Untersuchungen zur Strahlensensitivität von *NBS* Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

an der Ludwig-Maximilians-Universität

München

Vorgelegt von

Daniel Sagan

Oktober 2005

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp
2. Berichterstatter: PD Dr. A. Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 6. März 2006

Danksagung

Mein erster Dank geht an Frau Prof. Friederike Eckardt-Schupp, die sich mit großem Interesse und Engagement am Fortgang dieser Arbeit beteiligt hat. Ihr außerordentliches Vertrauen und ihre ständige Diskussionsbereitschaft waren von unschätzbarem Wert für die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

Ein ausgesprochenes Dankeschön gilt Frau Dr. Hedda Eichholtz-Wirth, bei der ich mich für die großartige Kooperations- und Hilfsbereitschaft insbesondere bei der Analyse der Apoptose bedanken möchte.

Frau Dr. Simone Mörtl möchte ich für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen danken. Während der gesamten Zeit half sie mir mit ihrer Expertise weiter.
Bei der Entwicklung der Vektorsysteme hat mich Herr Dr. Guido Drexler unterstützt, auch ihm gilt mein herzlicher Dank für die guten Anregungen, die er mir vermittelt hat und natürlich auch für die Überlassung seines entwickelten Vektors pGrec.

Bei Herrn Dr. Wolfgang Beisker und Herrn Dr. Michael Haag möchte ich mich für das Aussortieren der Zellen bedanken und Herrn Dr. Beisker möchte ich nochmals für die fachkundige Einweisung in die FACS-Analytik danken.

Mein Dank für die geduldige fachliche Unterstützung bei den Microarrayversuchen gilt Herrn Dr. Holger Laux und Herrn Dr. Jan Smida.

Für die Unterstützung bei vielen Experimenten und Zellkulturarbeiten gebühren Frau Ulrike Hamm und Frau Klaudia Winkler ein großer Dank.

1 Zusammenfassung 1
2 Einleitung 3
2.1 Genomische Stabilität 3
2.2 Chromosomale Instabilitätssyndrome 5
2.3 Ataxia telangiectasia (AT) und das Nijmegen Breakage Syndrome (NBS) 6
2.4 Struktur des NBS1 Gens und Charakterisierung des Genproduktes 8
2.5 Entwicklung und Fragestellung der Arbeit 10
2.6 Ausgewählte Phänotypen des NB-Syndroms 11
2.6.1 Ursachen für die Immundefizienz 11
2.6.2 Mögliche Gründe für die erhöhte Strahlensensitivität von *NBS* Zellen 13
2.6.2.1 NBS1 als DNA-Reparaturprotein 13
2.6.2.2 *NBS1* vermittelt Zellzyklusarrest nach Bestrahlung 16
2.6.2.3 strahleninduzierte Apoptose in *NBS* Zellen 17
2.7 Experimentelles System 19
2.7.1 *NBS* Lymphoblasten 19
2.7.2 Expressionsanalyse mit cDNA Microarrays 21
2.7.3 Analyse der Apoptose in *NBS1*$^{-/-}$Zellen 22
2.7.4 Rekombinationsvektor 22
3 Ergebnisse 25
3.1 Charakterisierung der Zelllinien 25
3.1.1 PCR zur Detektion der *NBS1* Mutation 25
3.1.2 SKY Analyse 26
3.2 Expressionsanalyse mittels cDNA Microarrays 27
3.2.1 Qualitätskontrolle der amplifizierten cDNA 27
3.2.2 Qualitätskontrolle der RNA und der Hybridisierung 29
3.2.3 Überlegungen zur Analyse der differentiellen Expression 30
3.2.4 Differentiell exprimierte Gene 33
3.2.5 Expressionsanalyse *LCK* 37
3.3 Analyse eines möglichen Phänotyps für die fehlende LCK Expression 38
3.3.1 Einfluss von NBS1 auf die Expression von *LCK* in Jurkat Zellen 39
3.3.2 Apoptoseverhalten 40
3.4 Strahleninduzierte Apoptose als eine Ursache für die erhöhte Strahlensensitivität in NBS Zellen 42
3.4.1 Strahleninduzierte Apoptose in *NBS1*$^{-/-}$ Zellen 42
3.4.2 Beteiligung eines p53-vermittelten Weges 45
3.4.3 Beteiligung der Todesrezeptoren 46
3.4.4 Rolle von CD95 an der Induktion der Apoptose 48
3.5 Entwicklung eines Vektorsystems zur simultanen Bestimmung der Reparaturvorgänge an einem sequenzspezifisch induziertem Doppelstrangbruch 51
3.5.1 Vorüberlegungen 51
3.5.2 Das „OFF-System“ 54
3.5.3 Das „ON-System“ 57
4 Diskussion 59
4.1 Verwendung der Zelllinien 59
4.2 Expressionsanalyse 61
4.3 Strahleninduzierte Apoptose 66
4.4 Vektorsysteme zur Bestimmung von NHEJ und HR 71
5 Material und Methoden 80
5.1 Beschreibung der Versuche 80
5.1.1 Zellkultur 80
5.1.1.1 V79B 80

5.1.1.2 lymphoblastoide Zelllinien ... 80
5.1.1.2.1 Kultur ... 80
5.1.1.2.2 Überprüfung der Identität ... 80
5.1.1.3 Jurkat ... 81
5.1.1.4 Gefrierkultur der Zellen ... 81
5.1.2 Behandlung der Zellen ... 81
5.1.2.1 γ-Bestrahlung ... 81
5.1.2.2 Caspase-8 Inhibition *in vivo* ... 82
5.1.2.3 CD95 vermittelte Apoptose ... 82
5.1.2.3.1 agonistischer Antikörper ... 82
5.1.2.3.2 antagonistischen Antikörper ... 82
5.1.3 Zelltransfektionen ... 82
5.1.3.1 V79B Zellen ... 82
5.1.3.2 Jurkat Zellen ... 82
5.1.4 Durchflußzytometrie ... 83
5.1.4.1 Apoptose ... 83
5.1.4.1.1 Annexin-V-Fluos Färbung ... 83
5.1.4.1.2 SubG1 Peak ... 83
5.1.4.2 Detektion der DSRed2 positiven Zellen ... 84
5.1.5 Proteinbiochemie ... 85
5.1.5.1 Zellaufschluss ... 85
5.1.5.2 SDS-Page und Westernblot ... 85
5.1.5.3 Caspase Aktivitätsbestimmungen ... 86
5.1.6 Quantifikationen auf RNA Ebene ... 87
5.1.6.1 Herstellung RNAse freier Lösungen durch DEPC Behandlung ... 87
5.1.6.2 RNA Isolation ... 87
5.1.6.3 RNA Qualitätskontrolle ... 87
5.1.6.4 quantitative PCR ... 88
5.1.6.4.1 cDNA Synthese ... 88
5.1.6.4.2 „Light Cycler“ ... 88
5.1.6.5 Microarray ... 93
5.1.6.5.1 Sequenzierung der Klone ... 94
5.1.6.5.2 Präparation der DNA und Amplifikation der Klone über PCR ... 94
5.1.6.5.3 Aufreinigung der PCR Produkte ... 95
5.1.6.5.4 Spotten ... 95
5.1.6.5.5 Herstellung der markierten cDNA ... 95
5.1.6.5.6 (Prä)Hybridisierung und Scannen der Microarrays ... 95
5.1.6.5.7 Datenerhebung und Ermittlung der Grenzen ... 96
5.1.7 Herstellung und Umgang mit (rekombinanter) DNA ... 100
5.1.7.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen ... 100
5.1.7.2 *E. coli* Transformation ... 100
5.1.7.3 Plasmidisolation ... 100
5.1.7.4 Isolierung genomischer DNA aus Säugerzellen ... 100
5.1.7.5 Restriktionsverdau ... 101
5.1.7.6 DNA Gelelektrophorese ... 101
5.1.7.7 Aufreinigung und Fällung von DNA ... 101
5.1.7.8 Ligation ... 101
5.1.7.9 Vektorkonstruktionen ... 102
5.1.7.9.1 pDSOFF ... 102
5.1.7.9.2 pDSON ... 102

5.1.7.10 Verwendung von siRNA zur Herunterregulation der *NBS1* Expression 102
5.1.8 Statistik 102
5.2 Zusammensetzung der Puffer 103
6 Aufstellung des verwendeten Materials 108
6.1 Zellen 108
6.2 Vektoren 109
6.2.1 pGrec und pGrec_w/o_EBNA1/oriP 109
6.2.2 pDsRed2N1 109
6.2.3 pDSON pDSOFF 110
6.2.4 pMA3, pMA4 110
6.3 Chemikalien 110
6.4 Kits 111
6.5 Enzyme 112
6.6 Antikörper 112
6.7 Substrate und Inhibitoren für die Caspaseassays 112
6.8 Oligonukleotide 112
6.9 Geräte, Membranen, Filter und Filme 113
6.10 Software 115
7 Literaturverzeichnis 116
8 Abkürzungen 126

1 Zusammenfassung

Das *Nijmegen Breakage Syndrom* (*NBS*) gehört zur Gruppe der humanen, vererbbaren Chromosomeninstabilitätssyndromen mit einem pleiotrophen Phänotyp. Betroffene Personen sind homozygot für eine Mutation im *NBS1* Gen, die zu einem Ausfall der Bildung eines funktionellen Genproduktes führt. *NBS* Patienten reagieren u. a. empfindlicher auf ionisierende Bestrahlung, sind immundefizient und entwickeln mit erhöhter Wahrscheinlichkeit maligne Erkrankungen.

Durch die vergleichende Analyse von zwei Zellpaaren mit *NBS1*$^{-/-}$ lymphoblastoiden Zelllinien und ihren entsprechenden *NBS1*$^{+/-}$ Linien, die aus Zellen von blutsverwandten Personen generiert wurden, wurden mögliche Ursachen für den auf zellulärer Ebene gut charakterisierten Phänotyp der erhöhten Strahlensensitivität der *NBS1*$^{-/-}$ Linien untersucht.

Die Analyse einer möglichen differentiellen Genexpression in diesen Zelllinien mittels DNA Microarraytechnologie ergab nur ein signifikant minderexprimiertes Gen in den *NBS1*$^{-/-}$ Linien beider Zellpaare: *LCK*. Dieses Gen ist an der positiven Regulation der strahleninduzierten Apoptose in B- und T-Zellen beteiligt, weshalb die Rolle von *NBS1* für die Regulation der strahleninduzierte Apoptose untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass *NBS1*$^{-/-}$ Zellen verglichen mit den entsprechenden *NBS1*$^{+/-}$ Zellen eine erhöhte Induktion von Apoptose nach γ-Bestrahlung aufweisen. Die Analyse des Apoptoseweges demonstrierte die negative Regulation des CD95 vermittelten Weges durch *NBS1*.

Die erhöhte strahleninduzierte Apoptose ist eine gute Erklärungsmöglichkeit für die beschriebene erhöhte Strahlensensitivität von *NBS* Zellen, da die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB) von der *NBS1* Mutation nicht beeinträchtigt wird und somit keine Erklärung für diesen Phänotyp bietet. Möglicherweise beeinflusst *NBS1* aber die Regulation der beiden DSB Reparaturwege homologe Rekombination oder nicht-homologe Endverknüpfung. Um zukünftig das Ausmaß der Verwendung dieser beiden Reparaturwege in *NBS1* defizienten Zellen studieren zu können, wurde ein Vektorsystem entwickelt, das die Quantifizierung der Verwendung dieser DSB Reparaturwege durch Analyse von Fluoreszenzmarken nach sequenzspezifischer Induktion von DSB *in vivo* ermöglicht.

Neben der Rolle von LCK in der Regulation der Apoptose ist LCK als T-zellspezifisches Protein insbesondere an der T-Zellaktivierung beteiligt. Deshalb wurde die Rolle von *NBS1* für die Regulation der *LCK* Expression in einer T-Zelllinie untersucht (Jurkat), um so möglicherweise eine weitere Ursache für die Immundefizienz der *NBS* Patienten beschreiben zu können. Allerdings ist die *LCK* Expression in diesen Zellen unabhängig von *NBS1*.

2 Einleitung

2.1 Genomische Stabilität

Die Möglichkeit einer gesicherten Weitergabe der genetischen Information ist letztendlich die Voraussetzung für die Existenz und das Fortbestehen der gesamten belebten Natur. Die biochemischen Vorgänge in einer Zelle sind auf ein intaktes Genom angewiesen, um das Überleben der Zelle zu sichern. Dies gilt sowohl für die Zellen einzelliger Organismen als insbesondere auch für die Zellen multizellulärer Organismen. Für Zellen in einem mehrzelligen Organismus ist die Integrität des Genoms sogar von noch größerer Bedeutung, da nur durch ein fein abgestimmtes Zusammenspiel aller Zellen im Organismus das Überleben desselbigen möglich ist. Die Kontrolle dieses Zusammenspiels wird durch ein – bisher größtenteils noch unverstandenes – Netzwerk von untereinander interagierenden Faktoren geregelt, deren Bauplan und Vorkommen in der Zelle als genetische Information gespeichert ist.

Da sich aber die Umwelt der Lebewesen ständig ändert, ist auch eine kontinuierliche Anpassung der Organismen an veränderte Lebensbedingungen notwendig. Eine absolute Stabilität und damit eine nur in Grenzen mögliche, veränderte Reaktion auf eine veränderte Umwelt ist dabei genauso hinderlich wie eine völlig instabile Informationsspeicherung. Die ständige Anpassung der Lebewesen an immer neue Lebensbedingungen führt schließlich zur Entstehung neuer Arten, ein Vorgang den wir als Evolution verstehen und der mit einem absolut stabilen Genom, welches resistent gegen jegliche Veränderung ist, nicht möglich ist.

Als Speichermedium für die genetische Information hat sich das Makromolekül DNA evolviert. Dabei handelt es sich keineswegs um ein chemisch inertes Molekül, sondern um ein Molekül, das bereits von Wasser, wie es überall in der Zelle vorkommt, durch Hydrolyse gespalten werden kann. Eine Säugerzelle verliert beispielsweise durch diesen Prozess ungefähr zehntausend Purine innerhalb von 20 Stunden bei 37 °C (Griffiths 1996). Hinzu kommen die durch exogene Umweltfaktoren induzierten DNA Schäden, beispielsweise durch γ-Strahlung oder Chemikalien. Diese Schäden können in der nächsten Replikationsrunde der Zelle zu Mutationen – also zu Veränderungen der gespeicherten Information – führen (Guenet 2004). Sogar bei jeder Zellteilung können prinzipiell

Mutationen in das Genom eingeführt werden, da auch die Replikationsmaschinerie der Zelle nicht vollständig fehlerfrei arbeitet (Resnick und Cox 2000). Ebenfalls existieren Mechanismen, die aktiv den Informationsgehalt der genetischen Information verändern, wie bei der gewollten Umlagerung und Punktmutationen in den Gensegmenten, die die Aminosäuresequenz und damit die Struktur einzelner Teile der Immunglobuline, der B-Zell- oder T-Zellrezeptoren bestimmen (Janeway 1997). Nur ein solcher Mechanismus ermöglicht eine effektive Immunantwort auf sehr viele, sich ständig verändernde Krankheitserreger ohne eine unendliche Speicherkapazität zu erfordern.

