zelllinien und Bakterienstämme¹

H4IIE	Ratten-Hepatom-Zelllinie (Fritz et al., 1991)
H4IIEC3/T	Ratten-Hepatom-Zelllinie (Hesse et al., 1984)
H4IIEC3/G ⁻	dito
Fao	dito
H5	dito
CHO-9	Fibroblasten-Zelllinie aus dem Ovar des chinesischen Hamsters
HeLa S3	menschliche Zelllinie eines Gebärmutterkarzinoms
E.coli DH5 α	Rekombinations- und restriktionsdefekter <i>E. coli</i> -Stamm zur Klonierung von rekombinanter DNA

2. Medien für Zell- und Bakterienkultur

Dulbecco, F12, fötales Kälberserum	Gibco, Karlsruhe
Waymouth MB 752/1	dito
CPSR - 1	Sigma, München
Hefeextrakt, Trypton, Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit

3. Antibiotika

Ampicillin	Sigma, München
Gentamycin, Neomycinsulfat (G418)	Gibco, Karlsruhe

¹ alle Zelllinien und Bakterienstämme stammen aus der Sammlung von Prof. Kaina
die Zelllinien H4IIEC3/T, H4IIEC3/G⁻, Fao und H5 wurden freundlicherweise von Prof. Wiebel (GSF, München) zur Verfügung gestellt

4. Materialien und Geräte für Zell- und Bakterienkultur

Kultur- und Einfriergefäße	Greiner, Nürtingen
5 ml, 15 ml, 50 ml Polystyrol und -propylengefäße	dito
20 x 20 cm ² Bakterienkulturplatten	Nunc, Wiesbaden
Elektroporationsgerät für Zellen	Pabisch, Köln
Elektroporationsgerät für Bakterien	Biorad, München

5. Mutagene und Strahlungsquellen

⁶⁰ Kobalt- γ -Quelle	Atomic Energy of Canada Ltd.
MMS, MNNG	Sigma, München
Röntgenquelle MÖD 301/4 mit einem 1mm Kupferfilter	Phillips
UV-Quelle (Hg-Lichtbogen-Lampe)	Phillips

6. Enzyme

alkalische Phosphatase (CIP)	Boehringer, Mannheim
AMV-Reverse Transkriptase	Boehringer, Mannheim
DNase I	Sigma, München
Klenow-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Kollagenase	Serva, Heidelberg
M-MLV Reverse Transkriptase	Gibco, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim
RNase A	Sigma, München
S1-Nuklease	Boehringer, Mannheim
T4-DNA Ligase	Boehringer, Mannheim
Taq-Polymerase	Amersham, Braunschweig
Trypsin	Gibco, Karlsruhe

7. Betäubungsmittel

Nembutal (Pentobarbital - Natrium)	Sanofi
------------------------------------	--------

8. Kits

Prime It (Random Priming Labeling Kit)

Stratagene, Heidelberg

T7-Sequencing Kit

Pharmacia, Freiburg

9. Plasmide

pBluescript KS+ kommerzieller Vektor (Stratagene, Heidelberg) zur Klonierung in *E.coli*

pCAT basic kommerzielles Reporter-genkonstrukt (Promega, Heidelberg) mit dem promotorlosen bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT-)-Gen

p000 menschliches MGMT-Promotorfragment (SstI) im Vektor pCAT basic, freundlicherweise von Prof. Mitra (Oak Ridge, USA) zur Verfügung gestellt

pSV2-CAT kommerzielles CAT-Reporter-genkonstrukt (Promega, Heidelberg) mit dem frühen Promotor des SV-40 Virus

10. cDNA-Sonden²

humane AP-Endonuklease (Eschbach, E., 1994)

GAPDH der Ratte im Plasmid pRGAPDH (Fritz et al., 1991)

Ligase I (Barnes et al., 1990)

MGMT der Ratte im Plasmid pCDNA II (Rahden-Staron, I. und Laval, F., 1991)

MPG der Ratte im Plasmid pAPDG 10 (O'Conner, T. und Laval, F., 1990).

Polymerase β im Plasmid pMT-pol β antisense (Fornace et al., 1989)

Tyrosin-Aminotransferase

11. Oligonukleotide

MPGTR

5' CTTGGGATCCTGCTCTGG 3'

MWG-Biotech, Ebersberg

² die cDNA-Sonden wurden von Prof. Kaina zur Verfügung gestellt. Sie sind, wenn nicht weiter angegeben, freundlicherweise aus verschiedenen Labors, in denen die Proben kloniert worden sind, der Arbeitsgruppe für diese Untersuchungen überlassen worden

12. Lösungen

PBS	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
20x SSC	175.3 g/l NaCl, 88.2 g/l NaCitrat, pH 7.0
10xTAE	0,4 M Tris-OH, 10 mM EDTA, pH 8,3 mit Essigsäure einstellen
10xTBE	54 g/l Tris - Base, 27,5 g/l Borsäure, 10 mM EDTA
TE (10:1)	10 mM Tris - HCl, 1 mM EDTA, pH8.0 (die Werte in der Klammer geben die Konzentrationen an Tris bzw. EDTA in mM an)

12.1. Lösungen für die Leberperfusion

Hank's-Lösung	0,4 g/l KCl, 0,06 g/l KH ₂ PO ₄ , 8 g/l NaCl, 0,06 g/l Na ₂ HPO ₄ , 1 g/l Glucose
PM	Hank's-Lösung mit Zusatz von 2,38 g/l HEPES, pH 7,4
Isolutionslösung	PM plus 0,14 g/l CaCl ₂ , 0,2 g/l MgSO ₄
Percoll-Lösung 1	50,5 % Percoll (d = 1,13 mg/ml), 5 mM NaOH, 8,775 g/l NaCl, 3,57 g/l HEPES, 5 g/l BSA, 1 g/l Glucose, pH 7,4
Percoll-Lösung 2	1x Hank's-Lösung mit 49,2 % Percoll (d = 1,13 mg/ml), 5 mM NaOH, 3,57 g/l HEPES, 5 g/l BSA, 1 g/l Glucose, pH 7,4

13. Spezielle Chemikalien

APS	Appligene, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma, München
Haftsilan, Dimethyldichlorsilan	Fluka, Neu - Ulm
Heparin-Natrium	Braun Melsungen
Kristallviolett, Giemsa - Färbelösung	Merck, Darmstadt
Lachsspermien - DNA	Sigma, München
LMP - Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Percoll	Pharmacia, Freiburg
Polyacrylamid/Bisacrylamidlösung	Roth, Karlsruhe
Seakem LE Agarose	dito
TEMED	BIORAD, München

14. Radioaktiv markierte Chemikalien

α -[³² P]-dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham, Braunschweig
γ -[³² P]-dATP (5000 Ci/mmol)	dito
α -[³⁵ S]-dATP (600 Ci/mmol)	dito
[¹⁴ C]-Chloramphenicol (56 mCi/mmol)	dito
[³ H]-Methylnitrosoharnstoff (16,5 Ci/mmol)	dito
[³ H]-Dimethylsulfonat (1,1 Ci/mmol)	DuPont de Nemours, Bad Homburg

Methoden

1. Kultivierung etablierter Zelllinien

Die Zelllinien CHO-9, H5, H4IIEC3/T, H4IIEC3/G⁻, Fao wurden in F12/Dulbecco's Medium (1:1) mit einem Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. H4IIE Zellen wurden in α -Medium mit 5% FCS kultiviert. Allen Medien wurde 50 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin zugesetzt. Die Kultur erfolgte in Plastikschaalen, auf deren Boden die Zellen als Einzelzellschicht wuchsen, in einem Brutschrank bei 37°C, in feuchter Atmosphäre mit 6% CO₂-Gehalt. Zur Passage wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Die Ablösung der Zellen von den Kulturschaalen erfolgte durch Verdau der extrazellulären Matrix mit Trypsin (0,25% Trypsin in PBS, ca. 5 min bei 37°C). Die gelösten Zellen wurden in Medium suspendiert und je nach Bedarf in entsprechender Verdünnung ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer.

1.1. Behandlung von Zellen mit Alkylantien, TPA und Forskolin

Alkylantien wurden sowohl für die Versuche zur Geninduktion als auch in den Dosis-Effekt-Versuchen verwendet. TPA und Forskolin wurden nur zur Geninduktion benutzt. Für alle Agenzien wurden Stocklösungen folgender Konzentrationen hergestellt:

- MMS 100 mM in H₂O
- MNNG 10 mM in H₂O (in DMSO auflösen !)
- TPA 200 $\mu\text{g/ml}$ in DMSO
- Forskolin 20 μM in DMSO

Die Stocklösungen wurden bei -20°C aufbewahrt. Die Zugabe der Substanzen zum Medium der Zellen erfolgte direkt aus den Stocklösungen. Die Behandlung mit MNNG und MMS erfolgte jeweils für eine Stunde. Danach wurde das Medium durch frisches ersetzt. Nach Zugabe von TPA oder Forskolin wurde das Medium nicht gewechselt.

1.2. Bestrahlung von Zellen

Röntgen-, γ - und UV-Strahlung wurden für Versuche zur Geninduktion verwendet. Die Röntgenbestrahlung erfolgte mit einer Phillips-Röntgenröhre (Mo 300) bei 250 kV und 10 mA. Die Dosisleistung der Röntgenquelle betrug dann 0,143 Gy/min. Zur γ -Bestrahlung wurde eine ^{60}Co -Strahlenquelle (Atomic Energy of Canada) verwendet. Die Dosisleistung der γ -Quelle betrug 385,15 Gy/h (Stand: 1.1.1995). Die Strahlungsintensität der UV-Quelle betrug 2 W/m² in 32 cm Entfernung. Zur Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann die Flüssigkeit über den Zellen so gut als möglich entfernt. Die Zellen wurden dann ohne Deckel unter die UV-Lampe gestellt und nach der Bestrahlung sofort mit frischem Medium überschichtet. Zur Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen wurden die Zellen in Medium mit geschlossenem Deckel der Strahlung ausgesetzt. Danach wurde das Medium gegen frisches ausgetauscht.

1.3. Dosis-Effekt-Versuche

Zur Messung eines Dosiseffektes von Mutagenen auf die Fähigkeit von Einzelzellen zu Kolonien auszuwachsen, wurden die Zellen so ausgesät, daß sich ca. 100 Kolonien auf einer 5 cm Kulturschale bildeten. Dazu wurden in Abhängigkeit von der Plattierungseffizienz und der zu erwartenden Kolonienzahl 200-1000 Zellen auf 5 cm Kulturschalen ausgesät. Die Plattierungseffizienzen der Zelllinien waren: Für H5-Zellen ca. 50%, für H4IIEC3/T- und H4IIE- ca. 40%, für H4IIEC3/G- ca. 25% und für Fao-Zellen ca. 65%. Nach 6 h hatten sich die Zellen am Boden der Kulturschale angeheftet. Nun erfolgte die Behandlung der Zellen mit steigenden Konzentrationen des Mutagens. Die Mutagenbehandlung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Nach ca. 7-10 Tagen waren die Kolonien makroskopisch sichtbar. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, 10 min mit Methanol fixiert und anschließend zur Anfärbung mit 0,5% Kristallviolett und 5% Giemsa (in Wasser) überschichtet (5-10 min). Zur Auswertung wurden die Kolonienzahlen, die mit einer bestimmten Dosis erhalten worden waren, relativ zur denen in der unbehandelten Kontrolle berechnet und halblogarithmisch in einer Dosis-Effekt-Kurve aufgetragen.

1.4. Transiente Transfektion durch Kalziumphosphat Kopräzipitation

Diese Methode wurde bei H4IIE-Rattenzellen und menschlichen HeLa S3-Zellen zur Transfektion von Reportergenkonstrukten (Promotor-CAT- und RSV- β -Gal-Konstrukte)

angewendet: 24 h vor der Transfektion wurden 10^6 Zellen auf einer 10 cm Kulturschale ausgesät. Für die Transfektion wurden 5 - 10 μg DNA pro Kulturschale in 0,5 ml Puffer A (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na_2HPO_4 , pH 7,15) aufgenommen. Anschließend wurde tropfenweise, unter leichtem Schwenken 0,5 ml Puffer B (250 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES) zugegeben. Zur Ausbildung des Präzipitates wurde die Lösung 45 - 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde dann zur gleichmäßigen Verteilung des Präzipitates gemischt und tropfenweise auf die Zellen gebracht. Anschließend wurden die Zellen für 15 h im Brutschrank kultiviert. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurden H4IIE-Zellen dann 5 ml 30% DMSO in Medium zugegeben (Endkonz. DMSO: 10%) und die Zellen weitere 30 min im Brutschrank inkubiert. HeLa S3-Zellen wurden ohne diese Behandlung transfiziert. Nach der DMSO-Behandlung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben. 6 h später wurden die Zellen nach Bedarf behandelt, und nach 24 h oder 48 h wurde Gesamtzellextrakt der Zellen hergestellt (s.u.). Zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz in den Einzelversuchen wurde ein RSV- β -Gal-Konstrukt, in dem das bakterielle β -Galactosidase-Gen unter der Kontrolle des viralen RSV (*Rous-Sarkoma-Virus*)-Promotors steht, kotransfiziert. Es wurde davon ausgegangen, daß der virale Promotor eine konstante Transkription des β -Galactosidase-Gens in den Säugerzellen bewirkt. Die β -Galactosidase-Aktivität in den Zellextrakten konnte somit als Maß für die Menge der erfolgreich transfizierten DNA genommen werden. Als Positivkontrolle für die Aktivitätsbestimmung eines eukaryotischen Promotors in den H4IIE-Zellen wurde das Reportergenkonstrukt pSV2-CAT transfiziert und die Promotoraktivität des darin vor das CAT-Gen klonierten frühen SV40-Promotors bestimmt. Zur Korrektur der unterschiedlichen Transfektionseffizienzen wurde die CAT-Aktivität in den Zellextrakten relativ zur parallel bestimmten β -Galactosidase-Aktivität berechnet.

2. Kultivierung von primären Ratten-Hepatozyten als Sphäroide

2.1. Isolierung von Ratten-Hepatozyten

2.1.1. Perfusion der Rattenleber

Die Isolierung der Hepatozyten erfolgte durch eine zweistufige Kollagenase-Perfusion einer frisch präparierten Rattenleber: In einer ersten Perfusion mit einer Lösung frei von Ca^{2+} - und

Mg²⁺-Ionen wurden die Zell-Zell-Kontakte gelöst, in der zweiten Perfusion mit Kollagenase wurde die extrazelluläre Matrix abgebaut. Durch diese Behandlung konnten die Hepatozyten anschließend aus der Leber ausgeschwemmt werden.

Männliche Sprague-Dawley Ratten mit ca. 200 g Körpergewicht wurden 7 Tage in einem 12 h Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Wasser und Nahrung wurden ad libidum angeboten. 24 h vor der Leberperfusion wurde die Futtergabe abgesetzt. Zur Präparation der Leber wurde das Tier mit Nembutal (intraperitoneal, 0,1 ml/100 g Körpergewicht) betäubt und zur Verhinderung der Blutgerinnung, Heparin-Natrium (0,2 ml/100 g Körpergewicht) in die Schwanzvene injiziert. Dann wurde der Bauchraum des Tieres geöffnet. In die freipräparierte Vena portae wurde eine Braunüle eingeführt, durch die die Perfusionslösungen über eine Infusionsapparatur (Durchflußrate ca. 20 ml/min.) in die Leber gelangen. War die erste Perfusionslösung (PM plus 0,08 g/l EGTA) an die Braunüle angeschlossen, wurde sofort die *Vena cava inferior* durchtrennt um ein Abfluß der Perfusionslösung zu erlauben. Eine erfolgreiche Perfusion zeigte sich durch die sofortige Verfärbung der Leber, da das Blut durch die farblose Perfusionslösung ersetzt wurde. Die Braunüle wurde durch zwei Ligaturen an der *Vena portae* befestigt und die Leber freipräpariert. Die Leber wurde nun in eine Perfusionsapparatur gehängt, in der eine Zirkulation der Perfusionslösung unter sterilen Bedingungen gewährleistet war. Die Leber wurde dann mit PM-Lösung perfundiert, der 50 mg Kollagenase, 4 mg Sojabohnen Trypsininhibitor und 1 mg DNase in 10 ml Hanks-Lösung (pH 7,4) zugegeben worden war. Nach 15 min wurde die Leber aus der Apparatur genommen. Die Hepatozyten wurden nun in 100 ml eiskalter Isolationslösung mechanisch aus dem zerfallenen Lebergewebe herausgelöst.

2.1.2. Anreicherung vitaler Hepatozyten

Die erhaltene Zellsuspension wurde nacheinander durch Nylongaze der Porenweiten 200 µm, 150 µm und 100 µm filtriert und zweimal mit Isolationslösung gewaschen, wobei die Zellen niedertourig (5 min., 200g) abzentrifugiert wurden. Die Anreicherung der Hepatozyten erfolgte durch eine Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation: Die Zellen wurden nach Zentrifugation in 50 ml eiskalter Percoll-Lösung aufgenommen und je 12,5 ml mit 25 ml eiskalter Percoll-Lösung 2 überschichtet. Nach 10 min. Zentrifugation (800 g, 4°C) sammelten sich die Hepatozyten am Boden, die weniger dichten Zelltrümmer, nichtparenchymatische Zellen und tote parenchymatische Zellen jedoch als Überstand auf der Percoll-Lösung. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet zweimal mit Isolationslösung gewaschen. Die Anzahl toter

Zellen wurde durch Trypanblaufärbung bestimmt und lag bei ca. 5% (entspricht 95% vitaler Hepatozyten).

2.2. Sphäroidbildung und Kultivierung

Je $2,5 \times 10^6$ Hepatozyten wurden auf unbeschichteten 10 cm „Bakterien-Petrischalen“ in 10 ml Waymouth Medium (10% CPSR-1, 1% Glutamin, 50 µg/ml Gentamycin, 2 mM Nicotinamid, 250 µM $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$, 100 µM δ -Aminolävulinsäure, 13 nM Transferrin, 10^{-8} M Insulin) ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Dazu wurden die entstandenen Zellaggregate in 50 ml-Röhrchen überführt und kurz abzentrifugiert (30 s, 200 g). Die Zellaggregate wurden anschließend in 4/5 Volumen der Ausgangskultur in o.g. Medium mit einem Zusatz von 10^{-7} M Hydrocortison auf unbeschichteten Petrischalen ausgesät. Nach weiteren 24 h war die Sphäroidbildung abgeschlossen. Die weitere Kultivierung erfolgte in Spinnerflaschen unter gleichmäßigem Rühren (40 U/min.) mit gleicher Zelldichte. Das Medium wurde alle 24 h erneuert.

2.3. Behandlung von Sphäroiden mit Alkylantien und Tumorpromotoren

Diese Behandlung mit MNNG zur Geninduktion wurde genauso wie für die etablierten Zelllinien beschrieben durchgeführt. Der Medienwechsel erfolgte wie unter 2.2 beschrieben. Die Stocklösung des Phenobarbitals war 100 mM in Zellkulturmedium (in 0,1 M NaOH lösen, Medium zugeben und anschließend neutralisieren!). Phenobarbital wurde beim täglichen Wechsel des Mediums erneut zugegeben.

2.4. Bestrahlung von Sphäroiden mit Röntgenstrahlen

Da die gläsernen Spinner-Kulturflaschen zur Bestrahlung nicht geeignet waren, wurden die Sphäroide in 50 ml Röhrchen überführt, bestrahlt (analog der Bestrahlung der etablierten Zelllinien), abzentrifugiert (30 s, 200 g) und mit frischem Medium weiterkultiviert.

3. Kultivierung von *E.coli*-Bakterien

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) oder SOC-Medium (20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM Glucose) in Flüssigkultur oder auf

Agarplatten (1,5% Agar). Zur Selektion auf Ampicillinresistenz wurde dem Medium 50 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

3.1. Transformation von *E.coli* Bakterien

3.1.1. Elektroporation

3.1.1.1. Präparation der Zellen

1 l LB-Medium wurden mit 10 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C kultiviert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 g), das Medium abgesaugt und zuerst mit 1 l, dann mit 0,5 l und schließlich mit 0,25 l eiskaltem 10% (v/v) Glycerin gewaschen. Die Zellen wurden zuletzt in 3 ml eiskaltem 10% (v/v) Glycerin aufgenommen und in 100 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

3.1.1.2. Transformation

100 µl Zellsuspension (s.o.) wurden auf Eis aufgetaut, mit bis zu 10 µl DNA-Lösung gemischt und in eiskalte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0,1 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV mit dem *E.coli*-Pulser der Firma BIORAD. Nach dem Puls wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert.

3.1.2. Transformation mit Kalziumchlorid (verändert nach Maniatis et al., 1982)

3.1.2.1. Herstellung kompetenter Zellen

1 l LB-Medium wurden mit 10 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C kultiviert. Die Bakterien wurden dann abzentrifugiert (4000 g), das Medium abgesaugt und die Bakterien in 20 ml eiskaltem, sterilem 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien schließlich in 4 ml eiskaltem, sterilem 50 mM CaCl₂, 15% v/v Glycerin aufgenommen und in Aliquots zu 300 µl bei -80°C aufbewahrt.

3.1.2.2. Transformation

300 µl kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 50 µl DNA-Lösung (mit 50 mM Tris pH 7,2 auf dieses Volumen bringen) gemischt und 40 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (3 min, 42°C) wurden die Bakterien noch 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor der Transformationsansatz in 1 ml LB-Medium gegeben und die

Bakterien 1 h bei 37°C wachsen konnten. Danach wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten ausplattiert (s.o.).

4. Herstellung von Gesamtzellextrakt aus Säugerzellen

Für die Herstellung von Gesamtzellextrakt wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült und mit einem Gummischaber, in 1 ml PBS, vom Boden der Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden abzentrifugiert und für die MGMT- oder MPG-Aktivitätstests in Ultraschallpuffer (TE (20:1) pH 8,5, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 5% Glycerin), für die CAT- oder β -Glaktosidase-Enzymtests in TE (10:1), pH 7,5 aufgenommen. Zur Herstellung eines Extraktes aus Säugerzellen ist es notwendig, die Zellmembran aufzubrechen. Dies erfolgte auf zwei Arten: Für den MGMT- und MPG-Enzymtest durch Behandlung der Zellen mit Ultraschall (Branson Sonifier 40W, 3mal 10 Pulse, auf Eis) und für den CAT- und β -Glaktosidase-Enzymtest durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen der Zellsuspension in flüssigem Stickstoff und einem 37°C-Wasserbad. Die Zelltrümmer wurden danach abzentrifugiert (10 min. 10000 g, 4°C) und der Überstand in Aliquots von 20-50 μ l in flüssigem Stickstoff eingefroren.

5. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford erfolgte durch Bindung von Comassie Blue G-250 an die Aminogruppen der Proteine. Auf einer Mikrotiterplatte wurden sowohl Verdünnungen einer BSA-Lösung bekannter Konzentration (1 mg/ml) zur Erstellung einer Eichkurve als auch Verdünnungen eines Zellextraktes aufgetragen (20 μ l) und mit Bradford-Reagenz (5-fach konzentriert von der Firma BIORAD) versetzt (200 μ l). Dann wurde die Absorption bei 600 nm bestimmt und die Proteinkonzentration im Zellextrakt mit der Eichkurve ermittelt.

6. Messung von Enzymaktivitäten

6.1. O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase Aktivität

Das Prinzip des Testes besteht darin, daß [³H]-markierte Methylgruppen von O⁶-Methylguaninen einer *in vitro* methylierten Lachsspermien-DNA auf das Methyltransferase-

Protein übertragen und kovalent gebunden werden. Da die Reaktion stöchiometrisch erfolgt, kann durch Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität die Methyltransferase-Aktivität ermittelt werden.

Die Methylierung des DNA-Substrates erfolgte durch Inkubation von 30 µl DNA-Lösung (6,3 mg/ml) mit [³H]-MNU (16,5 Ci/mmol) in 0,2 M NaCacodylat, 1 mM EDTA (pH 7,5) für 2h bei 37°C. Anschließend wurde die DNA mit 2 Vol. Ethanol ausgefällt, in TE (10:1) (pH 8) aufgenommen und mehrere Stunden gegen Citratpuffer und TE (10:1) (pH 8) dialysiert. Die gereinigte DNA wurde erneut gefällt und in TE (10:1) (pH 8) aufgenommen. Die Aktivität des DNA-Substrates betrug 2700 cpm/µl.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt in 200 µl Gesamtvolumen, 40 µl (108000 cpm) [³H]-DNA, 20 µl 10x Reaktionspuffer (700 mM Hepes-KOH pH 7,8, 10 mM Dithiothreitol, 50 mM EDTA) und 50 µg - 500 µg Gesamtzellextrakt. Die Reaktion wurde 60 min bei 37°C inkubiert und dann durch Zugabe von 400 µl 0,8 M TCA gestoppt.

Nach Zugabe von BSA (10 mg/ml) bis zu einer Proteingesamtmenge von 500 µg, wurde die DNA 15 min bei 95°C hydrolysiert und anschließend das Protein bei 0°C präzipitiert. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und der Überstand, der die hydrolysierte DNA enthielt, verworfen. Das Proteinpellet wurde zweimal mit 400 µl 5% TCA gewaschen und dann in 200 µl 1 N NaOH hydrolysiert. Nach Neutralisation mit 1 N HCl wurden, nach Zugabe von 5 ml Szintillationslösung die Radioaktivität in der Lösung im Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt.

Die MGMT-Aktivität ergibt sich aus der spezifischen Aktivität des Substrates und der Zählausbeute des Flüssigkeits-Szintillationszählers: Ca. 7,5% der Methylierungen der DNA mit MNU sind O⁶-Methylierungen des Guanins (Beranek, 1990). Bei einer Zählausbeute von 50% (1 cpm = 2 dpm) und einer spezifischen Aktivität des [³H]-MNU von 16,5 Ci/mmol entspricht 1 cpm 0,0555 fmol übertragener O⁶-Methylgruppen. Da das Substrat kovalent an das MGMT-Protein gebunden wurde, entspricht die Aktivität der MGMT direkt der gebundenen Menge an Methylgruppen pro Menge Gesamtprotein.

6.2. Methylpurin-DNA-Glykosylase Aktivität

Das Prinzip des Enzymtestes beruht auf der Freisetzung von [³H]-markierten, methylierten Purinbasen aus einer durch [³H]-DMS methylierten Lachsspermien-DNA. Die Aktivität der Glykosylase wird ausgedrückt als Menge der freigesetzten Basen pro Zeiteinheit und pro eingesetzter Proteinmenge.

Die Methylierung des DNA-Substrates erfolgte durch Behandlung von 20 mg DNA mit 4,55 mmol [³H]-DMS bei Raumtemperatur in TE (10:1) für 12 h. Die spezifische Aktivität des DNA-Substrates betrug 10⁵cpm/mg. Die methylierte DNA wurde vor jedem Aktivitätstest über eine Sephadex G75-Säule von spontan hydrolysierten Basen befreit.

In einem 100 µl-Ansatz wurden die methylierte DNA (60000 cpm), 20 µl 5x Reaktionspuffer (500 mM KCl, 250 mM Hepes pH 6,7), 5 µl 100 mM Dithiothreitol mit 300 µg-500 µg Gesamtzelleextrakt 1 h bei 37°C inkubiert und dann die Reaktion auf Eis abgestoppt.

Nach Zugabe von Hefe tRNA (5 µg) und BSA (200 µg) oder 50 µg Lachsspermien-DNA wurde die DNA in 0,1 Vol. NaAc 3 M (pH 4,8) und 2 Vol. Ethanol ausgefällt und abzentrifugiert (15 min, 10000g, 4°C). Der Überstand mit den freigesetzten Basen wurde in einem Rotationsverdampfer (*speed-vac*) eingedampft und in 30 µl FPLC-Laufpuffer (0,4 M NH₄H₂PO₄, 5% Methanol) aufgenommen. Die freigesetzten Basen wurden über eine „reversed phase“ Säule (PepRPC[®] HR5/5, Pharmacia) mit Hilfe der FPLC-Methode aufgetrennt. Vor der Auftrennung der [³H]-markierten Methylpurine wurden zur Kontrolle 5 µl eines Methylpurinmisches (3-Methyladenin, 1-Methyladenin, 1-Methylguanin, 7-Methylguanin, je 1 mg/ml) in 50 µl Laufpuffer über die FPLC-Säule aufgetrennt (Flußrate 0,5 ml/min) und der Trennerfolg durch kontinuierliche Messung der Absorption des Laufpuffers bei 254 nm kontrolliert. Das Gemisch wurde auch jedem präparativen FPLC-Lauf zugegeben, um die Trennung kontrollieren zu können. Es wurden 0,5 ml-Fractionen gesammelt. Die gesammelten Fractionen wurden mit 5 ml Szintillationslösung vermischt. Die Radioaktivität in den Fractionen wurde in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt.

Die Menge an freigesetzten Methylpurinen kann aus der spezifischen Aktivität der [³H]-markierten, methylierten Purinbasen und der Zählrohrbeute des Flüssigkeits-Szintillationszählers errechnet werden: Ca. 90% der Methylierungen der DNA mit DMS sind N³-Methyladenin und N⁷-Methylguanin (Beranek, 1990). Bei einer Zählrohrbeute von 50% (1 cpm = 2 dpm) und einer spezifischen Aktivität des [³H]-DMS von 1,1 Ci/mmol entspricht 1 cpm 0,818 fmol N³-Methyladenin- und N⁷-Methylguanin-Basen.

6.3. Chloramphenicol-Acetyltransferase Aktivität

Das bakterielle Gen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) dient als Reportergen für eukaryontische Promotoren. Die Expression des Reportergens wird durch die Enzymaktivität des translatierten Proteins bestimmt. Im Aktivitätstest werden Acetylgruppen von zugegebenen Acetyl-CoA durch das Enzym auf [¹⁴C]-markiertes Chloramphenicol übertragen.

Der Reaktionsansatz (140 μ l) bestand aus 119,5 μ l Proteinextrakt (in 0,25 M Tris pH 8), 20 μ l 4 mM Acetyl-CoA und 0,5 μ l [14 C]-Chloramphenicol (0,1 μ Ci). Die Reaktion wurde 2-15 h bei 37°C inkubiert und anschließend das Chloramphenicol mit 1 ml Ethylacetat aus dem Reaktionsansatz extrahiert. Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer ganz entfernt und das eingetrocknete Chloramphenicol in 20 μ l Ethylacetat aufgenommen. Die Auftrennung von acetyliertem und nichtacetyliertem Chloramphenicol erfolgte durch Dünnschichtchromatographie. Als feste Phase diente Kieselgel. Das Fließmittel war ein Gemisch aus 90% Chloroform und 10% Methanol. Die Quantifizierung der Enzymaktivität erfolgte autoradiographisch durch die Bestimmung der Menge an acetyliertem [14 C]-Chloramphenicol und wurde bezogen auf die eingesetzte Substratmenge. Die Autoradiographie wurde bei Raumtemperatur mittels einer photosensitiven Phosphorplatte (Fuji Photo Film Co.) durchgeführt und die Signale durch einen „Phosphoimage Reader“ (Fuji Photo Film Co.) gelesen. Die Auswertung der Autoradiographie erfolgte durch das Softwareprogramm *Mac BAS 1000* (Fuji Photo Film Co.).

6.4. β -Galaktosidase Aktivität

Das bakterielle Enzym β -Galaktosidase ist ein weiteres Reporterenzym für eukaryontische Promotoren. Der Enzymtest besteht in der Umsetzung des farblosen Substrates O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid in ein gelbgefärbtes Produkt.

In einem Standardansatz wurden 50-250 μ g Gesamtzelleextrakt in 200 μ l 60 mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 50 mM β -Mercaptoethanol über Nacht bei 37°C zusammen mit den Substrat (0,67 mg/ml) inkubiert. Durch Zugabe von 150 μ l 1M Na₂CO₃ wurde die Reaktion gestoppt und die relative Menge an Produkt durch die Messung der Absorption bei 405 nm bestimmt.

7. Präparation von Nukleinsäuren

7.1. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

7.1.1. Präparation kleiner Mengen

Die Bakterien einer 1,5 ml Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (1 min, 10000 rpm) und in 100 µl TE (25:10) (pH 8), 50 mM Glucose resuspendiert. Zur alkalischen Lyse der Zellen wurde 200 µl 0,2 M NaOH, 1% SDS zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 150 µl eiskalten 3 M NaAcetats (pH 4,5) wurden Proteine und hochmolekulare DNA ausgefällt (10 min bei 0°C). Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und der Überstand durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion weiter gereinigt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zugabe von 2 Volumen abs. Ethanol ausgefällt und pelletiert (15 min, 14000 rpm).

7.1.2. Präparation großer Mengen

Die Präparation großer Plasmidmengen aus 400 ml Übernachtskultur erfolgte ebenfalls durch alkalische Lyse der Zellen (s. 7.1.1.). Die Aufreinigung erfolgte danach durch eine Ionenaustausch-Chromatographie über Quiagensäulen nach dem Firmenprotokoll (Diagen). Die Ausbeute betrug je nach Plasmid 200 µg - 1 mg DNA.

7.2. Präparation von RNA aus Säugerzellen

Die Präparation von Gesamt-RNA wurde durch eine kombinierte Guanidiniumisothiocyanat/Phenol/Chloroform-Extraktion erreicht (nach Chomczynski und Sacchi, 1987). Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und pro ca. 10^7 Zellen (eine 10 cm Petrischale) mit 1 ml RNA-Lysepuffer (4 M Guanidiniumisothiocyanat, 100 mM β -Mercaptoethanol, 25 mM NaCitrat pH 7, 0,5% Sarkosyl) versetzt. Diese Behandlung bewirkt eine starke Hemmung anwesender RNasen bei gleichzeitiger Lyse der Zellen. Das viskose Lysat wurde von der Platte geschabt und in 15 ml Plastikröhrchen überführt. Dann erfolgte nacheinander und mit leichtem Mischen dazwischen die Zugabe von 1 ml wassergesättigtem Phenols, 100 µl 3 M NaAcetat (pH 4,5) und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1). Schließlich wurde gut gemischt und die Lösung 15 min auf Eis gestellt. Die ausgefallenen Proteine und DNA wurden danach abzentrifugiert (30 min, 13000 rpm) und der Überstand

erneut mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24,5:0,5) extrahiert. Schließlich wurde die RNA mit Isopropanol ausgefällt, abzentrifugiert (30 min, 13000 rpm), erneut in 400 µl RNA-Lysepuffer aufgenommen und mit Ethanol präzipitiert. Die RNA wurde in Wasser oder in einem Wasser-Ethanol-Gemisch (1:1) aufbewahrt.

8. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in wäßrigen Lösungen wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Einer OD_{260} von 1 entsprechen dabei 50 µg/ml DNA, 40 µg/ml RNA bzw. 20 µg/ml Oligonukleotide. Der Quotient OD_{260} / OD_{280} kann zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäurelösung benutzt werden: Der Quotient beträgt bei reiner DNA und 1,8 bei reiner RNA 2,0.

9. Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

9.1. Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren (>100 bp) wurden horizontale Agarosegele gegossen. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld bei 5 bis 10 V/cm. Zur Anfärbung der NS wurde dem noch flüssigen Gel 5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, das sich in die NS einlagert und sie so im UV-Licht bei 254 nm sichtbar macht.

9.1.1. DNA

Zur Elektrophorese von DNA wurden 0,8-1,5%ige Agarosegele in 1xTBE-Laufpuffer gegossen. Die DNA-Proben wurden zum Auftrag mit 6 x Ladepuffer (40% Sukrose, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylen Cyanol) versetzt. Die präparative Auftrennung von DNA erfolgte in *low melting* Agarosegele mit 1xTAE-Laufpuffer.

9.1.2. RNA

Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1%igen Agarosegelen mit MOPS-Laufpuffer (40 mM MOPS, 10 mM NaAc, 1 mM EDTA, pH 7). Zur Auftrennung von RNA in Agarosegelen mußte die RNA denaturiert werden: 5 µl RNA (5-20 µg) wurden mit 15 µl Denaturierungspuffer (2 µl 5x MOPS-Puffer, 3 µl Formaldehyd, 10 µl deionisiertes Formamid) versetzt und bei 56°C 15 min denaturiert. Die denaturierte RNA wurde (in einem Eis-Ethanol-

Gemisch) schnell abgekühlt und mit 4 µl Ladepuffer (50% Glycerin, 10 mM NaH₂PO₄, 0,4% Bromphenolblau) gemischt.

9.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung einzelsträngiger DNA-Fragmente, mit einer Länge von 50-500 bp aus Sequenzierreaktionen, *primer extension*-Reaktionen oder S1-Nuklease-Protektionsanalysen wurden 6% denaturierende Polyacrylamidgele (30% Harnstoff) der Größe 20 x 40 cm² und der Dicke von 0,4 mm gegossen. Die Auftrennung erfolgte in elektrischen Feld bei 45 V/cm, 40 mA mit 1xTBE als Laufpuffer. Die DNA wurde vor dem Auftragen 5 min bei 85°C denaturiert. Nach dem Lauf wurde das Gel durch Adsorption an aufgelegtes Whatman-Filterpapier von der Glasplatte abgezogen und bei 80°C 1h unter Vakuum auf dem Filterpapier getrocknet.

10. Nachweis von Nukleinsäurefragmenten durch Blot- und Hybridisierungstechniken

10.1. Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen (Southern-, Northern-Blot)

Der Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen (Hybond N⁺, Amersham, Braunschweig) erfolgte durch Kapillarkräfte; für DNA (Southern-Blot) wurde 0,4 M NaOH, für RNA (Northern-Blot) 20 x SSC als Fließmittel verwendet. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran kurz in 2 x SSC gespült und bei Raumtemperatur auf Whatman-Filterpapier getrocknet. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte bereits während des Transfers mit 0,4 M NaOH. Die transferierte RNA wurde durch UV-Licht auf der Nylonmembran fixiert (*UV-cross linking*).

10.2. Herstellung radioaktiver DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden für die Hybridisierung (s.u.) erfolgte durch sog. *random-priming*-Reaktionen (Prime-It Kit, Stratagene). Dabei wurden kurze DNA-Oligonukleotide (*primer*) zufälliger Sequenz an das zu markierende DNA-Fragment gebunden. Die Bindung erfolgt an komplementäre Sequenzen mit einer bestimmten Häufigkeit, die abhängig ist von der Anzahl der Oligonukleotide und deren Länge. Die gebundenen

Oligonukleotide dienen der zugegebenen Klenow-Polymerase als Startermoleküle, an das nun Desoxyribonukleotide ansynthetisiert wurden. Die radioaktive Markierung erfolgte durch den Einbau von α - ^{32}P -dCTP.

Ein Standardansatz enthielt 20-70 ng DNA (24 μl), der zusammen mit 10 μl Oligonukleotiden denaturiert (5 min, 95°C) wurde. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt und 10 μl 5x Klenow-Puffer (mit dATP, dTTP, dGTP), 3 μl α - ^{32}P -dCTP und 1 μl (5 Units) Klenow-Polymerase zugefügt. Der Ansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert. Zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde nach Zusatz von 5 μg Heringsperma-DNA, 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 4,5) und 2 Volumen Ethanol die DNA bei -20°C ausgefällt. Die ausgefallene DNA wurde abzentrifugiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 μl TE aufgenommen.

10.3. Hybridisierung von Nukleinsäuren und Autoradiographie

Die Vorhybridisierung und Hybridisierung erfolgte für DNA-DNA Hybridisierung in 7% SDS, 1 M Na_2HPO_4 pH 7,2 (mit Phosphorsäure eingestellt), 0,5 M EDTA, pH 8 und für DNA-RNA Hybridisierung in 1 M NaCl, 1% SDS, 10% Dextransulfat in rotierenden Glaszylindern in einem Hybridisierungssofen. Zur Vorhybridisierung wurden die Membranen in 2 ml/cm^2 Hybridisierungslösung für mindestens 1h bei 60°C äquilibriert. Dann wurden 90% der Hybridisierungslösung entfernt und die frisch denaturierte radioaktive Probe (10 min, 100°C) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60°C . Zur Entfernung der nicht oder unspezifisch gebundenen radioaktiven Probe wurde die Hybridisierungslösung entfernt und kurz mit 2xSSC, 0,5% SDS gespült. Danach wurde zweimal 15 min mit 2xSSC, 0,5% SDS bei 60°C gewaschen. Der Wascherfolg, d.h. die Verstärkung des Signals gegen den Hintergrund unspezifisch gebundener Radioaktivität, wurde mit einem Geiger-Müller-Zählrohr verfolgt. Bei starkem Hintergrundsignal wurde weiter mit 1xSSC, 0,5xSSC und schließlich mit 0,1xSSC, (mit jeweils 0,5% SDS) bei 60°C gewaschen. Zuletzt wurde die Membran in 2xSSC vom SDS befreit und feucht in Plastikfolie eingeschweißt.

Die gebundene Menge an DNA-Sonden wurde durch die Schwärzung eines Röntgenfilmes oder durch eine photosensitive Phosphorplatte (s. 6.3.) autoradiografisch bestimmt. Dazu wurde die eingeschweißte Membran in einer lichtdichten Kammer mit einem Röntgenstrahlensensitiven Film bei -80°C oder mit der Phosphorplatte bei Raumtemperatur exponiert. Die Schwärzung der Röntgenfilme wurde laserdensitometrisch (Ultrascan XL, LKB) bestimmt und durch ein Softwareprogramm (Gel Scan XL 2.0, LKB) quantifiziert.

11. Isolierung von DNA-Sequenzen aus einer Cosmidgenbank durch „Kolonie-Hybridisierung“

Die verwendete Genbank enthielt in den Cosmid-Vektor pWE 15 klonierte genomische DNA-Fragmente der Ratte (Stratagene, La Jolla, USA). *E.coli*-Bakterien, die die Cosmide enthielten, wurden in einer Dicht von 10^6 Zellen pro 400 cm^2 auf einer Nylonmembran ausplattiert („Masterfilter“), die auf LB-Agarose (mit $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Ampicillin zur Selektion) gelegt worden war. Nach 15-20 Stunden bei 37°C waren die Einzelzellen zu sichtbaren Kolonien ausgewachsen. Vom Masterfilter wurden zwei Abdrücke (Replikafilter) hergestellt: Der auf Filterpapier gelegte Masterfilter wurde mit einer neuen Nylonmembran bedeckt und Bakterien vom Masterfilter durch kräftiges Andrücken auf die neue Membran überführt. Der Vorgang wurde einmal wiederholt und die Replikafilter für weitere ca. 15 Stunden - oder bis die Kolonien etwa stecknadelkopfgroß waren - kultiviert. Der Masterfilter wurde bei 4°C aufbewahrt. Die Bakterien der Replikafilter wurden lysiert und ihre DNA auf den Nylonmembranen fixiert, indem sie zuerst 4 min. auf einen mit $0,2 \text{ N NaOH}$, 1% SDS und dann für 4 min. auf ein mit $0,5 \text{ N NaOH}$ getränktes Filterpapier gelegt wurden. Anschließend wurde die Membranen zur Neutralisation in $1 \text{ M Tris pH } 7,4$ überführt. Das sie bedeckende Bakterienlysat wurde in $2\times\text{SSC}$, $0,1\%$ SDS durch leichtes Reiben mit Zellstoff entfernt. Zum Schluß wurden die Membranen in $2\times\text{SSC}$ gewaschen und dann getrocknet. Zur Identifizierung bestimmter DNA-Fragmente wurde die Membranen wie oben beschrieben (siehe 10.3.) hybridisiert und die mit beiden Replikafiltern erhaltenen Signale verglichen. Von identischen Signalen wurden die entsprechenden Kolonien des Masterfilters in 20 mM MgSO_4 aufgenommen und $1:5000$ verdünnt auf LB-Agarose ($50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) ausplattiert.

Um Einzelklone zu erhalten wurde wie folgt weiterverfahren:

- Von den zu sichtbaren Kolonien ausgewachsenen Klonen wurden durch Auflegen einer Nylonmembran ein Replikafilter hergestellt. Seine Position auf der Bakterienplatte wurde durch Nadelstiche markiert.
- Die Bakterien auf dem Replikafilter wurde weiterkultiviert, bis Einzelkolonien zu sehen waren.
- Die DNA der Bakterien wurde wie oben beschrieben auf die Membran transferiert und fixiert.
- Die Membran wurde erneut mit der in der ersten Hybridisierung verwendeten radioaktiven Sonde hybridisiert und „positive Einzelklone“ von den Bakterienplatten in $5 \text{ ml LB-Flüssigmedium}$ überimpft.

Konnten in dieser ersten Verdünnungsrunde keine Einzelklone isoliert werden, so wurde der Vorgang mit einer stärkeren Verdünnung wiederholt. Die schließlich isolierten Einzelklone wurden in Southern-Analysen charakterisiert.

12. Klonierung von DNA in *E.coli*

12.1. Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde mit zweifachem Überschuß an Restriktionsendonukleasen für eine Inkubationszeit von 2 h bis über Nacht entsprechend den Bedingungen für das jeweilige Enzym durchgeführt. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten, die zur Klonierung verwendet wurden oder als radioaktive Sonden dienen sollten, wurden 20-50 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die fragmentierte DNA wurde durch eine präparative Gelelektrophorese (siehe 9.1.1.) der Größe nach getrennt. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten zur Klonierung wurden jeweils 5-10 µg Plasmid-DNA eingesetzt.

12.2. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden durch Elektroelution aus dem Agarosegel isoliert. Dazu wurde die jeweilige Bande im UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch überführt, der mit 400 µl TE (10:1) (pH 8) gefüllt wurde. Der Dialyseschlauch wird in eine Elektrophoresekammer mit TAE-Laufpuffer gelegt. Bei einer Spannung von 100 V wandert das DNA-Fragment aus dem Gel und sammelt sich an der Wand des Dialyseschlauchs. Das Gelstück wurde entfernt und die DNA durch kurzes Umpolen von der Wand des Dialyseschlauchs zurück in die TE-Lösung gebracht. Diese wurde zur Aufreinigung mit Phenol/CIA 1:1 extrahiert und anschließend mit 0,1 Volumen, 3 M NaAcetat (pH 4,5) und 2 Volumen Ethanol präzipitiert.

12.3. Modifizierungen von fragmentierter DNA

12.3.1. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Religation eines Plasmides mit zwei gleichen Enden zu verhindern, wurden die Phosphatgruppen an den Enden mit alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIP= *calf*

intestinal phosphatase) entfernt. Dazu wurden 2-5 µg Plasmid-DNA mit 1-2 U Phosphatase, bei 37°C für 1h inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wurde anschließend das Reaktionsgemisch 10 min auf 75°C erhitzt und das Protein mit Phenol/CIA extrahiert. Anschließend wurde die DNA ausgefällt.

12.3.2. Herstellung von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden (*blunt ends*)

War es nicht möglich, komplementäre überhängende Enden für den Plasmidvektor und das DNA-Fragment herzustellen, wurden 5'-überhängende DNA-Enden, die die meisten Restriktionsendonukleasen produzieren, mit dem Klenow-Fragment der E.coli Polymerase I behandelt. Dieses besitzt eine 5'-3'-Polymerase- und eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, jedoch keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität. In Anwesenheit von Desoxynukleotiden synthetisiert dieses Polymerasefragment an die 3'-Enden der DNA und macht diese Enden damit glatt. Zur Herstellung von *blunt end*-DNA mit Klenow-Polymerase wurde direkt nach dem Verdau ein Gemisch der vier Desoxyribonukleotide zugegeben (1 µl je 1 mM dNTP auf 20 µl) und mit 5 U Klenow-Enzym 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei *blunt end*-Ligationen wurde der Vektor anschließend immer mit Phosphatase behandelt (s.o). Die Herstellung von *blunt end*-DNA aus 3'-Überhängen war in dieser Arbeit nicht nötig. 3'-Überhänge werden durch Behandlung der DNA mit T4-DNA-Polymerase geglättet. Diese besitzt eine sehr starke 5'-3'-Exonukleaseaktivität, die in Anwesenheit von Desoxynukleotiden zu einem Abbau von 3'-Überhängen führt.

12.4. Ligation

Die Verbindung von Vektor und DNA-Fragment wird durch eine DNA-Ligase bewerkstelligt. Diese verknüpft die freien 5'-Phosphat- und 3'-OH-Gruppen komplementärer oder glatter DNA-Enden miteinander. Zur Ligation wurden 100 ng Fragment mit 200 ng Plasmid in einem Volumen von 5 µl vereinigt. Bei *blunt end*-Ligationen wurde dann 3 µl 50% PEG 6000 zugegeben. Nach Zugabe von 1 µl 10xLigationspuffer (nach Herstellerangabe) und 1U Ligase wurde auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt. Die Ligation fand über Nacht bei 15°C statt. Die DNA im Ligationsansatz wurde anschließend ausgefällt und in 10 µl Wasser aufgenommen. Die Hälfte davon wurde zur Transformation von E.coli Bakterien eingesetzt.

13. *In vitro* Synthese von DNA

13.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mittels Taq-Polymerase

Durch die Taq-Polymerase wird ein DNA-Stück, das zwischen zwei zum DNA-Fragment komplementären Oligonukleotiden als Synthesestartpunkte liegt, durch ein zyklisches Verfahren der Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese spezifisch vervielfältigt.

In einem Standardansatz von 20 µl wurde zunächst 2 µl 10xReaktionspuffer (Amersham), die beiden Oligonukleotide (25 pM Endkonzentration) und die DNA-Matrize (1 µg genomische DNA oder 20 ng Plasmid-DNA) für 10 min bei 95°C denaturiert. Dann wurden auf Eis 4 µl dNTP-Mix (1,25 mM je) und 0,5 µl Taq-Polymerase (5U/µl) zugegeben.

Die PCR-Reaktion erfolgte dann in einem PCR-Gerät (Perkin-Elmer) unter folgenden Reaktionsbedingungen: 1.) Denaturierung: 1 min bei 94°C. 2.) Hybridisierung von DNA-Matrize und Oligonukleotiden: 2 min bei 10-15°C unter der berechneten Schmelztemperatur der DNA-Oligonukleotid-Hybriden. 3.) Synthese: 3 min bei 72°C. (Die Dauer der Synthese hängt von der erwarteten Fragmentlänge ab. Als Faustregel gilt, daß die Syntheserate bei ca. 1000 bp/min liegt.). Die Anzahl der durchlaufenen Zyklen betrug 25-35.

13.2. Synthese durch Reverse Transkription

Die Reverse Transkriptase (RT) ist ein Enzym, das RNA als Matrize für die Synthese komplementärer DNA verwendet. In dieser Arbeit wurde das Enzym verwendet, um ausgehend von einem komplementären, radioaktiv markierten Oligonukleotid ein DNA-Strang zu synthetisieren, durch den der genaue Start der Transkription bestimmt werden konnte. Es wurden die AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*)- und die M-MLV (*Mouse Murine Leukemia Virus*)-Reverse Transkriptase benutzt. 25 pmol Oligonukleotid wurden mit 20 µg Gesamt-RNA in 20 µl 50% Formamid, 400 mM NaCl, 50 mM Pipes (pH 6,4) 5 min bei 56°C denaturiert und über Nacht bei 42°C hybridisiert. Die DNA wurde ausgefällt. Die Ansätze für die reversen Transkriptionen enthielten neben der RNA-Oligonukleotid-Hybriden:

für die AMV- Reverse Transkriptase: je 0,5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP
 5 µl 5x AMV-RT Reaktionspuffer
 2 µl (16U) AMV-RT
 ad 20 µl mit H₂O

Der Ansatz wurde für 2 h bei 47°C inkubiert.

Für die M-MLV Reverse Transkriptase: je 0,5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP
50 µg/ml Actinomycin D
100 mM DTT
5 µl 5x M-MLV-RT Reaktionspuffer
2 µl (20 U) M-MLV-RT
ad 20 µl mit H₂O

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert.

14. S1-Nuklease-Protektionsanalyse

Diese Methode wurde verwendet, um nach Hybridisierung eines radioaktiv markierten DNA-Strangs mit der komplementären mRNA den genauen Start der Transkription zu bestimmen. 30 µg Gesamt-RNA wurden mit einer radioaktiv endmarkierten und durch PCR hergestellten DNA-Sonde (ca. 100 ng, 10⁷ cpm) in 20 µl 50% Formamid, 400 mM NaCl, 100 mM PIPES, pH 6,4, für 10 min bei 85°C denaturiert und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Nach Zugabe von 300 µl S1-Nuklease-Puffer (280 mM NaCl, 50 mM NaAcetat, pH 4,5, 4,5 mM ZnSO₄ (Maniatis, T. et al., (1982))) wurden der Ansatz bei 40°C für 2 h mit 30 U S1-Nuklease behandelt, um die einzelsträngigen Nukleinsäuren abzubauen. Nach der Nukleasebehandlung wurden die Nukleinsäuren mit 2 Volumen abs. Ethanol ausgefällt, abzentrifugiert und in 5 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen. 1-2 µl davon wurden in einer PAGE analysiert.

15. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977) mit dem *T7-Sequencing Kit* (Pharmacia) durchgeführt. 2 µg Plasmid-DNA wurden in 0,5 N NaOH alkalisch denaturiert (15 min), mit Ethanol ausgefällt, abzentrifugiert und in 10 µl bidest. Wasser aufgenommen. Dann wurden 2 µl (10 pmol) Oligonukleotid, als Startermolekül der DNA-Synthese, 2 µl (1 M Tris (pH 7,6), 100 mM MgCl₂, 160 mM DTT) zugegeben und die Plasmid-DNA 5 min bei 65°C denaturiert. Die Hybridisierung der Oligonukleotide mit dem Plasmid erfolgte bei 37°C für 10 min und bei RT für 5 min. Zu dem Hybridisierungsansatz wurden 3 µl eines Desoxynukleotid-Gemisches (je 1,375 µM dCTP, dGTP, dTTP in 333,5 mM NaCl), 1 µl [³⁵S]-dATP und 2 µl (3,2 U) T7-DNA-Polymerase gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Nach der Synthese wurde der Ansatz zur Termination an spezifischen Basen in vier Gefäße verteilt, je 2,5 µl (7x10⁻¹² mol) eines Didesoxynukleotids (2,8 µM) zugegeben und fünf

weitere Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 µl Auftragspuffer für Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 9.2.) abgestoppt. Die DNA-Fragmente in 2-3 µl der verschiedenen Terminationsreaktionen wurden in einer PAGE aufgetrennt (siehe 9.2.) und autoradiographisch (siehe 10.3.) ausgewertet.

Ergebnisse

1. Basale und induzierte Expression der MGMT und der MPG in Hepatomzelllinien und in primären Hepatozyten der Ratte

Um zu prüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen der basalen Expression sowie der Induzierbarkeit der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) und N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) und der leberspezifischen Differenzierung von Rattenzellen gibt, wurde die Expression dieser Reparaturproteine auf mRNA- und Aktivitätsebene in unterschiedlich differenzierten Leberzellen der Ratte untersucht. Die dabei verwendeten Hepatomzelllinien sind Abkömmlinge von Zellen des Reuber Hepatoms H-35 (Pitot et al., 1964). Der nach dreifacher Subkultivierung aus dem Hepatom isolierte, stabile Zellstamm H4IIEC3 führte zur Etablierung der Zelllinie H4IIE. Diese Zelllinie besitzt einen hohen Grad an leberspezifischer Differenzierung (Pitot et al., 1964). Die in unterschiedlichen Laboratorien entstandenen Variationen H4IIEC3/T (Hesse et al., 1984), H5, Fao (Deschatrette und Weiss, 1974), FaofIC2-Rev7-Revertanten (Deschatrette et al., 1980) - auch H4IIEC3/G⁻ genannt (Hesse et al., 1984) - unterscheiden sich in der Expression leberspezifischer Funktionen, von denen einige in **Tabelle 2** aufgeführt sind.

Tabelle 2: Expression leberspezifischer Enzyme in Ratten-Hepatomzelllinien

	ADH ^a	Albumin ^b	TAT ^c	AAT ^d	Aldrin-epoxidase ^e
H4IIE			80-200		
Fao	+	2,5	54	33	29
H4IIEC3/G ⁻	+	0,04	55	90	18,1
H4IIEC3/T					0,8
H5	-	n.d.	1	n.d.	n.d.

a) Vorhandensein (+) oder Nichtvorhandensein (-) des Alkohol-Dehydrogenase-Isoenzym (ADH) der Leber nach Deschatrette et al. (1980).

b) Menge an Ratten-Serumalbumin in µg/10⁶ Zellen/24 h nach Deschatrette et al. (1980).

c) Tyrosin-Aminotransferase (TAT)-Aktivität in mU/mg Proteinextrakt nach Pitot et al. (1964), Deschatrette und Weiss (1974), Deschatrette et al. (1980).

d) Alanin-Aminotransferase (AAT)-Aktivität in mU/mg Proteinextrakt nach Deschatrette und Weiss (1974), Deschatrette et al. (1980).

e) Aldrinepoxidase Aktivitäten (pmol/min/mg Proteinextrakt) nach Hesse et al. (1984).

n.d., nicht detektierbar

Sie werden aufgrund dessen als leberspezifisch differenziert (H4IIEC3/G⁻, Fao) bzw. dedifferenziert (H5, H4IIEC3/T) angesehen. Zum Vergleich der aufgeführten etablierten Zelllinien mit nicht etablierten Ratten-Leberzellen wurden Hepatozyten durch eine zweistufige Leberperfusion aus der Leber männlicher Sprague-Dawley-Ratten isoliert (siehe Methodenteil und Walser, 1992). Die primären Hepatozyten aggregierten in unbeschichteten Plastikschalen zu makroskopisch sichtbaren Sphäroiden. Diese wurden in Spinner-Flaschen als Suspension in einem Medium kultiviert, in dem die Zellen überlebten, sich aber nicht mehr teilten und so über den gesamten Untersuchungszeitraum einen hohen Differenzierungsgrad aufrechterhielten (gemessen am Cytochrom P-450 (Cyt P-450)-Gehalt, Aktivität und Induzierbarkeit Cyt P-450-abhängiger Monooxygenasen, der TAT, und der Glutathion-S-Transferase (Beron, 1991; Walser, 1992).

1.1. Basale Expression der MGMT und MPG in Ratten-Leberzellen

Die basale Expression der MGMT und der MPG wurde sowohl auf Ebene der mRNA als auch auf der Ebene der Proteinaktivität bestimmt. Zum Vergleich mit einem leberspezifischen Marker wurde die Menge an Tyrosin-Aminotransferase (TAT)-mRNA in den Zellen gemessen. Wie aus **Abbildung 2** zu ersehen ist, zeigen die dedifferenzierten H5-Zellen in Northern-Blot-Analysen keine TAT Expression. In den anderen Zelllinien steigt die Menge an TAT-mRNA in der Reihenfolge H4IIEC3/T, H4IIE, H4IIEC3/G⁻ und Fao an. Die Expression der TAT stimmt mit der anderer leberspezifischer Marker überein (siehe **Tabelle 2**). Die größte Menge an TAT-mRNA findet man in primären Hepatozyten der Sphäroidkultur. Diese zeigen außerdem einen stabilen Gehalt an Cytochrom P-450, der etwa 30-40% des Gehaltes der Leber entspricht (Walser, 1992). Da als Monolayer kultivierte Hepatozyten innerhalb von 24 Stunden bis zu 90 % ihres Cytochrom P-450 Gehaltes verlieren (Beron, 1991), ist dies ein deutliches Zeichen dafür, daß bei den hier verwendeten primären Hepatozyten die leberspezifische Differenzierung während der Kultivierung als Sphäroide in hohem Maß erhalten bleibt.

1.1.1. Basale MGMT- und MPG-Aktivität

Die basalen Enzymaktivitäten der MGMT und der MPG sowie die Quantifizierung der TAT-mRNA-Menge in den verschiedenen Hepatomzelllinien und den primären Hepatozyten sind in **Tabelle 3** zusammengefaßt worden. Da die Zellen der verschiedenen Zelllinien und die primären Hepatozyten stark in ihrer Größe differieren, wurden die Enzymaktivitäten nicht auf die Proteinmenge im Zellextrakt, sondern auf die Zellzahl bezogen. Die MGMT-

Enzymaktivität entspricht der Menge an Methylgruppen, die von einem methylierten DNA-Substrat auf Protein im Zellextrakt in einer Stunde transferiert werden. In Vorversuchen wurde gezeigt, daß diese Zeitspanne ausreichend ist, um einen vollständigen Methylgruppen-Transfer auf das MGMT-Protein zu erreichen. Die dedifferenzierten H5-Zellen besaßen eine sehr geringe aber meßbare MGMT-Aktivität von 4 fmol übertragenen Methylgruppen pro 10^6 Zellen. Deutlich höhere Aktivität zeigten H4IIEC3/T- und H4IIE-Zellen mit 70 bzw. 113 fmol/ 10^6 Zellen. Die höchste MGMT-Aktivität war in den als leberspezifisch differenziert geltenden Hepatomzellen H4IIEC3/G⁻ (204 fmol/ 10^6 Zellen), Fao (159 fmol/ 10^6 Zellen) und in primären Hepatozyten (192 fmol/ 10^6 Zellen) zu finden. Die basale Aktivität der MGMT in den Hepatomzellen korrelierte mit der Expressionsstärke des leberspezifischen TAT-Enzyms (Tabelle 3). Die MGMT-Aktivität der Hepatozyten war im Gegensatz zur starken TAT-Expression (3,8-mal stärker als in Fao-Zellen) nicht deutlich höher als in den leberspezifisch differenzierten Fao-Zellen. Es sei erwähnt, daß die MGMT-Aktivität in primären Hepatozyten, die aus verschiedenen Tieren isoliert worden sind, starken Schwankungen unterlag und maximal Werte bis zu 400 fmol/ 10^6 Zellen gemessen worden sind.

Tabelle 3: MGMT- und MPG-Aktivitäten der Ratten-Hepatomzelllinien und primärer Hepatozyten, unbehandelt und nach Behandlung mit MNNG und Röntgenstrahlen.

Die Zellen wurden mit MNNG (15 μ M) und Röntgenstrahlen (X-ray) (2 Gy) behandelt, 48 h später geerntet und Proteinextrakt hergestellt. Die MGMT- und MPG-Aktivitäten wurde wie im Methodenteil beschrieben bestimmt. Die Basalaktivitäten entsprechen den Aktivitäten in unbehandelten Zellen und stellen, wie die Aktivitäten nach den jeweiligen Behandlungen, den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Bestimmungen dar. Für die Basalaktivitäten sind die Standardabweichung der Bestimmungen angegeben. Die Induktion der Aktivität nach den Behandlungen wurde relativ zu der unbehandelten Zellen berechnet und als Induktionsfaktor (I.F.) angegeben. Zum Vergleich der Aktivitäten mit einer leberspezifischen Funktion wurde die relative Menge der TAT-mRNA in den Zellen angegeben.

Zelllinie	MGMT (fmol/ 10^6 Zellen)					MPG (fmol[3MeA+7MeG]/ 10^6 Zellen/h)					TAT ^a
	Basalaktivität	MNNG		X-ray		Basalaktivität	MNNG		X-ray		
		I.F.	I.F.	I.F.	I.F.		I.F.	I.F.			
H5	4 \pm 2	0,4	0,1	4	1,0	65 \pm 3	60	0,9	90	1,3	n.d.
H4IIE	113 \pm 23	196	1,7	176	1,6	74 \pm 14	251	3,4	224	3,0	0,116
H4IIEC3/T	70 \pm 6	117	1,6	124	1,8	68 \pm 22	74	1,6	100	1,3	0,05
H4IIEC3/G ⁻	204 \pm 47	183	0,9	199	1,0	178 \pm 39	279	1,6	236	1,3	0,229
Fao	159 \pm 6	210	1,3	225	1,4	169 \pm 52	228	1,3	111	0,7	0,364
Hepatozyten	192 \pm 164	1015	5,3	518	2,7	782 \pm 324	1252	1,6	1427	1,8	1,379

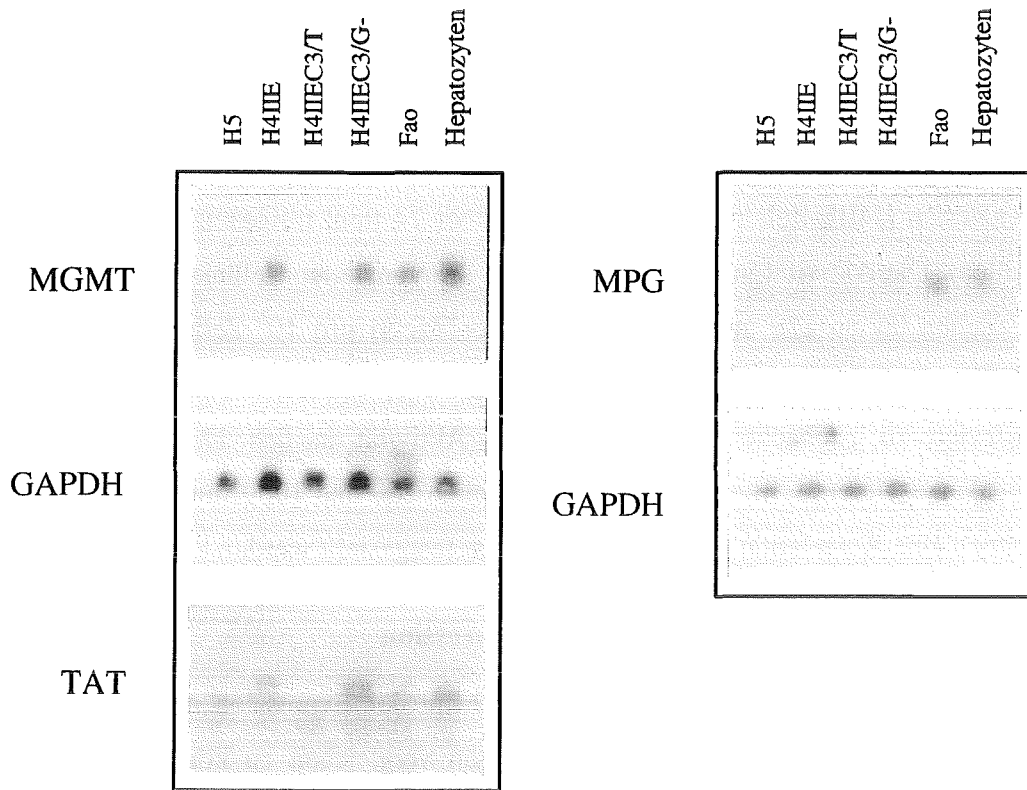
a) Die Angabe der TAT-Expression erfolgt nach den Bestimmungen der mRNA Mengen der TAT in **Abbildung 2**. n.d., nicht detektierbar.

Die MPG-Aktivität entspricht der Menge aus einem methylierten DNA-Substrat freigesetzter N-Methylpurine (3-MeA und 7-MeG (siehe Methodenteil)). Die MPG-Aktivität ist in den untersuchten Zelltypen ebenfalls unterschiedlich exprimiert. Es wurde keine Korrelation mit der TAT-Expression oder der MGMT-Aktivität beobachtet. So ist in den dedifferenzierten H5-Zellen und den H4IIEC3/T-Zellen die MPG-Aktivität etwa ebenso groß, wie in den differenzierten H4IIE-Zellen (65 und 68 gegenüber 74 fmol freigesetztes [3MeA+7MeG] pro 10^6 Zellen). Die Aktivität in den leberspezifisch differenzierten Zelllinien reicht von 74 fmol in H4IIE-Zellen bis zu 178 und 169 fmol [3MeA+7MeG] pro 10^6 Zellen in H4IIEC3/G⁻ und Fao-Zellen. Eine hohe durchschnittliche Aktivität von 782 fmol pro 10^6 Zellen ist in den Hepatozyten zu beobachten. Auch die MPG-Aktivität in den Hepatozyten, isoliert aus verschiedenen Tieren, schwankt erheblich (zwischen 200 und 1000 fmol pro 10^6 Zellen), ohne daß jedoch eine Korrelation zur MGMT-Aktivität festgestellt werden konnte.

1.1.2. Basale MGMT- und MPG-mRNA Expression

Um die mRNA-Mengen der MGMT und MPG mit der Expression der TAT-mRNA in den Hepatomzelllinien und den primären Hepatozyten vergleichen zu können, wurde ihre RNA isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembranen transferiert. Anschließend wurde mit [³²P]-markierten cDNA-Sonden der MGMT, der MPG, der TAT und der GAPDH hybridisiert. Die Hybridisierung mit der GAPDH-Sonde diente zur Quantifizierung der eingesetzten RNA-Menge. Wie in **Abbildung 2A** gezeigt, steigt die Stärke des Signals, das durch Hybridisierung mit der MGMT-Sonde erhalten wurde, in Relation zum GAPDH-Signal in der Reihenfolge H4IIEC3/T, H4IIE, H4IIEC3/G⁻, Fao, primäre Hepatozyten an. H5-Zellen zeigten kein Hybridisierungssignal. Erst durch wesentlich verlängerte Expositionszeiten konnten auch in der RNA von H5-Zellen geringe Mengen an MGMT-mRNA nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dies wie auch das Vorhandensein von MGMT-Aktivität zeigte, daß H5-Zellen phänotypisch Mex⁺ sind, also das MGMT-Gen exprimieren. Die MGMT-mRNA-Mengen spiegelten im wesentlichen die gemessenen Enzymaktivitäten wider. Eine Ausnahme stellen die primären Hepatozyten dar. Die Menge der MGMT-mRNA war - im Gegensatz zu den durchschnittlichen Enzymaktivitäten - in den primären Hepatozyten fast dreimal höher als in den Hepatomzellen (**Abbildung 2B**). Die MGMT-Aktivität in den Hepatozyten, aus denen die Gesamt-RNA präpariert wurde, lag allerdings deutlich über der durchschnittlichen Aktivität von 192 fmol/ 10^6 Zellen und betrug 377 fmol/ 10^6 Zellen (Durchschnittswert aus vier Bestimmungen dieser primären Hepatozytenkultur).

A



B

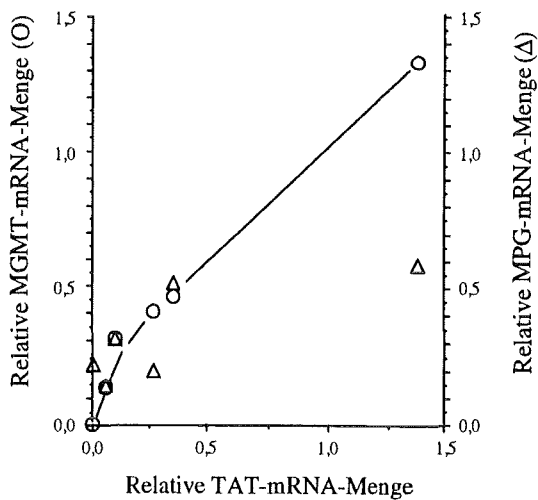


Abbildung 2: mRNA-Mengen der MGMT, der MPG und der TAT in Hepatomzelllinien und primären Hepatozyten der Ratte.

A: Autoradiogramm der Northern-Hybridisierung von je 10 µg Gesamt-RNA mit [³²P]-dCTP markierten cDNA Sonden. Die RNA wurde in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit UV-Licht fixiert. Die RNA wurde nacheinander mit den radioaktiven Sonden hybridisiert. Zur Quantifizierung der eingesetzten RNA-Mengen wurde mit der GAPDH-Sonde hybridisiert.

B: MGMT- und MPG-mRNA-Mengen in Abhängigkeit von der leberspezifischen TAT-Expression.

Die Schwärzung der Röntgenfilme wurden durch laserdensitometrische Vermessung quantifiziert. Die Signalstärken, die mit der MGMT-, der TAT- und der MPG-Sonde erhalten wurden, wurden relativ zu der Signalstärke, die mit der GAPDH-Sonde erhalten wurde, bestimmt. Die relativen mRNA-Mengen der MGMT und der MPG wurden gegen die der Tyrosin-Aminotransferase (TAT) aufgetragen.

Die Höhe der mRNA-Expression der MPG zeigte einige Abweichungen zur Höhe der Enzymaktivität in den untersuchten Zellen. So war insbesondere die MPG-mRNA-Menge der Hepatozyten vergleichbar hoch wie die in den Hepatomzelllinien, die Enzymaktivität war jedoch etwa 5-mal höher. Fao-Zellen enthielten etwa 2,5-mal mehr MPG-mRNA als H4IIEC3/G⁻-Zellen, wogegen die Enzymaktivität in beiden Zelllinien nahezu identisch waren (**Tabelle 3**). Auf der anderen Seite wiesen H5- und H4IIEC3/G⁻-Zellen etwa gleichviel MPG-mRNA auf, obwohl die Enzymaktivität in den H4IIEC3/G⁻-Zellen fast dreimal höher war als in H5-Zellen (**Tabelle 3**).

Die Signale auf den Röntgenfilmen, die in dem Autoradiogramm in **Abbildung 2A** zu sehen sind, wurden laserdensitometrisch vermessen und dadurch quantifiziert. Die **Abbildung 2B** zeigt die mRNA-Mengen des MGMT- und des MPG-Gens in den verschiedenen Hepatomzelllinien und den primären Hepatozyten im Vergleich zu deren relativer TAT-mRNA Menge, die als Indikator für den leberspezifischen Differenzierungsgrad der Zellen bestimmt wurde. In den Versuchen wurde die Signalstärke, die in der Hybridisierung mit den cDNA-Sonden erhalten wurden, in Relation zum GAPDH-Signal gesetzt, das als interner Standard für die eingesetzte RNA-Mengen gilt. Es zeigte sich, daß die mRNA-Menge der MGMT mit derjenigen der TAT in den Zellen anstieg (**Abbildung 2B**). Eine solche Korrelation war für die MPG, deren mRNA-Menge unabhängig von der der TAT schwankte, nicht zu beobachten.

1.2. Expression der MGMT und der MPG nach Einwirkung DNA schädigender Agenzien

Um den Effekt von DNA-schädigenden Behandlungen auf die Expression der MGMT und MPG in den unterschiedlich differenzierten Zelllinien und den primären Hepatozyten zu untersuchen, wurden sie mit Röntgenstrahlen und mit dem methylierenden Agens MNNG behandelt. Die verwendeten Mutagendosen von 2 Gy Röntgenstrahlen und 15 µM MNNG führen bekanntermaßen zur Induktion der MGMT- und MPG-Expression in H4IIE Ratten-Hepatomzellen (Laval, 1990; Fritz et al., 1991; Fritz und Kaina, 1992; Hartenstein, 1992; Mitra und Kaina, 1993). Ionisierende Strahlen verursachen DNA-Strangbrüche wie auch Basenschäden in der DNA; durch MNNG wird die DNA insbesondere an den N- und O-Positionen der Purin-Basen methyliert. Nach den Behandlungen wurde die RNA und der Gesamtzellextrakt von behandelten und unbehandelten Zellen präpariert und die mRNA-Mengen und Proteinaktivitäten der MGMT und MPG darin bestimmt.

1.2.1. Induzierbarkeit der MGMT

Wie in **Abbildung 3** gezeigt, reagierten die Zellen mit unterschiedlich starker Akkumulation der MGMT-mRNA (im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen) auf die Mutagenbehandlungen. Die Zelllinien H4IIE, H4IIEC3/T und H4IIEC3/G⁻ und die primären Hepatozyten zeigten eine relativ starke Zunahme der MGMT-mRNA-Menge. Diese betrug für H4IIE-Zellen nach Exposition mit Röntgenstrahlen und nach MNNG-Behandlung das 5,7- bzw. 2,3-fache und in H4IIEC3/T-Zellen das 3,7- bzw. 6,5-fache der MGMT-mRNA-Menge in unbehandelten Kontrollzellen. In H4IIEC3/G⁻-Zellen zeigte sich nach MNNG-Behandlung eine 4,1-fache, nach Röntgenbestrahlung jedoch nur eine 1,5-fache Induktion. Auch Fao-Zellen zeigten nur eine 1,5- bzw. 1,6-fache Zunahme der mRNA-Menge nach MNNG- und Röntgenstrahlen-Exposition. Keine Zunahme der mRNA-Menge nach diesen Behandlungen findet man in H5-Zellen (zur Quantifizierung siehe auch **Abbildung 5**)

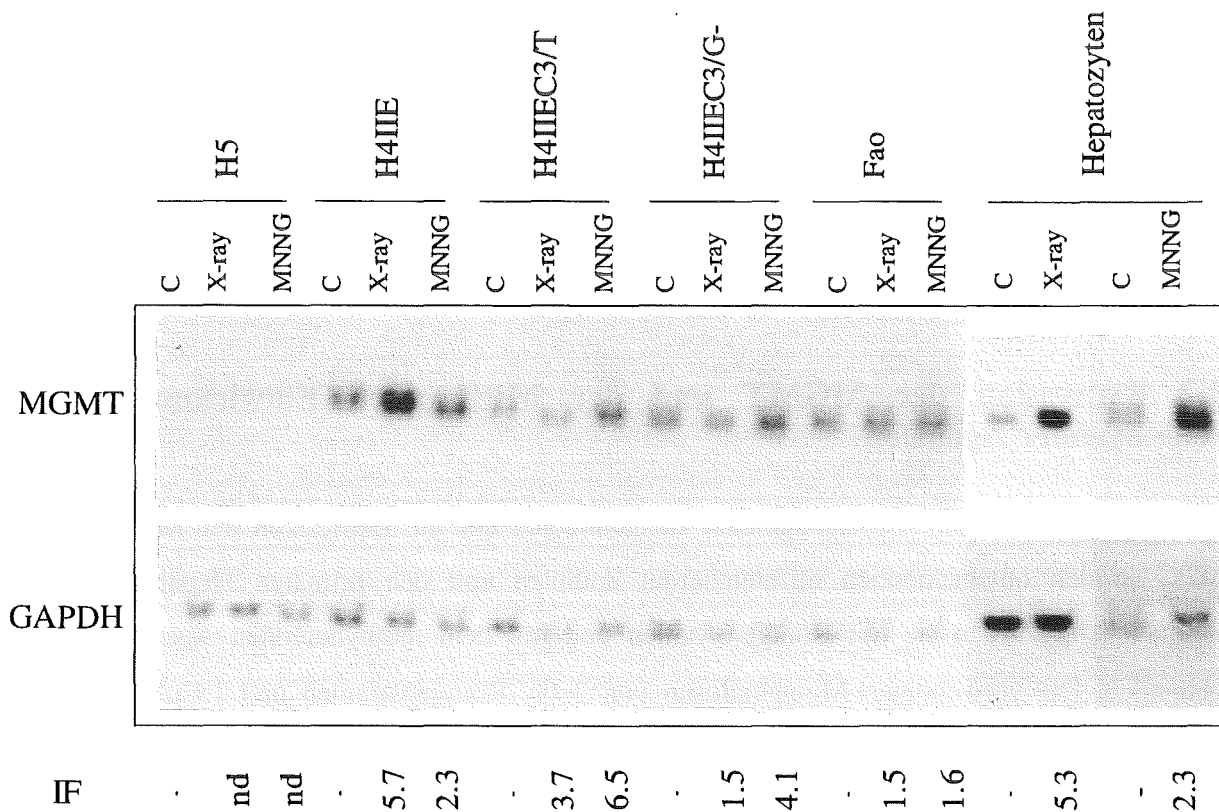


Abbildung 3: Akkumulation der MGMT-mRNA in Ratten Hepatomzelllinien und primären Hepatozyten nach Behandlung mit MNNG oder Röntgenstrahlen.

Gesamt-RNA wurde 24 h nach Zugabe von MNNG zum Medium (Endkonzentration 15 µM), oder nach Exposition mit Röntgenstrahlen (X-ray) (2 Gy) isoliert, auf einer Nylonmembran fixiert und mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde der Ratten-MGMT hybridisiert. Die Rehybridisierung mit GAPDH dient zur Quantifizierung der eingesetzten RNA-Menge. Die Signalstärken, die mit der MGMT-Sonde erhalten wurde, wurden relativ zur der von GAPDH bestimmt (MGMT/GAPDH). Die angegebenen Induktionsfaktoren (IF) geben die mRNA-Mengen relativ zur jeweils unbehandelte Kontrolle (C) an. nd, nicht detektierbar.

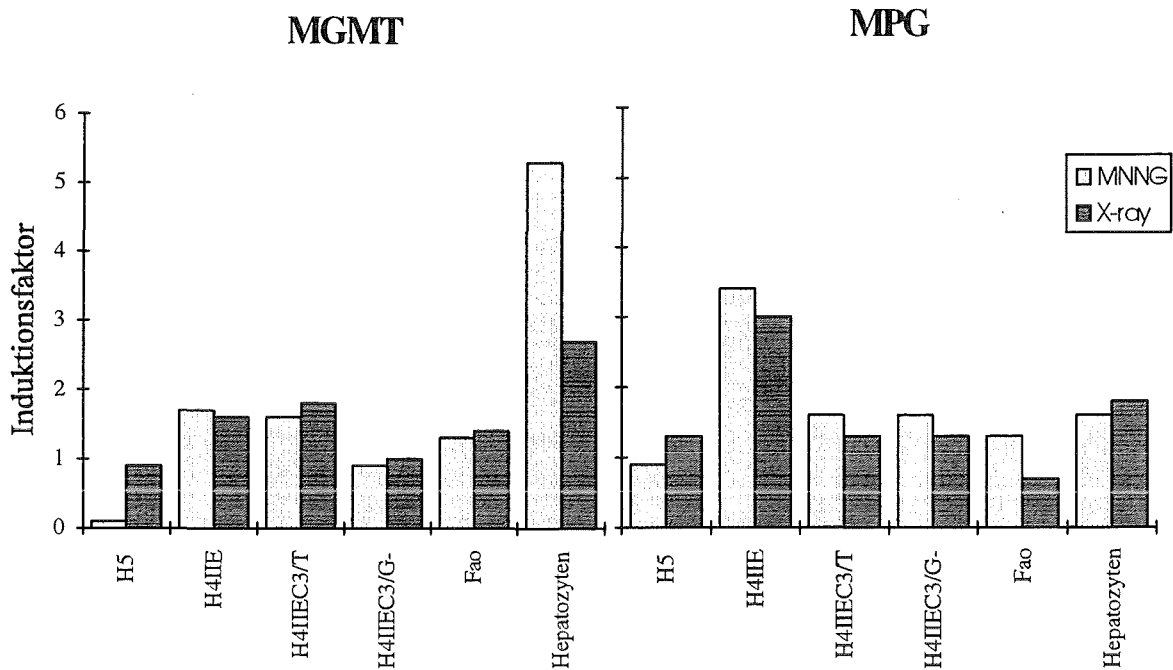


Abbildung 4: Vergleich der Induktion der MGMT- und MPG-Enzymaktivitäten nach Behandlung mit MNNG (15 μ M) und Röntgenstrahlen (X-ray) (2 Gy). Die Induktionsfaktoren sind der **Tabelle 3** entnommen und beziehen sich auf die Aktivität in unbehandelten Kontrollzellen des jeweiligen Versuchs.

Die Zunahme der mRNA-Mengen verlief parallel mit der Zunahme der MGMT-Aktivität. Die Aktivitäten der einzelnen Zelllinien nach Mutagenexposition sowie die Induktionsstärken (relativ zur unbehandelten Kontrolle) sind in **Tabelle 3** aufgeführt und in **Abbildung 4** graphisch dargestellt. Die stärkste Zunahme der Aktivität fand sich bei den frisch isolierten Hepatozyten (5-fach nach MNNG- und 2,7-fach nach Röntgenstrahlen-Behandlung). Eine reproduzierbare Zunahme zwischen dem 1,6- und 1,8-fachen der Aktivität in Kontrollzellen wurde auch in H4IIE- und H4IIEC3/T-Zellen beobachtet. Keine deutliche Induktion der MGMT-Aktivität war bei Fao-, H4IIEC3/G- und H5-Zellen zu verzeichnen. Die Aktivitätszunahme der MGMT in den Zellen ist meist geringer als die der mRNA-Menge. In H5-Zellen ist nach MNNG-Gabe sogar ein Rückgang der MGMT-Aktivität zu registrieren. Die Induktionsstärke der MGMT mRNA-Expression zeigte keine Korrelation zur leberspezifischen TAT-Expression der Hepatomzelllinien und der primären Hepatozyten (**Abbildung 5**). Ebenso war für die Induktion der MGMT-Aktivität und der TAT-Expression eine solche Korrelation nicht festzustellen (**Tabelle 3**).

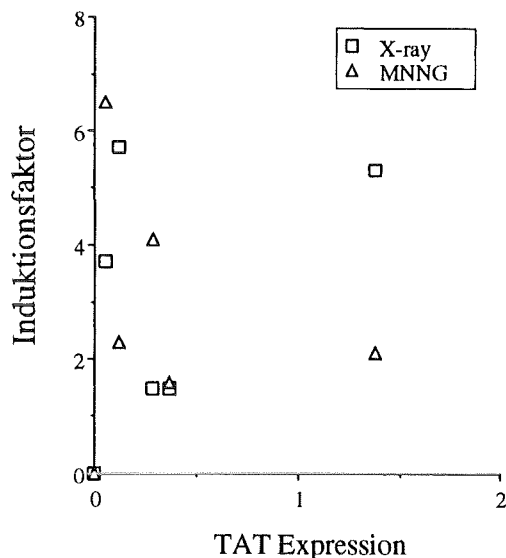


Abbildung 5: Vergleich der Induktion der MGMT-mRNA-Menge mit der TAT-mRNA-Expression in den verschiedenen Hepatom-Zelllinien und primären Hepatozyten der Ratte.

Die Schwärzung der Röntgenfilme, die im Autoradiogramm der Abbildung 2 gezeigt sind, wurden durch laserdensitometrische Vermessung quantifiziert. Zur Korrektur der unterschiedlichen RNA-Mengen wurden die Signalstärken der MGMT und der TAT relativ zu der Signalstärke der GAPDH berechnet. Der so erhaltene Induktionsfaktor für die mRNA-Menge der MGMT nach MNNG- und Röntgenstrahlen (X-ray)-Behandlung der Zellen wurde gegen die relative mRNA-Menge der Tyrosin-Aminotransferase (TAT) aufgetragen.

1.2.2. Induzierbarkeit der N-Methylpurin-DNA-Glykosylase

Nach der Behandlung der verschiedenen Ratten-Leberzellen mit Röntgenstrahlen und MNNG waren keine wesentlichen Unterschiede der MPG-mRNA-Mengen zwischen mutagenbehandelten und unbehandelten Zellen zu beobachten (**Abbildung 6**). Lediglich in H4IIEC3/T-Zellen zeigte sich nach MNNG-Behandlung eine leichte 1,5-facher Mengenzunahme. Im Gegensatz zu der mRNA-Menge war die MPG-Aktivität in H4IIE-Zellen nach denselben Behandlungen deutlich angestiegen (3- bis 3,4-fach, siehe **Tabelle 3** und **Abbildung 4**). Die Zellen der Zelllinien H4IIEC3/T und H4IIEC3/G⁻ wie auch die primären Hepatozyten zeigten ebenfalls einen wenn auch nur schwachen Anstieg der Enzymaktivität nach MNNG-Behandlung (1,6- bis 1,8-fache Aktivität der Kontrolle). H5- und Fao-Zellen zeigten keine deutliche Veränderung der MPG-Aktivität im Vergleich mit unbehandelten Zellen (0,7- bis 1,3-fache Aktivität der Kontrolle). Die Induktionsfaktoren der MPG-Aktivität sind vergleichend in **Abbildung 4** dargestellt.

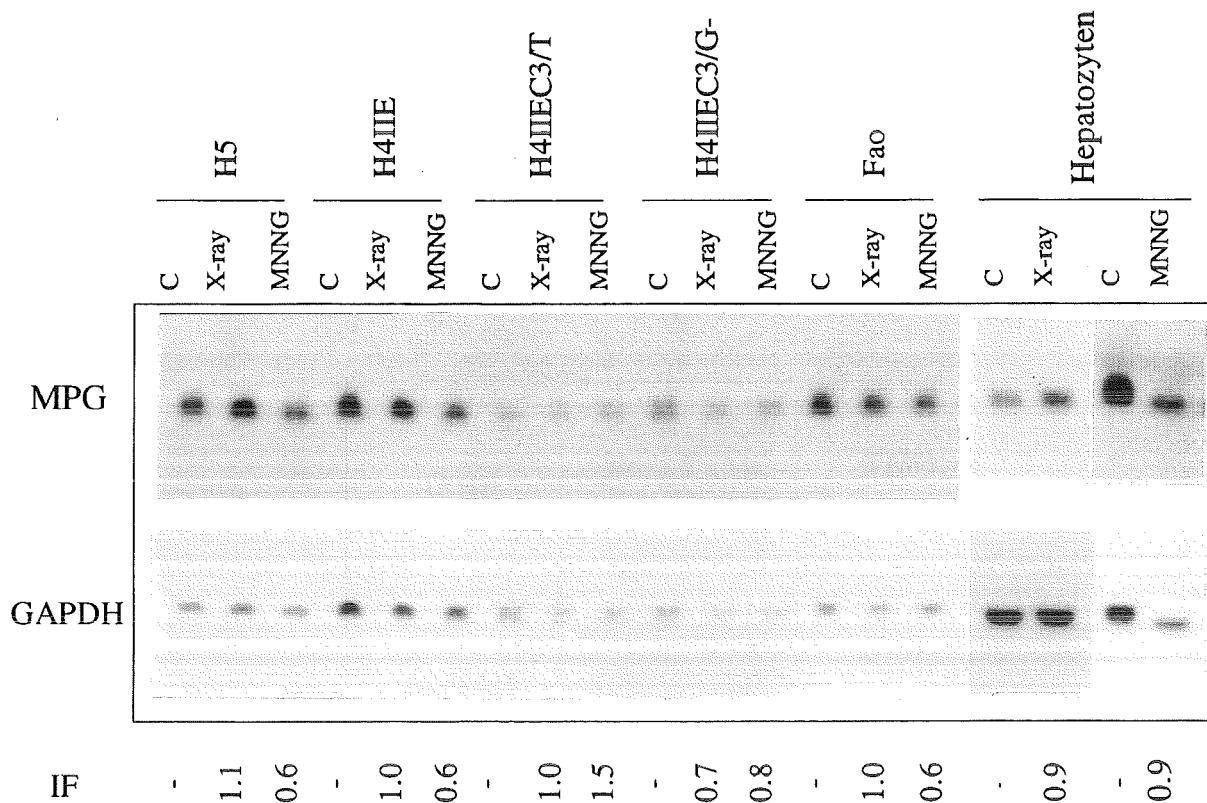


Abbildung 6: Akkumulation der MPG-mRNA in Ratten Hepatomzelllinien und Hepatozyten nach Behandlung mit MNNG oder Röntgenstrahlen (X-ray).

Gesamt-RNA wurde 24 h nach Zugabe von 15 μ M MNNG zum Medium oder nach Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlen (X-ray) isoliert und in Northern Analysen mit einer radioaktiv markierten Ratten-MPG cDNA Sonde hybridisiert. Die Rehybridisierung mit GAPDH diente der Quantifizierung der eingesetzten RNA-Menge. Die MPG-mRNA-Menge wurde relativ zur eingesetzten RNA-Menge bestimmt (MPG/GAPDH). Die angegebenen Induktionsfaktoren (IF) beschreiben die mRNA-Mengen in Relation zur jeweils unbehandelten Kontrolle (C).

1.3. Expression der MGMT und MPG nach Behandlung von primären Ratten-Hepatozyten mit dem Tumorpromotor Phenobarbital

Phenobarbital ist ein starker Tumorpromotor in der Rattenleber (Pereino et al., 1971 und 1975; Preat et al., 1987; Jirtle und Meyer, 1991). Die Verbindung induziert außerdem in der Rattenleber und in Ratten-Hepatomzellen leberspezifische Gene, wie z.B. Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen (Corcos und Weiss, 1988). Ob Phenobarbital auch einen induzierenden Effekt auf die Expression der MGMT oder MPG in frisch isolierten Ratten-Hepatozyten hat, wurde anhand der Zunahme der mRNA-Mengen 24 h nach der Zugabe dieser Substanz zur Zellkultur bestimmt. Es zeigte sich, daß Phenobarbital zu einer Akkumulation der

MGMT-mRNA führt, die vergleichbar ist mit der nach Behandlung mit MNNG. Die Transkriptmenge der MPG stieg im gleichen Zeitraum nicht an (**Abbildung 7**).

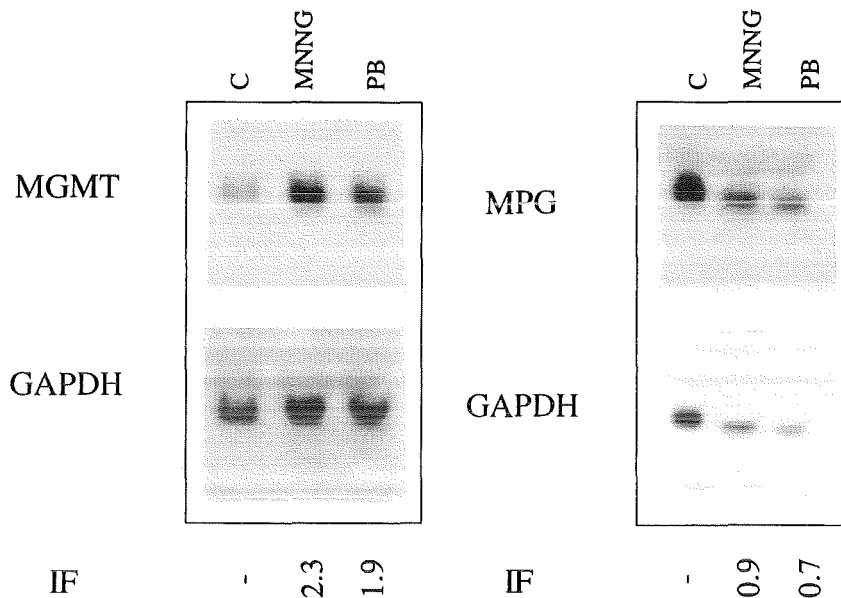


Abbildung 7: Akkumulation der mRNA-Mengen der MGMT und MPG in Ratten-Hepatozyten nach Behandlung mit MNNG und Phenobarbital (Pb).

Die frisch isolierten Ratten-Hepatozyten wurden nach ihrer Aggregation (siehe Methodenteil) mit 20 μM MNNG bzw. mit 1,5 mM Phenobarbital behandelt (siehe Methodenteil). Nach 24 Stunden wurde die RNA präpariert, auf eine Nylonmembran fixiert und mit den radioaktiv markierten cDNA-Sonden der MGMT, MPG und GAPDH hybridisiert. Die Hybridisierung mit GAPDH diente der Bestimmung der eingesetzten RNA-Menge. Die Signalstärke mit der MGMT- und der MPG-Sonde wurde relativ zur eingesetzten RNA-Menge bestimmt. Die angegebenen Induktionsfaktoren (IF) beschreiben die relativen mRNA-Mengen bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (C).

1.4. Sensitivität der Ratten-Hepatomzellen gegenüber der toxische Wirkung von Alkylantien

Die monofunktionellen alkylierenden Agenzien MNNG und MMS reagieren in unterschiedlicher Weise mit der DNA (siehe auch **Tabelle 1**). MMS reagiert in einem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus vorwiegend mit Stickstoffatomen der DNA (81%-83% der Alkylierungen *in vitro* finden am N7-Guanin, 10,4%-11,4% am N3-Adenin und 1,9%-3,8% am N1-Adenin statt (Beranek, 1990)). Der Anteil an Methylierung von Sauerstoffatomen ist gering (0,8% der Gesamtalkylierung entfallen auf Phosphotriester und 0,3% auf O⁶-Guanin). MNNG reagiert in einem $\text{S}_{\text{N}}1$ -Mechanismus mit den Stickstoff- und Sauerstoffatomen der DNA. Auch MNNG

liefert hauptsächlich Methylierungen an Stickstoffatomen (67% der Gesamtmethylierung *in vitro* an N7-Guanin, 12% an N3-Adenin, 2% an N3-Cytosin und 1% an N1-Adenin (Beranek, 1990)). Daneben findet jedoch auch eine relativ starke Methylierung an der O⁶-Position des Guanins statt (7% aller Methylierungen). Die Hauptprodukt der Methylierung sowohl durch MNNG wie auch durch MMS sind N-Methylpurine. Diese stellen durch die Bildung von AP-Stellen in der DNA sowohl prämutagene als auch prätoxische Läsionen dar (Randall et al., 1987; zur Übersicht siehe Kaina, 1993). Die Bedeutung von O⁶-Methylguanin als ebenfalls prätoxische DNA-Läsion wurde vielfach nachgewiesen (zur Übersicht siehe Yarosh, 1985; Pegg, 1990; Pegg und Byers, 1992). N-Methylpurine werden durch Exzisionsreparatur, deren erster Schritt die Entfernung der methylierten Basen durch die MPG ist, aus der DNA entfernt. O⁶-Methylguanin wird durch die MGMT repariert.

Um den Einfluß der unterschiedlich starken Expression der beiden Reparaturproteine auf das Überleben von Zellen der verschiedenen Ratten-Hepatomezelllinien nach Behandlung mit MNNG und MMS zu bestimmen, wurden Dosis-Effekt-Versuche durchgeführt. Zum Vergleich der Sensitivität der Ratten-Hepatomezellen gegenüber MNNG und MMS, die alle MGMT-Aktivität besitzen (Mex⁺-Phänotyp), mit Zellen einer MGMT defizienten Zelllinie (Mex⁻-Phänotyp), wurden CHO-9-Hamsterzellen (Mex⁻) in den Dosis-Effekt-Experimenten parallel untersucht. CHO-9-Zellen besitzen eine in der Höhe mit den Hepatomezellen vergleichbare MPG-Aktivität (Hartenstein, 1992; Ibeanu et al., 1992).

In **Abbildung 8** ist die Fähigkeit von Einzelzellen, nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen von MNNG und MMS zu Kolonien auszuwachsen, relativ zu einer unbehandelten Kontrolle aufgetragen. Es wird deutlich, daß die Zellen der Mex⁻-Hamsterzelllinie CHO-9 am sensitivsten gegenüber MNNG reagiert. Unter den Mex⁺-Ratten-Hepatomezellen reagierten Zellen der H5-Zelllinie, die die geringste MGMT-Aktivität aufwiesen, am sensitivsten gegenüber diesem methylierenden Agens. Sie waren jedoch deutlich resistenter als Zellen der CHO-9-Zelllinie. Die anderen Hepatomezellen zeigten gegenüber MNNG nur geringe voneinander abweichende Sensitivitäten (in **Abbildung 8** repräsentativ mit zwei Kurven dargestellt). Der Effekt von MMS auf die Fähigkeit der Zellen der untersuchten Zelllinien Kolonien zu bilden, war bei allen untersuchten Zelllinien, mit Ausnahme der Fao-Zelllinie, gleich. Fao-Zellen zeigten im Vergleich mit den Zellen anderen Zelllinien eine leicht erhöhte Koloniebildungsrate nach MMS-Behandlung.

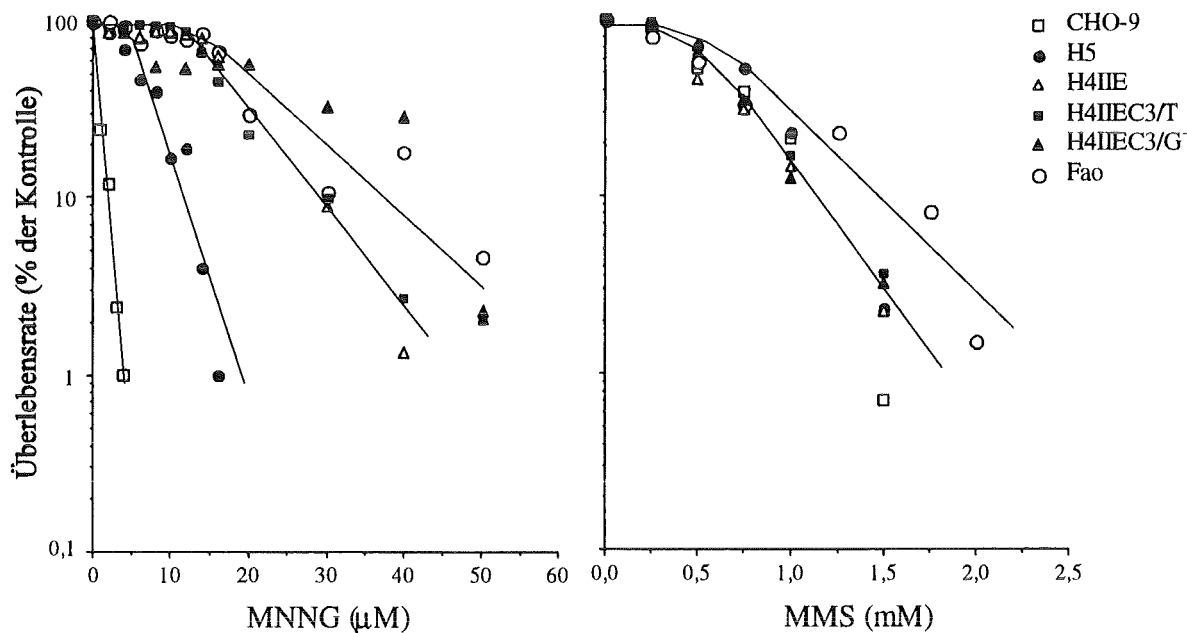


Abbildung 8: Überlebensraten von Zellen der Ratten-Hepatomezelllinien und der MGMT-defizienten Hamsterzelllinie CHO-9 nach Behandlung mit steigenden MNNG- und MMS-Konzentrationen. Eine definierte Anzahl von Zellen wurde mit den angegebenen Dosen MNNG und MMS für 1h behandelt. Nach 7-10 Tagen wurden die entstandenen Kolonien fixiert und angefärbt. Die Überlebensraten entsprechen der Anzahl der zu Kolonien ausgewachsenen Einzelzellen relativ zu einer unbehandelten Kontrolle. Die Kurvenwerte stellen Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar.

Zur Quantifizierung der Sensitivität der verschiedenen Zelllinien gegenüber der toxischen Wirkung von MNNG und MMS wurden aus dem durch lineare Regression bestimmten linearen Bereich der Überlebenskurven die D_0 -Dosen (Dosen, die das Überleben der Zellen auf 37% reduzieren) bestimmt (**Tabelle 4**). Bezogen auf diese D_0 -Werte zeigen die untersuchten Zelllinie folgende Sensitivitäten gegenüber MNNG und MMS: Mit Ausnahme der H5-Zellen weisen die Hepatomzellen eine relativ hohe Resistenz gegenüber MNNG auf. H5-Zellen sind um den

Tabelle 4: D_0 -Werte für MNNG und MMS der Ratten-Hepatomezelllinien und der MGMT defizienten (Mex⁻) Hamsterzelllinie CHO-9.

Die D_0 -Dosen entsprechen den Dosen der methylierenden Agenzien, bei denen nur noch 37% der Zellen überleben. Sie wurden aus dem linearen Bereich der in **Abbildung 8** gezeigten Überlebenskurven errechnet, der durch lineare Regression bestimmt wurde.

D ₀ -Dosen	
Behandlungen	Zelllinien
	CHO-9 H5 H4IIEC3/T H4IIE H4IIEC3/G ⁻ Fao
MNNG	0,99 7,19 19,67 18,28 21,74 24,54
MMS	0,64 0,77 0,71 0,64 0,71 0,83

Faktor 2,5 bis 3 sensitiver gegenüber MNNG als die anderen Hepatomzellen. Deren D_{50} -Werte schwanken maximal um den Faktor 1,3. Die CHO-9-Zellen, die keine meßbare MGMT-Aktivität besitzen, reagieren siebenmal sensitiver als H5-Zellen und etwa 20-mal sensitiver als die anderen Hepatomzellen. Die Sensitivität gegenüber MMS ist bei allen Zelllinien sehr ähnlich. Die in der Überlebenskurve resistenter erscheinenden Fao-Zellen zeigen nur einen minimal (1,1- bis 1,3-fach) erhöhten D_{50} -Wert im Vergleich mit den anderen Hepatomzellen oder den CHO-9-Hamsterzellen (**Tabelle 4**). Weder CHO-9- noch H5-Zellen, die beide eine deutlich geringere MGMT-Aktivität als die Zellen anderer Zelllinien besitzen, zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber MMS.