Die meisten DNA Schäden, die sich schließlich als Mutationen manifestieren können, sind jedoch für die betroffene Zelle und den Gesamtorganismus nachteilig. Deshalb haben sich Mechanismen entwickeln können, die die Stabilität des Genoms gewährleisten. Das sind vor allem Mechanismen zur Reparatur der DNA Schäden, aber auch Mechanismen zur Kontrolle des Zellzyklus, die es erlauben, genügend Zeit zur Reparatur der Schäden zu Verfügung zu stellen. Ist eine Zelle so geschädigt, dass eine sichere Reparatur nicht mehr zu gewährleisten ist, kann die Zelle durch ihr eingebautes Selbstmordprogramm (Apoptose) dem Organismus entzogen werden. Werden diese Sicherheitsmechanismen außer Kraft gesetzt, so ist unter Umständen eine Veränderung im großen Ausmaß die Folge. Ganze Chromosomensätze können so zahlenmäßig und strukturell verändert werden. Ein Vorgang, der maßgeblich an der Entstehung von Krebs beteiligt ist (Breivik 2005). Diese Erkenntnis ist schon sehr früh von Hansemann (1858-1920) und Boveri (1862-1915) beschrieben worden. Eine Zusammenfassung der auch in der modernen Molekularbiologie immer noch aktuellen Überlegungen gibt Wunderlich (Wunderlich 2002). Insgesamt betrachtet resultiert die beste Strategie in der Verwaltung des Genoms also in einem Gleichgewicht zwischen Stabilität auf einer Seite und Dynamik auf der anderen Seite (Abbildung 1).

Ein gutes Modellsystem, die molekularen und biochemischen Grundlagen dieser Sicherheitsmechanismen und insbesondere die DNA-Reparatur zu studieren, bieten Zellen oder Zelllinien von Patienten mit Defekten in diesen Mechanismen. Von besonderem Interesse ist die Analyse von Zellen von Patienten mit vererbten chromosomalen Instabilitätssyndromen.

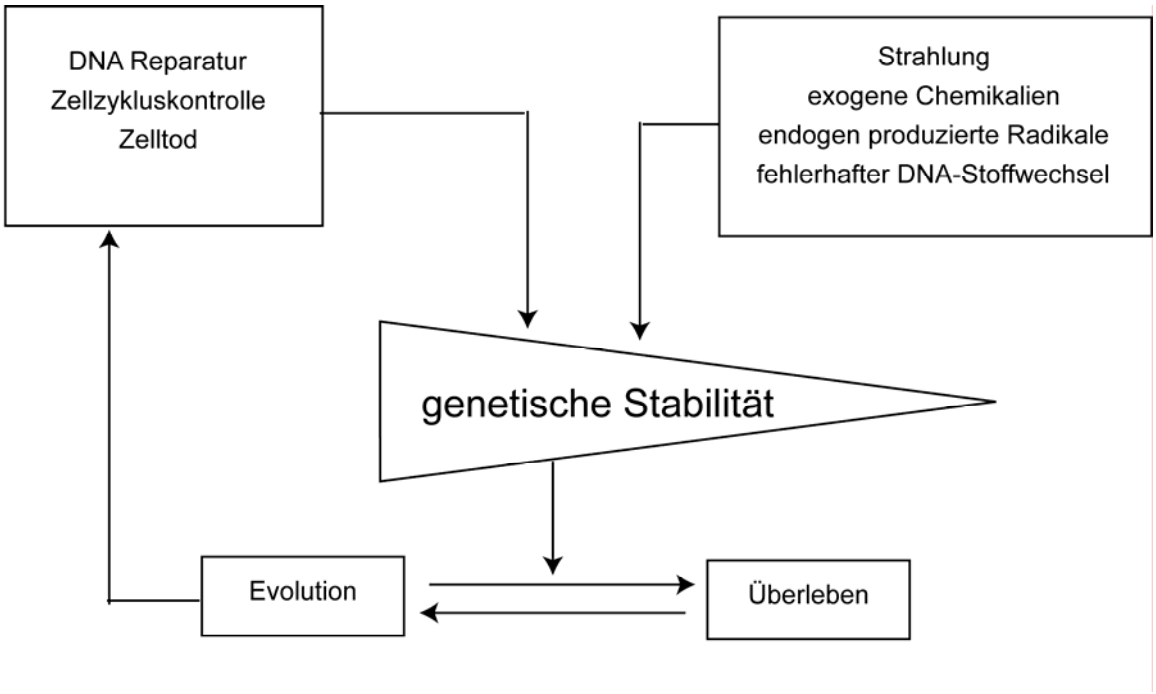


Abbildung 1: **Das Gleichgewicht zwischen genetischer Stabilität und Veränderung der genetischen Information trägt zum Überleben und zur Evolution der belebten Natur bei.** Die Stabilität der genetischen Information wird durch vielerlei Faktoren beeinflusst. Schädigende Einflüsse, wie Strahlung oder Chemikalien führen zu DNA Schäden, die sich in Mutationen manifestieren können. Die Zelle verfügt über ein großes Repertoire an Kontrollmechanismen, um die genetische Stabilität und somit ihr Überleben zu wahren. Um sich an immer neue Umweltbedingungen anzupassen, ist ein gewisses Maß an Veränderung der genetischen Information notwendig, eine wichtige Voraussetzung für den Prozess der Evolution. Defekte in Faktoren dieser Kontrollmechanismen führen zu einer erhöhten genomischen Instabilität und Zellen mit diesen Defekten bieten ein Modellsystem, Mechanismen zu studieren, wie diese Faktoren die genetische Stabilität vermitteln.

2.2 Chromosomale Instabilitätssyndrome

Unter dem Begriff "chromosomale Instabilitätssyndrome" werden vererbbare Krankheiten zusammengefasst, die auf zellulärer Ebene durch eine erhöhte Ansammlung von chromosomalen Aberrationen gekennzeichnet sind. Dies ist das Resultat einer gestörten Reaktion der Zelle auf eine Schädigung der DNA. Es handelt sich dabei um Krankheiten mit einem pleiotrophen Phänotyp. Patienten der meisten dieser Erkrankungen sind insbesondere immundefizient und entwickeln sehr häufig schon im jungen Alter maligne Erkrankungen (Wright 1999; Taylor 2001). Ein gut charakterisierter zellulärer Phänotyp ist die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber DNA schädigenden Agenzien, wie ionisierende Strahlung und DNA quervernetzende Chemikalien (Bigelow, Rary et al. 1979; Aurias, Antoine et al. 1985; Gluckman 1990; Lavin und Shiloh 1997; Kraakman-van der Zwet, Overkamp et al. 1999; Stewart, Maser et al. 1999). Dieser Phänotyp resultiert wiederum aus einer gestörten Reaktion auf die induzierten Schäden, insbesondere auf die erzeugten

Doppelstrangbrüche (DSB). In der nachfolgenden Tabelle 1 sind einige gut charakterisierte Syndrome und ihre betroffenen Gene aufgeführt.

Syndrom	betroffene(s) Gen(e)	Reparaturdefekt in der...
Ataxia telangiectasia, A-T	*ATM*	Reaktion auf DSB
AT-like syndrome	*AT-LD, MRE11*	Reaktion auf DSB
Nijmegen breakage syndrome	*NBS1*	Reparatur(?) und Reaktion auf DSB
Fanconis Anämie	*FANC A-G, D1, D2, L*	homologe Rekombination
Blooms Syndrom	*BLM*	homologe Rekombination

Tabelle 1: Übersicht über die bekannten humanen chromosomalen Instabilitätssyndrome und die betroffenen Gene (Eyfjord und Bodvarsdottir 2005). Alle Gene sind in direkter oder indirekter Weise mit der Erkennung, Prozessierung oder Reparatur von Doppelstrangbrüchen involviert. Ihr Ausfall führt u. a. zu dem Phänotyp der chromosomalen Instabilität. Die Rolle von *NBS1* in der DSB Reparatur ist nicht ausreichend geklärt und umstritten (siehe späterer Teil der Arbeit).

2.3 Ataxia telangiectasia (AT) und das Nijmegen Breakage Syndrome (NBS)

Das zentrale Gen, welches die genomische Stabilität überwacht, ist *ATM* (Shiloh 2003). Dieses Gen codiert für eine Serin/ Threonin Proteinkinase aus der Familie der Phosphatidylinositol-3 Kinase verwandten Kinasen (Savitsky, Bar-Shira et al. 1995; Lavin, Birrell et al. 2005). Zu dieser Gruppe von Proteinen gehören artübergreifend viele Proteine, die eine Rolle in der Zellzykluskontrolle nach Bestrahlung spielen (Lavin, Khanna et al. 1995). Tatsächlich steht das ATM Protein im Mittelpunkt in der Initiation der ablaufenden Prozesse nach der Induktion eines Doppelstrangbruches, wie in Abbildung 2 dargestellt. Der ATM Kinase lassen sich auf biochemischer Ebene also zahlreiche Funktionen zuordnen, die auf zellulärer Ebene gut untersucht werden können. Bei A-T handelt es sich entsprechend um eine Krankheit mit komplexen, unterschiedlichen Syndromen. Diese klinischen Syndrome lassen sich nicht immer so einfach wie die zellulären Phänotypen erklären. So sind A-T-Patienten sehr sensitiv gegenüber Bestrahlung, haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit maligne Erkrankungen des Blutes zu entwickeln und leiden an Immundefizienz (Taylor, Groom et al. 2004). Die Ursache dieser Syndrome lässt sich gut mit einer gestörten Antwort auf oder Reparatur von Doppelstrangbrüchen erklären, da durch ionisierende Bestrahlung Doppelstrangbrüche

induziert werden, die repariert werden müssen, damit die Zelle überleben kann. Auch für die Entwicklung eines intakten Immunsystems ist eine intakte Doppelstrangbruchreparatur notwendig (siehe Seite 11f). Schwieriger zu erklären sind die neurodegenerativen Effekte oder die Erweiterung der Blutgefässe, obwohl neurodegenerative Defekte bei vielen DNA-Reparatursyndromen beschrieben werden (McKinnon 2004).

Klinisch eng verwandt mit dem A-T-Syndrom ist das NB-Syndrom. Die zellulären und klinischen Phänotypen beider Syndrome sind nahezu identisch. Allerdings leiden Patienten des NB-Syndroms von den oben für A-T beschriebenen Syndromen an keinen neurodegenerative Schäden, im Sinne von Veränderungen im Kleinhirn. Auch zeigen sie keine Telangiectasie wie die A-T-Patienten (Shiloh 1997; Fritz und Digweed 2003).

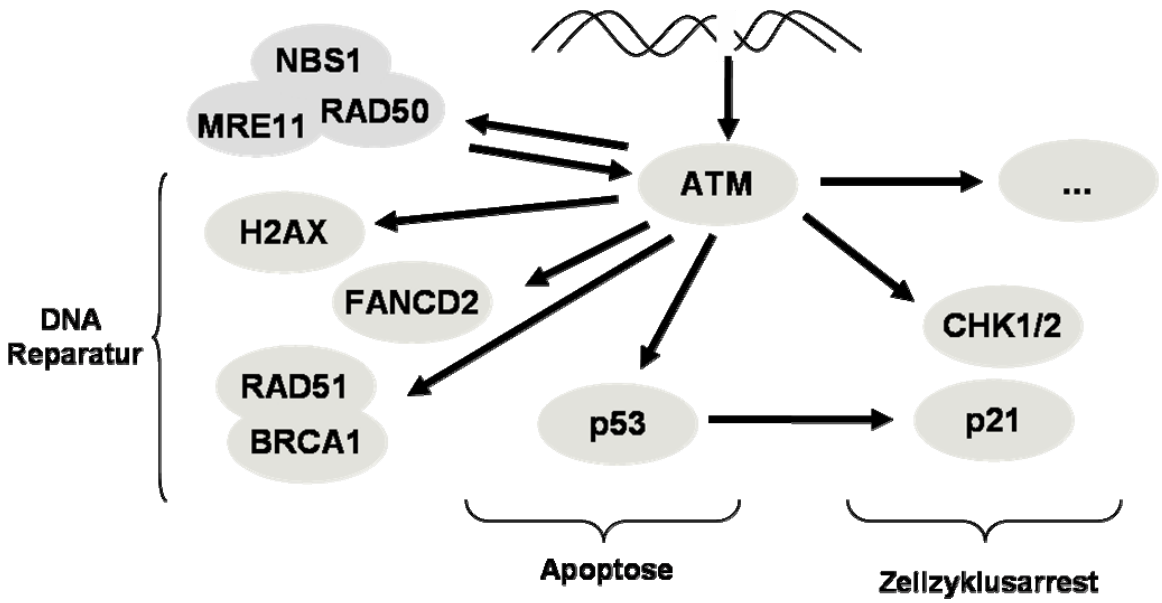


Abbildung 2: Die ATM Kinase ist der zentrale Initiator für Prozesse, die durch einen Doppelstrangbruch aktiviert werden. Durch einen Doppelstrangbruch aktiviert, phosphoryliert die Kinase zahlreiche Substrate. Über die Phosphorylierung der Zielproteine werden Signaltransduktionskaskaden reguliert, die es – je nach Ausmaß der Aktivierung – ermöglichen, auf den Doppelstrangbruch zu reagieren. So kann dieser repariert werden, nachdem die Zelle den Zellzyklus angehalten hat, oder die Zelle geht in Apoptose, da keine Möglichkeit mehr zur Reparatur besteht (verändert aus Shiloh *et al*. (Shiloh 2003), Lee *et al*. (Lee und Paull 2004)). Besonders zu beachten ist die Stellung des trimeren Komplexes MRE11/ RAD50/ NBS1 (MRN). Dieser Komplex wird sowohl von ATM aktiviert, er aktiviert seinerseits aber auch die ATM Kinase (siehe Text).

Das beim NB-Syndrom betroffene Gen ist *NBS1* (Varon, Vissinga et al. 1998; Tauchi 2000). Dessen Genprodukt bildet zusammen mit den zwei Proteinen RAD50 und MRE11 einen trimeren Komplex, der sowohl von der ATM Kinase aktiviert wird, als auch die volle Aktivierung dieser Kinase vermittelt (Uziel, Lerenthal et al. 2003; Lee und Paull 2004). Somit liegen beide Proteine in einem voneinander abhängigen Weg, was die Gemeinsamkeit der Symptomatik beider Krankheitsbilder erklärt.

2.4 Struktur des NBS1 Gens und Charakterisierung des Genproduktes

Das *NBS1* Gen ist auf Chromosom 8q21 lokalisiert. Die 16 Exons werden auf einem Bereich von ca. 51 kbp codiert. Die ungefähr 4,5 kb lange mRNA codiert ein Protein mit einer Länge von 754 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 85 kDa (siehe Abbildung 3).

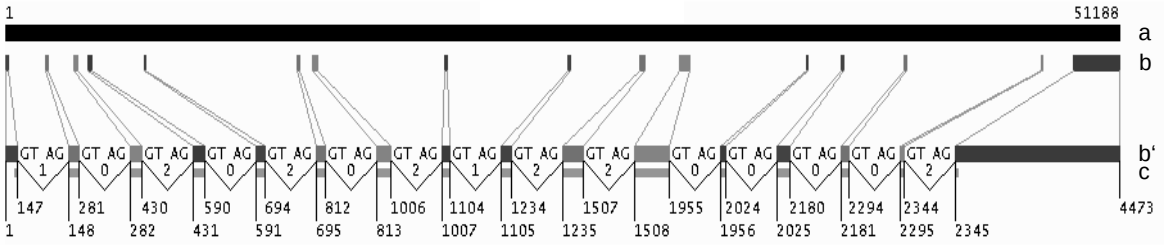


Abbildung 3: Das Gen *NBS1* (a) codiert über 16 Exons (b, b') verteilt für eine 4,5 kbp lange mRNA, die für ein Protein mit einer Länge von 754 Aminosäuren (c) codiert. Daten aus der GenBank entnommen und mit *MgAlign* (http://origin.bic.nus.edu.sg/mgalign/index.html) prozessiert.

Im NBS1 Protein lassen sich drei funktionale Domänen voneinander unterscheiden. Der N-Terminus beinhaltet die „fork head-associated" (FHA) Domäne und eine dem C-Terminus von BRCA1 homologe Domäne (BRCT). Diese Domäne ermöglicht die Erkennung des DNA Schadens durch Bindung an phosphorylierte Nucleosomen der H2AX Familie (γ-H2AX). In der zentralen Region befinden sich zwei Serinreste, die eine Signalübertragung über Phosphorylierung vermitteln können. Im C-Terminus befindet sich die Interaktionsdomäne zur Komplexbildung mit dem Protein MRE11 (siehe Abbildung 4) (Kobayashi, Tauchi et al. 2002; Tauchi, Matsuura et al. 2002).

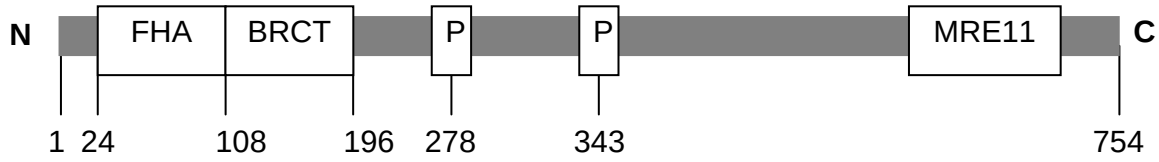


Abbildung 4: Das NBS1 Protein besitzt eine Drei-Domänenstruktur. Der N-Terminus dient zur Schadenserkennung, die zentrale Region zur Signaltransduktion durch Phosphorylierung, der C-Terminus besitzt eine Domäne zur Interaktion mit dem Protein MRE11. Verändert aus Tauchi *et al.* (Tauchi, Matsuura et al. 2002).

Zusammen mit diesem Protein und RAD50 bildet NBS1 einen trimeren Komplex (MRN Komplex), wie schon in Abbildung 2 gezeigt, der an der Erkennung von DNA Doppelstrangbrüchen beteiligt ist (D'Amours und Jackson 2002). Neben diesem bekannten Komplex interagiert NBS1 aber noch mit vielen weiteren Proteinen (siehe Abbildung 5). Dies sind überwiegend Proteine, die an der Erkennung und Reparatur von DNA Schäden beteiligt sind. Die Proteine ATM und ATR spielen vor allem bei der ersten Erkennung und Einleitung der DNA schadensvermittelten Signaltransduktionskaskaden eine Rolle. Die Rolle der Proteine MRE11 und RAD50 im trimeren Komplex zusammen mit NBS1 wird weiter unten im Detail erklärt. Die Proteine XRCC5 (KU80) und PRKDC (DNA-PK_{CS}) sind an der Doppelstrangbruchreparatur beteiligt (Collis, DeWeese et al. 2005) und der neu gefundene Interaktionspartner TREX1 ist eine 3'→5' Exonuklease, die möglicherweise an der Entfernung von falsch inkorporierten Nukleotiden bei der Replikation oder DNA Excisionsreparatur beteiligt ist (Hoss, Robins et al. 1999). ATF2 ist ein Transkriptionsfaktor, der an Doppelstrangbrüche rekrutiert wird. Die genaue Funktion ist aber unklar (Bhoumik, Takahashi et al. 2005).

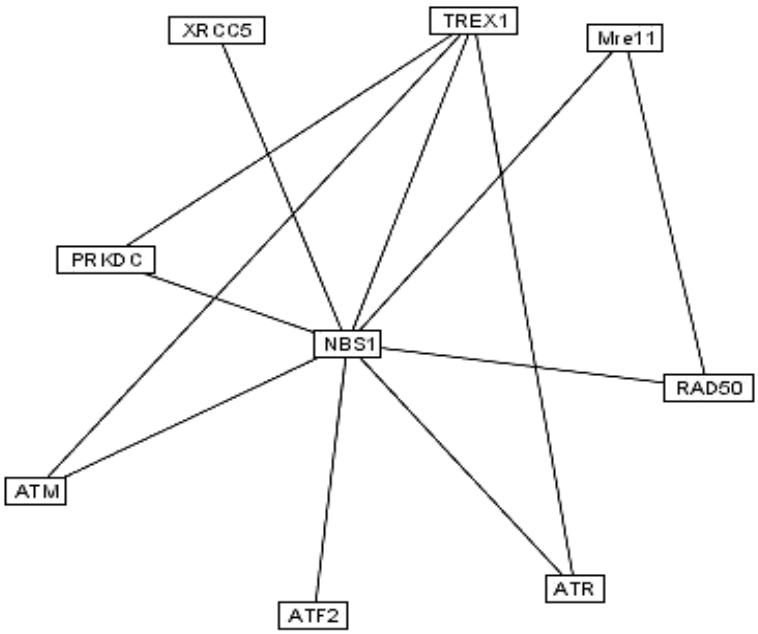


Abbildung 5: Das Protein NBS1 interagiert neben seinen bekannten Interaktionspartnern MRE11 und RAD50 auch noch mit zahlreichen weiteren Proteinen. Die Interaktionspartner sind der Datenbank *Biomolecular Interaction Network Database (BIND,* **http://bind.ca***)* entnommen. Proteininteraktionen zwischen zwei Faktoren sind durch Linien dargestellt, wobei es sich nicht notwendigerweise um eine direkte Interaktion handeln muss. Dies sind vor allem Faktoren, die direkt in der DNA-Reparatur oder Erkennung des DNA Schadens involviert sind (XRCC5, PRKDC, ATM, ATR, TREX1, RAD50, MRE11). Allerdings ist in einer neueren Arbeit auch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor ATF2 (activating transcription factor 2) nachgewiesen worden (Bhoumik, Takahashi et al. 2005).

2.5 Entwicklung und Fragestellung der Arbeit

Wie aus den vorangegangenen Abschnitten hervorgeht, handelt es sich bei *NBS* um ein sehr komplexes Syndrom mit vielen Phänotypen. Die molekularen Grundlagen für diese komplexe Krankheit sind bislang noch nicht hinreichend geklärt, allerdings gibt es für viele Phänotypen bereits gute Erklärungsmöglichkeiten.

In dieser Arbeit wurde versucht, die möglichen molekularen Ursachen einiger Phänotypen zu erklären. Zunächst sollte untersucht werden, ob es signifikante Genexpressions-unterschiede in *NBS* Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollzellen gibt, um die Komplexität dieses Syndroms zu erklären. Im Rahmen der Versuche konnte ein Gen identifiziert werden, welches eine wichtige Rolle in der T-Zellaktivierung und in der Regulation der Apoptose spielt. Deshalb wurde im nächsten Schritt der Einfluss von *NBS1* auf die Regulation der Apoptose, besonders im Hinblick auf die erhöhte Strahlensensitivität der *NBS* Zellen und auf immunologische Prozesse untersucht.

In der Literatur wird NBS1 vornehmlich als DNA Reparaturprotein und als Faktor zur Signalübertragung nach einem Doppelstrangbruch nach angesehen (van Engelen, Hiel et al. 2001; D'Amours und Jackson 2002; Huang und Dynan 2002; Kobayashi, Tauchi et al. 2002; Tauchi, Kobayashi et al. 2002; Tauchi, Matsuura et al. 2002; Dudas und Chovanec 2004; Kobayashi, Antoccia et al. 2004; Clatworthy, Valencia-Burton et al. 2005). Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe und von Kooperationspartnern haben jedoch gezeigt, dass kein Defekt in der Reparaturkinetik von Doppelstrangbrüchen zu detektieren ist (Kraakman-van der Zwet, Overkamp et al. 1999). Möglicherweise ist allerdings ein verändertes Gleichgewicht zwischen den beiden Wegen für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) und homologe Rekombination (HR)) die Ursache für die genomische Instabilität der *NBS* Zellen. Deshalb wurde parallel zur obigen Thematik in dieser Arbeit damit begonnen, ein System aufzubauen, mit dem das Verhältnis der Beteiligung der beiden Doppelstrangbruch-reparaturwege an sequenzspezifisch induzierten Doppelstrangbrüchen bestimmt werden kann.

2.6 Ausgewählte Phänotypen des NB-Syndroms

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich vor allem auf zwei beschriebene Phänotypen: Immundefizienz auf zellulärer Ebene und erhöhte Strahlensensitivität der *NBS* Zellen.

2.6.1 Ursachen für die Immundefizienz

Wie bereits oben erwähnt, ist die Immundefizienz ein besonderes Kennzeichen vieler Chromosomeninstabilitätssyndrome. *NBS* Patienten haben eine geringere Serumkonzentration an IgG, IgG2, IgG4 und IgA verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe. Die IgM Konzentration ist hingegen nicht verändert (Group 2000). Dies lässt sich auf zellulärer Ebene sehr gut mit einem Defekt bei der „class switch" Rekombination erklären (van Engelen, Hiel et al. 2001; Lahdesmaki, Taylor et al. 2004). *NBS1* hat keinen Einfluss auf die V(D)J-Rekombination des T- und B-Zellrezeptors, allerdings ist gerade an diesen Loci der Neukombination der Genfragmente, eine erhöhte Frequenz an chromosomalen Translokationsereignissen nachzuweisen (Fritz und Digweed 2003). In einem artfiziellen Versuchssansatz, bei dem die V(D)J Rekombination mit rekombinanten Konstrukten in *S. cerevisiae* nachgestellt wurde, zeigt sich allerdings die Notwendigkeit von *NBS1* für diesen Rekombinationsvorgang (Clatworthy, Valencia-Burton et al. 2005). Eher gering ist auch der Einfluss der somatischen Hypermutation,

obwohl eine etwas geringere Hypermutationsrate in den "switch" Regionen von *NBS* Zellen festgestellt wurde (Lahdesmaki, Taylor et al. 2004).

Auf zellulärer Ebene verfügen *NBS* Patienten über eine geringere Anzahl an $CD3^+$/ $CD4^+$-Zellen. Die Anzahl der $CD8^+$-Zellen ist nicht betroffen, allerdings exprimieren die $CD8^+$-Zellen der *NBS* Patienten den CD8 Marker vermindert. Die Anzahl der $CD56^+$ Zellen (natürliche Killerzellen) ist bei *NBS* Patienten signifikant erhöht (Michalkiewicz, Barth et al. 2003). Insbesondere ist für diese Arbeit der Befund interessant, dass mononukleäre Blutzellen eines *NBS* Patienten schlechter mit anti-CD3 Antikörper und Phorbol-12-myristat-13-Acetat (PMA) zu stimulieren sind als gesunde Kontrollzellen; die molekulare Ursache ist jedoch unbekannt (Garcia-Perez, Allende et al. 2001). Die Abbildung 6 zeigt Erklärungsmöglichkeiten auf, wie die Immundefizienz auf zellulärer Ebene beschrieben werden kann.

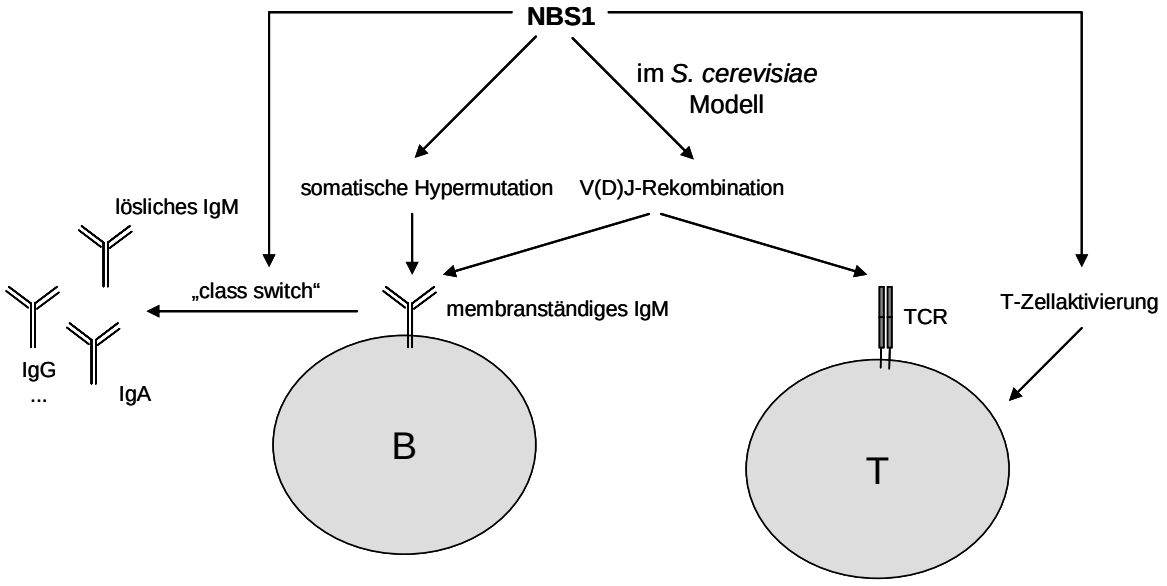


Abbildung 6: Die beobachtete Immundefizienz der *NBS* Patienten lässt sich auf zellulärer Ebene gut erklären, da das NBS1 Protein verschiedene Mechanismen der erworbenen Immunantwort beeinflusst. Der trimere MRN Komplex (in der Abbildung ist nur NBS1 dargestellt) ist offenbar für die class switch Reaktion nötig, da in einem Pool von *NBS* Patientenzellen nur eine verminderte Anzahl von Zellen detektiert werden kann, die andere Isotypen als IgM produzieren (van Engelen, Hiel et al. 2001; Lahdesmaki, Taylor et al. 2004). Alle Isotypen können auch membrangebunden vorkommen, der Einfachheit sind hier nur die löslichen Moleküle dargestellt. Eine Rolle für die somatische Hypermutation wird ebenfalls diskutiert, allerdings scheint der Einfluss hierauf nur sehr gering zu sein (Lahdesmaki, Taylor et al. 2004). Keine Beteiligung konnte für den Komplex bisher für die V(D)J-Rekombination nachgewiesen werden (Yeo, Xia et al. 2000). Allerdings scheint NBS1 an der T-Zellaktivierung beteiligt zu sein. *NBS* Patienten haben eine verminderte Anzahl an $CD3^+$ und $CD4^+$ Zellen und exprimieren den CD8 Marker vermindert. Mononukleäre *NBS* Blutzellen sind *in vitro* schlechter durch Mitogene zu aktivieren (Garcia-Perez, Allende et al. 2001). B: B-Zelle, T: T-Zelle, TCR: T-Zellrezeptor.

2.6.2 Mögliche Gründe für die erhöhte Strahlensensitivität von *NBS* Zellen

Für diese Arbeit wurde eine Cs-137 Quelle für die γ-Bestrahlung verwendet. Durch die γ-Bestrahlung wird die DNA geschädigt, was prinzipiell die biologischen Effekte der Strahlung erklärt (Belli, Sapora et al. 2002). Allerdings werden auch andere zelluläre Strukturen als DNA durch die Bestrahlung geschädigt, bzw. verändert, wie beispielsweise Proteine (Puchala, Szweda-Lewandowska et al. 2004; Seo, Lee et al. 2004).

Es werden direkte und indirekte Bestrahlungseffekte unterschieden. Wird ein γ-Quant absorbiert und trifft das so freigesetzte Sekundärelektron direkt auf die DNA und induziert dort einen Schaden, so wird dies mit direktem Effekt bezeichnet. Reagiert das erzeugte Sekundärelektron zunächst mit einem weiteren Molekül (höchstwahrscheinlich Wasser), so werden, im Falle von Wasser, OH-Radikale erzeugt. Diese Radikale reagieren mit dem DNA Molekül und schädigen es. Das ist der indirekte Effekt (Hall 2000).