2. Untersuchungen zur Induzierbarkeit von Genen der DNA-Exzisionsreparatur und des MGMT-Gens in H4IIE Ratten-Hepatomzellen

Die Reparatur von DNA-Methylierungsschäden in Säugerzellen erfolgt auf zwei unterschiedliche Arten: Die Methylgruppen an der O⁶-Position des Guanins werden durch die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) in einer einstufigen Reversionsreparatur beseitigt. Die Entfernung von N-Methylpurinen - besonders N3- und N7-substituierter - erfolgt durch die Zusammenarbeit der N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) mit den anderen Enzymen (AP-Endonuklease, Polymerase β , Ligase) der Exzisionsreparatur von geschädigten Basen (Barnes et al., 1993). Ob die an der Reparatur von Methylierungsschäden der DNA beteiligten Enzyme koreguliert werden, ist nicht bekannt. Um eine erste Antwort auf die Frage einer möglichen Koregulation der genannten Reparaturenzyme zu bekommen, wurde die Expression ihrer Gene nach Behandlung mit Mutagenen (MNNG und Röntgenstrahlen) sowie nach Hormonbehandlung (Dexamethason) in H4IIE-Ratten-Hepatomzellen untersucht. Dazu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach den Behandlungen die RNA der Zellen isoliert und die mRNA-Mengen der Reparaturgene bestimmt.

2.1. Expression von DNA-Reparaturgenen in H4IIE-Zellen nach Behandlung mit Mutagenen

2.1.1. Abhängigkeit der MGMT- und MPG-mRNA-Expression von der Mutagendosis

Die zur Induktion der MGMT und MPG gewählten Dosen in den vorgehend dargestellten Experimenten waren auf der Grundlage bereits publizierter Daten gewählt worden. Es handelt sich um Dosen, die nur geringe toxische Wirkungen aufweisen (Überlebensraten nicht unter 10 % reduziert). Da unklar war, ob sich die Induktionen dosisabhängig steigern ließen, wurde in H4IIE-Zellen die MGMT-mRNA-Expression sowie die der MPG nach verschiedenen hohen MNNG-Konzentrationen und Röntgendosen bestimmt (**Abbildung 8**). Es zeigte sich, daß die MGMT-mRNA in Abhängigkeit von der Röntgenstrahlen-Dosis induziert wird (bei 2 Gy eine 4,3-fache Induktion) und bei 8 Gy ein Maximum einer 8,6-fachen Induktion der mRNA-Menge (im Vergleich zu unbehandelten Zellen) erreichte. Nach Behandlung mit dem methylierenden Agens MNNG in einer Endkonzentration von 20 μ M, wurde eine 2,5-fache Induktion der MGMT mRNA-Menge beobachtet, die sich allerdings durch Erhöhung der Konzentration noch

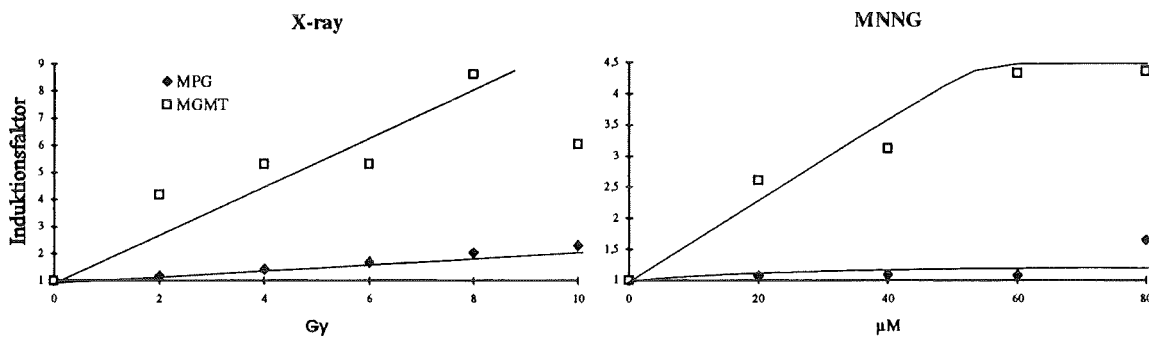
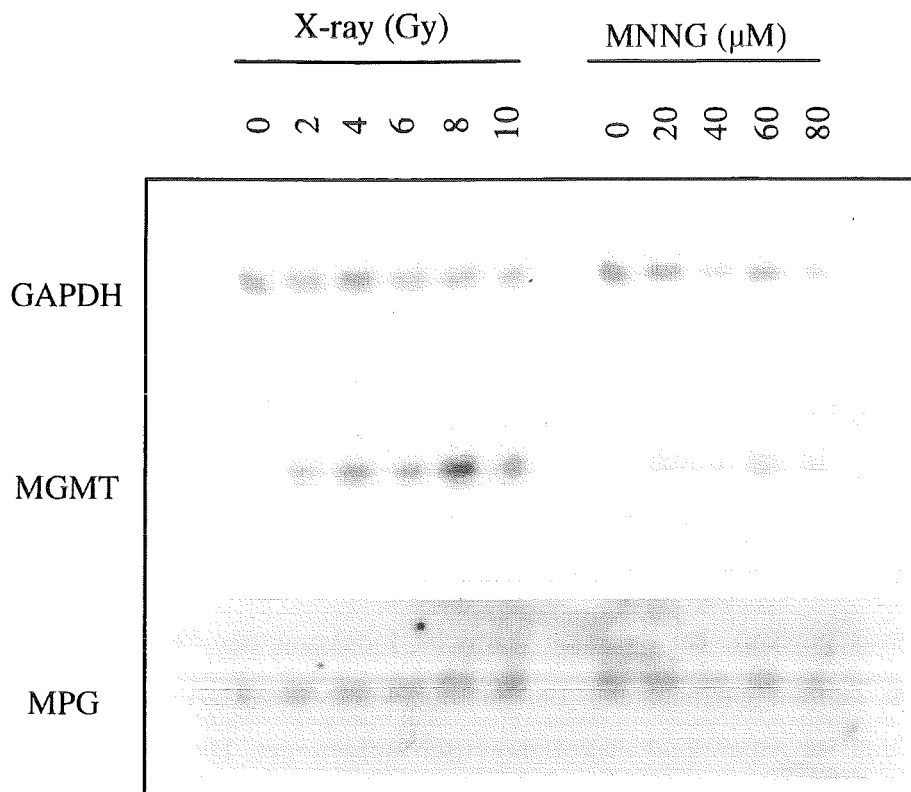


Abbildung 9: Dosisabhängigkeit der MGMT- und MPG-Expression in der Ratten-Hepatomzelllinie H4IIE. Gesamt-RNA wurde 24 h nach Zugabe von MNNG zum Medium oder nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen (X-ray) aus den Zellen isoliert, auf eine Nylonmembran fixiert und mit einer radioaktiv markierten MGMT, MPG und GAPDH cDNA-Sonde hybridisiert. Die Rehybridisierung mit GAPDH dient zur Quantifizierung der eingesetzten RNA-Menge. Die Signalstärke mit der MGMT- und MPG-Sonde wurde relativ zur eingesetzten RNA-Menge bestimmt. Die angegebenen Induktionsfaktoren sind ein Maß für die relativen mRNA-Mengen bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

deutlich steigern ließ und erst bei einer Endkonzentration von 60 μM ein Plateau erreichte (Induktionsfaktor 4,3).

Die mRNA-Menge der MPG zeigte keine Veränderungen nach MNNG-Behandlung mit steigenden Konzentrationen. Nach Einwirkung von Röntgenstrahlen wurde eine leichte dosisabhängige Zunahme der mRNA-Menge beobachtet (**Abbildung 9**). In separaten Versuchen mit höheren Strahlungsdosen wurde der hier gezeigte 2,3-fache Anstieg des Basalwertes unbehandelter Zellen durch eine Dosis von 10 Gy nur leicht erhöht (2,5-fache Induktion bei 18 Gy, nicht gezeigte Daten).

2.1.2. Expression von Reparaturgenen nach Einwirkung von Röntgenstrahlen

Mit Hilfe homologer und heterologer cDNA-Sonden der MPG, AP-Endonuklease, Polymerase β und der Ligase I (siehe Materilateil) wurde die Expression der entsprechenden Gene in H4IIE Ratten-Hepatomzellen nach Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy untersucht. Diese Dosis wurde trotz der oben beschriebenen steigenden Induktionsraten nach höheren Dosen gewählt, da Dosen über 2 Gy relativ toxisch sind. Daher wurden für die Induktionsversuche die niedrigste Dosis gewählt, bei der eine deutliche Induktion der MGMT sichtbar war. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die RNA aus den Zellen isoliert, aufgereinigt und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die auf eine Nylonmembran transferierte und fixierte RNA wurde anschließend mit den o.g. cDNA-Sonden hybridisiert. Zur Quantifizierung der RNA-Mengen wurde mit einer GAPDH-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierungssignale wurden durch laserdensitometrische Vermessung der Autoradiographien quantifiziert und die Signalstärken relativ zum GAPDH-Signal berechnet. Im folgenden werden Änderungen der mRNA-Mengen um mehr als das 1,5-fache der Menge unbehandelter Zellen als „signifikant“ angesehen. Abweichungen die darunter liegen, sind im Schwankungsbereich der Untersuchungsmethode und daher nicht signifikant. Nach Röntgenbestrahlung mit 2 Gy zeigte sich die folgende Expression der mRNA der betrachteten Gene (**Abbildung 10**):

- MGMT Die mRNA-Menge der MGMT stieg 6 h nach der Behandlung an. Nach 24 h erreichte sie das 4,3-fache des Ausgangswertes und fiel in den Tagen danach ab, wobei nach 73 h immer noch eine leicht erhöhte mRNA-Menge zu beobachten war.
- MPG, Ligase Die mRNA-Mengen der MPG und Ligase zeigten keine signifikanten Änderungen nach Röntgenbestrahlung.

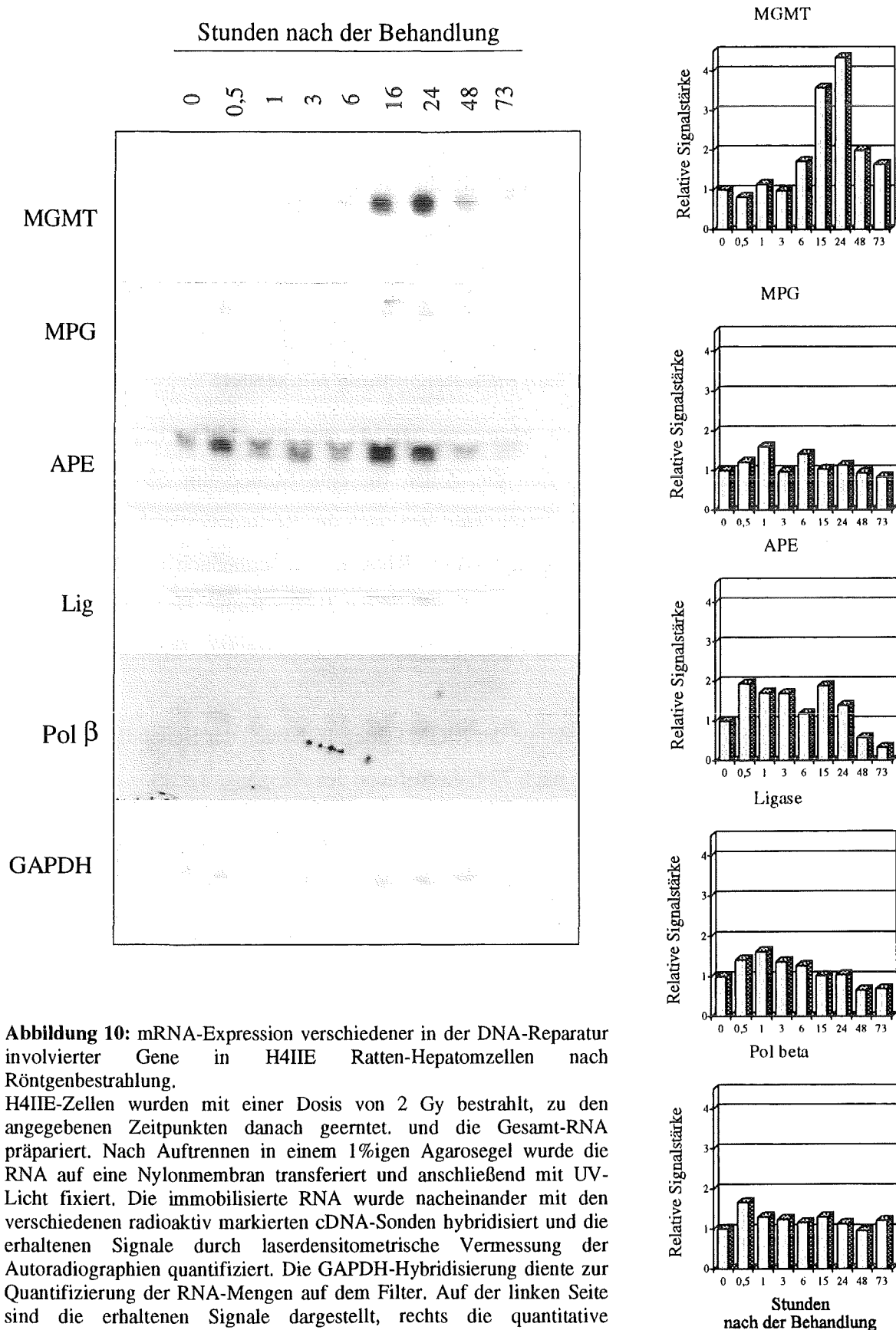


Abbildung 10: mRNA-Expression verschiedener in der DNA-Reparatur involvierter Gene in H4IIE Ratten-Hepatomzellen nach Röntgenbestrahlung. H4IIE-Zellen wurden mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten danach geerntet, und die Gesamt-RNA präpariert. Nach Auftrennen in einem 1%igen Agarosegel wurde die RNA auf eine Nylonmembran transferiert und anschließend mit UV-Licht fixiert. Die immobilisierte RNA wurde nacheinander mit den verschiedenen radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisiert und die erhaltenen Signale durch laserdensitometrische Vermessung der Autoradiographien quantifiziert. Die GAPDH-Hybridisierung diente zur Quantifizierung der RNA-Mengen auf dem Filter. Auf der linken Seite sind die erhaltenen Signale dargestellt, rechts die quantitative Auswertung der Signale. Die mRNA-Expression wurde relativ zum Kontrollwert (zum Zeitpunkt t=0) berechnet.

- **APE** Die Menge an APE-mRNA zeigte zu den Zeiten 0,5 h-, 1 h-, 3 h-, und 15 h nach der Behandlung signifikant erhöhte mRNA-Mengen, wobei nach 0,5 h und nach 15 h die Maximalmenge der APE-mRNA vom 1,9-fachen unbehandelter Zellen erreicht wurde. Nach dem 24 h-Wert sank die mRNA-Menge auf 30% der Kontrolle ab.
- **Polymerase β** Die mRNA-Menge der Polymerase β zeigte nur am 0,5 h-Wert eine nur gering erhöhte mRNA-Menge (1,7-fache Menge der unbehandelten Kontrolle).

2.1.3. Expression von Reparaturgenen nach Behandlung mit MNNG

Um den Einfluß des methylierenden Mutagens MNNG auf die mRNA-Expression von Reparaturgenen zu untersuchen, wurden die Zellen für eine Stunde mit 50 μ M MNNG behandelt. Dann wurde zu denselben Zeitpunkten wie nach der Röntgenbestrahlung die RNA der Zellen isoliert. Die auf Nylonmembran fixierte RNA wurde schließlich mit den cDNA-Sonden der Reparaturgene hybridisiert. Die Behandlung der H4IIE-Ratten-Hepatoma-Zellen mit MNNG hatte folgenden Einfluß auf die mRNA-Mengen der untersuchten Gene (**Abbildung 11**):

- **MGMT** Die mRNA-Menge der MGMT stieg 16 h nach der Behandlung an, und erreichte nach 72 h das 4-fache des Ausgangswertes.
- **MPG, APE, Ligase** Die mRNA-Mengen der MPG, der APE und der Ligase zeigten keine signifikanten Veränderungen.
- **Polymerase β** Bis 16 h nach der Behandlung fiel die mRNA-Menge stetig ab. Dann stieg sie bis auf das 2-fache des Ausgangswerts (nach 72 h) an.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß nur bei der MGMT eine relativ hohe (etwa 4-fache) Induktion der mRNA-Expression zu beobachten war. Die mRNA-Expression der an der Exzisionsreparatur beteiligten Reparaturenzyme zeigte dagegen nur geringe oder keine (signifikanten (s.o.)) Veränderungen. Die APE-mRNA-Menge war zu den Zeitpunkten 0,5, 1, 3 und 15 h nach der Bestrahlung und die der Polymerase β 72 h nach MNNG-Behandlung schwach (1,7- bis 2-fach) induziert.

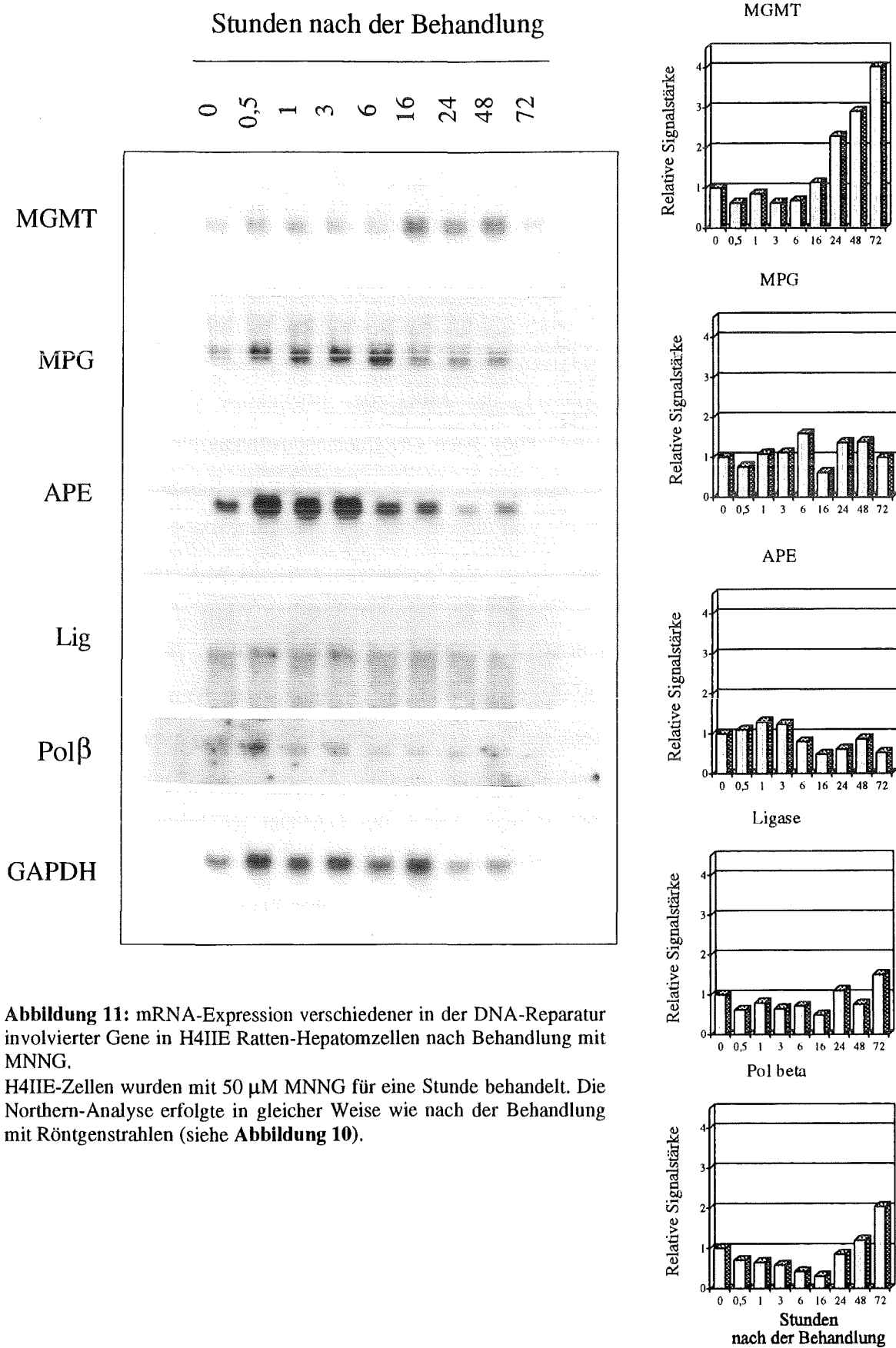


Abbildung 11: mRNA-Expression verschiedener in der DNA-Reparatur involvierter Gene in H4IIE Ratten-Hepatoma-Zellen nach Behandlung mit MNNG.

H4IIE-Zellen wurden mit 50 μ M MNNG für eine Stunde behandelt. Die Northern-Analyse erfolgte in gleicher Weise wie nach der Behandlung mit Röntgenstrahlen (siehe **Abbildung 10**).

2.2. DNA-Reparaturgene sind in der Ratten-Hepatomzelllinie H4IIE durch Dexamethason induzierbar

Es lagen bisher keine vergleichenden Untersuchungen zur Wirkung von Hormonen auf die Expression von DNA-Reparaturgenen vor. Die Behandlung von H4IIE-Ratten-Hepatomzellen mit dem künstlichen Glucocorticoid-Hormon Dexamethason (Riad-Fahmy et al., 1979) wurde als Beispiel für einen möglichen physiologischen Induktor der Expression von Reparaturgenen gewählt.

Wie bei der Untersuchung der Geninduktion nach Einwirkung DNA-schädigender Agenzien, wurden die mRNA-Mengen der MGMT, der MPG, der Polymerase β und der AP-Endonuklease in H4IIE Ratten-Hepatomzellen nach Dexamethason-Behandlungen bestimmt. Als Kontrolle für die Wirkung des künstlichen Hormons wurde die Induzierbarkeit des Tyrosin-Aminotransferase-Gens gewählt. Von diesem Enzym ist bekannt, daß es in der Leber und in H4IIE-Hepatomzellen der Ratte durch Glucocorticoide induziert wird. (Kenny, 1961; Pitot et al., 1964). Die Induktion beruht auf der transkriptionellen Aktivierung des Gens (Jantzen et al., 1987). Wiederum wurde zu verschiedenen Zeiten nach der Behandlung die RNA aus den Zellen isoliert. Nach elektrophoretischer Trennung und Transfer auf eine Nylonmembran, wurde die fixierte RNA mit den verschiedenen DNA-Sonden hybridisiert. Die Signale wurden durch laserdensitometrische Vermessung der Autoradiographien quantifiziert. Zur Korrektur unterschiedlicher RNA-Mengen wurde mit GAPDH rehybridisiert und die Signalstärken relativ zum GAPDH-Signal berechnet.

Die mRNA-Menge der untersuchten Gene zeigten nach Behandlung mit Dexamethason folgende Veränderungen (**Abbildung 12**):

- MGMT Die mRNA-Menge stieg bereits 3 h nach der Hormongabe an und erreichte nach 16 h das 5,2-fache des Ausgangswertes. Danach fiel sie ab und erreichte 48 h nach der Behandlung wieder das 2-fache des Ausgangswertes.
- MPG Die mRNA-Menge der MPG sank nach 16 h unter den Kontrollwert ab und erreichte 24 h nach der Hormongabe ihren Tiefstwert, das 0,2-fache des Ausgangswertes (5-fache Reduktion). Nach weiteren 24 h war die mRNA-Menge wieder leicht gestiegen, hatte die Ausgangsmenge aber noch nicht wieder erreicht.

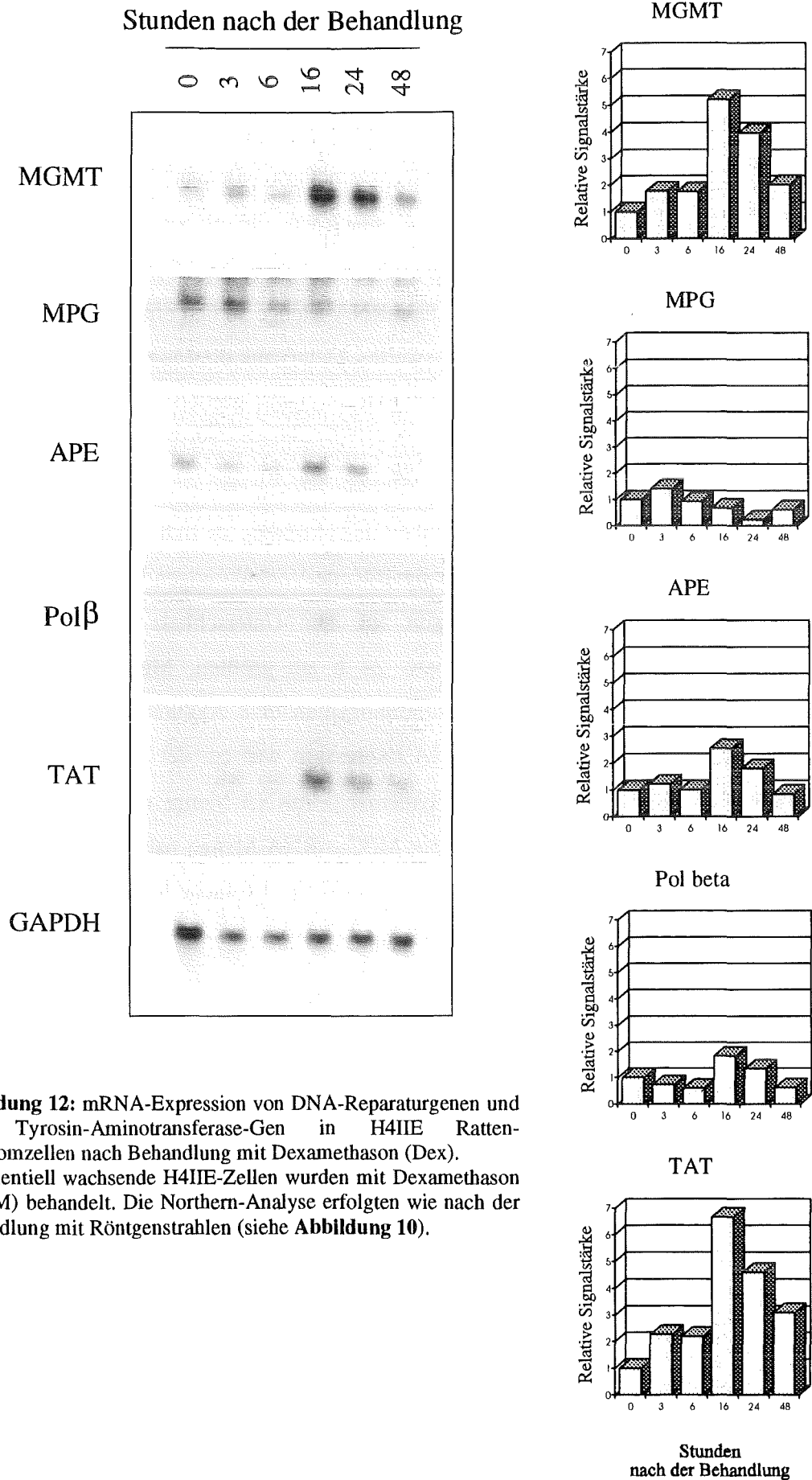


Abbildung 12: mRNA-Expression von DNA-Reparaturgenen und dem Tyrosin-Aminotransferase-Gen in H4IIE Ratten-Hepatomzellen nach Behandlung mit Dexamethason (Dex). Exponentiell wachsende H4IIE-Zellen wurden mit Dexamethason (10^{-7} M) behandelt. Die Northern-Analyse erfolgte wie nach der Behandlung mit Röntgenstrahlen (siehe **Abbildung 10**).

- APE Die APE-mRNA-Menge zeigte in den ersten 6 h nach der Gabe von Dexamethason keine Veränderung. 10 h später aber war die mRNA-Menge auf das 2,6-fache angestiegen. Danach sank die mRNA-Menge wieder auf den Ausgangswert ab.
- Polymerase β Die mRNA-Mengen nach Dexamethason-Behandlung zeigte nach 16 h einen 1,8-fachen Anstieg. Danach sank die mRNA-Menge wieder auf das Ausgangsniveau.
- TAT Bereits nach 3 h stieg die mRNA-Menge an und erreichte nach 16 h das 6,7-fache des Ausgangswertes. Dann sank die Menge der mRNA wieder ab und erreichte 48 h nach der Hormongabe wieder das 3-fache des Ausgangswertes.

Die Induktion der TAT zeigte die Wirksamkeit des Hormons als Induktor der Transkription in H4IIE-Zellen. Alle Reparaturgene wiesen signifikante Veränderungen ihrer mRNA-Expression durch die Behandlung mit Dexamethason auf. Die Unterschiede zur mRNA-Menge in unbehandelten Zellen waren nach 16 bzw. 24 h am größten. Mit Ausnahme der MPG induzierte Dexamethason bei allen Reparaturenzymen eine Akkumulation der kodierenden mRNA. Die stärkste Zunahme der mRNA-Expression war bei der MGMT zu beobachten, gefolgt von der AP-Endonuklease. Die Polymerase β -mRNA-Menge war nur nach 16 h relativ schwach (aber signifikant) angestiegen. Die MPG-mRNA-Menge nahm nach Dexamethason-Behandlung signifikant ab (5-fache Reduktion nach 24 h, 1,6-fache Reduktion nach 16 und 48 h im Vergleich zu unbehandelten Zellen).

Die beobachteten relativ schwachen Änderungen (mit Ausnahme der MGMT der Ratte) der mRNA-Expression machen Aussagen zur Induzierbarkeit von in der Reparatur von DNA-Alkylierungsschäden involvierten Genen schwierig. Die Verwendung isolierter Promotoren zusammen mit bakteriellen Reportergenen kann hier zu klareren Aussagen über die transkriptionellen Regulation der Gene führen.

3. Analyse der Induzierbarkeit des menschlichen MGMT-Promotors

Der Promotor des menschlichen MGMT-Gens war bereits 1991 isoliert und charakterisiert worden (Harris et al., 1991). Obwohl er mehrere potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren besitzt (AP-1, AP-2, GRE, Hitzeschock-Element; siehe **Abbildung 13**), die eine Induzierbarkeit seiner Aktivität vermuten lassen, konnte diese in menschliche Zellen bisher nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden (Pegg, 1990). Die menschliche Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa S3, sowie die menschliche Hepatomzelllinie HepG2 beispielsweise exprimieren das MGMT-Gen, zeigen aber keine Induktion der Transkription nach MNNG-Behandlung (Fritz et al., 1991; Fritz, 1992). Es existiert bislang nur ein Hinweis, demzufolge auch in einer menschlichen Zelllinie - der LICH-Hepatomzelllinie - eine Induktion der MGMT-Aktivität durch Mutagene erfolgen kann (Laval, 1990). Induktion der MGMT-mRNA in menschlichen Zellen ist bislang nicht gezeigt worden. Dies steht im Gegensatz zur Induktion der MGMT auf transkriptioneller Ebene in Ratten-Hepatomzellen (Fritz et al., 1991; Chan et al., 1992). Es stellte sich daher die Frage, ob der menschliche MGMT-Promotor

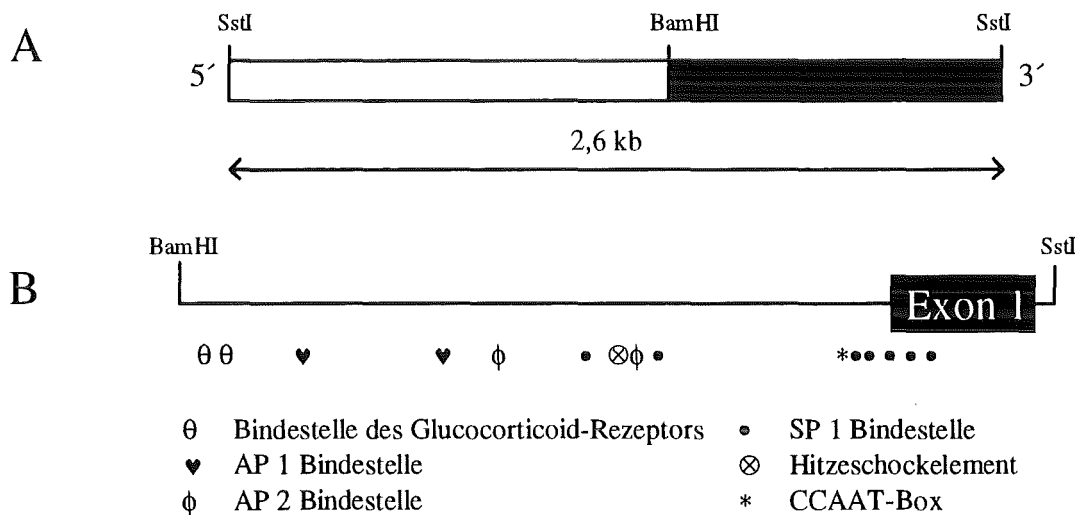


Abbildung 13 A: Diagramm des 2,6 kb langen menschlichen MGMT-Promotorfragmentes, das im zur Transfektion verwendet Plasmid p000 vor das bakteriellen Reportergen Chloramphenicol-Acetyltransferase kloniert wurde. Der ausgefüllte Bereich stellt den Teil dar, dessen Sequenz bekannt ist.

B: Der sequenzierte Teil des menschlichen MGMT-Promotors (-954 bis +202 relativ zum Transkriptionsstart). Die Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sind gekennzeichnet (Verändert nach Harris et al., 1991).

tatsächlich nicht induzierbar ist, oder ob die verwendeten menschlichen Zellen und Behandlungen für eine solche Induktion nicht geeignet waren.

Es wurden folgende Versuchsansätze gewählt, um die Induzierbarkeit der Aktivität des menschlichen MGMT-Promotors zu untersuchen:

1. Der menschliche MGMT-Promotor wurde als Reportergenkonstrukt (Promotor-CAT-Konstrukt) in H4IIE-Rattenzellen transfiziert. Da H4IIE-Zellen offenbar Faktoren exprimieren, die für die induzierbare Expression des MGMT-Gens der Ratte verantwortlich sind, wurde die Aktivität des menschlichen MGMT-Promotors in diesen Zellen nach Behandlungen untersucht, die die Expression des endogene Rattengens induzieren (Laval, 1990; Fritz et al., 1991; Fritz und Kaina, 1992).
2. Der menschliche MGMT-Promotor besitzt potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (AP-1, AP-2, GRE), die eine Aktivierung des Promotors auch durch nicht DNA-schädigende Induktoren der Transkription möglich erscheinen lassen. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist das MGMT-Gen in H4IIE-Zellen auch durch Dexamethason induzierbar. Es wurde daher in einem zweiten experimentellen Ansatz untersucht, ob solche „physiologischen Induktoren“ der Transkription einen Einfluß auf die Aktivität des menschlichen MGMT-Promotors nach Transfektion in Zellen der menschlichen Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa S3, wie auch der Ratten-Hepatomezelllinie H4IIE ausüben können.