Die Strahlensensitivität einer Zellpopulation wird bestimmt, indem eine bestimmte Anzahl von Zellen mit unterschiedlichen Strahlendosen bestrahlt wird und die Anzahl der überlebenden Zellen (meistens als koloniebildende Einheiten definiert) bestimmt wird. Der relative Anteil der Anzahl überlebender Zellen bezogen auf die Anzahl der überlebenden Zellen in einer unbestrahlten Kontrolle wird gegen die Bestrahlungsdosis aufgetragen. Der Abfall der Kurve ist ein Maß für die Strahlensensitivität. Die Strahlensensitivität ist zelltypspezifisch und u. a. abhängig davon, wie gut der durch die Bestrahlung induzierte Schaden toleriert, bzw. repariert werden kann. Deshalb wird diese Größe insbesondere von Faktoren beeinflusst, die die induzierten Doppelstrangbrüche in der DNA reparieren, den Zellzyklus bis zur Reparatur anhalten, oder die die Zelle über den programmierten Zelltod (Apoptose) sterben lassen.

2.6.2.1 NBS1 als DNA-Reparaturprotein

In Säugerzellen existieren drei Hauptreparaturwege zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen: Homologe Rekombination (HR), Einzelstranganlagerung („Single Strand Annealing“ (SSA)) und Nicht-homologe Endverknüpfung („Non-homologous endjoining“ (NHEJ)) (siehe Abbildung 7). In der Abbildung ist nur einer von drei beschriebenen Mechanismen zur konservativen HR gezeigt, wie er von Resnick 1976 vorgeschlagen wurde (Resnick 1976). Alle diese HR Mechanismen sind abhängig von den

Proteinen RAD52, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54, RAD54B, XRCC2, XRCC3 und dem MRE11/ RAD50/ NBS1 Komplex. Die ersten neun Proteine vermitteln den Strangaustausch und die Suche nach homologen Regionen (Pfeiffer, Goedecke et al. 2000; Dudas und Chovanec 2004). Die Rolle des trimeren Komplexes in diesem Mechanismus scheint die Bereitstellung der überhängenden 3' Enden zu sein. Allerdings ist dieses umstritten, da das MRE11 Protein 3' → 5' (und nicht 5' → 3') Exonukleaseaktivität besitzt. Die beiden Proteine MRE11 und NBS1 vermitteln zusätzlich das Aufwinden der DNA Doppelhelix. Mit Hilfe der Helikaseaktivität und der Endonukleaseaktivität von MRE11 lässt sich nun die Herstellung der 3' überhängenden Enden durch den trimeren Komplex erklären. Zunächst wandert der Komplex vom Doppelstrangbruch aus in Richtung 3' Ende und entwindet die Doppelhelix. Durch die Endonukleaseaktivität von MRE11 wird eine Phosphodiesterbindung gespalten, so dass ein langes überhängendes 3' Ende entsteht. Dieses Modell wurde von Moreau *et al.* für den homologen Komplex in *S. cerevisiae* vorgeschlagen (Moreau, Morgan et al. 2001).

Ein weiteres Modell für die homologe Rekombination ist das SDSA-Modell („Synthesis-dependent strand-annealing") (Nassif, Penney et al. 1994). Hierbei bleibt die neu synthetisierte DNA auf einem Molekül, da die neu synthetisierten DNA Stränge von dem Vorlagenstrang getrennt werden und zum gebrochenen Strang zurückkehren (an Position * in Abbildung 7). Es entstehen also keine Crossoverprodukte, wie beim vorigen Modell, bei dem sowohl Crossover-, als auch non-Crossoverprodukte entstehen. Dieser Vorgang ist der vorwiegende Mechanismus in Hefe, weil die meisten HR Ereignisse mit einem non-Crossoverprodukt enden.

Darüber hinaus existieren zahlreiche weitere Modelle, um homologe Rekombination mechanistisch zu erklären, die aber alle abhängig von den oben genannten Proteinen sind (Pfeiffer, Goedecke et al. 2000).

Ein weiterer homologieabhängiger Weg zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist SSA. Da dieser Prozess unabhängig von RAD51 ist, unterscheidet er sich von den HR Mechanismen (Lin, Sperle et al. 1984). Der Ablauf ist in Abbildung 7 (B) dargestellt.

Schließlich existiert noch ein homologieunabhängiger Weg zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen (NHEJ). Bei diesem Weg werden, wie unten dargestellt, nach der Prozessierung der Enden, was zu einem Verlust von Nukleotiden führen kann, zu verwendbaren Substraten, diese einfach wieder miteinander verknüpft. Dieser Weg ist abhängig von den Proteinen KU70/80, DNA-PKCS, XRCC4, LIG4 und dem RAD50/MRE11/NBS1 Komplex (Pfeiffer, Goedecke et al. 2000).

Der trimere Komplex ist also in beide Prozesse, nämlich HR und NHEJ involviert.

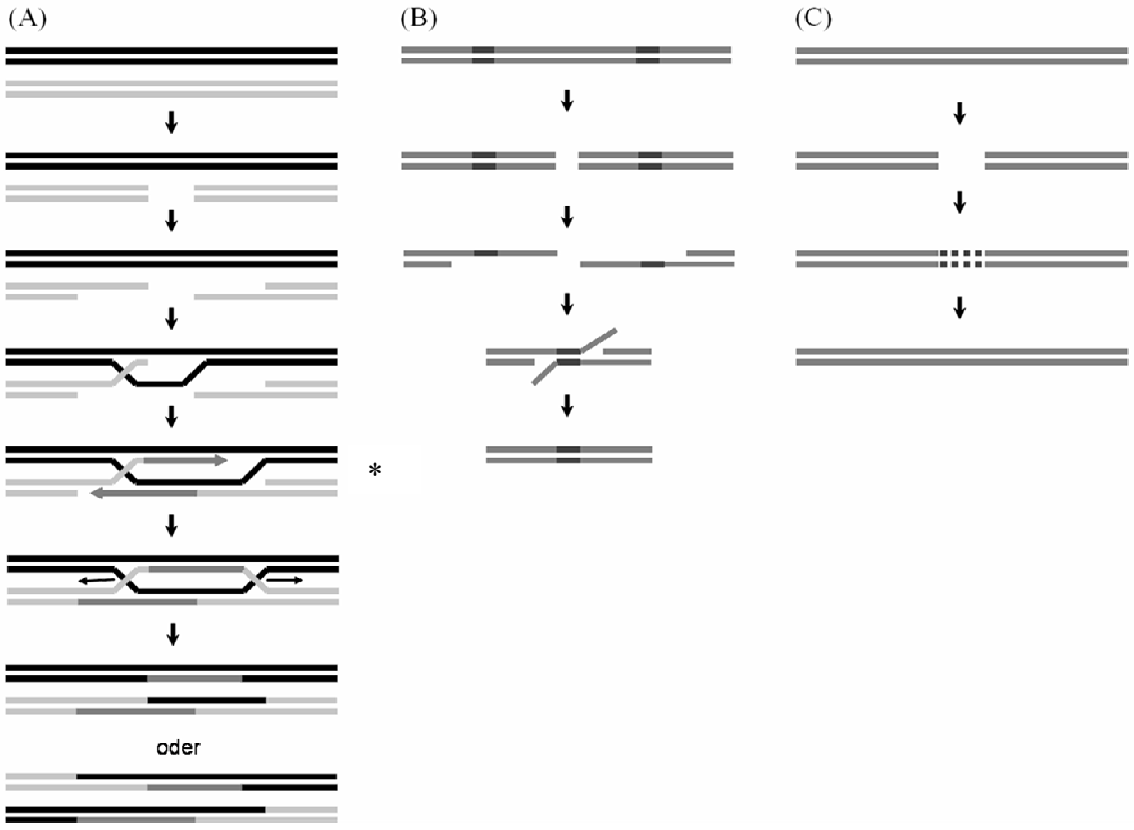


Abbildung 7: In Säugerzellen gibt es drei Hauptreparaturwege zur Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen: HR (A): Dieser Reparaturweg ist zur Reparatur auf eine homologe Sequenz zur Sequenz, in der sich der DSB befindet, angewiesen. Durch exonukleolytische Aktivität werden am DSB überhängende 3' Enden erzeugt. Diese wandern in die homologe intakte Sequenz ein und es kommt zur Neusynthese von DNA, wobei die intakte Sequenz als Vorlage dient. Durch Ligaseaktivität werden Phosphodiesterbindungen geknüpft. Die Verzweigungsstellen bewegen sich voneinander weg („branch migration") und die Holliday Struktur kann auf zwei Wege aufgelöst werden, so dass entweder ein Crossoverprodukt entsteht (unten) oder nicht (oben). **SSA (B):** Bei diesem Vorgang werden ebenfalls überhängende 3' Enden erzeugt und zwar solange, bis zwei komplementäre Sequenzen (dunkelgrau) einzelsträngig vorliegen und hybridisieren können. Die überhängenden 3' Enden werden entfernt und der Bruch schließlich durch Ligaseaktivität geschlossen. **NHEJ (C):** Bei diesem Reparaturweg ist keinerlei Homologie zwischen den DNA Molekülen erforderlich. Die Bruchenden werden lediglich prozessiert (dargestellt durch die kleinen Quadrate), damit sie schließlich miteinander ligiert werden können. (Abbildung nach Dudas& Chovanec, 2004 (Dudas und Chovanec 2004)). Für die Erklärung weiterer Modelle siehe Text.

2.6.2.2 *NBS1* vermittelt Zellzyklusarrest nach Bestrahlung

Damit die Zelle Zeit findet, den durch die Bestrahlung erzeugten DNA Schaden zu reparieren, muss der Zellzyklus bis zur vollendeten Reparatur angehalten werden. Daran ist das NBS1 Protein maßgeblich beteiligt. *NBS* Zellen zeigen nach Induktion von Doppelstrangbrüchen zahlreiche Defekte in der Zellzyklusregulation. Charakteristisch für *NBS* Zellen ist das Vorkommen der so genannten strahlungsresistenten DNA Synthese (RDS), wobei die Zellen kurz nach DNA Schädigung mit der DNA Synthese fortfahren. Offensichtlich ist das NBS1 Protein an der Aktivierung des S-Phasen-Kontrollpunktes beteiligt (Falck, Petrini et al. 2002; Yazdi, Wang et al. 2002). Es gibt mindestens drei parallele Wege, die zur Arretierung des Zyklus in der S-Phase führen. Einer der Wege ist möglicherweise unabhängig von *NBS1*. Deshalb ist der Phänotyp der RDS in *NBS* Zellen nicht so stark ausgeprägt wie in A-T Zellen, bei denen alle drei Wege gestört sind (Falck, Petrini et al. 2002).

Zusätzlich zum Defekt in der Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase ist *NBS1* eventuell an der Regulation des G2/M Kontrollpunkts beteiligt (Buscemi, Savio et al. 2001). Allerdings berichten andere Gruppen über eine intakte Aktivierung des G2/M Kontrollpunktes (Antoccia, di Masi et al. 2002) in *NBS* Zellen.

Die Funktionen von *NBS1* bezüglich der Zellzyklusregulation nach Schädigung der DNA sind also nicht eindeutig und es existieren widersprüchliche Ergebnisse (siehe oben), wobei die Funktion von *NBS1* bei der Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase nach Bestrahlung am besten charakterisiert ist.

Weiterhin ist in *NBS* Zellen die Induktion des Gens für das Protein p21, *CDKN1A,* nach Bestrahlung gestört (Jongmans, Vuillaume et al. 1997; Matsuura, Balmukhanov et al. 1998; Little, Nagasawa et al. 2002). p21 wirkt als Zellzyklusinhibitor beim Übergang von der G1 Phase in die S-Phase (Samuel, Weber et al. 2002) und verbindet deshalb *NBS1* und den G1/ S Arrest miteinander.

2.6.2.3 strahleninduzierte Apoptose in *NBS* Zellen

Kann die Zelle den induzierten Schaden nicht mehr reparieren, so hat sie die Möglichkeit, den programmierten Zelltod (Apoptose (Kerr, Wyllie et al. 1972)) einzuleiten. Der apoptotische Zelltod entfernt die Zelle aus dem Zellverband, so dass kein Schaden – wie beispielsweise unkontrolliertes Wachstum – mehr von ihr ausgehen kann. Durch den apoptotischen Zelltot wird keine Entzündungsreaktion, wie bei der Nekrose, ausgelöst. Apoptose ist ein normales Ereignis in der Entwicklung der mehrzelligen Organismen (Jacobson, Weil et al. 1997), kann aber auch durch zahlreiche exogene Faktoren, wie z. B. γ-Bestrahlung induziert werden (Verheij und Bartelink 2000). Kennzeichnend für diese Art von Zelltod ist die Signalübertragung von dem Stimulus bis zum Zelltod über Caspasen. Caspasen funktionieren in der Apoptose sowohl als Signalübermittler und schließlich auch als Enzyme, die den Abbau der Zelle bewerkstelligen (Thornberry und Lazebnik 1998). Diese proteolytischen Enzyme werden als inaktive Zymogene produziert. Durch proteolytische Spaltung werden die Zymogene in ihre aktive Form umgewandelt. Dabei können sich die Caspasen selbst spalten, was eine exponentielle Amplifikation des Signals zur Folge hat. Die Spaltung anderer Caspasen ermöglicht eine Signalweiterleitung und die Modulation des Signals. Letztendlich werden über die so genannten Initiatorcaspasen (Caspase -2, -8, -9, und -10) die Effektorcaspasen gespalten (Caspase-3, -6 und -7) und aktiviert. Die Effektorcaspasen übernehmen den Abbau der zellulären Strukturen (Thornberry und Lazebnik 1998; Philchenkov 2004; Riedl und Shi 2004).

Durch die durch γ-Bestrahlung induzierten DNA Doppelstrangbrüche, werden zahlreiche zelluläre Reaktionen induziert. Dazu gehören die zuvor beschriebenen Effekte wie DNA Reparatur und Zellzyklusarrest, aber eben auch Apoptose. Prinzipiell gibt es zwei getrennte Wege, Apoptose einzuleiten. Der erste Weg führt in die Apoptose unter Einbeziehung des Mitochondriums und ein zentraler Faktor dieses Weges ist das Tumorsuppressorprotein p53. Es ist allgemein akzeptiert, dass Apoptose nach Bestrahlung über diesen Weg eingeleitet wird (Kaina 2003; Norbury und Zhivotovsky 2004; Puchala, Szweda-Lewandowska et al. 2004). Ein zentraler Signalübermittler vom DNA Schaden zum zellulären Effekt in diesem Weg ist die Kinase ATM (Shiloh 2003). Die Substrate dieser Kinase sind unter anderem MDM2, CHK2 und p53 (Banin, Moyal et al. 1998; Maya, Balass et al. 2001; McGowan 2002). Die Phosphorylierung dieser Proteine führt zu einer Stabilisierung des Proteins p53 und zur Verstärkung der Wirkung als Transkriptionsfaktor (Chehab, Malikzay et al. 1999; Dumaz und Meek 1999; Maya, Balass

et al. 2001) für die Transkription pro-apoptotischer Gene (Vousden und Lu 2002). Laut Literatur ist dieser Weg allerdings in *NBS* Zellen gestört (Matsuura, Balmukhanov et al. 1998; Little, Nagasawa et al. 2002). Insbesondere scheint schon die Stabilisierung des Proteins p53 betroffen zu sein (Jongmans, Vuillaume et al. 1997). Dieser Effekt erklärt sich durch die Notwendigkeit des MRN Komplexes für die Aktivierung der ATM Kinase (wie bereits unter 2.3 erwähnt) und der anschließenden Phosphorylierung von p53 (Lee und Paull 2004). So zeigten Crompton *et al*, dass die strahlungsinduzierte Apoptose in *NBS* Lymphozyten reduziert ist (Crompton, Shi et al. 2001).

Der zweite Weg, Apoptose zu induzieren, geht von der Aktivierung der Todesrezeptoren („death receptors“) aus. Diese Wege sind nicht notwendigerweise abhängig von p53. Allerdings wird die Genexpression für den in dieser Arbeit untersuchten Rezeptor CD95, *TNFRSF6*, von p53 reguliert (Owen-Schaub, Zhang et al. 1995; Sheard, Uldrijan et al. 2003), wobei die Aktivierung des Rezeptors unabhängig von p53 (O'Connor, Harris et al. 2000) ist. Die Aktivierung des Rezeptors wird über die Bindung seines Liganden CD95L vermittelt (Lavrik, Golks et al. 2005). Daraufhin kommt es zur Bildung eines Rezeptorclusters und zur Aktivierung von Caspase-8, eventuell (je nach Zelltyp) von Caspase-9 und schließlich zur Aktivierung der Caspase-3 (Houston und O'Connell 2004). In der **Abbildung 8** ist schematisch die Induktion der Apoptose über die zwei hier beschriebenen, verschiedenen Möglichkeiten dargestellt. Letztendlich aktivieren beide Wege die Effektorcaspase Caspase-3, deren Aktivität schließlich zum apoptotischen Phänotyp der Zellen führt.

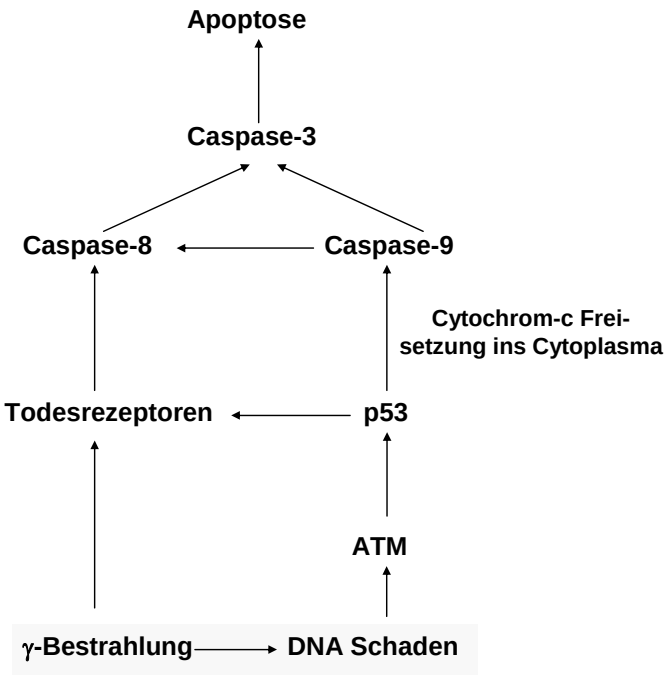


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung der möglichen Apoptoseinduktion nach γ-Bestrahlung. Durch die ionisierende Bestrahlung werden u. a. Doppelstrangbrüche in der DNA induziert, welche die ATM-Kinase aktivieren. Daraufhin wird das Tumorsuppressorprotein p53 stabilisiert, welches u. a. die Transkription pro-apoptotischer Gene stimuliert, worauf das mitochondriale Protein Cytochrom-C in das Cytoplasma gelangt und zusammen mit weiteren Proteinen die Caspase-9 aktiviert. Durch die γ-Bestrahlung können auch die Todesrezeptoren aktiviert werden, die wiederum die Caspase-8 aktivieren. Aktivierte Caspase-8 und Caspase-9 aktivieren schließlich die Effektorcaspase Caspase-3. Es gibt zwischen diesen Wegen zahlreiche Quervernetzungen und nicht alle Wege existieren in allen Zellen.

2.7 Experimentelles System

2.7.1 *NBS* Lymphoblasten

Für die Analyse von *NBS* abhängigen Effekten wurden EBV-immortalisierte B-Zelllymphoblasten verwendet. Die verwendeten vier Zelllinien lassen sich in zwei Paare mit jeweils zwei Linien gruppieren. Die Linien innerhalb eines Paares stammen von blutsverwandten Personen. Zwischen den Linien der unterschiedlichen Paare besteht kein bekannter verwandtschaftlicher Zusammenhang. Immer eine Linie eines Paares ist homozygot für die 657del5 Mutation des *NBS1* Gens, die andere Linie ist heterozygot für diese Mutation, das zweite *NBS1* Allel codiert für das Wildtyp Genprodukt. Die Bezeichnungen der Linien im Einzelnen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Verwendung eines solchen Systems minimiert die Effekte, die aus einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund stammen und nicht in einem ursächlichen Zusammenhang mit der *NBS1* Mutation stehen, da nur Effekte als *NBS1* abhängig angesehen werden, die in beiden Zellpaaren zu beobachten sind.

Familie	Bezeichnung	Genotyp
A	P111	wt/657del5 (*NBS1*$^{+/-}$)
	P112	657del5/657del5 (*NBS1*$^{-/-}$)
B	P306	wt/657del5 (*NBS1*$^{+/-}$)
	P247	657del5/657del5 (*NBS1*$^{-/-}$)

Tabelle 2: Bezeichnungen der verwendeten Zelllinien und ihr verwandtschaftlicher Zusammenhang. Im folgenden Teil der Arbeit werden die homozygot für die 657del5 Mutation des *NBS1* Gens mit *NBS1*$^{-/-}$ bezeichnet, die für die Mutation heterozygoten mit *NBS1*$^{+/-}$.

Durch die verbreitete 657del5 Mutation werden zwei aberrante NBS1 Proteine in den Zellen produziert: NBS1^{p26} und NBS1^{p70}. Durch die Mutation verschiebt sich der Leserahmen des *NBS1* ORFs (siehe Abbildung 9). NBS1^{p26} wird unter Verwendung des normalen Startcodons translatiert, aber die Translation stoppt auf Grund eines neu kreierten Stoppcodons. NBS1^{p70} wird von einem alternativen, internen Startcodon aus translatiert, welches den normalen Leserahmen wieder rekonstituiert. Das NBS1^{p26} Fragment besteht aus der Aminosäuresquenz 1-218, das NBS1^{p70} Fragment aus der Sequenz 221-754 der Wildtypsequenz. Das NBS1^{p26} Fragment beinhaltet also noch die FHA und BRCT Domänen, das NBS1^{p70} Fragment die phosphorylierbaren Serinreste und die MRE11 Interaktionsdomäne (siehe Abbildung 4) (Maser, Zinkel et al. 2001). Zurzeit stehen keine immortalen, humanen oder Säuger Zelllinien mit einer Nullmation des *NBS1* Gens zu Verfügung, da Nullmutationen des Gens in Mäusen letal sind und auch Zellen mit einer induzierbaren Nullmutation in Kultur verloren gehen (Demuth, Frappart et al. 2004).

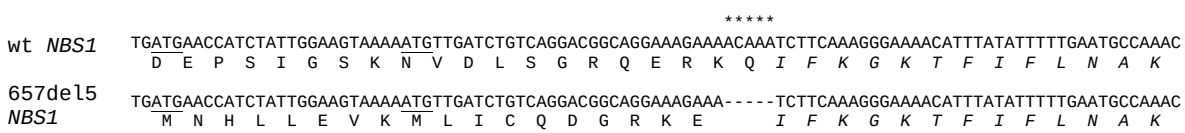


Abbildung 9: NBS1^{p70} wird von einem alternativen Startcodon aus translatiert, somit wird der ursprüngliche Leserahmen wieder hergestellt. In der Abbildung sind die Sequenzen für das Wildtyp *NBS1* (wt *NBS1*) Gen gezeigt (nt 600-700), Bei der 657del5 Mutation werden 5 Nukleotide deletiert (mit * markiert in der wt Sequenz). Durch Translation von einem der alternativen Startcodons aus (unterstrichen) wird der ursprüngliche Leserahmen wieder hergestellt, was an der Aminosäuresequenz abgelesen werden kann.

2.7.2 Expressionsanalyse mit cDNA Microarrays

Für die Genexpressionsanalyse wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie cDNA Microarrays hergestellt. Dazu konnte auf ein großes Arsenal von Genen zurückgegriffen werden, die bereits von der kooperierenden Arbeitsgruppe ausgesucht wurden (Gene aus den Bereichen Zelladhäsion, WNT- MAPKinasesignalwegen, Transkriptionsfakoren, DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle). Zusätzlich haben wir ungefähr 50 Gene ausgewählt (hauptsächlich DNA Doppelstrangbruchreparaturgene) und die dazugehörigen cDNA Klone als IMAGE Klone über das *deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH* (*RZPD*) angefordert. IMAGE Klone enthalten „standardisierte" Plasmide, die es erlauben über M13/-21M13 Oligonukleotide die klonierte cDNA mittels PCR zu amplifzieren. Die aufgereinigten PCR Produkte wurden auf die Objektträger aufgebracht. Um eine kovalente Vernetzung der PCR Produkte mit der Glasoberfläche zu gewährleisten, wurden zur Amplifikation Oligonukleotide mit einer Aminogruppe am 5' Ende verwendet, die mit der Aldehydbeschichtung der Glasoberfläche eine kovalente Bindung eingeht. Bei der Auswahl der Klone wurde darauf geachtet, dass das klonierte cDNA Fragmente eine ungefähre Länge von 600 Basenpaaren hat und möglichst weit am 3' Ende der entsprechende mRNA liegt, da die reverse Transkription der markierten cDNA für die Hybridisierung des Arrays mit Poly(dT)-Oligonukleotiden erfolgt und folglich am 3' Ende der mRNA beginnt.

Da nicht sichergestellt werden kann, dass die angeforderten Klone auch das richtige cDNA Fragment erhalten, wurden die Fragmente sämtlicher Klone von beiden Seiten her sequenziert. Eine Datenbankrecherche („BLAST-Search") bzw. ein Sequenzalignment der erhaltenen Sequenzen mit der entsprechenden Sequenz der gewünschten mRNA stellten sicher, dass es sich um den richtigen Klon handelte.

Die so hergestellten Microarrays (genaueres siehe Material und Methoden) wurden mit cy3/ cy5 markierter cDNA aus den vier lymphoblastoiden Zelllinien hybridisiert und zwar ohne oder 2 h nach Bestrahlung mit 4 Gy. Die gewonnenen Daten wurden mit Real-Time-PCR Analyse verifiziert.

2.7.3 Analyse der Apoptose in *NBS1*$^{-/-}$Zellen

Apoptose wurde in den lymphoblastoiden Zelllinien mit verschiedenen biochemischen Nachweismethoden (Annexinfärbung, SubG1-Peak, PARP-1 Spaltung und Caspase-3 Aktivitätsbestimmungen) detektiert. Durch Analyse der γ-strahleninduzierten Apoptoseinduktion nach Bestrahlung und nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren konnte der Weg identifiziert werden, der in *NBS1*$^{-/-}$ Zellen verändert ist.

2.7.4 Rekombinationsvektor

Um Reparaturereignisse in Zellen *in vivo* analysieren zu können, bietet sich die Verwendung von rekombinanten DNA-Molekülen an, die je nach verwendetem Reparaturweg zu einem unterschiedlichen Phänotyp führen.

Um Reparaturereignisse an Doppelstrangbrüchen verfolgen zu können, hat sich die Untersuchung der Reparatur eines sequenzspezifisch induzierten Doppelstrangbruches etabliert. Durch Verwendung der I-SceI Endonuklease gelingt es, in Säugerzellen einen solchen Doppelstrangbruch zu induzieren (Rouet, Smih et al. 1994; Rouet, Smih et al. 1994). Bei der I-SceI Endonuklease handelt es sich um eine Homingendonuklease, die natürlicherweise im Genom des Mitochondriums von *S. cerevisiae* codiert ist. Die Sequenz wurde für die Verwendung in Säugerzellen angepasst (Colleaux, d'Auriol et al. 1986).

Das hier vorgestellte System ist eine Weiterentwicklung des Vektorsystems pGrec, das es ermöglicht, spontane Rekombinationsereignisse zu detektieren. In pGrec entsteht nach einem HR Ereignis zwischen zwei mutierten *egfp* Allelen ein wt *EGFP* Allel, dessen Rekonstitution durch grün fluoreszierende Zellen phänotypisch verfolgt werden kann (Drexler, Rogge et al. 2004; Drexler, Wilde et al. 2004).

In dieser Arbeit wurde die Reporterkassette des bestehenden Vektors pGrec um folgende Element erweitert (Abbildung 10).

- zwei I-SceI Erkennungssequenzen wurden in den Vektor eingebracht, um sequenzspezifisch Doppelstrangbrüche induzieren zu können.
- ein Leserahmen für das rot fluoreszierende Protein DSRed2 wurde eingebracht, der die Detektion von NHEJ Ereignissen ermöglicht.

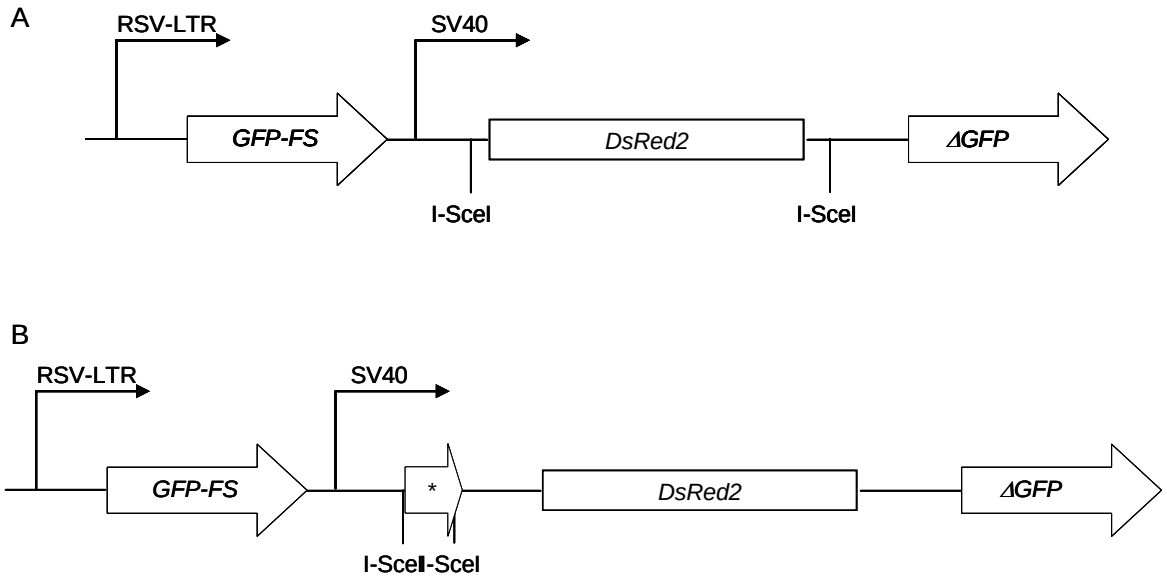


Abbildung 10: Die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide. Beim „OFF-System" wird der *DsRed2* Leserahmen durch I-SceI vermittelten Verdau vom SV40 Promotor getrennt, die *DsRed2* Expression also verhindert (A). Beim „ON-System" wird der kurze Leserahmen (*), der die DSRed2 Translation verhindert durch einen I-SceI Verdau aus dem Vektor entfernt. Nach einem Religationsereignis kann das DsRed2 Protein translatiert werden (B). Bei beiden Vektoren besteht die Möglichkeit zur Produktion des grün fluoreszierenden EGFP Proteins nach einem homologen Rekombinationsereignis zwischen den beiden mutierten *egfp* Allelen (*GFP-FS*, *ΔGFP*).Der Abstand zwischen dem *GFP-FS* Allel und dem *DsRed2* Startcodon beträgt ca 0,4 kbp, zwischen dem *DsRed2* Stopcodon und dem *ΔGFP* Allel beträgt ca. 0,1 kbp.