Zur Untersuchung der Aktivität des isolierten menschlichen MGMT-Promotors war ein 2,6 kb langes Promotorfragment (**Abbildung 13A**) vor das bakterielle Reporter gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase in den Vektor pCAT basic kloniert worden (Harris et al., 1991). Das entstandene Konstrukt hatte die Bezeichnung p000 erhalten (**Abbildung 14**).

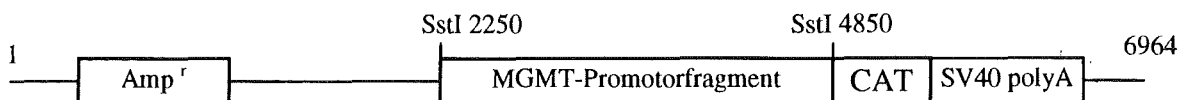


Abbildung 14: Karte des Plasmids p000 (6,964 kb).

Das 2,6 kb lange menschliche MGMT-Promotorfragment wurde vor das bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (CAT) in den Vektor pCAT basic kloniert. Das Plasmid pCAT basic enthält den Ampicillin-Resistenzmarker, das CAT-Gen und das SV40 Polyadenylierungssignal (nach Ramana, persönliche Mitteilung). Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Mitra zur Verfügung gestellt.

Die Expression des bakterielle Reportergens Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) durch eukaryontische Promotoren läßt sich direkt durch die Messung der Enzymaktivität des Genproduktes bestimmen, da es in Säugerzellen keine entsprechende Enzymaktivität gibt (Gorman et al., 1982). Das CAT-Enzym überträgt Acetylgruppen von Acetyl-CoA auf Chloramphenicol.

3.1. Aktivität des menschlichen MGMT-Promotors in der Ratten-Hepatomezelllinie H4IIE nach Einwirkung DNA-schädigender Agenzien

3.1.1. Der menschliche MGMT-Promotor ist in H4IIE-Rattenzellen aktiv

Zur Bestimmung der Aktivität des menschlichen MGMT-Promotors in H4IIE-Hepatomezellen der Ratte wurde das Plasmid p000, in dem das bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase Reportergen unter der Kontrolle des menschlichen 2,6 kb langen SstI-Promotorfragments steht (**Abbildung 14**), durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation in die Rattenzellen transfiziert. Zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz in den Einzelversuchen wurde ein RSV- β -Gal Konstrukt, in dem das bakterielle β -Galactosidase-Gen unter der Kontrolle des viralen RSV

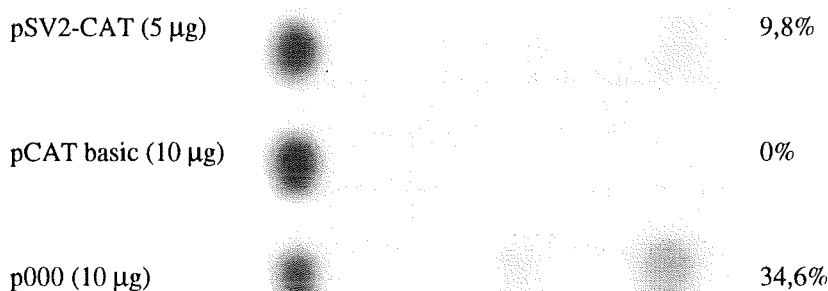


Abbildung 15: Aktivität des menschlichen MGMT-Promotors in H4IIE Ratten-Hepatomezellen.

Das Reportergenkonstrukt p000 wurde durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation in H4IIE-Zellen transfiziert (siehe Methodenteil). Als Kontrollen wurden das Reportergenkonstrukt pSV2-CAT und der promotorlose Vektor pCAT basic ebenfalls in H4IIE-Zellen transfiziert. 48 Stunden später wurde Gesamtzellextrakt der Zellen präpariert. Zur Bestimmung der Promotoraktivität wurde die CAT-Aktivität in den Zellextrakten bestimmt. Dazu wurde [14 C]-markiertes Chloramphenicol durch das CAT-Enzym mit Acetyl-CoA umgesetzt und die entstandenen Produkte dünnschichtchromatographisch getrennt (Fließmittel: 90% Chloroform, 10% Methanol). Die prozentuale Menge an acetyliertem Chloramphenicol wurde autoradiographisch bestimmt und mit der parallel bestimmten β -Galactosidase-Aktivität für die Transfektionseffizienz korrigiert. Die eingesetzten Mengen an Plasmid und die Umsatzmengen in Prozent der eingesetzten Menge an Chloramphenicol sind angegeben.

(*Rous-Sarkoma-Virus*)-Promotors steht, kotransfiziert (siehe Methodenteil). Zur Korrektur der unterschiedlichen Transfektionseffizienzen wurde die CAT-Aktivität in den Zellextrakten relativ zur parallel bestimmten β -Galactosidase-Aktivität berechnet. Als Positivkontrolle für die Aktivitätsbestimmung eines eukaryontischen Promotors in den H4IIE-Zellen wurde das Reportergenkonstrukt pSV2-CAT transfiziert und die Promotoraktivität des darin vor das CAT-Gen klonierten frühen SV40-Promotors bestimmt. Wie in **Abbildung 15** gezeigt, wurde das CAT-Reportergen durch den menschlichen MGMT-Promotor in den H4IIE Rattenzellen exprimiert, und zwar mit einer Stärke, die das 1,4- bis 1,7-fache des viralen SV40-Promotors betrug.

3.1.2. Der menschliche MGMT-Promotor wird in H4IIE-Rattenzellen aktiviert

Die Transkription des MGMT-Gens der Ratte wird in H4IIE-Zellen durch DNA-schädigende Behandlungen induziert. Dazu gehören unter anderem Behandlungen mit den methylierenden Agenzien MNNG und MMS sowie Exposition mit ionisierenden Strahlen und UV-Licht (siehe vorliegende Arbeit; Fritz et al., 1991; Chan et al., 1992). Da der menschliche Promotor in H4IIE-Ratten-Hepatomzellen aktiv war, konnte nun die Induzierbarkeit der Promotoraktivität nach den oben genannten DNA-schädigenden Behandlungen in diesen Zellen untersucht werden. Um die fehlende Induktion des menschlichen MGMT-Gens in HeLa-Zellen nach Mutagenbehandlung (Fritz et al., 1991) am isolierten Promotor zu prüfen, wurde dessen Aktivität unter denselben Behandlungsbedingungen, mit denen die Induktion in H4IIE-Zellen der Ratte untersucht wurde, auch in HeLa-Zellen bestimmt.

H4IIE- oder HeLa-Zellen (10^6 pro 10 cm Platte) wurden mit 10 μ g p000 und 1 μ g pRSV- β -Gal durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation über Nacht transfiziert. Acht Stunden nach dem bei den H4IIE-Rattenzellen anschließend durchgeführten DMSO-Schock, wurden die Zellen mit UV-Licht (254 nm) oder mit γ -Strahlen bestrahlt bzw. mit MNNG oder MMS behandelt (siehe Methodenteil). Die Verwendung der energiereichen, ionisierenden γ -Strahlen erlaubte, bei gleichzeitig verkürzter Aufenthaltsdauer der Zellen außerhalb des Zellkultur-Inkubators, die Exposition mit einer relativ hohen Strahlendosis (20 Gy). Diese Dosis führte, wie in **Abbildung 9** für Röntgenstrahlen gezeigt, zu einer gesteigerten Induktion der endogenen MGMT-mRNA-Expression in H4IIE-Zellen. Zur Messung der Aktivität des menschlichen MGMT-Promotors wurde die Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase und der β -Galactosidase im Gesamtzellextrakt bestimmt. Die Expression des CAT-Gens wurde relativ zu

der des β -Galactosidase-Gens angegeben und dies wiederum in Bezug zur unbehandelten Kontrolle gesetzt (Induktionsfaktor).

In **Abbildung 16** ist die Induktion der Promotoraktivität in H4IIE- und HeLa S3-Zellen nach den unterschiedlichen Behandlungen der Zellen relativ zur Aktivität in unbehandelten Kontrollzellen dargestellt: Die Behandlungen mit MNNG und mit MMS führten zu einer dosisabhängigen Induktion der Promotoraktivität in der Ratten-Hepatomzelllinie H4IIE, die allerdings - wie die hohen Standardabweichungen zeigen - starke Schwankungen aufwies. Es wurde eine bis zu 5-fache Induktion mit 60 μ M MNNG, und maximal 7,8-fache Induktion mit 2 mM MMS erreicht. Eine deutliche Induktion der CAT-Aktivität war auch nach γ -Bestrahlung mit 20 Gy (2,9-fach) festzustellen, während nach Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht (10 J/m²) keine deutlichen Induktion (1,5-fach) beobachtet werden konnte.

Die Transfektionsexperimente in HeLa S3-Zellen bestätigten, daß die MGMT-Expression in diesen Zellen nach Mutagenbehandlung nicht induziert wird: Weder durch MNNG- und MMS-Behandlung, noch durch γ -Bestrahlung fand eine Induktion der MGMT-Promotoraktivität statt. Auch die Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht (10 J/m²) führte in den HeLa S3-Zellen, wie in H4IIE-Zellen, lediglich zu einem geringen, 1,5-fachen Anstieg der Aktivität des isolierten Promotors (**Abbildung 16B**).

3.2. Die Promotoraktivität des humanen MGMT-Gens ist durch TPA, Forskolin und Dexamethason induzierbar

Der menschliche MGMT-Promotor besitzt - wie bereits erwähnt - Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 und den Glucocorticoid-Rezeptor (GR). Die AP-1- und AP-2- und Glucocorticoid-abhängige Transkription von Genen ist durch Phorbolester, Forskolin und Dexamethason modulierbar (Steinberg et al., 1975; Crook et al., 1978; Hynes et al., 1983; Karin et al., 1984; Angel et al., 1987; Imagawa et al., 1987; Doppler et al., 1989). Diese Stoffe sind keine Mutagene, sondern führen zu Veränderungen in zellulären Reaktionsabläufen, die letztlich die Transkription bestimmter Gene steuern. Der Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) aktiviert den Proteinkinase C abhängigen Signaltransduktionsweg, der zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und AP-2 und der durch sie regulierten Gene führt (Angel et al., 1987; Imagawa et al., 1987; Lee et al., 1987). Forskolin erhöht den intrazellulären cAMP-Gehalt durch Aktivierung der

Adenylatcyclase (Seamon und Daly, 1986). Dies führt unter Beteiligung der Proteinkinase A zur Induktion der AP-2-abhängigen Transkription (Imagawa et al., 1987). Der menschliche MGMT-Promotor verfügt über je zwei potentielle AP-1- und AP-2-Bindestellen. Außerdem besitzt er zwei potentielle Glucocorticoid-Rezeptor-Bindestellen (**Abbildung 13B**), die eine Regulation der Promotoraktivität durch das künstliche Glucocorticoidhormon Dexamethason vermuten lassen. Das Vorhandensein potentieller Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 und den GR warfen die Frage auf, ob der MGMT-Promotor durch die erwähnten „physiologischen Induktoren“ der Transkription induzierbar ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden menschliche HeLa S3- und H4IIE-Ratten-Zellen mit dem Promotorkonstrukt p000 transfiziert und anschließend mit Dexamethason, TPA und Forskolin behandelt. Die Agenzien wurden für zwei Tage auf den Zellen belassen. Danach wurden die Zellen geerntet und die CAT-Aktivität im Zellextrakt bestimmt. Unterschiede in der MGMT-Promotoraktivität durch schwankende Transfektionseffizienzen in den Einzelversuchen wurden, wie vorhergehend beschrieben, durch Kotransfektion des RSV- β -Gal-Konstruktes und Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität im Zellextrakt korrigiert (siehe Methodenteil).

In **Abbildung 16** ist die Induktion der CAT-Aktivität in HeLa S3- und H4IIE-Zellen nach den unterschiedlichen Behandlungen relativ zur Aktivität in unbehandelten Kontrollzellen dargestellt. Eine reproduzierbare 2-fache Induktion wurde nach den Behandlungen mit Dexamethason, Forskolin und TPA in den menschlichen HeLa S3-Zellen beobachtet. Dexamethason führte auch in H4IIE-Zellen zu einer Induktion (4-fach) der Promotoraktivität. Dagegen konnte in den Ratten-Hepatomzellen nach Forskolin- und TPA-Behandlung keine Induktion beobachtet werden.

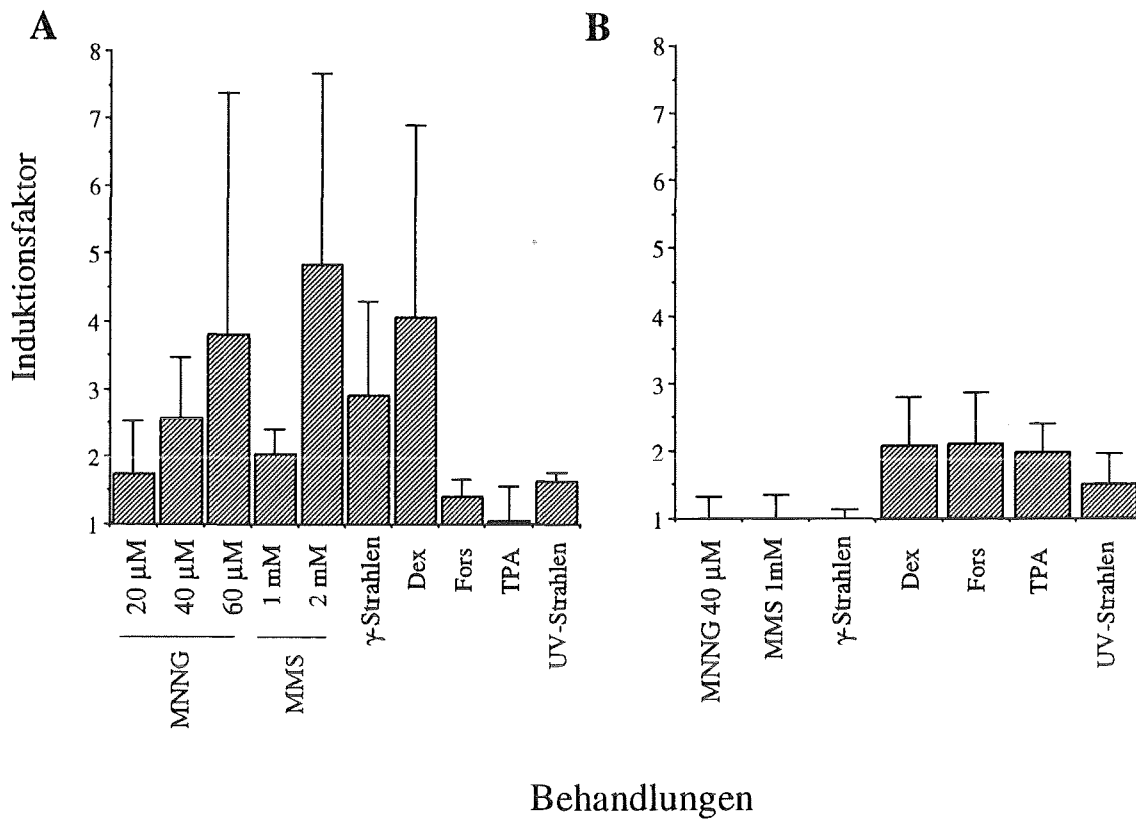


Abbildung 16: Induktion des menschlichen MGMT-Promotors in H4IIE-Ratten-Hepatomzellen (A) und in menschlichen HeLa S3-Cervixkarzinomzellen (B).

10 µg des Plasmids p000 wurden zusammen mit 1 µg pRSV-β Gal durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation transfiziert. Acht Stunden später wurden die Zellen mit den angeführten Agenzien behandelt (siehe Methodenteil). Die Endkonzentrationen an MNNG und MMS sind angegeben; für Dexamethason (Dex) betrug sie 10^{-7} M, für TPA 100 ng/ml und für Forskolin (Fors) 10 µM. Die Strahlendosen betragen 20 Gy γ-Strahlen und 10 J/m^2 UV-Strahlen. 48 h nach Applikation der Agenzien wurden die Zellen geerntet und die CAT- und β-Galactosidase-Aktivität im Gesamtzellextrakt bestimmt. Die CAT-Aktivität wurde anhand der β-Galactosidase-Aktivität für verschiedene Transfektionseffizienzen korrigiert. Die Induktionsfaktoren beziehen sich jeweils auf die unbehandelte Kontrolle und stellen den Mittelwert aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

4. Isolierung und Charakterisierung des MPG-Promotors der Ratte

4.1. Isolierung eines genomischen Fragments des MPG-Gens aus einer Cosmid-Genbank der Ratte

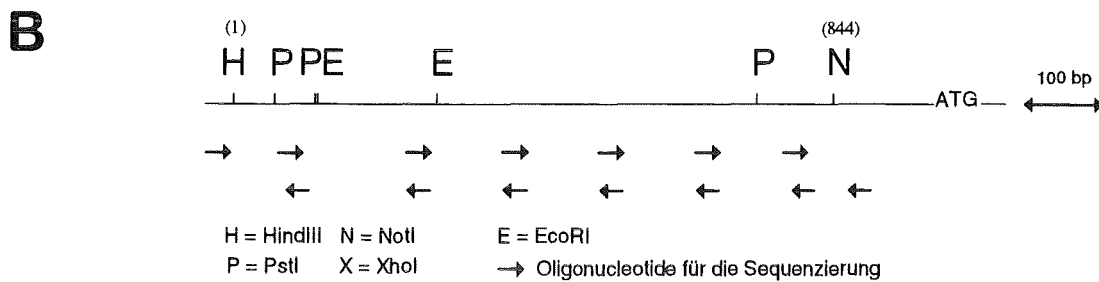
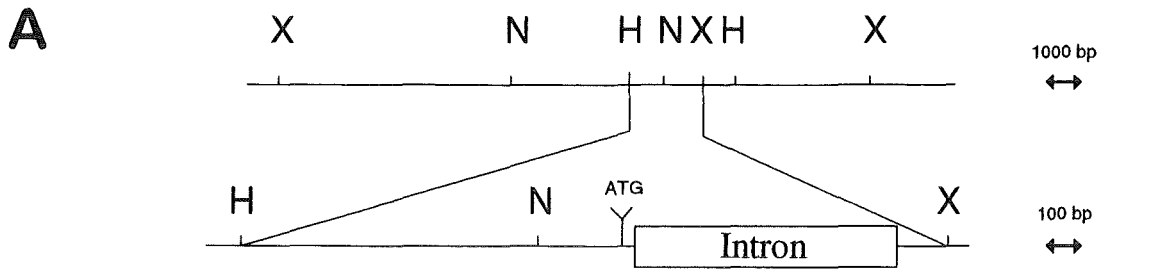
Wie die vorhergehend dargestellten Ergebnisse deutlich machen, ist die Klärung der Frage, ob die MPG auf transkriptioneller Ebene induziert wird durch Untersuchung der mRNA-Expression schwierig, weil nur geringe Induktionseffekt beobachtet wurden (siehe auch Laval, 1991; Hartenstein, 1992; Mitra und Kaina, 1993). Um eine mögliche transkriptionelle Regulation genauer untersuchen zu können, sollte der MPG-Promotors der Ratte isoliert werden. In einer bakterielle (*E.coli*) Cosmid-Genbank der Ratte wurde mit der Methode der Koloniehybridisierung nach genomischen MPG-Sequenzen gesucht (siehe Methodenteil). Als Sonde wurde die radioaktiv markierte cDNA des MPG-Gens der Ratte verwendet (freundlicherweise von F. Laval zur Verfügung gestellt). Ein Cosmid ist ein vom Bakteriophagen λ abstammender Klonierungs-Vektor, bei dem alle viralen Teile außer den cos-Sequenzen, die für die Verpackung der DNA in den Viruspartikel nötig sind, durch fremde DNA ersetzt wurden. Es enthält 30 - 40 kb fremde DNA. Da das Genom der Ratte eine Größe von $2-3 \times 10^9$ bp (Alberts et al., 1987) hat, enthalten 5×10^4 bis 10^5 *E.coli*-Klone der Genbank das gesamte Genom der Ratte.

Es wurden, ausgehend von 10^6 *E.coli*-Zellen, nach Koloniehybridisierung 60 positive, mit der MPG-cDNA hybridisierende Klone erhalten. Nach zwei weiteren Hybridisierungsrunden (siehe Methodenteil) wurden 20 unabhängige Einzelklone isoliert. Die erste Charakterisierung der Cosmide erfolgte mit verschiedenen Restriktionsenzymen und anschließender Agarose-Gel-Elektrophorese. Es zeigte sich, daß alle Cosmide dasselbe Muster an verschieden langen Fragmenten aufwiesen. Die anschließende Hybridisierung der auf Nylonmembranen transferierten DNA-Fragmenten mit der MPG-Sonde bestätigte, daß alle Cosmide identische Insertionen eines genomischen MPG-Fragments enthielten.

4.2. Kartierung eines Cosmids mit genomischen MPG-Sequenzen

Zur physikalischen Kartierung des Cosmid-Bereichs, der mit der MPG-Sonde hybridisierte, wurden mit einem der isolierten Cosmide, pMPGCII/14, weitere Southern-Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurde zunächst die cDNA-Sonde, die für die Koloniehybridisierung verwendet worden war, mit dem Restriktionsenzym XhoI in ein 250 bp langes 5'- und ein 750 bp langes 3'- Fragment gespalten. Mit den radioaktiv markierten Fragmenten wurde dann die Cosmid-DNA, die mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten worden war, hybridisiert.

Zunächst wurde das Cosmid mit dem Restriktionsenzym XhoI behandelt. Da dieses Enzym einmal innerhalb der cDNA schneidet, sollte auch das Gen in mindestens zwei Teile gespalten werden. Von den entstehenden Fragmenten sollte dann nur eines oder - falls in Intronbereichen des Gens geschnitten wird - einige wenige mit der 5'- MPG-Probe hybridisieren können. Da das Enzym XhoI aufgrund seiner Erkennungssequenz genomische DNA nur selten schneidet, war mit großen Restriktionsfragmenten zu rechnen, die eine erste Eingrenzung des MPG-Gens auf dem Cosmid zulassen würden. Auf diese Weise wurde ein ca. 15 kb langes XhoI-Restriktionsfragment erhalten, das mit dem 5'- MPG-cDNA-Fragment hybridisierte, nicht jedoch mit dem 3'- Fragment. Außerdem wurde ein ca. 7,5 kb langes Fragment erhalten, das mit dem 3'-Fragment, nicht aber mit dem 5'-Fragment hybridisierte. Die weiteren Fragmente der XhoI-Restriktion waren etwa 9 kb und 4,6 kb groß, hybridisierten mit keiner der beiden MPG-Sonden und stellen entweder Vektor- oder Intronfragmente dar. Nach Restriktion des Cosmids mit dem Enzym NotI, das ebenfalls eine im Säuger genom nur selten vorkommende Erkennungssequenz besitzt und deshalb große Restriktionsfragmente liefert, wurden vier Fragmente erhalten. Nur eines, ein ca. 9 kb großes Fragment, hybridisierte mit beiden MPG cDNA-Sonden. Dieses Fragment enthält folglich den gesamten kodierenden Bereich des MPG-Gens. Die anderen Fragmente hatten eine Länge von etwa 14 kb, 8 kb und 4,5 kb. Zur weiteren Charakterisierung wurden Restriktionsanalysen mit dem Enzym HindIII und mit Kombinationen je zwei der genannten Enzyme (HindIII/XhoI, HindIII/NotI, XhoI/NotI) durchgeführt. Dadurch wurden die oben beschriebenen mit der 5'-MPG-Sonde hybridisierenden großen Restriktionsfragmente genauer kartiert. Die erhaltenen Restriktionsmuster und Hybridisierungssignale sind in **Abbildung 17A** in einem Diagramm zusammengefaßt.



```

HindIII                                     PstI
1  AAGCTTAGGT CCCAGAGAAG TAAGAATTAA GAGATACTGG GCAACGGTTA CCCAGCTCAG CTCCCTGCAG TTCTGGACCT

81  GCCCTCCAAG CTAGTTCTGC TTAGGTGGTG AGCCTCTTCG CAAGCAGTTC CAAGCATCAG GGGTCCAGGG ATGTAAGTGG
    PstI      EcoRI
161 GGCTCCACTG CAGAGGCAGA ATTCCCTTCC CTCCCACCTA TCAGCTGTGA TCACCCAGGG TAGGGTTCTC CAGATGGGGA
                                EcoRI
241 AGGCATCCGC TTCCGGTCAG TTCCACCATC CAGCGATAAA GCTGGAGAAG GAGAATTCCA GGATCAAAAC CCAGACTGAG
321 GGGTTGGGGA TTTAGCTCAG TGGTAGAGCG CTTGCC'TAGG AAGCGCAAGG CCCTGGGTTC GGTCCCCAGC TCCGAAAAAA
401 AAAGAACCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA CCACAAAAAA CACAAAAAAA ACCAAAAAAA AAAAAAAAAA ACCAGACTGA
481 GATTCCCTCA TGCTTGTTC'T CTACAACACC CAACGCACCC TCTGTGGCCC ACC'TATCTC AAGGCAGGGC CTCTGTATCC
561 GGGACCCCTG AAAAGTCAGT CCAGGTT'CAg AGAGTATTGC TTGATGGCAG TCGGGCCAT'T GGGACAGAAC CAGACCTAGA
641 GAACCTGGGT TCCAATCCTA GTGGT'GAAAG TAAAGGTTTC TACTACTGCC CCGCCCTGTC CCTCCCTCTA GGCTCCTCAC
    PstI
721 TCCGCTCTTT CTGCAGATTT GCCCCACCCC CGCGCTGTAC GCCTTCTGCG CAGACTCAGG CTT'CAgTCCC CGCCCTCACT
                                NotI
801 GCGCTTCCGG TGGCCTGGGC TGTGCTGGCG GCGGCTAGAT GCGCGGCCGC GGTGGTACTG CGCGCCTGGG CAGAGGATCC
881 CTAAAACCGG TGTCCGTGGT GCTCCCCGAC ACCGAGCACC CTGCATTTCC TGGACGAACC CGCCGCC'CAg GGAATGCCAG
961 AGCAGGATCC CAAGTGACCG GATCTCGTGA GGTCCGGCCAG ATGCCAGCGC CGGTGACA 1118
  
```

Abbildung 17 A: Physikalische Karte des Cosmids pMPGCII/14 im Bereich des MPG-Gens.

Der Bereich von der rechten NotI bis zur rechten XhoI Erkennungssequenz enthält die gesamte kodierende Sequenz des MPG-Gens. Das zur Sequenzierung in den Vektor pBluescript subklonierte HindIII/XhoI-Fragment mit der 5'-flankierenden Sequenz und dem 5'-Bereich des MPG-Gens ist vergrößert dargestellt. Das erste Intron (siehe Text) und das Startkodon der Proteinbiosynthese sind angegeben.

B: Sequenzierungsstrategie und Sequenz der 5' vom ersten Intron gelegenen Region. Zur besseren Übersicht der schematischen Darstellungen und der Sequenz sind die Erkennungsstellen der Restriktionsendonukleasen und das Startkodon hervorgehoben.

4.3. Sequenzierung des potentiellen Promotorbereichs des MPG-Gens der Ratte

Die Kartierung des Cosmids ergab, daß auch DNA-Fragmente erhalten worden waren, die den 5'-nichtkodierenden Bereich des MPG-Gens umfassen und folglich Bereiche der potentiellen Promotorregion enthielten. Dieser Bereich wurde sequenziert.

Wie sich aus dem Vergleich mit der publizierten cDNA (O'Conner und Laval, 1990) ergab, enthält ein 2,1 kb langes Fragment, welches durch Verdau mit den Restriktionsenzymen HindIII und XhoI erhalten worden war, einen cDNA Anteil von 250 bp und einen 1,85 kb langen Bereich nichtkodierender DNA. Zur Bestimmung der Sequenz dieses 5'-nichtkodierenden DNA-Bereichs, wurde das HindIII/XhoI-Restriktionsfragment in den Vektor pBluescript® KS⁺ subkloniert. Die Sequenzanalyse ergab, daß das MPG-Gen in diesem Bereich ein Intron von ca. 1 kb Länge (**Abbildung 17A**) enthält, das den potentiellen Promotorbereich, der mit diesem Restriktionsfragment isoliert worden war, auf 850 bp reduziert. Die Sequenzierung beider DNA-Stränge vor dem Intron erfolgte nach dem Sequenzierungsschema in **Abbildung 17B** und ergab die in derselben Abbildung dargestellte Sequenz. Es stellten sich einige Differenzen zur publizierten cDNA-Sequenz heraus (O'Conner und Laval, 1990), die die ersten acht Basenpaare der cDNA-Sequenz und einen Basentausch bei Position 35 der cDNA-Sequenz betreffen. Ein Vergleich der von mir bestimmten mit der publizierten Sequenz ist in **Abbildung 18** gezeigt.

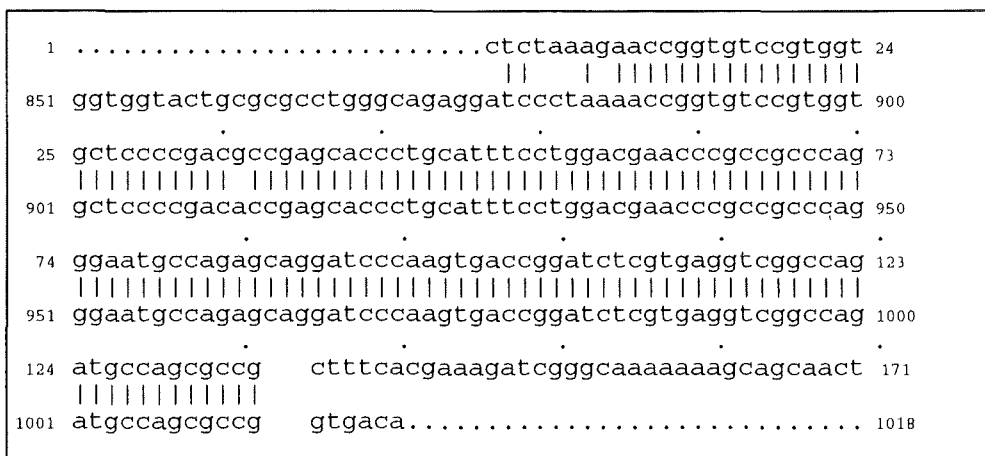


Abbildung 18: Sequenzvergleich der publizierten cDNA Sequenz (O'Conner und Laval, 1990) im Bereich 1-171 und der Sequenz des Cosmids pMPGCII/14 (**Abbildung 17**) im Bereich 851-1018. Identische Basen sind durch Striche verbunden. Das Ende des ersten Exons ist abgesetzt und entspricht der Position 1012 der genomischen Sequenz bzw. der Position 135 der cDNA Sequenz.

Die Sequenz des potentiellen Promotorbereichs kann aufgrund ihrer Basenzusammensetzung in drei Abschnitte gegliedert werden: Von Position 1 bis 394 besitzt die DNA einen GC-Gehalt (prozentualer Anteil der Basen Guanin und Cytosin) von 59%. Danach folgt ein Bereich (Position 395 bis 471), der 86% Adeninbasen (66 von 77 Basen) enthält (14% GC-Gehalt). Der letzte Bereich bis zum Beginn des Startkodons der Proteinbiosynthese hat einen hohen GC-Gehalt von 62%.

4.4. Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes des MPG-Gens der Ratte

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des MPG-Gens der Ratte wurden *primer extension*- und S1-Nuklease-Protektionsanalysen durchgeführt. Das Oligonukleotid MPGTR (siehe Materialteil), das eine homologer Sequenz zum nichtkodierenden DNA-Strang der genomischen Sequenz (Position 957 bis 974) hat, wurde radioaktiv endmarkiert und sowohl in den *primer extension*-Analysen als auch zur Herstellung der Sonden für die S1-Nuklease-Protektionsanalysen verwendet.

Für die S1-Nuklease-Protektionsanalyse wurde Gesamt-RNA aus primären Ratten-Hepatozyten isoliert. Diese wurde über Nacht mit einer radioaktiv markierten einzelsträngigen DNA-Sonde hybridisiert (siehe Methodenteil), die den Anfangsbereich der publizierten cDNA und einen 5' davor gelegenen Bereich von ca. 240 bp überdeckte. Diese Sonde war mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) synthetisiert worden. Als Startermoleküle dienten dabei das oben erwähnte radioaktiv markierte Oligonukleotid MPGTR und ein weiteres Oligonukleotid, das homolog zum kodierenden Strang der genomischen Sequenz (Position 615 bis 633) ist. Das klonierte genomische HindIII/XhoI-Fragment des MPG-Gens (s.o. und **Abbildung 17A**) diente als Matrize. Die entstandene Sonde war doppelsträngig und nur der von dem Oligonukleotid MPGTR aus synthetisierte, nichtkodierende DNA-Strang, der komplementär zur mRNA-Sequenz ist, radioaktiv endmarkiert. Vor der Hybridisierung mit der RNA wurde der DNA-Doppelstrang thermisch denaturiert. Nach Hybridisierung der RNA mit der radioaktiven DNA-Sonde (siehe Methodenteil) wurden die Nucleinsäuren im Hybridisierungsansatz mit der einzelstrangspezifischen Nuklease S1 behandelt. Die S1-Nuklease baut alle ungepaarten, einzelsträngigen Nucleinsäuren zu Mono- und Oligomeren ab. Radioaktiv markiert sind nun die Doppelstränge, die entweder aus der Rehybridisierung komplementärer DNA-Stränge oder aus der Hybridisierung von DNA mit komplementärer RNA entstanden sind. Die rehybridisierten DNA-Doppelstränge entsprechen der eingesetzten

radioaktiven DNA-Sonde, die in der Polymerase-Ketten-Reaktion synthetisiert worden war. Sie enthalten idealerweise keine einzelsträngigen Bereiche und sind daher in ihrer ganzen Länge vor dem Abbau durch die S1-Nuklease geschützt. Die mRNA-Moleküle bilden nur bis zum Startpunkt der Transkription und bis zum Ende der DNA-Sonde (Position 974 der genomischen Sequenz, s.o.) einen Hybrid-Doppelstrang aus. Die überhängenden einzelsträngigen Bereiche werden von der S1-Nuklease abgebaut, die so die radioaktive DNA-Sonde bis zur ersten Base der mRNA - also dem Transkriptionsstart - verkürzt. Die radioaktiven DNA-Fragmente wurden nach der S1-Nukleasebehandlung in einer denaturierenden PAGE aufgetrennt (**Abbildung 19**).

Für die *primer extension*-Analyse wurde ebenfalls RNA aus primären Ratten-Hepatozyten verwendet. Die RNA wurde mit dem oben erwähnten radioaktiv endmarkierten Oligonukleotid MPGTR hybridisiert (siehe Methodenteil). Das hybridisierte Oligonukleotid diente einer Reversen Transkriptase als Startpunkt für die DNA-Synthese. Der Einsatz einer Reversen Transkriptase war deshalb notwendig, da nur sie RNA als Matrize für die DNA-Synthese verwenden kann. Die Reverse Transkriptase verlängert im Idealfall das Oligonukleotid bis zum Ende der RNA-Matrize - also bis zum Startpunkt der Transkription. Ein Problem bei der DNA-Synthese können Sekundärstrukturen der RNA sein, die sich insbesondere in Bereichen mit hohem Gehalt an den Basen Guanin (G) und Cytosin (C) ausbilden. Da die Sequenz des MPG-Gens in dem Bereich des vermuteten Transkriptionsstarts GC-reich ist, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt, um dieser Schwierigkeit zu begegnen: Zum einen wurde die Reverse Transkriptase des *avian myeloblastosis virus* (AMV), die bei 42°C ihr Aktivitätsoptimum hat, bei einer Reaktionstemperatur von 47°C eingesetzt. Die erhöhte Temperatur wirkt der Ausbildung von Sekundärstrukturen entgegen (Harris et al., 1991). Trotzdem konnten mit diesem Enzym keine eindeutigen Produkte erhalten werden. Eine bei GC-reichen RNA-Vorlagen wirksame DNA-Polymerase ist die Reverse Transkriptase des *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV). Die Verwendung dieses Enzyms führte bei einer GC-reichen RNA-Vorlage bereits bei 37°C zu eindeutigen Ergebnissen (Harris et al., 1991). In einem zweiten Versuchsansatz wurde daher die M-MLV-Reverse Transkriptase bei einer Reaktionstemperatur von 37°C verwendet. Die dabei erhaltenen Produkte wurden in einer denaturierenden PAGE aufgetrennt.

In **Abbildung 19** sind die elektrophoretisch aufgetrennten Produkte der S1-Nuklease- und der *primer extension*-Analyse als Autoradiogramm dargestellt. Parallel wurde eine

Sequenzierreaktion, die mit dem Oligonukleotid MPGTR durchgeführt worden war, in der PAGE aufgetrennt. In der *primer extension*-Analyse wurden zwei Hauptprodukte erhalten. Diese entsprechen, wie der Vergleich mit der Sequenzierreaktion ergibt, einem Transkriptionsstart bei den Positionen 862 bzw. 860 der genomischen Sequenz. Das Signal des kürzeren Produktes ist deutlich stärker als das des längeren. Beide Produkte sind auch im S1-Nuklease-Protektionsansatz dominierend. Neben diesen beiden Produkten finden sich hier außerdem noch weitere, kürzere Fragmente, die auf zum Teil nicht geschützte Bereiche am Anfang der mRNA hinweisen. Diese Produkte treten jedoch nicht in der *primer extension*-Analyse auf. Das Ergebnis der *primer extension*- und S1-Nuklease-Analyse ist, daß die beiden Guanine in Position 860 und 862 der genomischen Sequenz (**Abbildung 17**) als hauptsächlich verwendete Startpunkte der Transkription des MPG-Gens der Ratte benutzt werden.

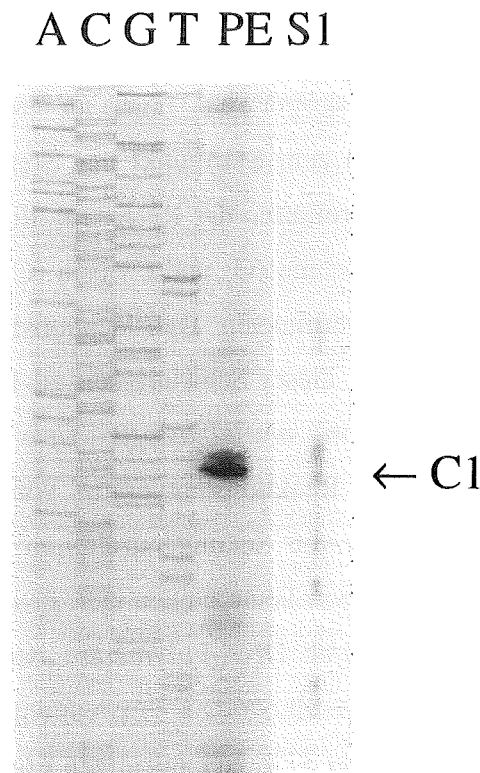


Abbildung 19: Autoradiogramm der *primer extension*- (PE) und S1-Nuklease-Protektions-Analyse (S1) zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des MPG-Gens der Ratte.

Parallel zu beiden Reaktionen wurde eine Sequenzierreaktion mit demselben Oligonukleotid (MPGTR), das auch in der PE- und S1-Analyse verwendet wurde (siehe Text), durchgeführt. Die Auftrennung der Produkte erfolgte in einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamidgel. Das Hauptprodukt der *primer extension* Reaktion entspricht dem Abbruch der DNA-Synthese in der Sequenzierung am Cytosin in Position 862 des nichtkodierenden Stranges und ist mit C1 markiert.

4.5. Funktionelle Charakterisierung des potentiellen Promotorbereichs des MPG-Gens der Ratte

4.5.1. Charakterisierung des MPG-Promotors durch Reporter-Gen-Analysen

Um festzustellen, ob der 5'-flankierende, nichtkodierende Bereich des MPG-Gens Promotoraktivität besitzt, wurde das HindIII/NotI-Restriktionsfragment aus diesem Bereich (vgl. **Abbildung 17B**) vor das bakterielle Reporter-Gen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) in den Vektor pCAT basic kloniert. Dazu wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI geschnitten. Die durch den Verdau mit dem Enzym HindIII komplementären Überhänge des Vektors und des genomischen Fragments wurden ligiert. Die nichtkomplementären Überhänge des Vektors und des genomischen Fragments, die durch Restriktion mit den Enzymen NotI und XbaI entstanden waren, wurden durch Klenow Polymerase aufgefüllt und die so entstandenen „glatten Enden“ ebenfalls ligiert. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pMPG-CATII (**Abbildung 20**).

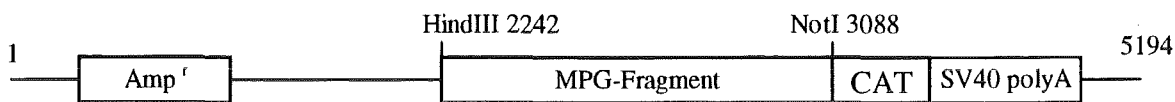


Abbildung 20: Karte des Plasmids pMPG-CATII.

Das 846 bp lange HindIII/NotI-Restriktionsfragment des 5'-nichtkodierenden Bereichs des MPG-Gens wurde in den durch die Restriktionsenzyme HindIII und XbaI geschnittenen Vektor pCAT basic, vor das CAT-Reporter-Gen kloniert (siehe Text).

Um den Bereich festzulegen, der maximale Promotoraktivität aufweist, wurden außerdem verschiedene kürzere Restriktionsfragmente und ein um 3,75 kb längeres Fragment, das durch Restriktion des ursprünglich isolierten Cosmids mit dem Enzym NotI erhalten worden war (vgl. **Abbildung 17A**), in denselben Vektor vor das CAT-Gen kloniert (**Abbildung 21A**). Alle vor das CAT-Gen klonierten Fragmente besitzen dasselbe 3'-Ende, was durch Sequenzierung überprüft wurde, aber unterschiedlich lange 5'-flankierende Bereiche. Die CAT-Konstrukte wurden jeweils zusammen mit einem RSV- β -Gal Konstrukt mittels Kalziumphosphat-Kopräzipitation in H4IIE Ratten-Hepatomzellen transfiziert. Die CAT-Aktivität wurde 48 h nach der Transfektion im Zellextrakt bestimmt und zur parallel bestimmten β -Galactosidase-Aktivität (zur Korrektur der Transfektionseffizienz in den Einzelversuchen) in Relation gesetzt.

Maximale Promotoraktivität wurde bei dem 846 bp langen HindIII/NotI-Fragment gefunden. Dessen Aktivität erwies sich als etwa gleichstark (1,2-fach stärker) wie die des frühen viralen SV40-Promotors, die durch Transfektion des Plasmides pSV2-CAT in den H4IIE-Zellen parallel bestimmt worden war. Alle anderen Promotoraktivitäten wurden relativ zur Aktivität des HindIII/NotI-Fragments angegeben (**Abbildung 21A**). Ein um 298 Basenpaare 5'-deletiertes EcoRI/NotI-Fragment zeigte eine auf 34% verringerte Promotoraktivität. Ein um weitere 428 Basenpaare 5'-verkürztes PstI/NotI-Fragment zeigte ebenfalls eine im Vergleich zum HindIII/NotI-Fragment verringerte Aktivität. Diese ist mit 64 % der Aktivität des 846 bp-Fragments aber deutlich stärker als die des längeren EcoRI/NotI-Fragments. Das längste Promotorfragment schließlich zeigte mit 18% der maximalen Aktivität die geringste Promotoraktivität (**Abbildung 21A**).

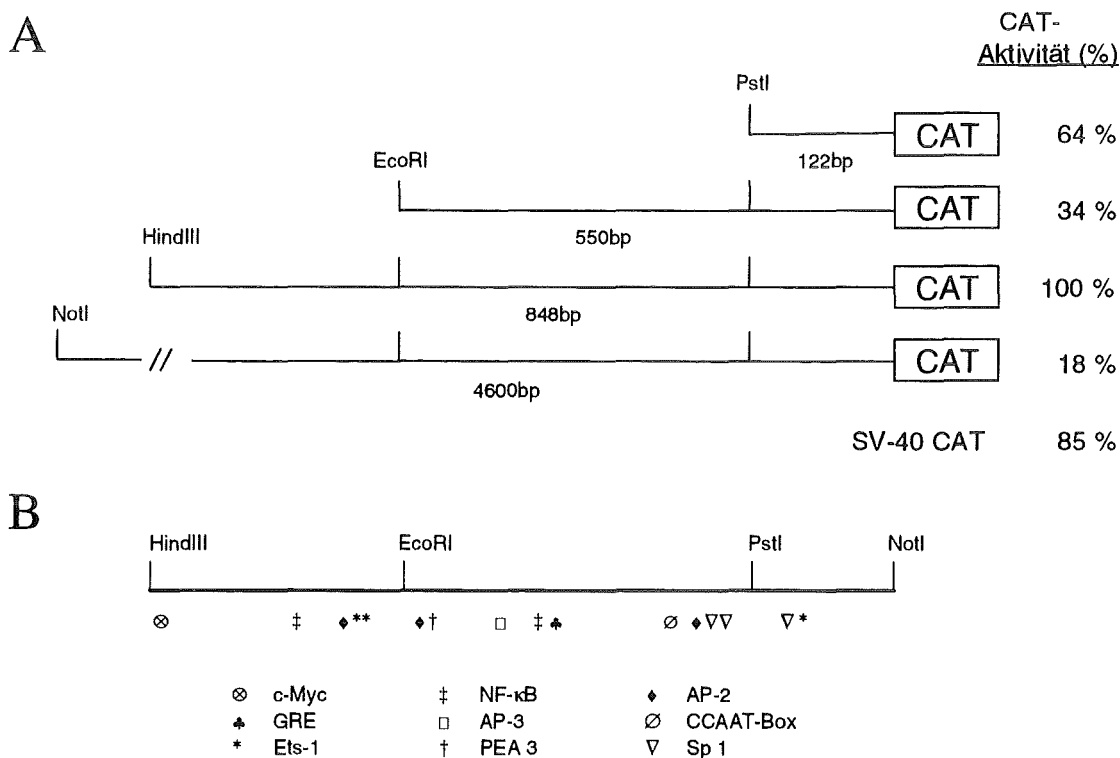


Abbildung 21 A: Relative CAT-Aktivitäten in H4IIE-Zellen nach Transfektion verschiedener MPG-Promotor-CAT-Konstrukten und des Plasmids pSV2-CAT. Bei der Bestimmung der Werte wurde die Transfektionseffizienz berücksichtigt. Die Werte entsprechen dem Mittel aus mindestens fünf unabhängigen Versuchen. Die Aktivität, die durch das HindIII/NotI-Fragment vermittelt wurde, war maximal, im Vergleich mit den anderen Fragmenten, und wurde als Referenzwert (=100%) benutzt.

B: Mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in der 5' nichtkodierenden Region des MPG-Gens. In der Sequenz des HindIII/NotI-Restriktionsfragments, das maximale Promotoraktivität verleiht, wurde mit Hilfe einer Computeranalyse nach Bindestellen für Transkriptionsfaktoren gesucht. Potentielle regulatorische Elemente sind gekennzeichnet.

4.5.2. Potentielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen im MPG-Promotor

Mit Hilfe einer Computeranalyse durch das *GCG sequence analysis software package* (Version 7.3) wurde in dem sequenzierten 5'-Bereich des MPG-Gens nach Bindesequenzen von Transkriptionsfaktoren, die in einer Datenbank für bekannt Transkriptionsfaktor-Bindestellen (TFD, Version 7.3, 9/93) gespeichert sind, gesucht. Einige möglicherweise funktionell wichtige Bindestellen sind in **Abbildung 21B** dargestellt. So finden sich insbesondere im 3'-Bereich der Sequenz, also in der Nähe des Transkriptionsstarts, potentielle Bindestellen für den Transkriptionsfaktor SP1. Hier liegt auch eine „CCAAT-Box“, an die präsumtiv der Transkriptionsfaktor CTF bindet (Jones et al., 1987). Außerdem finden sich mögliche Bindestellen für die aktivierbaren Transkriptionsfaktoren AP-2, AP-3 und NF-κB, für Proteine der Ets-Familie (Ets-1, PEA 3), für den Transkriptionsfaktor c-Myc und für den Glucocorticoidrezeptor (GR). Homologien der gefundenen potentiellen Bindestellen zu den

Tabelle 5: Vergleich der potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die durch Computeranalyse im MPG-Promotor gefunden wurden, mit deren Konsensussequenzen

Transkriptionsfaktor	Sequenz der Bindestelle im MPG-Promotor	Konsensussequenz der Transkriptionsfaktor-Bindestelle ^a	übereinstimmende Basen
c-Myc	TCTCTTA	TCTCTTA	8/8
GR	CCTCATGCTTGTCTC	AGAACANNNTGTTCT ^b	9/15 ^b
Ets-1	GCGGATGC	(G/C)(A/C)GGA(A/T)G(T/C)	8/8
	CCGGAAGC		8/8
	CCGGAAGC		8/8
NF-κB	GGGGCTCCAC	GGGR(A/C/T)T(T/C)(T/C)CC ^c	9/10
	GGAATCTCA		9/10
AP-3	TGTGGTTT	TGTGG(A/T)(A/T)(A/T)	8/8
PEA3	AGGAAG	AGGAA(G/A)	6/6
CTF	TCCAAT	GCCAAT ^d	5/6
AP-2	CCCAACCC	CCC(A/C)N(G/C)(G/C)(G/C)	8/8
	CCCCGCC		8/8
	CCCCATCT		6/8
Sp1	AGGCGGAGT	(G/A)GGC(G/T)(G/A)(G/A)(G/A)(G/T)	9/9
	GGGCGGGGC		8/9
	GGGCGGGGA		8/9

a) Referenz für Bindestellen, wenn sie nicht separat aufgeführt ist, ist Faisst und Meyer (1992).

b) Die Glucocorticoid-Rezeptor (GR)-Bindestelle im Uteroglobingen nach Jantzen et al. (1987), die das Softwareprogramm als Referenz angibt (TGTCAGTCTTGTCTC) ergibt eine Übereinstimmung von 12/15 Basen.

c) Konsensussequenz nach Lenardo und Baltimore (1989).

d) Konsensussequenz nach Mitchell und Tjian (1989).

Konsensussequenzen der Transkriptionsfaktor-Bindestellen sind in **Tabelle 5** gezeigt. Neben potentiellen Bindestellen für bekannte Transkriptionsfaktoren wurde auch eine Sequenz gefunden, für die noch keine Proteinbindung nachgewiesen wurde, die aber transkriptionelle Funktionen im Promotor des Adenin-Phosphoribosyltransferase-Gens des Menschen, der Maus und des Chinesischen Hamsters zu haben scheint (Park und Taylor, 1988). Diese Sequenz (GCCCC(A/G)CCC(T/C)) kommt zweimal identisch, einmal mit einem und einmal mit zwei Basenaustauschen im MPG-Promotor vor (Positionen 688, 740, 787, 697 der genomischen Sequenz).

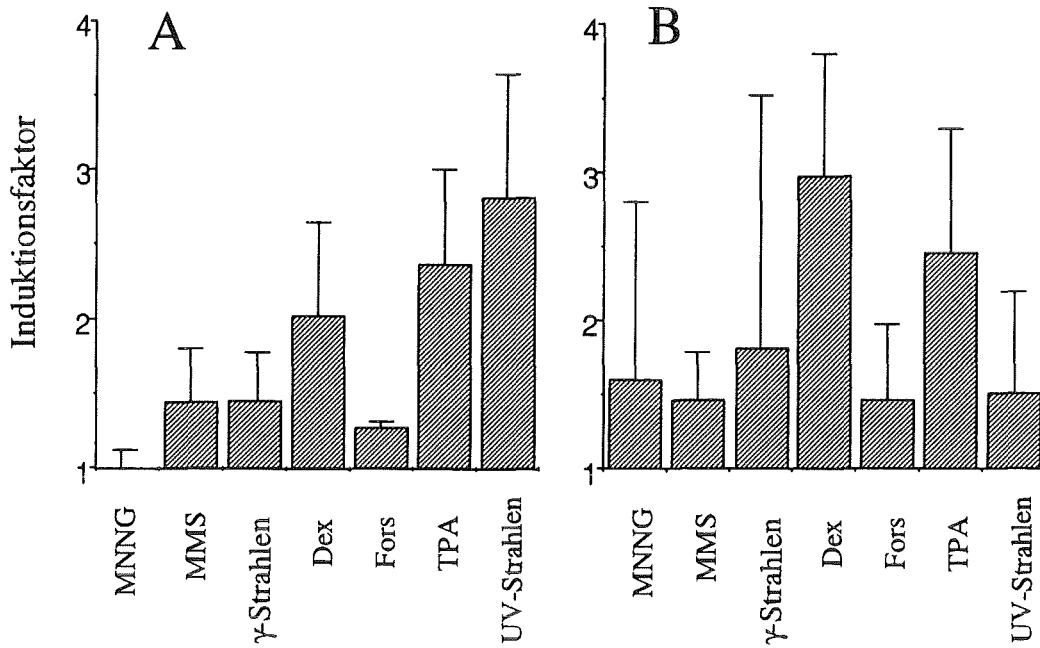
4.5.3. Die Aktivität des klonierten MPG-Promotors ist induzierbar

Die gefundenen potentiellen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (AP-2, AP-3, NF- κ B, PEA 3 und den Glucocorticoidrezeptor) im Promotor des MPG-Gens der Ratte warfen die Frage auf, ob der MPG-Promotor der Ratte durch Behandlungen, die diese Transkriptionsfaktoren aktivieren, in seiner Aktivität gesteigert werden kann.

Neben Behandlungen mit Dexamethason, TPA, Forskolin und UV-Licht, die zur Aktivierung des Promotors geeignet schienen (siehe 3.2. und Stein et al., 1989; Mercurio und Karin, 1989; Rørth et al., 1990; Devary et al., 1993), wurden auch solche mit MNNG und MMS und mit ionisierenden Strahlen durchgeführt, die in H4IIE-Zellen zu einer geringen Akkumulation der mRNA des MPG-Genes führen (**Abbildung 9**; Hartenstein, 1992). Wie bei der Untersuchung des MGMT-Promotors der Ratte wurde hierbei auch γ -Strahlen (20 Gy) als potentieller Induktor angewendet. Zur Untersuchung der Induktion der Aktivität des MPG-Promotors wurden die Fragmente des MPG-Promotors mit der Länge 848 bp, 550 bp und 122 bp (**Abbildung 21A**) verwendet. Da das kurze Promotorfragment keine potentiellen Bindestellen für bekannte, die Induktion der Transkription vermittelnde Faktoren besitzt, wurde es als Negativkontrolle für die Wirkung der induzierenden Behandlungen eingesetzt.

Die Reportergenkonstrukte wurden zusammen mit dem Plasmid pRSV- β -Gal transient in H4IIE Ratten-Hepatomzellen transfiziert. Acht Stunden nach dem DMSO-Schock wurden die Zellen mit TPA, Forskolin, UV-Licht oder Dexamethason sowie mit MNNG, MMS oder γ -Strahlen behandelt (siehe Methodenteil). Achtundvierzig Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet und die CAT- und β -Galactosidase-Aktivität in den Zellextrakten bestimmt.

In **Abbildung 22** sind die Aktivitäten der drei Promotorfragmente nach den verschiedenen Behandlungen relativ zur Aktivität in unbehandelten Kontrollzellen graphisch dargestellt. Das 846 bp lange MPG-Promotorfragment vermittelt eine 2-fache Induktion der CAT-Expression nach Dexamethason-, eine 2,4-fache Induktion nach TPA-Behandlung und eine 2,8-fache Induktion nach Bestrahlung mit UV-Licht. Die anderen Behandlungen führten zu keinen signifikanten Expressionssteigerungen (unter dem 1,5-fachen der Aktivität von unbehandelten Kontrollzellen wurde als nicht signifikant angesehen). Wurde die Transkription des CAT-Gens durch das kürzere 550 bp lange Promotorfragment vermittelt, so änderte sich die Induzierbarkeit der CAT-Expression in zwei Punkten: Die Induktion nach Dexamethason-Behandlung stieg auf das 3-fache und die Induktion durch UV-Licht sank auf das 1,5-fache der Kontrolle. Der Anstieg der CAT-Expression änderte sich nur geringfügig gegenüber dem längeren (550 bp) Fragment nach Behandlung mit MNNG, Forskolin, und γ -Strahlen und gar nicht nach TPA- und MMS-Behandlung (**Abbildung 22**). Verkürzte man das die CAT-Expression steuernde MPG-Promotorfragment auf 122 bp, so fand keine Induktion der Enzymaktivität nach TPA- und UV-Behandlung mehr statt. Hingegen stieg die Induktion der CAT-Expression nach Dexamethason-Behandlung auf das 5,7-fache der Aktivität von unbehandelten Kontrollzellen (**Abbildung 22**).



Behandlungen

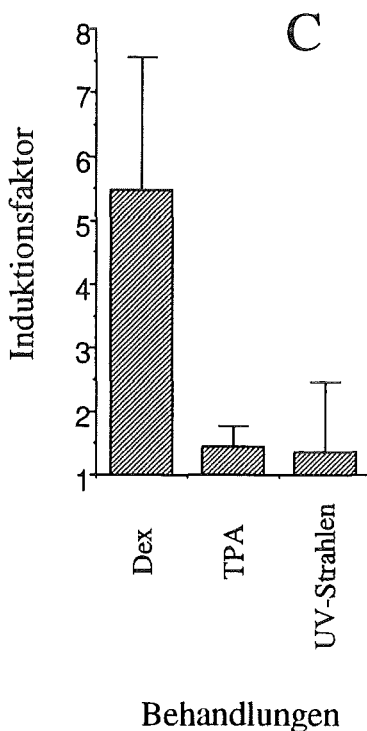


Abbildung 22: Effekt von Mutagenen, Dexamethason (Dex), TPA und Forskolin (Fors) auf die Promotoraktivität verschiedener MPG-Promotorfragmente in H4IIE-Rattenzellen. Es wurden unterschiedliche 5'-deletierte, in Reportergen (CAT)-Konstrukten klonierte Promotorfragmente verwendet: Ein 846 bp langes HindIII/NotI-Fragment (A), ein 550 bp langes EcoRI/NotI-Fragment (B) und ein 122 bp langes PstI/NotI-Fragment © (siehe Abbildung 21A).

Jeweils 10 μ g eines MPG-Promotor-CAT-Konstrukts wurde zusammen mit 1 μ g pRSV- β Gal durch Kalziumphosphat-Kopräzipitation in H4IIE-Zellen transfiziert. 8 h später wurden die Zellen mit den Agenzien behandelt (siehe Methodenteil). Die jeweiligen Endkonzentrationen waren: 50 μ M MNNG, 1 mM MMS, 10^{-7} M Dexamethason (Dex), 100 ng/ml TPA und 10 μ M Forskolin (Fors). Die Strahlendosen betragen 20 Gy γ -Strahlen und 10 J/m² UV-Strahlen. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und die CAT- und β -Galactosidase-Aktivität im Gesamtzellextrakt bestimmt. Die CAT-Aktivität wurde durch die β -Galactosidase-Aktivität für verschiedene Transfektionseffizienzen korrigiert. Die Induktionsfaktoren beziehen sich auf eine unbehandelte Kontrolle und stellen den Mittelwert aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Behandlungen

Diskussion

Zusammenhang zwischen basaler MGMT-Expression und der Expression leberspezifischer Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der DNA-Reparaturproteine MGMT und MPG in Ratten-Leberzellen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad bestimmt. Bei den Zelllinien, die sich vom Reuber-Hepatom H-35 der Ratte ableiten, wie auch bei den primären Hepatozyten der Ratte korrelierte die Expression der MGMT-mRNA mit der leberspezifischen TAT-mRNA. Eine Korrelation der MGMT-Aktivität mit der leberspezifischen Aldrinepoxidase-Aktivität in verschiedenen Ratten-Leberzellen war 1984 von Hesse et al. beschrieben worden. Die von Hesse et al. bestimmten MGMT-Aktivitäten in den Zelllinien Fao, H4IIEC3/T, H4IIEC3/G⁻ und H5 konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Darüber hinaus wurde auch die MGMT-Aktivität in der Zelllinie H4IIE sowie in als Sphäroide kultivierten primären Ratten-Hepatozyten bestimmt. Auch in diesen Zellsystemen korrelierte die MGMT-Aktivität mit der Expression eines leberspezifischen Markers (TAT) (Grombacher und Kaina, 1995).

Die MGMT-Aktivität wies in den frisch isolierten Hepatozyten verschiedener Tiere relativ große Schwankungen auf. Individuelle Unterschiede der MGMT-Aktivität wurden auch bei verschiedenen Organen des Menschen beschrieben (Sagher et al., 1989, Strauss, 1990). Worauf diese Unterschiede in der MGMT-Expression zurückgehen, ist noch unklar.

Die starke MGMT-Expression in leberspezifisch differenzierten Zellen im Vergleich zu weniger differenzierten Zelltypen kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß leberspezifische Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Transkription des MGMT-Gens beteiligt sind. Ein Beispiel für ein Gen, dessen leberspezifische Expression von Transkriptionsfaktoren abhängt, ist das Albumingen. Cereghini et al. berichteten 1988, daß Unterschiede in der Expression des Albumingens in leberspezifisch differenzierten H4II-, C2rev7- (diese entsprechen den in dieser Arbeit verwendeten H4IIE-, bzw. H4IIE/G⁻-Zellen), und Fao-Zellen sowie den dedifferenzierten H5- und C2-Hepatomzellen mit der Bindung eines spezifischen Transkriptionsfaktors (*albumin proximal factor*, kurz APF) an den Promotor Einklang steht. Dieser Faktor wurde nur in den differenzierten, Albumin produzierenden Zellen an den

Promotor des Albumingens gebunden vorgefunden (Cereghini et al., 1988). Sequenzen, die homolog zu der Bindestelle des APF im Albuminpromotor der Ratten sind, fand man auch in den Promotoren des Albumingens der Maus, des Huhns, des Krallenfroschs und des Menschen, darüber hinaus in den Promotoren anderer leberspezifisch exprimierter Gene (α -Fetoprotein, α - und β -Fibrinogen, Pyruvatkinase, Heptaglobin) (Konsensussequenz der Bindestelle (G/A)GTTA(A/C)TNNT(C/T)NNC(A/C) (Cereghini et al., 1988)). Wenngleich die Expression der MGMT im Gegensatz zur Albumin-Expression nicht ausschließlich in der Leber erfolgt, so könnte doch die Stärke ihrer Expression in leberspezifisch differenzierten Zellen auf die Beteiligung leberspezifischer Transkriptionsfaktoren zurückgehen.

Ist die Induktion der MGMT leberspezifisch?

Die Induktionsstärke der MGMT-Aktivität und -mRNA-Expression in der Leber weist eine große Schwankungsbreite auf: Es sind Induktionsexperimente *in vivo* durchgeführt worden, die zur Zunahme der MGMT-Aktivität in der Leber nach Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 8 Gy bzw. 10 Gy vom 3,4- bzw. 5-fachen des Basalwertes führten (Margison et al., 1985; Schmerold und Wiestler, 1986). Es wurden jedoch auch Induktionen in der Leber weiblicher Ratten nach Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von 15 Gy gefunden, die wesentlich höher lagen (17,6-fache Induktion der Enzymaktivität und 12-fache Induktion der mRNA-Menge im Vergleich zur Leber unbehandelter Ratten (Chan et al., 1992)). In der Leber von männlichen Ratten, die in parallelen Versuchen verwendet wurden, zeigte sich nur eine 3,5-fache Induktion der MGMT-Aktivität und keine Zunahme der mRNA-Menge nach Bestrahlung (Chan et al., 1992). Außerdem wurde eine 10-fache Induktion der mRNA-Menge nach Behandlung von Ratten mit 2-Acetylaminofluoren, einem aromatischen Amid, beobachtet (Potter et al., 1991). In der vorliegenden Arbeit konnte eine 5,7-fache Induktion der MGMT-Reparaturaktivität in primären Hepatozyten nach MNNG-Behandlung (15 μ M) und eine 2,7-fache nach Röntgenbestrahlung (2 Gy) nachgewiesen werden. Die mRNA-Mengen waren nach MNNG-Behandlung um das 2,3-fache und nach Röntgenbestrahlung um das 5,3-fache erhöht. Die geringere Induzierbarkeit der MGMT in als Sphäroide kultivierten Hepatozyten, verglichen mit den publizierten *in vivo* Experimenten, kann mehrere Gründe haben. Die Hepatozyten wurden aus männlichen Ratten isoliert. Sie verlieren während der Sphäroidbildung 40-60% ihres Cytochrom (Cyt) P-450-Gehalts und ihrer Cyt-P450-spezifischen Enzymaktivitäten, die sich dann aber stabilisieren und in ihrer folgenden Kultivierung nicht weiter absinken (Walser, 1992). Außerdem wurden die primären Hepatozyten in der vorliegenden Arbeit nur einer

Röntgenstrahlen-Dosis von 2 Gy ausgesetzt, wohingegen in den Versuchen, die zu einer starken Induktion der MGMT-Expression *in vivo* führten, mit einer Dosis von 15 Gy bestrahlt (Chan et al., 1992) wurde. Eine Dosisabhängigkeit der MGMT-Induktion auf mRNA-Ebene in H4IIE-Hepatomzellen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Es können also sowohl potentielle Dedifferenzierung der isolierten Hepatozyten wie auch ungleiche Strahlendosen Gründe für die verminderte Induzierbarkeit der MGMT sein. Insgesamt gesehen erwiesen sich aber als Sphäroide kultivierte primäre Hepatozyten im Vergleich mit den etablierten Hepatomzelllinien als besser induzierbar und stellen somit ein gutes *in vitro*-Modellsystem zur Untersuchung der MGMT-Induktion dar.

Die dedifferenzierte Zelllinie H5 zeigte keine Induktion der MGMT-Enzymaktivität nach Röntgenbestrahlung und sogar eine Reduktion der Aktivität nach MNNG-Behandlung. Bei der Behandlung der Zellen mit MNNG ist zu bedenken, daß durch die Reaktion der MGMT mit dem in der DNA induzierten O⁶-Methylguanin und eventuell auch durch direkte Methylierung des Proteins (Turbeville und Craddock, 1971) dessen Aktivität vermindert wird. Dieser Effekt kann durch eine gesteigerte Neusynthese des Proteins kompensiert werden. In den Hepatomzellen, in denen die MGMT-Aktivität induziert wird, findet offenbar sogar eine Überkompensation statt. Die geringere Induktion der MGMT-Aktivität im Vergleich mit der MGMT-mRNA-Menge zeigt jedoch, daß auch in diesen Zellen die MGMT-Aktivität durch die induzierende MNNG-Behandlungen verringert wird. In H5-Zellen fand eine Kompensation der Inaktivierung der MGMT durch verstärkte Neusynthese des Proteins innerhalb 48 Stunden nach Mutagengabe offensichtlich nicht statt, so daß die MNNG-Behandlung in diesen Zellen zu einer Abnahme der MGMT-Aktivität führte.

Die Tatsache, daß in differenzierten primären Ratten-Hepatozyten nicht aber in dedifferenzierten H5-Ratten-Hepatomzellen die MGMT-Aktivität und -mRNA-Expression induzierbar waren, weist auf einen Zusammenhang der Induzierbarkeit des MGMT-Gens mit der leberspezifischen Differenzierung der Zelle hin. In dieselbe Richtung läßt sich die Akkumulation der MGMT-mRNA nach Behandlung der frisch isolierten Hepatozyten mit dem leberspezifischen Tumorpromotor Phenobarbital deuten. Phenobarbital ist kein Mutagen; es induziert in der Leber und in Hepatomzellen der Ratte die Transkription von Genen, wie zum Beispiel die von Cytochrom P-450 b/e und P-450 PB1 (Corcos und Weiss, 1988). Nach Phenobarbital-Behandlung akkumuliert die mRNA dieser Cytochrom P-450-Gene in der Leber und in den leberspezifisch differenzierten Hepatomzellen H4II, C2Rev7 (diese entsprechen den

in dieser Arbeit verwendeten H4IIE- und H4IIEC3/G-Zellen) und Fa0, nicht aber in den dedifferenzierten H5-6-, C2- und P4-Hepat0mzellen (Corcos und Weiss, 1988). Phenobarbital induziert offensichtlich die Expression bestimmter Gene in Leberzellen, zu denen auch das MGMT-Gen geh0rt.

Deutet das bisher gesagte auf einen Zusammenhang der MGMT-Induktion mit der leberspezifischen Differenzierung von Zellen hin, so wird dieser m0gliche Zusammenhang durch den Vergleich der Induktionsraten der MGMT-Expression in den verschiedenen Hepat0mzelllinien mit deren TAT-Expression (oder anderer leberspezifischer Marker, siehe **Tabelle 2**) nicht bekr0ftigt. So zeigten die leberspezifisch differenzierten Fa0- und H4IIEC3/G-Zellen nur eine schwache Induktion der MGMT-Aktivit0t durch MNNG und R0ntgenstrahlen. Dar0ber hinaus fand bei Fa0-Zellen auch nur eine geringe Induktion der mRNA-Menge statt. Hingegen war in H4IIEC3/T-Zellen, die nur eine geringe TAT-Expression und geringe Aldrinepoxidase-Aktivit0t besitzen, eine starke Induktion der MGMT-Expression auf mRNA- und Proteinebene durch die o.g. Mutagene zu beobachten.