Wie die Abbildung 10 zeigt, wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Systeme konzipiert und konstruiert.

Beim „OFF-System" (Abbildung 10A) ist der Leserahmen für ein rot fluoreszierendes Protein (DSRed2), der zwischen den beiden mutierten *egfp* Allelen liegt, von zwei I-SceI Erkennungsstellen flankiert. Das Konstrukt wurde genomisch integriert, die Zellen fluoreszieren also rot. Nach der *I-SceI* Expression geht dieser Leseahmen verloren und nach der Reparatur über einfache End-Verknüpfung entstehen nun nicht fluoreszierende Zellen, nach Reparatur über ein HR Ereignis zwischen den beiden *egfp* Allelen kann eine grün fluoreszierende Zelle entstehen. Komplexere Reparaturereignisse, wie z. B. Reparatur des Doppelstrangbruches unter Einbeziehung des homologen Schwesterchromatids lassen über HR Ereignisse wieder rot fluoreszierende Zellen entstehen. Da sich aber die meisten Zellen in G1 befinden, wurde diese Art der Reparatur vernachlässigt.

Auch können Zellen entstehen, die sowohl rote, als auch grüne Fluoreszenz zeigen. In diesem Fall hat ein nicht reziproker Sequenzaustausch zwischen den beiden *egfp* Allelen

stattgefunden und der *DSRed2* Leserahmen geht dabei nicht verloren (Genkonversion). Der Doppelstrangbruch wurde entweder zuvor oder nach dem Genkonversionsereignis über NHEJ repariert.

Beim „ON-System“ (Abbildung 10B) wird das rot fluoreszierende Protein erst dann produziert, wenn ein NHEJ Ereignis stattfindet. Hierbei ist ein kurzer nonsense ORF dem ORF für das rot fluoreszierende Protein vorgeschaltet. Dieser nonsense ORF ist von den zwei I-SceI Erkennungsstellen flankiert, der nach *I-SceI* Induktion deletiert werden kann. Durch Reparatur über ein HR Ereignis zwischen den beiden *egfp* Allelen können wiederum grün fluoreszierende Zellen entstehen. Die Reparatur über ein NHEJ Ereignis kann zu einer rot fluoreszierenden Zelle führen. Auch hier sind wiederum komplexere Ereignisse durch Reparatur unter Einbeziehung des Schwesterchromatids möglich, wobei ein HR Ereignis nicht zu einer Rekonstitution eines funktionellen *EGFP* Allels führt. Durch ein mit einer Genkonversion gekoppeltem NHEJ Ereignis können Zellen entstehen, die sowohl grün, als auch rot fluoreszieren.

Die entstehenden (Rekombinations)produkte werden im Detail in der Diskussion erklärt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Zelllinien

3.1.1 PCR zur Detektion der *NBS1* Mutation

Um die 657del5 Mutation im Exon 6 des *NBS1* Gens schnell detektieren zu können und somit auch eine Möglichkeit zu haben, ein Vertauschen der Kulturen sofort erkennen zu können, wurde eine PCR-Nachweismethode entwickelt, die *NBS1*$^{+/-}$ Zellen von den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen eindeutig voneinander unterscheiden zu können. Da alle Zelllinien mindestens ein 657del5 Allel tragen, wurde das wt Allel spezifisch detektiert, welches in den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen nicht vorkommt.

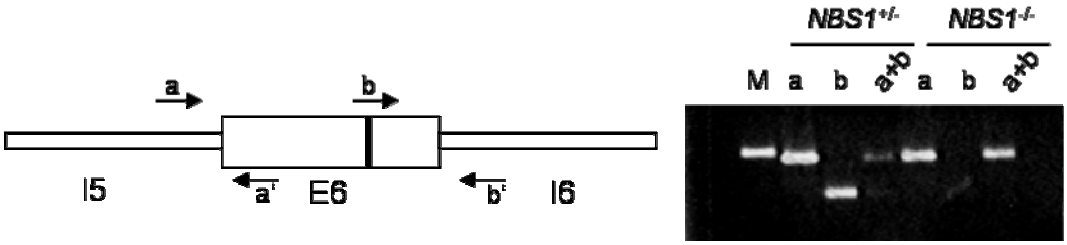
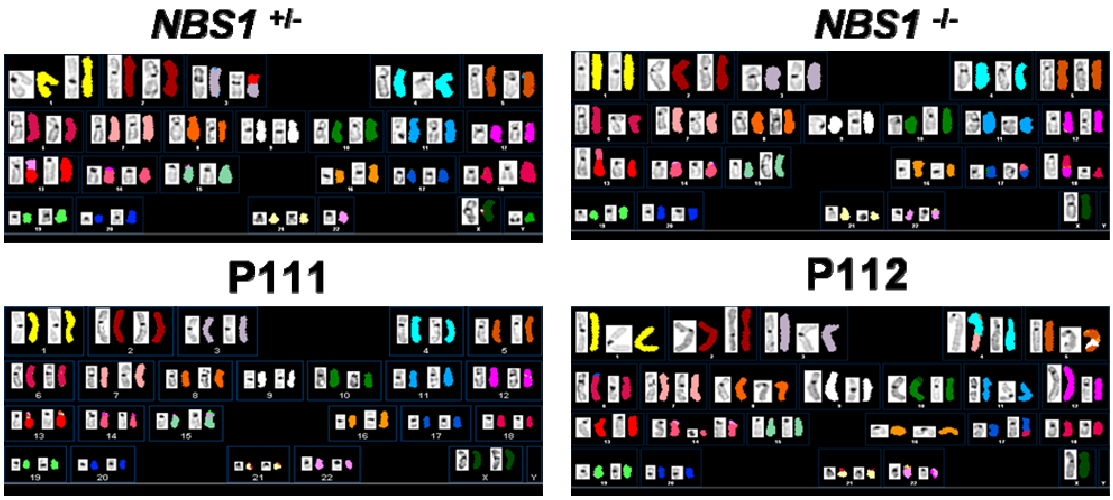


Abbildung 11: PCR gestützte Analyse zur Identifikation der *NBS1*$^{+/-}$ und *NBS1*$^{-/-}$ Zelllinien mittels Amplifikation eines wt spezifischen Fragments. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass ein vorwärts Oligonukleotid (b (NBS1wtfwd)) nur mit dem wt Allel in Exon 6 (E6) hybridisiert. Das entsprechende rückwärts Oligonukleotid (b' (NBS1Intron6rev)) ist einer Sequenz im Intron 6 (I6) des *NBS1* Gens komplementär. Zur Kontrolle der DNA Präparation und der PCR Bedingungen wird gleichzeitig ein Fragment aus der Grenze des Intron 5 (I5)/ Exon 6 amplifiziert. Eine PCR mit dem Oligonukleotidpaar b ergibt nur in den *NBS1*$^{+/-}$ Zellen ein Produkt, mit dem Oligonukleotidpaar a (NBS1Exon6rev, NBS1intron5fwd) kann in allen Zelllinien ein Produkt nachgewiesen werden. Leider ist die Effizienz einer Multiplex-PCR (mit beiden Oligonukleotidpaaren (a+b)) zu gering, um beide Produkte gleichzeitig in einem Ansatz nachweisen zu können. M: 250 bp Bande des Längenstandards.

Wie in der Abbildung 11 ersichtlich, lassen sich mit den für die Wildtypsequenz spezifischen Oligonukleotide nur mit DNA Präparationen der *NBS1*$^{+/-}$ Zellen ein PCR Produkt erzeugen. Das für beide Allele spezifische Oligonukleotidpaar erzeugt mit Präparationen aller Zelllinien ein Produkt und dient so als Kontrolle für die DNA Präparation und für die PCR Reaktion.

3.1.2 SKY Analyse

Wie in der Einleitung erwähnt, handelt es sich bei den Zelllinien um EBV immortalisierte B-Zellen. Da eine EBV-Immortalisierung zu einer erhöhten genetischen Instabilität führen kann (Gualandi, Giselico et al. 2001) und es sich bei *NBS* um ein genetisches Instabilitätssyndrom handelt, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Hieber/ Institut für molekulare Strahlenbiologie das Ausmaß der chromosomalen Aberrationen in den Zellen mittels SKY-Analyse untersucht (siehe Abbildung 12).



P111:	der(13)t(13;22)(p11;p11) t(3;13)(p12;q22)	P112:	der(13)t(13;14)(p11;p11) i(15q) der(17)t(17;14)(q22;q?) der(18)t(18;12)(q21;q?)
P306:	normaler Karyotyp	P247:	der(4)t(4;7)(q27;q?) t(6;17)(p21.1;q24) der(10)t(X;10) ace(14) mar(12)

Abbildung 12: SKY-Analyse der verwendeten Zelllinien zum Nachweis von chromosomalen Aberrationen. Die *NBS1*$^{-/-}$ Zellen haben mehr klonale Aberrationen, als ihre blutsverwandten *NBS1*$^{+/-}$ Zellen angesammelt. P112: Vier Aberrationen, P111: Zwei Aberrationen; P247: Fünf Aberrationen, P306: keine Aberration. Da in den *NBS1*$^{+/-}$ Zellen nahezu keine Aberrationen zu finden sind, ist der Einfluss der EBV Immortalisierung auf die chromosomale Instabilität zu vernachlässigen. Die gefundenen Aberrationen in den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen sind höchstwahrscheinlich auf den wohlbekannten Phänotyp der chromosomalen Instabilität des *NBS* Syndroms zurückzuführen.

In den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen lassen sich, wie für Zellen eines chromosomalen Instabilitätssyndroms zu erwarten, mehr Aberrationen beschreiben als in den *NBS1*$^{+/-}$ Zellen. Da alle vier Zelllinien auf die gleiche Art mit EBV immortalisiert wurden (Neitzel 1986), sind die beobachteten Aberrationen tatsächlich Ausdruck des *NBS* Phänotyps. Die

heterozygote Linie P306 hat einen normalen Karyotyp und in der Linie P111 lassen sich nur zwei klonale Aberrationen beschreiben.

3.2 Expressionsanalyse mittels cDNA Microarrays

3.2.1 Qualitätskontrolle der amplifizierten cDNA

Auf den Array wurde cDNA von ca. 1300 Genen – teilweise mehrfach – aufgebracht, die zuvor über eine PCR amplifiziert wurde. Alle Klone wurden vor der Amplifikation sequenziert, um sicherzustellen, dass sie das gewünschte Insert tragen. Dabei hat sich herausgestellt, dass ungefähr 15 % der angeforderten Klone falsch ausgeliefert wurden, die dann nachbestellt werden mussten.

Das Vorhandensein der PCR Produkte wurde mit Gelelektrophorese überprüft. Die Abbildung 13 zeigt ein Bild einer solchen Elektrophorese. Diese Prozedur wurde für alle 1300 PCR Produkte durchgeführt, hier ist nur das Bild der Produkte für die neu angeforderten Klone (siehe Tabelle 3) gezeigt.

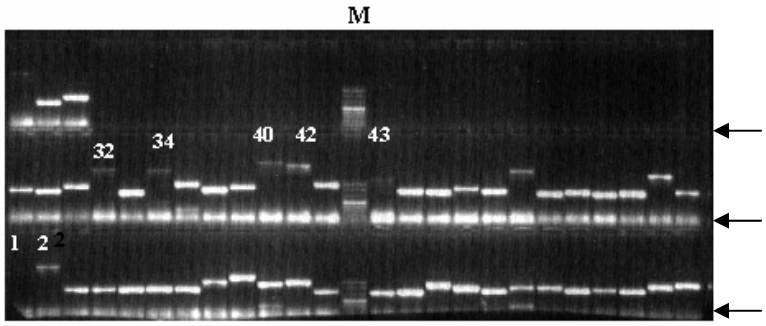


Abbildung 13: Gelfoto der PCR-Produkte für die Microarrayproduktion. M: Markerspur, weiße Zahlen über den Spuren signalisieren den Ausfall der PCR Produkte, diese PCR Reaktionen wurden wiederholt. Die Pfeile deuten auf die nicht verbrauchten Oligonukleotide in der PCR Reaktion. Darüber sind die PCR Produkte zu erkennen.

Die cDNA der meisten Klone lässt sich unter den Standard PCR-Bedingungen gut amplifizieren, allerdings lässt sich für einige Klone (siehe Abbildung) so nicht genügend PCR Produkt gewinnen (Klon Nummer 1, 2, 32, 34, 40, 42, 43). Die cDNA dieser Klone wurde mit dem *Triple Master PCR Kit* der Firma *Eppendorf* amplifiziert. Dem Kit liegen zwei Puffer bei, wobei der beigelegte Tuning Puffer das beste Ergebnis ergab (Abbildung 14).

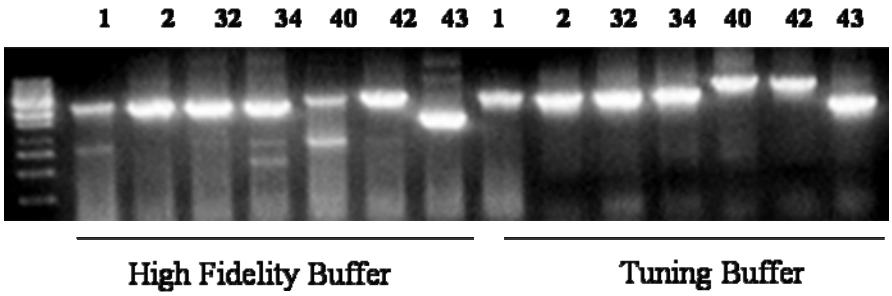


Abbildung 14: Wiederholung der PCR mit optimierten Bedingungen für die ausgefallenen Produkte in Abbildung 13. Mit dem *Triple Master PCR Kit* der Firma *Eppendorf* wurden die PCR Reaktionen für die Klone wiederholt, die unter Standard PCR Bedingungen kein Produkt ergaben. Es wurden beide Puffer verwendet, wobei der Tuning Puffer (rechts) ein besseres PCR Ergebnis ergab.

Gensymbol	Ref. Sequenz	Klon-Nummer
ABL1	NM_007313	IMAGp998D035768
ADPRT	NM_001618	IMAGp998K104451
AICDA	NM_020661	IMAGp998F213811
ATR	NM_001184	IMAGp998P244602
ATRX	NM_000489	IMAGp998H056130
BAG4	NM_004874	IMAGp998F015694
BLM	NM_000057	IMAGp998B145596
G22P1	NM_001469	IMAGp998C075324
HSPA1A	NM_005345	IMAGp998D044139
HSPA1B	NM_005346	IMAGp998B166279
HTATIP	NM_006388	IMAGp998G204566
LIG4	NM_002312	IMAGp998H18168
MAD2L2	NM_006341	IMAGp998E085780
MDM2	NM_002392	IMAGp998E232654
MRE11A	NM_005591	IMAGp998N245721
NBS1	NM_002485	IMAGp998K016116
NFKB1	NM_003998	IMAGp998H08189
POLH	NM_006502	IMAGp998F184540
PRKDC	BC024963	IMAGp998M094332
RAD18	NM_020165	IMAGp998O033974
RAD51C	NM_002876	IMAGp998K145740
RAD51L1	NM_002877	IMAGp998B156495
RAD51L1	NM_133510	IMAGp998N017428
RAD51L3	NM_133630	IMAGp998L135154
Rad54L	NM_003579	IMAGp998N153346
Rad54L	NM_003579	IMAGp998J156217
RECQL4	NM_004260	IMAGp998B157845
RELA	NM_021975	IMAGp998J022576
REV1L	NM_016316	IMAGp998I156393
REV3L	NM_002912	IMAGp998F168050
SMARCA3	NM_139048	IMAGp998F175657
TNF	NM_000594	IMAGp998L124300
TNFAIP3	NM_006290	IMAGp998P055274
TNFRSF1A	NM_001065	IMAGp998O134604
TNFRSF6	NM_152877	IMAGp998F143409
TNFSF6	NM_000639	IMAGp958O191689

TRAF6	NM_004620	IMAGp998G073544
TRAF6	NM_004620	IMAGp998A073961
UBE2A	NM_003336	IMAGp998P055026
UBE2B	NM_003337	IMAGp998O053546
UBE2N	NM_003348	IMAGp998F19972
UBE2V1	NM_021988	IMAGp998N193511
UBE2V2	NM_003350	IMAGp998C153948
XRCC2	NM_005431	IMAGp958K212035
XRCC3	NM_005432	IMAGp998L1611274
XRCC4	NM_022406	IMAGp998M065918
XRCC5	NM_021141	IMAGp998P043159

Tabelle 3: Aufstellung der angeforderten IMAGE Klone für die entsprechenden Gene. Alle Klone wurden sequenziert und auf das Vorhandensein der entsprechenden Referenzsequenz überprüft. Sie mussten teilweise mehrfach nachgefordert werden.