Zusammenfassend l0sst sich feststellen, da0 es durchaus Hinweise f0r eine Beteiligung leberspezifischer Faktoren an der Induktion der MGMT gibt. Ein genereller Zusammenhang zwischen MGMT-Induktion und der Expression leberspezifischer Enzyme konnte aber an den untersuchten *in vitro*-Zellsystemen nicht nachgewiesen werden. Der Vorgang der Induktion der MGMT-Transkription scheint ein komplexer, nicht allein von leberspezifischen Transkriptionsfaktoren abh0ngiger Vorgang zu sein.

Die MPG-Expression zeigt keine Korrelation mit der Expression leberspezifischer Enzyme

Die Untersuchung der basalen MPG-Expression in unterschiedlich differenzierten Leberzellen zeigte, da0 die MPG-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene nicht mit der leberspezifischen TAT-Expression (oder anderer leberspezifischer Marker, siehe **Tabelle 2**) korreliert. So war insbesondere die Aktivit0t in den dedifferenzierten H5- und den leberspezifisch differenzierten H4IIE-Zellen nahezu identisch. Die beobachtete geringe (2 - 3-fachen) Schwankung der basalen MPG-Expression bei etablierten Ratten-Hepat0mzelllinien deckt sich mit fr0heren Beobachtungen an Nager- und menschlichen Zelllinien (Chakravarti et al., 1991; Hartenstein, 1992). Im Gegensatz dazu wurden in den verschiedenen Organen der Maus gro0e Expressionsunterschiede der MPG gefunden (Washington et al., 1988): In Proteinextrakten des

Magens wurde eine 8 - 15-fach höhere MPG-Aktivität festgestellt als in den Extrakten aller anderer untersuchten Organe. Die Aktivitäten in den Extrakten der Leber, der Lunge, der Nieren, der Milz und des Gehirns waren etwa vergleichbar hoch (0,98-1,58 fmol/μg DNA) (Washington et al., 1988).

Vergleicht man MPG-Enzymaktivität und MPG-mRNA-Mengen in den verschiedenen Zelllinien und den primären Hepatozyten untereinander, so wird deutlich, daß die mRNA-Menge nicht mit der MPG-Aktivität korreliert: Die relativ hohe Enzymaktivität in den primären Ratten-Hepatozyten beruht nicht auf einer entsprechend großen MPG-mRNA-Menge in diesen Zellen. Weiterhin besitzen Fao-Zellen etwa dreimal mehr MPG-mRNA als H4IIEC3/G-Zellen, die Enzymaktivität in diesen Zellen ist aber fast gleich stark. Ein ähnliches Resultat fanden Chakravarti et al., als sie die mRNA-Menge und Enzymaktivität der MPG in Ratten-, Maus- und menschlichen Zellen verglichen: Alle Zellen wiesen eine etwa gleiche Enzymaktivität auf, die mRNA-Menge in Rattenzellen war aber wesentlich geringer als in den anderen Zellen (Chakravarti et al., 1991). Dies deutet darauf hin, daß die Expression der MPG-Aktivität auf posttranskriptioneller Ebene reguliert wird.

Leberspezifisch differenzierte Hepatomzellen sind resistenter als dedifferenzierte Zellen gegenüber der toxischen Wirkung von MNNG, nicht aber von MMS

Die methylierenden Agenzien MNNG und MMS liefern in unterschiedlicher Menge methylierte DNA-Addukte (Tabelle 1). Der Hauptunterschied besteht in der Reaktion mit den Sauerstoffatomen der DNA: MNNG reagiert zu etwa 7% aller Methylierungen mit der O⁶-Position des Guanins, wohingegen MMS nur 0,3% der Gesamtmethylierung an dieser Position einführt. Sowohl O⁶-Methylguanin als auch N1- und N3-Methylpurine sind cytotoxische DNA-Schäden (Kataoka et al., 1986; Lindahl et al., 1988; Kaina et al., 1991; Kaina et al., 1993). Die mit MNNG behandelten Ratten-Hepatomzellen und die MGMT-defizienten (Mex⁻) CHO-Hamsterzellen zeigten eine Sensitivität gegenüber der toxischen Wirkung von MNNG, die von der Höhe ihrer MGMT-Aktivität abhing. So ergibt sich aus dem Vergleich der D₀-Werte für MNNG eine etwa dreimal höhere Sensitivität von H5-Zellen, die nur eine geringe MGMT-Aktivität besitzen, und eine 20mal höhere Sensitivität von Mex⁻ CHO-Zellen gegenüber diesem Mutagen, als für die anderen untersuchten Hepatomzellen.

Die Sensitivität gegenüber der toxischen Wirkung von MMS war bei Zellen aller Zelllinien, auch bei H5- und CHO-Zellen, nahezu gleich. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Reaktionsprodukte von MNNG und MMS mit der DNA (Tabelle 1), so kann das Resultat dahingehend interpretiert werden, daß O⁶-Methylguanin ein die Toxizität vermittelnder Schaden ist, was sich mit früheren Erkenntnissen deckt, die mit MGMT-Transfektanten gewonnen wurden (Kaina et al., 1991, Kaina et al., 1993).

Die durch die der MPG entfernten N-Methylpurine sind potentielle prätoxische Läsionen, wie die hohe Sensitivität von MPG-defizienten *E.coli* Mutanten gegenüber MMS zeigt (Lindahl et al., 1988). Die Empfindlichkeit der MPG-profizienten Ratten-Hepatomzellen gegenüber der toxischen Wirkung von MMS ist nicht korreliert mit der Höhe der basalen und bei H4IIE-Zellen durch Mutagenbehandlung induzierten MPG-Aktivität. Auch in anderen Säugerzellsystemen war die Höhe der MPG-Enzymaktivität meist kein protektiver Faktor gegenüber Alkylantien: In CHO-9-Hamsterzellen, in denen die menschliche MPG, sowie in V79-Hamsterzellen, in denen die *alkA* kodierten *E.coli*-Glykosylase oder die Ratten-MPG funktionell überexprimiert wurde, führte dies nicht zu einer erhöhten Resistenz gegenüber MMS (Ibeanu et al., 1992; Habraken und Laval, 1993). Lediglich in von V79- abstammenden *irs 1*-Hamsterzellen, die eine verringerte MPG-Aktivität besitzen, führte die Überexpression der *alkA* kodierten *E.coli*-Glykosylase und der Ratten-MPG zu einer erhöhten Resistenz gegenüber MMS (Habraken und Laval, 1993). Da bei der Exzisionsreparatur von DNA-Alkylierungsschäden außer der MPG noch weitere Enzyme (AP-Endonuklease, Polymerase, Ligase) beteiligt sind, hängt die Effektivität der Reparatur von der aufeinander abgestimmten Aktivität aller beteiligter Enzyme ab. Der limitierende Schritt dieses Reparaturweges kann in Abhängigkeit von der betrachteten Zelllinie unterschiedlich sein. Überexpression der MPG hat in den Hamsterzelllinien V79 und *irs 1* wohl deshalb unterschiedliche Folgen, weil im Gegensatz zu V79-Zellen in *irs 1*-Zellen die reduzierte MPG-Aktivität möglicherweise zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Exzisionsreparatur geworden ist.

In CHO-9-Hamsterzellen führte neben der Überexpression der menschlichen MPG auch die der menschlichen AP-Endonuklease nicht zu einer erhöhten Resistenz gegenüber MMS und MNNG (Eschbach, 1994). Die enzymatischen Reaktionen der MPG und der AP-Endonuklease scheinen folglich in dieser Zelllinie nicht geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Exzisionsreparatur von methylierten Basen zu sein.

Gene involviert in der Exzisionsreparatur von DNA-Alkylierungsschäden zeigen in H4IIE-Zellen nur schwache Änderungen ihrer Expression nach Mutagenbehandlung

Die quantitativen Änderungen der mRNA-Expression nach MNNG- und Röntgenstrahlen-Behandlung von H4IIE-Zellen waren bei den an der Exzisionsreparatur beteiligten Enzymen MPG, AP-Endonuklease, Polymerase β und Ligase gering. Lediglich die für die AP-Endonuklease kodierende mRNA zeigte über einen längeren Zeitraum (0,5 bis 15 h nach der Behandlung) nach Röntgenbestrahlung eine leicht erhöhte Expression. Alle anderen signifikanten (mehr als 1,5-fachen (siehe Ergebnisse)) Änderungen der mRNA-Menge nach Mutagenbehandlung waren auf einen der untersuchten Zeitpunkte beschränkt, so daß sie keine klare Aussage zur Induktion der mRNA-Expression zulassen. Die mRNA-Menge der MPG nahm nur bei hohen Röntgenstrahlendosen (mehr als 8 Gy) signifikant zu. Frühere Beobachtungen zeigten, daß die mRNA-Menge der MPG in H4IIE-Zellen nach Bestrahlung mit einer Dosis von 3 Gy Röntgenstrahlen und mit MNNG (10, 20 und 30 μM) erst 48 Stunden nach der Behandlung der Zellen deutlich zunimmt (Laval, 1991; Hartenstein, 1992; Mitra und Kaina, 1993). Möglicherweise ist bei höheren Strahlendosen die Akkumulation der MPG-mRNA stärker und daher bereits früher zu beobachten. Eine dosisabhängige Induktion der anderen an der Exzisionsreparatur beteiligten Gene kann nicht ausgeschlossen werden. Wie die Promotoranalysen des in dieser Arbeit klonierten Promotorbereichs des MPG-Gens der Ratte zeigen (s.u.), ist eine Induktion der MPG auf transkriptioneller Ebene nach Mutagenexposition (MNNG, MMS, γ -Strahlen) nicht nachzuweisen. Die mRNA-Akkumulation der MPG nach Behandlung von H4IIE-Zellen ist daher wahrscheinlich auf eine erhöhte Stabilität der mRNA zurückzuführen.

Die Induzierbarkeit der an der Exzisionsreparatur beteiligten Ligase und der Polymerase β nach Mutagenbehandlung konnte in unterschiedlichen Zellsystemen gezeigt werden. So wurde in Affen-Nierenzellen nach Bestrahlung mit UV-Licht eine Induktion der Ligase-Aktivität beobachtet (Mezzina und Nocentini, 1978) und in CHO-Hamsterzellen war die Polymerase β auf mRNA-Ebene durch verschiedene Mutagene (MNNG, MMS, H_2O_2 , AAAF) induzierbar (Fornace et al., 1989). Sowohl DNA-Ligase als auch Polymerase β zeigten nach Mutagenbehandlung in H4IIE-Zellen keine erhöhte mRNA-Expression. Die Spezifität der Induzierbarkeit beider Enzyme in unterschiedlichen Zellsystemen weist auf Unterschiede in der

Promotorstruktur der kodierenden Gene oder auf unterschiedliche Fähigkeit der Zellen zur Aktivierung der Transkription hin.

Die Induktion der MGMT-Expression erfolgt nach Bestrahlung mit γ -Strahlen schneller als nach MNNG-Behandlung

Die MGMT-mRNA-Menge nimmt nach Behandlung mit γ -Strahlen bereits nach sechs Stunden zu. Die mRNA-Zunahme erfolgt damit nach Bestrahlung deutlich schneller als nach Gabe von MNNG, nach der erstmals 16 Stunden später eine Zunahme der mRNA-Menge beobachtet werden konnte. Die Behandlungen, die zu einer Induktion der MGMT führen (Laval, 1990; Fritz und Kaina, 1992), induzieren direkt oder indirekt, als Folge eines Replikationsblocks oder der Exzisionsreparatur modifizierter Basen, DNA-Strangbrüche (Laval, 1990; Fritz und Kaina, 1992). Die Hypothese, daß diese DNA-Strangbrüche das auslösende Signal für die Induktion der MGMT sind, wird durch die oben erwähnte schnellere Induktion der MGMT durch Röntgenstrahlen, im Vergleich zur MNNG-Behandlung, gestützt: Röntgenstrahlen induzieren direkt, ohne Verzögerung, DNA-Strangbrüche, wohingegen diese nach MNNG-Behandlung als Folge der Reparatur methylierter Basen erst zu einem späteren Zeitpunkt aus AP-Stellen der DNA entstehen können (Coquerelle et al., 1995).

Dexamethason führt zur Akkumulation der mRNA von Reparaturgenen in H4IIE-Ratten-Hepatomen

Sowohl die mRNA-Menge der MGMT als auch die der AP-Endonuklease und Polymerase β stieg nach Gabe des künstlichen Glucocorticoid-Hormons Dexamethason signifikant an. Eine leicht erhöhte mRNA-Expression der Polymerase β war nur zu einem der untersuchten Zeitpunkte (16 h-Wert) nach Hormonbehandlung festzustellen und ist daher kein deutlicher Hinweis auf eine Induktion der mRNA. Ein reprimierender Einfluß von Dexamethason auf die mRNA-Expression war bei der MPG zu beobachten. Beide Effekte, sowohl die Zunahme wie die Abnahme der mRNA-Menge, können auf Veränderung der Transkription der entsprechenden Gene oder auf eine veränderte Stabilität der jeweiligen mRNA zurückzuführen sein. Im Fall der Glucocorticoid-Hormone ist eine Einwirkung auf die Transkriptionsrate von Genen bekannt. Glucocorticoide aktivieren die Transkription bestimmter Gene durch Bindung an Sequenzen im Promotor (*glucocorticoid responsive elements*, kurz GRE) (Geisse et al., 1982). Es gibt eine Reihe von Genen, wie zum Beispiel die Gene der am Aminosäurekatabolismus in der Leber beteiligten TAT (Steinberg et al., 1975),

Tryptophanoxygenase (Danesch et al., 1983) und Glutaminsynthetase (Crook et al., 1978), solche, die in der Brustdrüse exprimiert werden, wie das β -Caseingen (Doppler et al., 1989) und Gene des *mouse mammary tumor virus* (MMTV) (Hynes et al., 1983), bei denen Glucocorticoide die Transkription aktivieren. Darüber hinaus aktiviert Dexamethason das Metallothionein-IIA Gen (Karin et al., 1984), das durch noch nicht bekannte Mechanismen zur Resistenz gegenüber alkylierende Agenzien beitragen kann (Kaina et al., 1990). Wenngleich eine Erhöhung der mRNA-Stabilität durch das Hormon nicht ausgeschlossen werden kann, so ist doch die transkriptionelle Aktivierung des MGMT- und des AP-Endonuklease-Gens der Ratte durch Dexamethason wahrscheinlich verantwortlich für die beobachtete verstärkte Akkumulation der mRNA.

Der MPG-Promotor der Ratte besitzt ein GRE. Da die mRNA-Menge der MPG nach Dexamethason-Behandlung abnimmt wird hier die Transkription durch das Glucocorticoid-Hormon vermutlich gehemmt. Eine Repression der Transkription durch Glucocorticoide ist insbesondere bei Cytokingenen bekannt (Culpepper und Lee, 1987; Taniguchi, 1988) - ein Effekt, der zur entzündungshemmenden und immunsupprimierenden Wirkung der Glucocorticoide beiträgt (Baxter und Forsham, 1972; Bowen und Fauci, 1988). Sie wird über die direkte Wechselwirkung des Glucocorticoid-Rezeptors mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B bewirkt und führt zu einer Reduktion der NF- κ B-abhängigen Transkription (Scheinmann et al., 1995). Eine andere Art der Repression durch Glucocorticoide ist für das Gen der α -Untereinheit des Gonadotropins beschrieben worden (Akerblom et al., 1988). Im Promotor dieses Gens überlagert das GRE die beiden cAMP-abhängigen Enhancer-Sequenzen (*cAMP responsive element* (CRE)). In diesem Fall ist die Bindung des Glucocorticoid-Rezeptors an die DNA für die negative Regulation der Transkription verantwortlich, entweder dadurch, daß die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die CREs verhindert oder deren Funktion beeinflusst wird. Nur in einem Fall, beim Prolaktin des Schweins, ist die direkte Repression der Transkription durch die Bindung des Hormon-Rezeptor-Komplexes an ein GRE („negatives GRE“) beschrieben worden (Sakai et al., 1988). Interessanterweise besitzt der von mir klonierte MPG-Promotorbereich zwei Bindestellen für den Transkriptionsfaktor NF- κ B, wobei eine von einem GRE überlagert wird. Alle drei der oben beschriebenen Mechanismen, also die direkte Wechselwirkung des Glucocorticoid-Rezeptors mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B, die Überlagerung der NF- κ B-Bindestelle durch das GRE sowie der direkte negative Einfluß des an das GRE gebundenen Hormon-Rezeptor-Komplexes, könnten für die Reduktion der Transkription des MPG-Gens verantwortlich sein.

Die Regulation von Reparaturgenen durch Hormone stellt einen wichtigen Beitrag zur Problematik der Hormonabhängigkeit der Kanzerogenese dar. Hormone beeinflussen die kanzerogene Wirkung von chemischen Mutagenen in der Ratten-Leber: Die Behandlung von Ratten mit N-Hydroxy-2-acetyl-aminofluoren, einem aromatischen Amin, führt zur Tumorentstehung in der Leber. Die Anzahl der Primärtumoren ist - geschlechtsabhängig - in der Leber männlicher Ratten deutlich höher. Durch die Gabe von Wachstumshormon, einem Hypophysenhormon, wird die Tumorzahl in der Leber männlicher Ratten auf die weiblicher Ratten reduziert (Liao et al., 1993). Auch die MGMT-Aktivität in der Rattenleber wird Wachstumshormon-abhängig reguliert: Entfernt man Ratten die Hypophyse, dann sinkt die MGMT-Aktivität in der Leber auf die Hälfte ab. Verabreicht man diesen Ratten Wachstumshormon, so steigt die MGMT Aktivität in der Leber auf den Wert vor der Entfernung der Hypophyse an (Pegg und Wiest, 1983). Offensichtlich korreliert die hormonelle Steigerung der MGMT-Enzymaktivität mit der geringeren Tumorentstehung in der Leber weiblicher und mit Wachstumshormon behandelte männlicher Ratten. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist außer der MGMT auch das AP-Endonuklease-Gen, das in der Exzisionsreparatur geschädigter Basen involviert ist, durch Dexamethasongabe induzierbar. Möglicherweise spielt daher auch die Expression von an der Exzisionsreparatur beteiligten Enzymen eine Rolle bei der Hormonabhängigkeit der Kanzerogenese in Ratten.

Die Aktivität des menschlichen MGMT-Promotors wird in menschlichen HeLa-Zellen und H4IIE-Rattenzellen unterschiedlich reguliert

Es war bekannt, daß die MGMT-Expression in H4IIE-Rattenzellen durch Mutagenbehandlung induzierbar ist, in menschlichen HeLa-Cervixkarzinomzellen sowie menschlichen HepG2-Hepatomzellen aber nicht (Fritz et al., 1991). Die MGMT-Expression wird in H4IIE-Zellen auf transkriptioneller Ebene reguliert (Fritz et al., 1991; Chan et al., 1992). Die transkriptionelle Aktivierung oder Repression eines Gens durch exogene Stimuli ist von zwei Voraussetzungen abhängig. Erstens muß die Zelle in der Lage sein, durch Signaltransduktion die Stimuli bis auf die Ebene der Transkription weiterzuleiten. Dies geschieht durch eine Reihe von Reaktionskaskaden, die schließlich zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen. Die zweite Voraussetzung ist, daß der Promotor eines Gens in der Lage ist, durch die Bindung dieser aktivierten Transkriptionsfaktoren die Expression des Gens zu modulieren. Es existierte bislang nur ein Hinweis darauf, daß auch der menschliche MGMT-Promotor in der Lage ist, auf Mutagenbehandlung zu reagieren: 1990 berichtete Laval über die Induktion der MGMT-

Aktivität in menschlichen LICH-Hepatomzellen durch Mutagene (Laval, 1990). In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß der menschliche MGMT-Promotor in H4IIE-Rattenzellen durch die Mutagene MNNG, MMS sowie γ -Strahlen induzierbar ist. Keine dieser Mutagen-Behandlungen führte in HeLa-Zellen zur Erhöhung der Aktivität des isolierten MGMT-Promotors, was mit früheren Beobachtungen übereinstimmt, wonach die mRNA-Expression des menschlichen MGMT-Gens in HeLa-Zellen durch Mutagen nicht induziert wird (Fritz et al., 1991). Die fehlende Induktion der Promotoraktivität in HeLa-Zellen ist offensichtlich darauf zurückzuführen, daß diese Zellen nicht in der Lage sind, die durch die Mutagene ausgelösten Signale bis zur transkriptionellen Aktivierung des MGMT-Gens weiterzuleiten. Auf welcher Ebene die Signaltransduktion blockiert wird, ist offen, da die beteiligten Reaktionsketten und Transkriptionsfaktoren bisher nicht bekannt sind.

Durch den Vergleich der Aktivität des menschlichen MGMT-Promotors in H4IIE- und HeLa-Zellen wurden noch weitere Unterschiede offenbar, die auf der unterschiedlichen Fähigkeit der beiden Zelllinien zurückgeht, bestimmte Signale auf Transkriptionsebene weiterzuleiten: In HeLa-Zellen war der MGMT-Promotor durch den Tumorpromotor TPA, den Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin sowie durch UV-Licht induzierbar. In H4IIE-Zellen führte lediglich die Bestrahlung mit UV-Licht zu einer im Vergleich zu den anderen Mutagenbehandlungen schwachen Induktion. Weder TPA noch Forskolin steigerten die Transkriptionsrate des CAT-Reportergens in H4IIE-Zellen. Durch Dexamethason konnte die Promotoraktivität sowohl in HeLa- als auch in H4IIE-Zellen gesteigert werden. Die Aktivitätszunahme war in H4IIE-Zellen dabei doppelt so hoch wie in HeLa-Zellen.

Bei HeLa-Zellen sind einige der Transkriptionsfaktoren bekannt, die als Antwort auf die genannten Behandlungen aktiviert werden: Der Tumorpromotor TPA und der Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin bewirken in HeLa-Zellen eine Aktivierung von Genen durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und AP-2 an Bindestellen im Promotor (Angel et al., 1987; Imagawa et al., 1987). Der Transkriptionsfaktor AP-1 trägt in HeLa-Zellen auch zu einer durch UV-Licht aktivierten Transkription von Genen bei (Stein et al., 1989). Da der menschliche MGMT-Promotor sowohl zwei potentielle AP-1- als auch zwei potentielle AP-2-Bindestellen besitzt, ist eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und AP-2 an der Aktivierung des Promotors durch TPA, Forskolin und UV-Licht wahrscheinlich. Es wäre interessant zu sehen, ob die fehlende Induktion des menschlichen MGMT-Promotors in H4IIE-

Zellen durch TPA- bzw. Forskolin-Behandlung auf eine Nichtaktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und AP-2 zurückgeht.

Die quantitativen Unterschiede in der Promotoraktivierung durch Dexamethason in HeLa- und H4IIE-Zellen sind möglicherweise auf unterschiedliche Mengen an Dexamethason-Rezeptor in diesen Zellen zurückzuführen. In Fto2B-3 Ratten-Hepatomzellen zumindest konnte dieser Zusammenhang zwischen Hormon-Rezeptormenge und Promotoraktivierung beobachtet werden (Strähle et al., 1989).

Der MPG-Promotor der Ratte besitzt Eigenschaften konstitutiv aktiver Promotoren

Der Promotor des MPG-Gens der Ratte gehört, wie die Promotoren der menschlichen AP-Endonuklease (Harrison et al., 1992; Robson et al., 1992; Akiyama et al., 1994) und des menschlichen MGMT-Gens (Harris et al., 1991), zur Klasse der GC-reichen Promotoren, die keine TATA-Box besitzen. Solche Promotoren wurden insbesondere in sogenannten „housekeeping genes“ gefunden, also in Genen, die in allen Zellen aktiv sind und eine konstante Transkriptionsrate aufweisen (Zawel und Reinberg, 1993).

Die GC-reiche Sequenz des MPG-Promotors der Ratte wird von einem 77 Basenpaare langen Bereich, der vorwiegend aus Adenin-Nukleotiden zusammengesetzt ist (86%), in zwei Hälften geteilt. Adeninreiche Sequenzen führen - vermutlich indem sie die Helixstruktur der DNA ändern - zu Knicken in der DNA (Wu und Crother, 1984). Auf Grund der relativ schwachen Bindungskräfte zwischen AT-Basenpaaren können solche Bereiche leicht „aufgeschmolzen“ werden. Die mögliche Funktion dieser Region könnte darin liegen, die Bindung z.B. der RNA-Polymerase bzw. des Präinitiationskomplexes der Transkription zu erleichtern (Wu und Crother, 1984).

Die TATA-Sequenz legt den Transkriptionsstartpunkt in Genen fest: An die TATA-Sequenz bindet der Transkriptionsfaktor TFIID. Dieser bildet zusammen mit anderen den Präinitiationskomplex, an den die RNA-Polymerase II bindet, wodurch die Transkriptionsinitiation gesteuert wird (Zawel und Reinberg, 1993). An der Festlegung des Transkriptionsstartpunktes bei Promotoren ohne TATA-Box ist sehr wahrscheinlich die koordinierte Wirkung bestimmter Transkriptionsfaktoren, wie z.B. dem Sp1-Protein, notwendig, an welche die RNA-Polymerase binden kann und so an eine bestimmte Stelle im

Promotor dirigiert wird (Mitchell und Tjian, 1989). Die Transkription des MPG-Gens beginnt an zwei nahe beeinanderliegenden Guanin-Basen. Das Hauptprodukt der *primer extension*-Analyse deutet auf die hauptsächliche Verwendung des Guanins in Position 862 der genomischen Sequenz hin. Ein weiterer Transkriptionsstart liegt unmittelbar davor am Guanin der Position 860. Beide Startpunkte führen zu fast gleich langen mRNA-Produkten. In der S1-Nuklease-Protektionsanalyse wurden dieselben Produkte wie in der *primer extension*-Analyse erhalten; außerdem traten hier aber auch noch kürzere Reaktionsprodukte auf. Diese sind wahrscheinlich auf Instabilitäten am Beginn des mRNA-DNA-Hybriddoppelstranges zurückzuführen, die auf Grund von Sekundärstrukturen in der mRNA entstehen. Die teilweise einzelsträngigen Bereiche der mRNA oder des homologen DNA-Stranges werden dann durch die S1-Nuklease abgebaut. Diese für die Bestimmung des Transkriptionsstarts unbrauchbaren kürzeren Produkte erschweren eine Quantifizierung der Benutzung der beiden Transkriptionsstartpunkte durch die S1-Nuklease Protektionsanalyse.

Der normalerweise verwendete Transkriptionsstartpunkt des MPG-Gens (s.o.) liegt außerhalb (13 Basenpaare 3' von der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NotI (vgl. **Abbildung 17B** und **Abbildung 21A**) der Promotorfragmente, die in den Reporter-genkonstrukten vor das CAT-Gen kloniert worden sind. Die Transkription startet in den Reporter-gen (MPG-Promotor-CAT)-Konstrukten folglich nicht an derselben Stelle wie im MPG-Gen. Da die Transkriptionsinitiation in Promotoren ohne TATA-Box nicht von der Position einer bestimmten Sequenz, sondern eher von der Beteiligung und räumlichen Anordnung von Transkriptionsfaktoren und deren Bindestellen abhängt (Mitchell und Tjian, 1989), können offensichtlich auch andere Basen als die im normalen DNA-Sequenzzusammenhang verwendeten Guanine (s.o.) als Transkriptionsstartpunkte dienen.

Das (-861/-13)-Promotorfragment des MPG-Gens der Ratte zeigte eine Aktivität in H4IIE-Zellen, die vergleichbar hoch war wie die des relativ starken viralen SV40-Promotors. Das längste, 4,6 kb lange, klonierte Promotorfragment zeigte dagegen mit nur 18% dieser Aktivität eine deutliche Reduktion der Transkriptionsrate des CAT-Reporter-gens. Dafür können zwei Gründe vorliegen: a.) Im Bereich 5' der Position -861 liegen weitere Sequenzen, die einen reprimierenden Einfluß auf die Transkriptionsrate ausüben. b.) Die Menge des erfolgreich transfizierten Plasmids, das etwa doppelt so groß wie das (-861/-13)-Reporter-genkonstrukt ist (9,3 kb gegenüber 5,5 kb), ist vermindert (vergleiche dazu auch Harris et al., 1991). Da auf den Reporter-genkonstrukten keine selektiven Marker vorhanden sind, die eine direkte

Mengenbestimmung des transfizierten Plasmids zulassen würden, konnte nur die Transfektionseffizienz in den Experimenten durch Kotransfektion des Plasmides pRSV- β -Gal bestimmt werden. Dieses Plasmid hat jedoch in allen Kotransfektionen dieselbe Größe und kann daher keinen Korrekturfaktor für größenbedingte Unterschiede in der Menge der transfizierten Plasmide liefern. Wie zu erwarten war, bewirkte die Verkürzung des (-861/-13)-Promotorfragments um 298 bp, die zum Verlust potentieller Bindestellen der Transkriptionsfaktoren c-Myc, NF- κ B, AP-2 und Ets-1 führte, eine Reduktion der Promotoraktivität. Völlig unerwartet war dagegen, daß bei einer weiteren Verkürzung um 428 bp, eine erneute Steigerung der Promotoraktivität verzeichnet werden konnte. Durch die weitere 5'-Deletion des Promotorbereichs gehen viele potentielle Transkriptionsfaktor-Bindestellen verloren (AP-2, PEA 3, AP-3, NF- κ B, GRE, Sp1 und die „CCAAT-Box“). Das resultierende (-135/-13)- Promotorfragment ist 122 bp lang und besitzt nur zwei potentielle Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Ets-1. Trotzdem ist seine Promotoraktivität fast doppelt so hoch wie das des (-563/-13)-Fragments (64% gegenüber 34 % der Aktivität des (-861/-13)-Promotorfragments). Es sind daher möglicherweise im deletierten (-563/-135)-Sequenzbereich reprimierende Elemente vorhanden, die in dem (-563/-13)-Promotorfragment eine dominierende Rolle in der Regulation der Transkription übernehmen. Ein bekanntermaßen zur Repression der Transkription fähiges Element ist das GRE (Akerblom et al., 1988; Guertin et al., 1988; Jonat et al., 1990).

Die Induktion der MPG-Promotoraktivität ist durch Bindung von aktivierten Transkriptionsfaktoren erklärbar

Die Aktivität des isolierten MPG-Promotors in H4IIE-Rattenzellen wird durch Behandlung der Zellen mit TPA, UV-Licht und Dexamethason gesteigert. In Säugerzellen sind Signaltransduktionswege bekannt, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen, die an den MPG-Promotor der Ratte binden könnten. TPA kann die Induktion der Genexpression u.a. durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-3, PEA-3 oder NF- κ B (Chiu et al., 1987; Rørth et al., 1990; Griffin et al., 1989) vermitteln, die potentielle Bindestellen im MPG-Promotor der Ratte besitzen. UV-Licht führt zur Induktion der Genexpression über die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B (Stein et al., 1989; Radler-Pohl et al., 1993; Devary et al., 1993). An der Induktion der Promotoraktivität des MPG-Promotors durch UV-Licht könnte die Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B beteiligt sein, der zwei potentielle Bindestellen innerhalb des 848 bp langen Promotorfragments (-861/-13) besitzt. Dafür spricht

insbesondere, daß mit dem Verlust einer der möglichen NF- κ B-Bindestelle in dem kürzeren (-563/-13)-Promotorfragment auch die Höhe der Induktion der Transkription nach UV-Bestrahlung auf etwa die Hälfte zurückgeht.

Die Dexamethason-abhängige Transkription, die durch den isolierten MPG-Promotor vermittelt wird, bedarf einer besonderen Betrachtung, da *in vivo* die MPG-mRNA-Menge nach Dexamethason-Behandlung abfällt, der isolierte MPG-Promotor jedoch eine Steigerung seiner Aktivität durch Dexamethason erfährt. Außerdem zeigt das 122 bp lange (-135/-13)-Promotorfragment, dem die Bindestelle für den Glucocorticoid-Rezeptor fehlt, eine höhere Aktivierung durch Dexamethason als die beiden längeren Promotorfragmente, die das GRE enthalten. Zur Erklärung dieser Sachverhalte nehme ich an, daß die Hormonabhängigkeit des kurzen (-135/-13)-Promotorfragments (ohne eigenes GRE) und die Induktion der Promotoraktivität der längeren Promotorfragmente durch Sequenzen vermittelt wird, die auf dem bakteriellen Teil des Vektors pCAT basic liegen, der zur Reporteranalyse verwendet wurde. So läßt sich auch die Steigerung der hormonabhängigen Aktivierung der immer kürzeren Promotorfragmente (846, 550, 122 bp) vom 2,4- über das 3- zum 5,3-fachen dadurch erklären, daß diese im bakteriellen Teil des Vektors gelegene Sequenz näher an den Transkriptionsstartpunkt gelangt und dadurch einen steigenden Einfluß auf die Transkription erlangt (siehe dazu auch Jantzen et al., 1987). Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, daß das 4,6 kb lange MPG-Promotorfragment, das einen großen Abstand zwischen dem bakteriellen Teil des Vektors und dem Transkriptionsstart schafft, keine Dex-abhängige Aktivierung mehr zeigt (nicht gezeigte Daten). Die *in vivo* gefundene Reduktion der mRNA-Menge nach Dexamethason-Behandlung von H4IIE-Zellen kann am isolierten Promotor in diesen Reporterkonstrukten nicht geklärt werden. Der Einfluß bakterieller Sequenzen auf die Promotoraktivität bleibt auf die Dexamethason-vermittelte Transkription beschränkt. Nach TPA- und UV-Behandlung zeigt das (-135/-13)-Promotorfragment keine Aktivierung.

MGMT und MPG werden in Ratten-Leberzellen nicht koreguliert

Die beiden an der Reparatur von DNA-Alkylierungsschäden beteiligten Proteine MGMT und MPG zeigen auf Transkriptionsebene keine Koregulation. Weder die Behandlungen der Zellen mit mutagenen Alkylantien, ionisierenden Strahlen oder UV-Licht, noch die Behandlung mit „physiologischen Modulatoren“ der Transkription wie Tumorpromotoren und Hormonen führten zu einer vergleichbaren Expressionsänderung der beiden Gene. Unterschiede in der

gewebespezifischen Expression der beiden Gene (Washington et al., 1988; Wilson et al., 1993) wie auch die Expression der MPG in Mex⁻-Zellen (z.B. CHO-9 Hamsterzellen), die keine MGMT exprimieren, deuten darüber hinaus auf eine getrennte Regulation beider Gene hin. Eine unterschiedliche transkriptionelle Regulation von MGMT und MPG mag überraschen, da die spezifische Reparatur von Alkylierungsschäden der DNA die Aktivität beider Enzyme verlangt, denn alle Agenzien, die den DNA-Schaden O⁶-Methylguanin produzieren, erzeugen auch N-Methylpurine (Beranek, 1990). Dies ist möglicherweise auch der Grund weshalb in *E.coli*-Bakterien die für die induzierbare O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase und die induzierbare N-Methylpurin-DNA-Glycosylase kodierenden Gene *ada* und *alkA* durch das Ada-Protein koreguliert werden. Weshalb in Säugerzellen diese Koregulation offensichtlich nicht stattfindet ist bislang noch unbekannt.