3.2.2 Qualitätskontrolle der RNA und der Hybridisierung

Die RNA wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, mit *Trizol* isoliert. Pro Hybridisierung wurden 30-50 µg RNA in die cDNA Synthese eingesetzt. Da die RNA Präparation immer noch mit DNA verunreinigt ist, was die präzise photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA Lösung stört, wird die DNA mit einem DNAse Verdau degradiert und anschließend die DNAse über eine erneute Extraktion mit *Trizol* entfernt. Dann wird die Qualität der RNA mit einer Formaldehyd-Gelelektrophorese überprüft und erst anschließend für die Synthese der cy3/ cy5 markierten cDNA eingesetzt (siehe Abbildung 15).

In allen vier Zelllinien beträgt die Ausbeute an RNA ca. 35 pg/ Zelle. Da die Genexpression u. a. auch von der Dichte der Kultur und v. a. von der Wachstumsphase der Zellen abhängt, wird die Kultur nur dann zur RNA Präparation verwendet, wenn sie eine Dichte von 0,7 $x10^6$ Zellen/ ml nicht übersteigt. Die Zellen der verwendeten Kulturen müssen eine Generationszeit von <48 h aufweisen, was durch wiederholtes Bestimmen des Zelltiters der Kultur festgestellt wird. Die Zellen befinden sich somit in der exponentiellen Wachstumsphase.

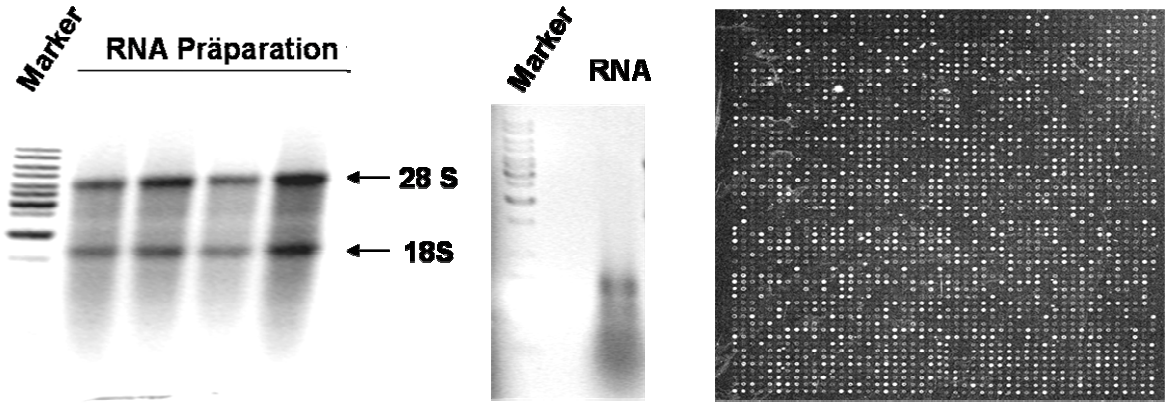


Abbildung 15: Qualitätskontrolle der RNA Präparationen mit Formaldehyd-Gelelektrophorese. Bei intakt isolierter DNA sind die beiden ribosomalen rRNA 28S, 18S Moleküle als distinkte Banden, wie in den hier gezeigten vier RNA Präparationen, nach der Elektrophorese zu erkennen (ganz links). Im Mittelteil der Abbildung ist eine Präparation mit degradierter RNA gezeigt. Die intakte RNA wird bei der cDNA Synthese mit cy3/ cy5 markiert und zu Hybridisierung eingesetzt. Mit Hilfe eines Scanners werden die Signale ausgelesen. Der rechte Teil der Abbildung zeigt das Ergebnis einer Hybridisierungsreaktion mit cy3 markierter cDNA.

3.2.3 Überlegungen zur Analyse der differentiellen Expression

Prinzipiell gibt es zwei Arten, ein Microarray Experiment für die Analyse der differentiellen Genexpression durchzuführen. Sollen zwei Zelllinien A, B miteinander verglichen werden, so werden zwei Microarrays verwendet. Die cDNA der Zelllinie A wird mit cy3 und cy5 markiert (A^{cy3}, A^{cy5}), ebenso die der Zelllinie B (B^{cy3}, B^{cy5}). Nun wird der erste Array (R_1) mit A^{cy3} und B^{cy5} hybridisiert, der zweite Array (R_2) wird mit A^{cy5} und B^{cy3} hybridisiert. Anschließend werden die beiden Arrays gescannt und dabei die Intensitäten (I) für jeden Farbkanal für jeden Punkt auf dem Array ermittelt. Für jeden Punkt liegen dann also folgende Daten vor:

$$I_n\,(R_1(A^{cy3}));\ I_n\,(R_1(B^{cy5}));\ I_n\,(R_2(B^{cy3}));\ I_n\,(R_2(A^{cy5})),\ \text{wobei}$$

n die Nummer des Punktes auf dem Array identifiziert.

Nach Normalisierung der Intensitäten (so dass die Summe der gemessenen Intensitäten aller Punkte eines Arrays und eines Farbkanals für jeden Array und jeden Kanal gleich sind) und Berücksichtigung des lokalen Hintergrundes um jeden Punkt, werden die Intensitäten I in die berechneten Intensitäten I^b transformiert, wobei folgende Daten erhalten werden:

$$I^b_n\,(R_1(A^{cy3}));\ I^b_n\,(R_1(B^{cy5}));\ I^b_n\,(R_2(B^{cy3}));\ I^b_n\,(R_2(A^{cy5}))$$

Nun wird für jeden Punkt n auf dem Array R das Intensitätenverhältnis $Q_{R,n}$ der beiden Farbkanäle in folgender Weise berechnet:

$$Q_{R_1,n} = \log_2 \frac{I^b{}_n(R_1(A^{cy3}))}{I^b{}_n(R_1(B^{cy5}))}, \text{ und}$$

$$Q_{R_2,n} = \log_2 \frac{I^b{}_n(R_2(B^{cy3}))}{I^b{}_n(R_2(A^{cy5}))}$$

Q kann dabei Werte von -∞ bis +∞ annehmen, wobei gilt:

$$Q_{R_1} \begin{cases} < 0 \text{ für Gene, die in der Linie B höher exprimiert sind als in der Linie A} \\ = 0 \text{ für Gene, die in der Linie B gleich exprimiert sind wie in der Linie A} \\ > 0 \text{ für Gene, die in der Linie B geringer exprimiert sind als in der Linie A} \end{cases}$$

und für

$$Q_{R_2} \begin{cases} < 0 \text{ für Gene, die in der Linie A höher exprimiert sind als in der Linie B} \\ = 0 \text{ für Gene, die in der Linie A gleich exprimiert sind wie in der Linie B} \\ > 0 \text{ für Gene, die in der Linie A geringer exprimiert sind als in der Linie B} \end{cases}$$

Der Vorteil in der Verwendung logarithmierter Werte ist, dass die so von Q angenommenen Werte symmetrisch um 0 verteilt sind. Bei Verwendung von nicht logarithmischen Werten ist dies nicht so, da anschaulich ausgedrückt, weniger Zahlen zur Darstellung von Werten zwischen 0 und 1 zu Verfügung stehen als zwischen 1 und ∞.
Ein weiterer großer Vorteil dieser Methode ist, dass die Verhältnisse Q doppelt ermittelt werden, im idealen Fall gilt nämlich:

$$Q_{R_1} = -Q_{R_2}$$

Weichen die tatsächlichen Werte hiervon ab, so ist ein Fehler beispielsweise in der Hybridisierung leicht zu erkennen, da die oben genannte Beziehung dann natürlich nicht gilt. Allerdings gibt es Gene, für die diese Beziehung niemals erfüllt wird, da eine identische Inkorporation der mit cy3 und cy5 markierten dNTPs in die synthetisierte cDNA für diese Gene nicht möglich ist, so dass gälten würde:

$$I^b{}_n(R_1(A^{cy3})) = I^b{}_n(R_2(A^{cy5})) \quad \text{und} \quad I^b{}_n(R_1(B^{cy5})) = I^b{}_n(R_2(B^{cy3}))$$

Ein großer Nachteil dieser Methode ist, dass bei Ausfall eines Farbsignals eine Auswertung nicht mehr möglich ist. Da speziell die Markierung der cDNA mit cy5 sehr fehleranfällig ist und im Fall dieser Arbeit oftmals ein zu schwaches Signal ergeben hat, wurde für die Versuche folgende Hybridisierungsmethode gewählt (Referenzmethode):

Der erste Array R_1 wird mit A^{cy3} und A^{cy5} hybridisiert, der zweite Array mit A^{cy5} und B^{cy3}. Nach der Ermittlung der Intensitäten für jeden einzelnen Punkt auf dem Array und die Verrechnung mit dem lokalen Hintergrund liegen – analog zu oben – folgende normalisierte Intensitäten vor:

$$I^b_n\,(R_1(A^{cy3}));\ I^b_n\,(R_1(A^{cy5}));\ I^b_n\,(R_2(B^{cy3}));\ I^b_n\,(R_2(A^{cy5}))$$

Bei ausreichendem cy5 Signal können nun wiederum zwei Quotienten gebildet werden:

$$Q'_{R_1,n} = \frac{I^b_n\,(R_1(A^{cy3}))}{I^b_n\,(R_1(A^{cy5}))} \text{ und}$$

$$Q'_{R_2,n} = \frac{I^b_n\,(R_2(B^{cy3}))}{I^b_n\,(R_2(A^{cy5}))}$$

daraus wird wieder das logarithmierte Intensitätsverhältnis Q'' gebildet:

$$Q'' = \log_2 \frac{Q'_{R_2,n}}{Q'_{R_1,n}}$$

Für Q'' gilt dann:

$$Q''\begin{cases} < 0 \text{ für Gene, die in der Linie A höher exprimiert sind als in der Linie B} \\ = 0 \text{ für Gene, die in der Linie A gleich exprimiert sind wie in der Linie B} \\ > 0 \text{ für Gene, die in der Linie A geringer exprimiert sind als in der Linie B} \end{cases}$$

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass eventuelle Anomalien, die bei dem Hybridisierungsprozeß auftreten, rechnerisch eliminiert werden, da sie sowohl das cy3, als auch das cy5 Signal um den gleichen Faktor stören. Weiterhin findet diese Methode immer dann Verwendung, wenn das Material einer Probe (hier B) nur in sehr begrenzter Menge zur Verfügung steht, da es im Gegensatz zur anderen Methode bei der Referenzmethode nur für eine Hybridisierungsreaktion benötigt wird.

Leider kam es immer wieder vor, dass das cy5 Signal so schwach war, dass eine sichere, reproduzierbare Auswertung dieses Signals kaum möglich war. Dann bietet die Methode den großen Vorteil, dass auch eine Aussage über differentielle Genexpression alleine über das cy3 Signal gemacht werden kann. Es wird folgender Quotient gebildet:

$$Q'''_n = \log_2 \frac{I^b_n\,(R_2(B^{cy3}))}{I^b_n\,(R_1(A^{cy3}))}$$

Für Q''' gilt dann:

$$Q''' \begin{cases} < 0 \text{ für Gene, die in der Linie A höher exprimiert sind als in der Linie B} \\ = 0 \text{ für Gene, die in der Linie A gleich exprimiert sind wie in der Linie B} \\ > 0 \text{ für Gene, die in der Linie A geringer exprimiert sind als in der Linie B} \end{cases}$$

Diese Methode ist übrigens die einzig verwendbare für Hybridisierungsexperimente von Membran-Arrays (z. B. von der Firma Clontech), die mit radioaktiver Markierung arbeiten, da hier nicht zwei getrennte Signale für einen Punkt aufgenommen werden können. Da Artefakte in der Hybridisierung rechnerisch nicht eliminiert werden können, muss das Experiment bei dieser Art von Auswertung öfters wiederholt werden, was bei der Verwendung von Zelllinien im Fall dieser Arbeit wenig problematisch ist, wohl aber bei der Verwendung von begrenztem Untersuchungsmaterial.

Die tatsächlichen Grenzen, d. h. die Werte für Q''', ab dem ein Gen für über- oder unterexprimiert angesehen wird, hängt natürlich von der Güte der Hybridisierung und der Empfindlichkeit des Systems ab. Die genaue Ermittlung der Grenzen für jeden Array ist in Material und Methoden beschrieben.

3.2.4 Differentiell exprimierte Gene

Mit der oben angegebenen Strategie und dem in Material und Methoden genau beschriebenen Algorithmus zur Ermittlung der Grenzen, ab wann ein Gen als differentiell exprimiert klassifiziert wird, konnten in den zwei Zellpaaren ohne und 2 h nach Bestrahlung mit 4 Gy einige Gene identifiziert werden, die differentiell exprimiert sind. Für das Zellpaar P111/ P112 wurden 7 Gene identifiziert, die in den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen geringer exprimiert werden, als in den blutsverwandten *NBS1*$^{+/-}$ Zellen und 7 Gene, die erhöht exprimiert werden. Für das andere Zellpaar (P306/ P247) wurden 4 Gene gefunden, die in den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen geringer exprimiert werden als in den *NBS1*$^{+/-}$ Zellen. In diesem Zellpaar können 8 Gene als erhöht exprimiert identifiziert werden.

Nach Bestrahlung zeigen die *NBS1*$^{-/-}$ Zellen mit der Microarray basierten Expressionsanalyse im Vergleich mit den zugehörigen *NBS1*$^{+/-}$ Zellen überwiegend eine verminderte Expression von differentiell exprimierten Genen. In dem P111/ P112 Zellpaar sind 8 Gene nach Bestrahlung geringer exprimiert als in den *NBS1*$^{+/-}$ Zellen, im P306/

P247 Zellpaar 10 Gene. Überexprimiert nach Bestrahlung sind im Zellpaar P111/ P112 lediglich 3 Gene, im Zellpaar P306/ P247 ist 1 Gen nach Bestrahlung überexprimiert (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17). Werden die jeweils ohne Bestrahlung oder 2 Stunden nach Bestrahlung differentiell exprimierten Gene in den Zellpaaren miteinander verglichen, lässt sich zwei Stunden nach der Bestrahlung ein Gen identifizieren, welches in beiden *NBS1*$^{-/-}$ Linien vermindert exprimiert wird: *LCK*. Die anderen in der Abbildung 16 und Abbildung 17 gezeigten reproduzierbar und signifikant differentiell exprimierten Gene sind nur in jeweils einem Paar unterschiedlich exprimiert. Deshalb ist der Expressionsunterschied nicht mit der *NBS1* Mutation korreliert.