Ausblick

An der Reparatur von DNA-Alkylierungsschäden sind die Reparaturproteine MGMT und MPG maßgeblich beteiligt. Es wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß beide Proteine u.a. auf transkriptioneller Ebene reguliert werden. Für die MPG gibt es darüber hinaus Hinweise für eine Regulation auf posttranskriptioneller Ebene, die einer näheren Untersuchung bedürfen.

Wie wir gesehen haben, ist der MGMT-Promotor des Menschen induzierbar. Die Induzierbarkeit ist abhängig von der Zelle, in der der Promotor aktiv ist. Es erscheint daher sinnvoll, menschliche Zellsysteme (z.B. Leberzellen) zu etablieren, die eine Untersuchung der Induktion des MGMT-Gens zulassen.

Die MGMT-Expression der Ratte wird nach unterschiedlichen Stimulierungen relativ stark induziert. Zur Klärung der molekularen Grundlagen dieser Induktion ist die Isolierung des MGMT-Promotors der Ratte unerlässlich.

Bei der Aufklärung der Reparaturwege für Alkylierungsschäden der DNA darf nicht außer Acht gelassen werden, daß nicht nur die MGMT und MPG, sondern auch andere Reparaturenzyme an der Entfernung von Alkylierungsschäden der DNA beteiligt sind. So trägt auch die Exzisionsreparatur von Addukten, die die DNA strukturell deformieren, zur Entfernung von - insbesondere langkettigen - Alkylgruppen bei (Bronstein et al., 1992; Klein et al., 1994). Um die Fähigkeit einer Zelle, Alkylierungen der DNA zu reparieren, richtig

beurteilen zu können, ist folglich die Untersuchung möglichst vieler Reparaturenzyme, ihrer Regulation und Substratspezifität notwendig. Ein wichtiger experimenteller Ansatz zur Klärung der biologischen Bedeutung eines bestimmten Reparatursystems *in vivo* wird das gezielte Ausschalten bestimmter Reparaturenzyme in transgenen Tieren durch Insertionsmutagenese sein.

Literaturverzeichnis

- Akerblom, I. E., Slater, E. P., Beato, M., Baxter, D. J. und Mellon, P. L. (1988). Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive element. *Science* **241**: 350-353.
- Akiyama, K., Seki, S., Oshida, T. und Yoshida, M. C. (1994). Structure, promotor analysis and chromosomal assignment of the human APEX gene. *Biochimica et Biophysica Acta* **1219**: 15-25.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. D. (1987). Molekularbiologie der Zelle. (Jaenicke, L. Ed.) VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**: 729-739.
- Balmain, A. und Pragmell, I. B. (1983). Mouse skin carcinomas induced *in vivo* by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. *Nature* **303**: 72-74.
- Barnes, D. E., Johnston, L.H., Kodama K.-I., Tomkinson, A.E., Lasko, D.D. und Lindahl, T. (1990). Human DNA ligase I cDNA: Cloning and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6679-6683.
- Barnes, D. E., Lindahl, T. und Sedgwick, B. (1993). DNA repair. *Current Opinion in Cell Biology* **5**: 424-433.
- Baxter, J. D. und Forsham, P. H. (1972). Tissue effects of glucocorticoids. *Am. J. Med.* **53**: 573-589.
- Beranek, D. T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research* **231**: 11-30.
- Beron, J. (1991). Biochemische Charakterisierung von multizellulären Sphäroiden aus primären Rattenhepatocyten. *Diplomarbeit*. Universität Karlsruhe.
- Bertini, R., Coccia, P., Pagani, P., Marinello, C., Salmona, M. und D'Incalci, M. (1990). Interferon inducers increase O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in the rat liver. *Carcinogenesis* **11**: 181-183.
- Bowen, D. L. und Fauci, A. S. (1988). Adrenal cortico steroids. In: *"Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates"*. Gallin, J.I., Goldstein, I.M. and Snyderman, R. (Eds.) Raven Press, New York.
- Bronstein, S. M., Skopek, T. R. und Swenberg, J. A. (1992). Efficient repair of O⁶-ethylguanine, but not O⁴-ethylthymine or O²-ethylthymine, is dependent upon O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase and nucleotide excision repair activities in human cells. *Cancer Research* **52**: 2008-2011.
- Calmels, S., Ohshima, H., Crespi, M., Leclerc, H., Cattoen, C. und Bartsch, H. (1987). N-nitrosamin formation by microorganisms isolated from gastric juice and urine: biochemical studies on bacteria-catalyzed nitrosation. In *"The Relevance of N-nitrosocompounds to human cancer"*. (H. Bartsch et al., Ed.) IARC Scientific Publication, Lyon,

- Cereghini, S., Blumenfeld, M. und Yaniv, M. (1988). A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. *Genes and Development* **2**: 957-974.
- Chakravarti, D., Ibeanu, G. C. und Tano, K. M., S. (1991). Cloning and expression in *E.coli* of a human cDNA encoding the DNA repair protein N-methylpurin-DNA glycosylase. *The Journal of Biological Chemistry* **266**: 15710-15715.
- Chan, C. L., Wu, Z., Eastman, A. und Bresnick, E. (1990). Induction and purification of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase from rat liver. *Carcinogenesis* **11**: 1217-1221.
- Chan, C.-L., Wu, Z., Eastman, A. und Bresnick, E. (1992). Irradiation-induced expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells. *Cancer Research* **52**: 1804-1809.
- Chang, B.-D., Beattie, C.W., Hussain, R.A. und Anderson, A.C. (1993). Estrous cycle modulation of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase expression in rat mammary epithelial cells. *Cancer Letters* **75**: 11-18.
- Chiu, R., Imagawa, M., Imbra, R. J., Bockoven, J. R. und Karin, M. (1987). Multiple cis- and trans-acting elements mediate the transcriptional response to phorbol esters. *Nature* **329**: 648-651.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanat-phenol-chloroform extraction. *Analytic Biochemistry* **162**: 156-159.
- Clamon, G. H. (1992). Alkylating Agents. In "The Chemotherapy Sourcebook". (M. C. Perry, Ed.) Williams and Wilkins, Baltimore,
- Cooper, D. P., O'Conner, P. J. und Margison, G. P. (1982). Effect of acute dose of 2-acetylaminofluorene on the capacity of rat liver to repair methylated purines in DNA *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Research* **42**: 4203-4209.
- Cooper, D. P., Styles, J., Bradbrook, C., Charlesworth, J. D., Chu, Y. H., O'Conner, P. J. und Margison, G. P. (1985). Methylated purines formed in DNA by dimethylnitrosamin in rats previously exposed to hepatotoxic and hepatocarcinogenic regimes: effect of the repair of O⁶-methylguanine. *Chem.-Biol. Interactions* **53**: 283-301.
- Coquerelle, T., Dosch, J., Kaina, B. (1995). Overexpression of N-methylpurine-DNA glycosylase in Chinese hamster ovary cells renders them more sensitive to the production of chromosomal aberrations by methylating agents - a case of imbalanced DNA repair. *Mutation Research* **336**: 9-17.
- Corcos, L. und Weiss, M. C. (1988). Phenobarbital, dexamethason and benzantracene induce several cytochrome P450 mRNAs in rat hepatoma cells. *FEBS Letters* **233**: 37-40.
- Crook, R. B., Louie, M., Deuel, T. F. und Tomkins, G. M. (1978). Regulation of glutamine synthetase by dexamethasone in hepatoma tissue culture cells. *The Journal of Biological Chemistry* **253**: 6125-6131.
- Culpepper, J. und Lee, F. (1987). Glucocorticoid regulation of lymphokine production by murine T lymphocytes. *Lymphokines* **13**: 275-289.
- Danesch, U., Hashimoto, S., Renkawitz, R. und Schütz, G. (1983). Transcriptional regulation of the tryptophan oxygenase gene in rat liver by glucocorticoids. *The Journal of Biological Chemistry* **8**: 4750-4753.
- Deschatrette, J. und Weiss, M. C. (1974). Characterization of differentiated and dedifferentiated clones from a rat hepatoma. *Biochimie* **56**: 1603-1611.

- Deschrette, J., Moore, E. E., Dubois, M. und Weiss, M. C. (1980). Dedifferentiated variants of a rat hepatoma: Reversion analysis. *Cell* **19**: 1043-1051.
- Devary, Y., Rosette, C., DiDonato, J. A. und Karin, M. (1993). NF- κ B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science* **261**: 1442-1444.
- Dianov, G., Price, A. und Lindahl, T. (1992). Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 1605-1612.
- Dianov, G. und Lindahl, T. (1994). Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway. *Current Biology* **4**: 1069-1076.
- Doppler, W., Groner, B. und Ball, R. K. (1989). Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat β -casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 104-108.
- Dumneco, L. L., Allay, E., Norton, K. und Gerson, S. L. (1993). The prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O⁶-methylguanine-DNA alkyltransferase. *Science* **259**: 219-222.
- Dutta-Choudhury, T.A., Bak, B.H. und Guzman, R. (1991). Cellular levels of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in mammary epithelial cells and liver from virgin, pregnant and pituitary grafted mice. *Carcinogenesis* **12**: 1795- 1800.
- Engelse, L. den, Froot, B. G. J., Menkveld, G. J. und Tates, A. D. (1986). Enhanced repair of O⁶-methylguanine in liver DNA of rats pretreated with phenobarbital, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, ethionin, or N-alkyl-N-nitrosoureas. *Carcinogenesis* **7**: 1941-1947.
- Engelward, B. P., Boosalis, M. S., Chen, B. J., Deng, Z., Siciliano, M. J. und Samson, L. D. (1993). Cloning and characterization of a mouse 3-methyladenin/7-methylguanine DNA glycosylase cDNA whose gene maps to chromosome 11. *Carcinogenesis* **14**: 175-181.
- Eschbach, E. (1994). Erhöhung der Resistenz von Säugetierzellen gegenüber DNA-schädigenden Agenzien durch Transfektion humaner cDNA. *Dissertation*, Universität Karlsruhe.
- Evensen, G. und Seeberg, E. (1982). Adaptation to alkylation resistance involves the induction of a DNA glycosylase. *Nature* **296**: 773-775.
- Faisst, S. und Meyer, S. (1992). Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acid Research* **20**: 3-26.
- Fiddler, W., (1975). The occurrence and determination of N-nitroso compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology* **31**: 352-360.
- Fornace, J., A.J., Zamudzka, B., Hollander, C. und Wilson, S. H. (1989). Induction of β -polymerase mRNA by DNA-damaging agents in chinese hamster ovary cells. *Molecular and Cellular Biology* **9**: 851-853.
- Frisch, S. M. und Ruley, H. E. (1987). Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *The Journal of Biological Chemistry* **262**: 16300-16304.
- Fritz, G., Tano, K., Mitra, S. und Kaina, B. (1991). Inducibility of the DNA repair gene encoding O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 4660-4668.

- Fritz, G. (1992). Charakterisierung zellulärer Schutzfunktionen gegenüber der toxischen Wirkung von alkylierenden Agenzien in Säugerzellen. *Dissertation*, Universität Karlsruhe
- Fritz, G. und Kaina, B. (1992). Stress factors effecting expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase mRNA in rat hepatoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1171**: 35-40.
- Frosina, G. und Abbondandolo, A. (1985). The current evidence for an adaptive response to alkylating agents in mammalian cells, with special reference to experiments with *in vitro* cell cultures. *Mutation Research* **154**: 85-100.
- Fukuhara, M., Hyakawa, H., Sakumi, K. und Sekiguchi, M. (1992). Induced synthesis of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase in rat hepatoma cells exposed to DNA-damaging agents. *Jpn. J. Cancer Res.* **83**: 72-77.
- Gallagher, P. E. und Brent, T. P. (1984). Further purification and characterization of human 3-methyladenin-DNA glycosylase. *Biochimica et Biophysica Acta* **782**: 394-401.
- Geisse, S., Scheidereit, C., Westphal, H. M., Hynes, N. E., Groner, B. und Beato, M. (1982). Glucocorticoid receptors recognize DNA sequences in and around murine mammary tumor virus DNA. *EMBO J.* **1**: 1613-1619.
- Gorman, C. M., Moffat, L. F. und Howard, B. H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* **2**: 1044-1051.
- Griffin, G. E., Leung, K., Folks, T. M., Kunkel, S. und Nabel, G. J. (1989). Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF- κ B. *Nature* **339**: 70-73.
- Grombacher, T. und Kaina, B. (1995). Constitutive expression and inducibility of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurin-DNA glycosylase in rat liver cells exhibiting different status of differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1270**: 63-72.
- Guertin, M., LaRue, H., Bernier, D., Wrangle, O., Chevrette, M., Gingras, M.-C. und Belange, L. (1988). Enhancer and promotor elements directing activation and glucocorticoid repression of the α_1 -fetoprotein gene in hepatocytes. *Molecular and Cellular Biology* **8**: 1398-1407.
- Habraken, Y. und Laval, F. (1993). Increased resistance of the Chinese hamster mutant irs1 cells to monofunctional alkylating agents by transfection of the *E.coli* or mammalian N3-methyladenin-DNA-glycosylase genes. *Mutation Research* **293**: 187-195.
- Harris, C. C. (1991). Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Research (Supplement)* **51**: 5023-5044.
- Harris, L. C., Potter, P. M., Tano, K., Shiota, S., Mitra, S. und Brent, T. P. (1991). Characterization of the promotor region of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acid Research* **19**: 6163-6167.
- Hartenstein, B. (1992). Untersuchungen zur Veränderung der Expression der N-Methylpurin-DNA-Glykosylase von Säugerzellen nach Behandlung mit mutagenen Agenzien. *Diplomarbeit*, Universität Karlsruhe.
- Harrison, L., Ascoine, G., Menninger, J. C., Ward, D. C. und Demple, B. (1992). Human apurinic endonuclease gene (APE): structure and genomic mapping (chromosome 14q11.2-12). *Human Molecular Genetics* **1**: 677-680.

- Hesse, S., Mezger, M. und Wiebel, F. J. (1984). The capacity of rat hepatoma cell lines for O⁶-methylguanine-DNA repair correlates with their status of differentiation. *Carcinogenesis* **5**: 975-978.
- Hofe, E. von, Fairbairn, L., Margison, G.P. (1992). Relationship between O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mutation, transforming, and cytotoxicity in C3H/10T^{1/2} cells expressing exogenous alkyltransferase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 11199-11203.
- Hynes, N., van Oyen, A. J. J., 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.
- Ibeanu, G., Hartenstein, B., Dunn, W. C., Chang, L. Y., Hofmann, E., Coquerelle, T., Mitra, S. und Kaina, B. (1992). Overexpression of human DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase results in the increased removal of N-methylpurines in DNA without a concomitant increase in resistance to alkylating agents in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* **13**: 1989-1995.
- Imagawa, M., Chiu, R. und Karin, M. (1987). Transcription Factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: Protein kinase C and cAMP. *Cell* **51**: 251-260.
- Ishizaki, K., Tsujimura, T., Yawata, H., Fujio, C., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., Ikenaga, M. (1986). Transfer of the *E. coli* O⁶-methylguanine methyltransferase gene into repair-deficient human cells and restoration of cellular resistance to N-methyl-N-nitrosoguanidine. *Mutation Research* **166**: 135-141.
- Jantzen, H.-M., Strähle, U., Gloss, B., Steward, F., Schmid, W., Boshart, M., Miksicek, R. und Schütz, G. (1987). Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell* **49**: 29-38.
- Jantzen, K., Fritton, H. P., Igo-Kemense, T., Espel, E., Janich, S., Cato, A. C. B., Mugele, K. und Beato, M. (1987). Partial overlapping of binding sequences for steroid hormone receptors and DNaseI hypersensitive sites in the rabbit uteroglobin gene. *Nucleic Acid Research* **15**: 4535-4550.
- Jirtle, R. J. und Meyer, S. A. (1991). Liver tumor promotion: Effect of phenobarbital on EGF and protein kinase C signal transduction and transforming growth factor- β 1 expression. *Digestiv Diseases and Science* **36**: 659-668.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K.-K., Cato, A. C., Gebel, S., Ponta, H. und Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: Down-modulation of AP-1 (fos/jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**: 1189-1204.
- Jones, K. A., Kadonaga, J. T., Rosenfeld, P. J., Kelly, T. J. und Tijan, R. (1987). A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* **48**: 79-89.
- Kaina, B., Lohrer, H., Karin, M. und Herrlich, P. (1990). Overexpressed human metallothionein IIA gene protects Chinese hamster ovary cells from killing by alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2710-2714.
- Kaina, B., Fritz, G., Mitra, S. und Coquerelle, T. (1991). Transfection and expression of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* **12**: 1857-1867.

- Kaina, B. (1993). Mechanismen der DNA-Reparatur und der Mutagenese. In "Mutationsforschung und genetische Toxikologie". (R. Fahrig, Ed.) Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 65-86.
- Kaina, B., Fritz, G. und Coquerelle, T. (1993). Contribution of O⁶-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations: New insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines. *Environ. Mol. Mutagen.* **22**: 283-292.
- Kaina, B., Fritz, G., Eschbach, E., Dosch, J. und Preuss, I. (1995). Transfer of genes affecting resistance of mammalian cells to alkylating drugs - implications for cancer chemotherapy. *Contrib. Oncol.* **48**: 125-141.
- Kamiya, H., Miura, K., Ohtomo, N., Nishimura, S. und Ohtsuka, E. (1991). Transforming activity of a c-Ha-ras gene containing O-6-methylguanine in codon 12. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**: 996-1002.
- 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-II_A gene. *Nature* **308**: 513-519.
- Karran, P., Hjelmgren, T. und Lindahl, T. (1982). Induction of a DNA glycosylase for N-methylated purines is part of the adaptive response to alkylating agents. *Nature* **296**: 770-773.
- Kataoka, H., Yamamoto, Y. und Sekiguchi, M. (1983). A new gene (alkB) of *Escherichia coli* that controls sensitivity to methyl methane sulfonate. *Journal of Bacteriology* **153**: 1301-1307.
- Kataoka, H., Hall, J. und Karran, P. (1986). Complementation of sensitivity to alkylating agents in *Escherichia coli* and Chinese hamster ovary cells by expression of a cloned bacterial DNA repair gene. *EMBO J.* **5**: 3195-3200.
- Kedar, P. S., Widen, S. G., Englander, E. W., Fornace, J., A.J. und Wilson, S. H. (1991). The ATF/CREB transcription factor-binding site in the polymerase β promoter mediates the positive effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3729-3733.
- Kenny, F. T. (1961). Induction of tyrosine- α -ketoglutarat transaminase in rat liver. III. Immunochemical analysis. *The Journal of Biological Chemistry* . **237**: 1610-1614.
- Klein, C. J., Bleeker, M. J., Roelen, H. C. P. F., Rafferty, J. A., Margison, J. P., Brugghe, H. F., Elst, H. v. d., Marel, G. A. v. d., Boom, J. H. v., Kriek, E. und Berns, A. J. M. (1994). Role of nucleotide excision repair in processing of O⁴-alkylthymine in human cells. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 25521-25528.
- Larson, K., Sahm, J., Shenkar, R. und Strauss, B. (1985). Methylation-induced blocks to *in vitro* DNA replication. *Mutation Research* **150**: 77-84.
- Laval, F. (1985). Repair of methylated bases in mammalian cells during adaptive response to alkylating agents. *Biochimie* **67**: 361-364.
- Laval, F. (1990). Induction of proteins involved in the repair of alkylated bases in mammalian cells by DNA-damaging agents. *Mutation Research* **233**: 211-218.
- Laval, F. (1991). Increase of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase and N³-methyladenine glycosylase RNA transcripts in rat hepatoma cells treated with DNA-damaging agents. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **176**: 1086-1092.

- Lawley, P. D. (1984). Carcinogenesis by alkylating agents. In "Chemical Carcinogens". (C. E. Searl, Ed.) American Chemical Society, Washington D.C., **1**: 325-484.
- Lee, W., Michell, P. und Tjian, R. (1987). Purified transcriptionfactor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**: 741-752.
- Lefebvre, P. und Laval, F. (1986). Enhancement of O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferase activity induced by various treatments in mammalian cells. *Cancer Research* **46**: 5701-5705.
- Lenardo, M. J. und Baltimore, D. (1989). NF-κB: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* **58**: 227-229.
- Liao, D., Porsch-Hällström, I., Gustafson, J.-A. und Blanck, A. (1993). Sex differences at the initiation stage of rat liver carcinogenesis - influence of growth hormone. *Carcinogenesis* **14**: 2045-2049.
- Lindahl, T., Sedgwick, B., Sekiguchi, M. und Nakabeppu, Y. (1988). Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 133-157.
- Loveless, A. (1969). Possible relevance of O⁶-alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature* **223**: 206-207.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., und Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- Margison, G. P., Butler, J. und Hoey, B. (1985). O⁶-methylguanine methyltransferase activity is increased in rat tissues by ionizing radiation. *Carcinogenesis* **6**: 1699-1702.
- Mercurio, F. und Karin, M. (1989). Transcriptionfactor AP-3 and AP-2 interact with the SV 40 enhancer in a mutually exclusive manner. *EMBO Journal* **8**: 1455-1460.
- Mezzina, M. und Nocentini, S. (1978). DNA ligase activity in UV-irradiated monkey kidney cells. *Nucleic Acid Research* **5**: 4317-4328.
- Mirvish, S.S., (1975). Formation of N-nitroso compounds: Chemistry, kinetics, and *in vivo* occurrence. *Toxicology and Applied Pharmacology* **31**: 325-351.
- Mitchell, E. P. und Schein, P. S. (1992). Nitrosourea. In "The Chemotherapy Sourcebook". (M. C. Perry, Ed.) Williams and Wilkins, Baltimore.
- Mitchell, P. J. und Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**: 371-378.
- Mitra, G., Pauly, G. T., Kumar, R., Pei, G. K., Hughes, S. H., Moschel, R. C. und Barbacid, M. (1989). Molecular analysis of O⁶-substituted guanine-induced mutagenesis of ras oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8650-8654.
- Mitra, S. und Kaina, B. (1993). Regulation of repair of alkylation damage in mammalian genomes. *Progr. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **44**: 109-142.
- Nakabeppu, J., Kondo, H. und Sekiguchi, M. (1984). Cloning and characterization of the *alkA* gene of *Escherichia coli* that encodes 3-methyladenin DNA glycosylase. *The Journal of Biological Chemistry* **259**: 13723-13729.
- Narayan, S., Beard, W. A. und Wilson, S. H. (1995). DNA damage-induced transcriptional activation of a human DNA polymerase β chimeric promotor: recruitment of preinitiation complex *in vitro* by ATF/CREB. *Biochemistry* **34**: 73-80.

- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305-312.
- O'Conner, T. und Laval, F. (1990). Isolation and structure of a cDNA expressing a mammalian 3-methyladenin-DNA glycosylase. *EMBO Journal* **9**: 3337-3342.
- Offringa, R., Smits, A. M. M., Houweling, A., Bos, J. L. und van der Eb, A. J. (1988). Similar effects of adenovirus E1A and glucocorticoid hormones on the expression of the metalloprotease stromelysin. *Nucleic Acids Research* **16**: 10973-10984.
- Park, J.-H. und Taylor, M. W. (1988). Analysis of signals controlling expression of the chinese hamster ovary aprt gene. *Molecular and Cellular Biology* **8**: 2536-2544.
- Pegg, A. E. (1978). Enzymatic removal of O⁶-methylguanine from DNA by mammalian cell extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84**: 166-173.
- Pegg, A. E. und Perry, W. (1981). Stimulation of transfer of methyl groups from O⁶-methylguanine in DNA to protein by rat liver extract in response to hepatotoxins. *Carcinogenesis* **2**: 1195-1200.
- Pegg, A. E., Wiest, L., Foot, R.S., Mitra, S. und Perry, W. (1983). Purification and properties of O⁶-methylguanine-DNA transmethylase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* **258**: 2327-2333.
- Pegg, A. E. und Wiest, L. (1983). Regulation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase levels in rat liver and kidney. *Cancer Research* **43**: 972-975.
- Pegg, A. E. (1990). Mammalian O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Research* **50**: 6119-6129.
- Pegg, A. E. und Byers, T. L. (1992). Repair of DNA containing O⁶-alkylguanine. *FASEB Journal* **6**: 2302-2310.
- Peraino, C., Fry, R. J. M. und Staffeld, E. (1971). Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in rat by 2-acetylaminofluoren. *Cancer Research* **31**: 1506-1512.
- Peraino, C., Fry, R. J. M., Staffeld, E. und Christopher, J. P. (1975). Comparative enhancing effect of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantion, and dichlorodiphenyltrichlorethan on 2-acetylaminofluoren-induced tumorigenesis in the rat. *Cancer Research* **35**: 2884-2890.
- Pitot, H. C., Peraino, C., Morse, J., P.A. und Potter, V. R. (1964). Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver *in vivo*. *National Cancer Institute Monograph* **13**: 229-245.
- Pletsa, V., Gentil, A., Margot, A., Armier, J., Kyrtopoulos, S. A. und Sarasin, A. (1992). Mutagenesis by O⁶meG residues within codon 12 of the human Ha-ras proto-onkogene in monkey cells. *Nucleic Acid Research* **20**: 4897-4901.
- Potter, P. M., Wilkinson, M. C., Fitton, J., Carr, F. J., Brennan, J., Cooper, D. P. und Margison, G. P. (1987). Characterization and nucleotide sequence of ogt, the O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase gene of *E.coli*. *Nucleic Acid Research* **15**: 9177-9193.
- Potter, P. M., Rafferty, J. A., Cawkwell, L., Wlkinson, M. C., Cooper, D. P., O'Conner, P. J. und Margison, G. P. (1991). Isolation and cDNA cloning of a rat O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene, molecular analysis of expression in rat liver. *Carcinogenesis* **12**: 727-733.

- Preat, V., Lans, M., Gerlach, J. d., Taper, H. und Roberfrid, M. (1987). Influence of the duration and the delay of administration of phenobarbital on its modulating effect on rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **8**: 333-335.
- Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Gebel, S., Auer, H.-P., Bruder, J. T., Rapp, U., Angel, P., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1993). UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. *EMBO J.* **12**: 1005-1012.
- Rahden-Staron, I. und Laval, F. (1991). cDNA cloning of the rat O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferase. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* **177**: 597-602.
- Randall, S. K., Eritja, R., E., K., Petruska, J. und Goodman, M. F. (1987). Nucleotide insertion kinetics opposite abasic lesion in DNA. *The Journal of Biological Chemistry* . **262**: 6864-6870.
- Rebeck, G. W., Coons, S., Carroll, P. und Samson, L. (1988). A second DNA methyltransferase repair enzyme in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3039-3043.
- Rebeck, G. W. und Samson, L. (1991). Increased spontaneous mutation and alkylation sensitivity of *Escherichia coli* strains lacking the ogt O⁶-methylguanine-DNA repair methyltransferase. *J. Bacteriol.* **73**: 2068-2076.
- Riad-Fahmy, D., Read, G. und Huges, T. A. (1979). Corticosteroids. In "*Hormones in Blood*". (C. h. Gray und V. H. T. James, Ed.) Academic Press, London,
- Robson, C. N., Hochhauser, D., Craig, R., Rack, K., Buckle, V. J. und Hickson, I. D. (1992). Structure of the human DNA repair gene HAP1 and its localization to chromosome 14q 11.2-12. *Nucleic Acid Research* **20**: 4417-4421.
- Rørth, P., Nerlov, C., Blasi, F. und Johnsen, M. (1990). Transcription factor PEA3 participates in the induction of urokinase plasminogen activator transcription in murine keratinocytes stimulated with epidermal growth factor or phorbol-ester. *Nucleic Acid Research* **18**: 5009-5117.
- Rydberg, B. und Lindahl, T. (1982). Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionin is a potentially mutagenic reaction. *EMBO Journal* **1**: 211-216.
- Rydberg, B., Spurr, N. und Karran, P. (1990). cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. cDNA expression in *Escherichia coli* and gene expression in human cells. *The Journal of Biological Chemistry* **265**: 9563-9569.
- Sagher, D., Karrison, T., Schwarz, J., Larson, R. und Strauss, B. (1989). Heterogeneity of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in peripheral blood lymphocytes: relationship between this activity in lymphocytes and in lymphoblastoid lines from patients with Hodgkin's disease or non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Research* **49**: 5339-5344.
- Sakai, D. D., Helms, S., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.-Å., Rottman, F. M. und Yamamoto, K. R. (1988). Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes and Development* **2**: 1144-1154.
- Samson, L. und Cairns, J. (1977). A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature* **267**: 281-282.

- Samson, L. und Schwartz, J. (1980). Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. *Nature* **287**: 861-863.
- Samson, L., Derfler, B. und Waldstein, E. A. (1986). Suppression of human DNA alkylating-repair defects by *Escherichia coli* DNA-repair genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5607-5610.
- Samson, L. und Linn, S. (1987). DNA alkylation repair and the induction of cell death and sister chromatid exchange in human cells. *Carcinogenesis* **8**: 227-230.
- Samson, L. (1992). The suicidal DNA repair methyltransferases of microbes. *Moleculare Microbiology*. **6**: 825-831.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **74**: 5463- 5467.
- Scheinmann, R. I., Gualberto, A., Jewell, C. M., Cidlowski, J. A. und Baldwin, J., A.S. (1995). Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 943-953.
- Schmerold, I. und Wiestler, O. D. (1986). Induction of rat liver O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase following whole body X-irradiation. *Cancer Research* **46**: 245-249.
- Seamon, K. B. und Daly, J. W. (1986). Forskolin: its biological and chemical properties. *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Research* **20**: 1-150.
- Singer, B. (1985). *In vivo* formation and persistence of modified nucleosides resulting from alkylating agents. *Environ. Health. Persp.* **62**: 41-48.
- Singer, B. (1986). O-alkyl pyrimidines in mutagenesis and carcinogenesis: Occurrence and significance. *Cancer Research* **46**: 4879-4885.
- Singhal, R.K., Prasad; R., Wilson, S.H. (1995). DNA polymerase beta conducts the gap-filling step in uracil-initiated base excision repair in a bovine testis nuclear extract. *The Journal of Biological Chemistry* **270**
- Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Steffen, A., Litfin, M. und Herrlich, P. (1989). UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Moleculare and Cellular Biology* **9**: 5169-5181.
- Steinberg, R. A., Levinson, B. B. und Tomkins, G. M. (1975). Kinetics of steroid induction and deinduction of tyrosine aminotransferase synthesis in cultured hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 2007-2011.
- Strähle, U., Boshart, M., Stewart, F. und Schütz, G. (1989). Glucocorticoid- and progesterone-specific effects are determined by differential expression of the respective hormone receptors. *Nature* **339**: 629-632.
- Strauss, B. S. (1990). The control of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) activity in mammalian cells: A pre-moleculare view. *Mutation Research* **233**: 139-150.
- Sukumar, S., Notario, V., Merin-Zanca, D. und Barbacid, M. (1983). Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature* **306**: 658-661.
- Swenberg, J. A., Bedell, M.A., Billings, K.C., Umbenhauer, D.R. und Pegg, A.E. (1982). Cell-specific differences in O⁶-alkylguanine repair activity during continuous exposure to carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 5499-5502.

- Tabin, C. J., Bradley, S. M., Bargmann, C. I., Weinberg, R. A., Papageorge, A. G., Scolnik, E. M., Dhar, R., Lowy, D. R. und Chan, E. H. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* **300**: 143-149.
- Taniguchi, T. (1988). Regulation of cytokine gene expression. *Annu. Rev. Immunol.* **6**: 439-464.
- Teo, I., Sedgwick, B., Demple, B., Li, B. und Lindahl, T. (1984). Induction to resistance to alkylating agents in *E. coli*: The *ada+* gene product serves both as a regulatory protein and as an enzyme for repair of mutagenic damage. *EMBO Journal* **3**: 2151-2157.
- Teo, I., Sedgwick, B., Kilpatrick, M. W., McCarthy, T. V. und Lindahl, T. (1986). The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*. *Cell* **45**: 315-324.
- Turbeville, C. und Craddock, V.M. (1971). Methylation of nuclear proteins by dimethylnitrosamin and by methionin in the rat *in vivo*. *Biochem. J.* **124**: 725-739
- Tsimis, J. und Yarosh, D. B. (1990). Adaptive response induction by bacterial catalysis of nitrosation. *Environ. Mol. Mutagenesis* **15**: 69-70.
- Vaca, C. E., Wilhelm, J. und Harms-Ringdahl, M. (1988). Interaction of lipid peroxidation products with DNA. *Mutation Research* **195**: 137-149.
- Volkert, M. R. (1988). Adaptive response of *Escherichia coli* to alkylation damage. *Env. Molec. Mutagenesis* **11**: 241-255.
- Walker, G. C. (1985). Inducible DNA repair systems. *Ann. Rev Biochem.* **54**: 425-457.
- Walser, B. (1992). Entwicklung und Charakterisierung eines dreidimensionalen Zellkultursystems für Hepatozyten adulter Ratten (Hepatozyten-Sphäroide). *Dissertation*, Universität Heidelberg.
- Washington, W. J., Dunn Jr., W. C., Generoso, W. M. und Mitra, S. (1988). Tissue-specific variation in repair activity for 3-methyladenin in DNA in two stocks of mice. *Mutation Research* **207**: 165-169.
- Widen, S. G., Kedar, P. und Wilson, S. H. (1988). Human β -polymerase gene. *The Journal of Biological Chemistry* **263**: 16992-16998.
- Wilson, R. E., Hoey, B. und Margison, G. P. (1993). Ionizing radiation induces O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase mRNA and activity in mouse tissue. *Carcinogenesis* **14**: 679-683.
- Wogan, G. N. (1975). Nitrosamines and nitrosamides: Environmental occurrence and toxicological significance. *Toxicology and Applied Pharmacology* **31**: 323-324.
- Wu, H.-M. und Crother, D. M. (1984). The locus of sequence-directed and protein induced DNA bending. *Nature* **308**: 509-513.
- Wu, Z., Chan, C.-L., Eastman, A., Bresnick, E. (1991). Expression of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in Chinese hamster ovary cells and restoration of cellular resistance to certain N-nitroso compounds. *Molecular Carcinogenesis* **4**: 482-488.
- Yaokum, G. H., Lechner, J. F., E.W., G., Korba, B. E., Malan-Shibley, L., Willey, J. C., Valerio, M. G., Shamsuddin, A. K. M., Trmup, B. F. und Harris, C. C. (1985). Transformation of human bronchial epithelial cells transfected by Harvey ras oncogene. *Science* **227**: 1174-1179.

- Yarosh, D. B. (1985). The role of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research* **145**: 1-16.
- Zawel, L. und Reinberg, D. (1993). Initiation of transcription by polymerase II: A multi-step process. *Progr. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **44**: 67-108.