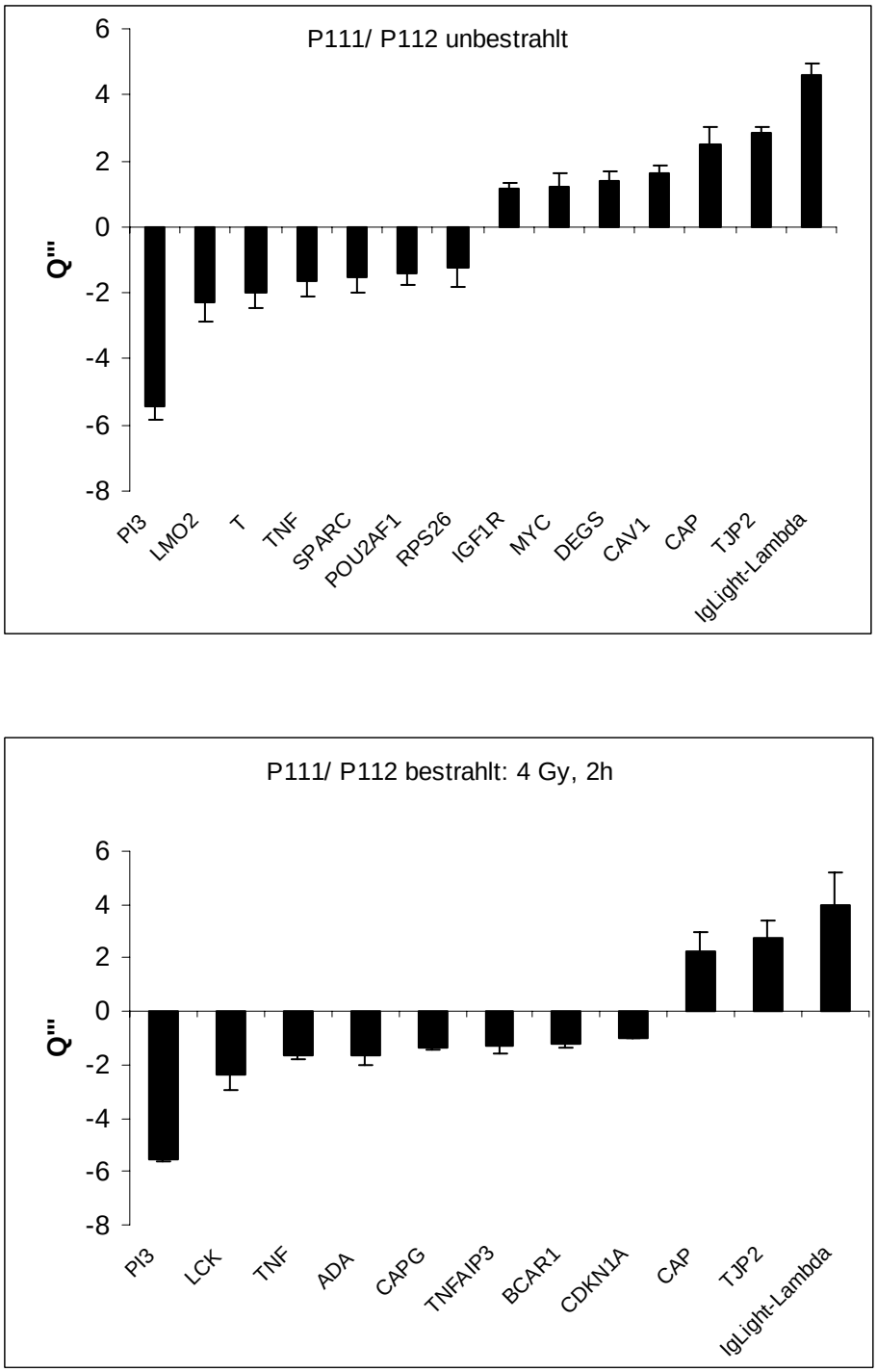
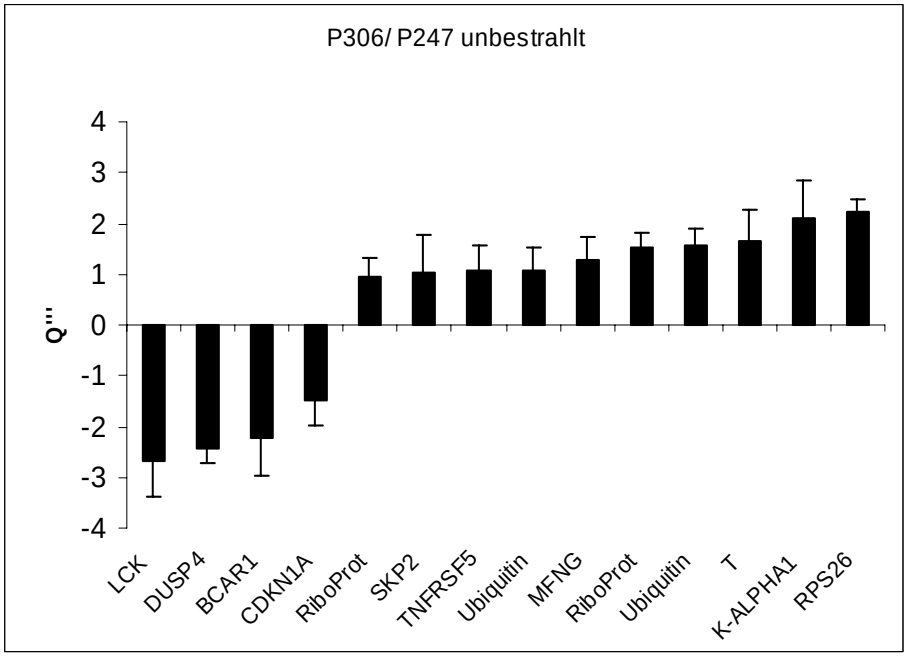


Abbildung 16: Differentiell exprimierte Gene in dem Zellpaar P111/ P112. Aufgetragen ist der Q''' Wert („log2ratio"), d. h. Gene für die Q'''<0 sind in den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen geringer exprimiert als in den *NBS1*$^{+/-}$ Zellen und umgekehrt. Nach der Bestrahlung sind die meisten (8 von 11) differentiell exprimierten Gene in den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen geringer exprimiert als in den *NBS1*$^{+/-}$ Zellen.



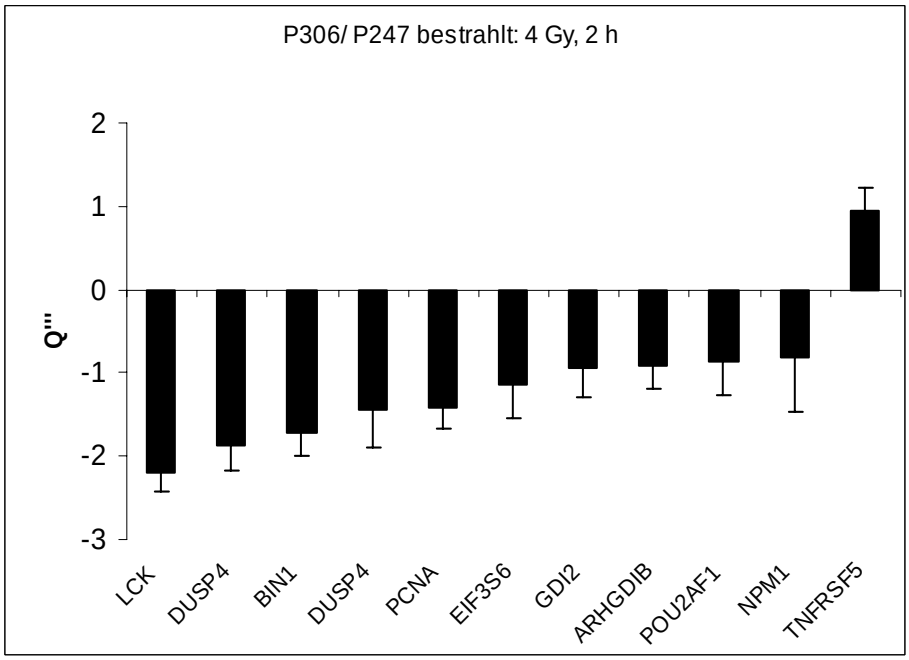


Abbildung 17: Auch im Zellpaar P306/ P247 lassen sich differentiell exprimierte Gene detektieren (Q''' Werte analog zu Abbildung 16). Auch hier sind nach der Bestrahlung die meisten differentiell exprimierten Gene (9 von 10) in den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen geringer exprimiert als in den *NBS1*$^{+/-}$ Zellen. Einige Gene sind auf dem Array mehrfach enthalten, was ein doppeltes Vorkommen einiger Genbezeichnungen erklärt.

3.2.5 Expressionsanalyse *LCK*

Da die Grenzen, ab wann ein Gen als differentiell exprimiert betrachtet wird, bei den Microarrayexperimenten sehr streng gewählt wurden, um nicht wegen der erheblichen (biologischen) Varianz von Versuch zu Versuch in der Expression der Gene und der zusätzlich teilweisen hohen (technischen) Varianz in der Hybridisierung der Microarrays sehr viele Gene fehlerhaft als differentiell exprimiert zu identifizieren, ist das *LCK* Gen im Fall des Zellpaares P111/ P112 (unbestrahlt) nicht als differentiell exprimiert aufgefallen. Dennoch wurde die Expression dieses Gens anschließend in unbestrahlten Zellen auch in den Zelllinien dieses Paares untersucht. Wie die Abbildung 18 zeigt, ist das *LCK* Gen in den Zellen der Linie P112 um den Faktor 3,6 vermindert exprimiert (im Vergleich zu Zellen der Linie P111), in der Linie P247 um den Faktor 6,4 (verglichen mit Zellen der Linie P306).

Eine Überprüfung dieser Expressionsdaten mittels quantitativer „Real-Time-PCR“ ergibt eine Reduktion der Genexpression um den Faktor 2,0 für Zellen der Linie P112 und um den Faktor 34 für Zellen der Linie P247. Auf Proteinebene manifestiert sich der Unterschied in der Expression des *LCK* Gens noch deutlicher. Das Protein LCK ist in Extrakten der *NBS1*$^{-/-}$ Linien nahezu nicht nachzuweisen, lässt sich aber deutlich in Extrakten der *NBS1*$^{+/-}$ Linien detektieren.

LCK ist eine Rezeptorkinase aus der SRC Tyrosinkinasefamilie, die natürlicherweise in T-Zellen exprimiert wird. Eine Expression in B-Zellen ist auf CD5^{+}-B-Zellen (B-1) beschränkt. Konventionelle B-Zellen (CD5^{-}; B-2) exprimieren diese Kinase nicht, durch eine EBV Immortalisierung kann die Genexpression jedoch induziert werden (Majolini, D'Elios et al. 1998). Um auszuschließen, dass der Grund für die fehlende LCK Expression möglicherweise eine unterschiedliche Reaktion der Zelllinien auf die EBV Immortalisierung ist, was z. B. für B-Lymphoblasten von Werner Syndrom Patienten gezeigt ist (Sugimoto, Tahara et al. 2004), wurde die *NBS1* Expression in einer humanen, hTERT-immortalisierten Epithelzelllinie mittels RNAi herunterreguliert und die Expression des *LCK* Gens mit quantitativer PCR quantifiziert. 48 h nach Herunterregulierung der *NBS1* Expression auf 20% des ursprünglichen Expressionsniveaus, nimmt die *LCK* Expression auf 55% ab (Angermeier und Mörtl, 2005, persönliche Mitteilung), was gegen eine ursächliche Beteiligung der EBV Immortalisierung an der beobachteten verminderten *LCK* Expression in den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen

spricht. Es wird daher angenommen, dass die verminderte *LCK* Expression mit dem *NBS1*$^{-/-}$ Status korreliert.

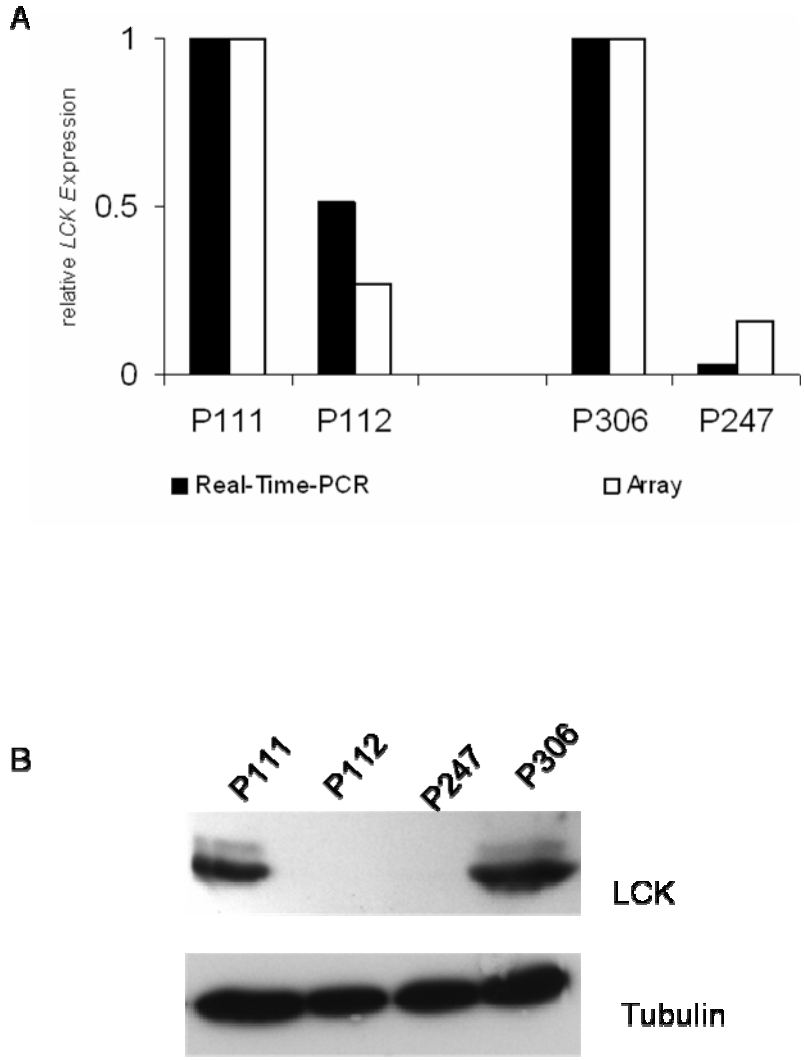


Abbildung 18: Expressionsanalyse des *LCK* Gens in unbestrahlten Zellen. Auf mRNA-Ebene ist das *LCK* Gen in *NBS1*$^{-/-}$ Zellen im Vergleich zu *NBS1*$^{+/-}$ Zellen geringer exprimiert. Die weißen Balken stellen die aus den Microarrayversuchen gewonnen Daten dar, die schwarzen Balken die Daten der quantitativen PCR für das *LCK* Gen (A). Auf Proteinebene ist der auf mRNA Ebene zu sehende Unterschied noch drastischer ausgeprägt: Es ist nahezu kein LCK Protein in den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen nachzuweisen, wohingegen das Protein in den Extrakten der *NBS1*$^{+/-}$ Zellen gut zu detektieren ist. Die Detektion des Proteins Tubulin zeigt eine gleiche Beladung der Spuren an (B).

3.3 Analyse eines möglichen Phänotyps für die fehlende LCK Expression

Wie erwähnt, ist LCK ein T-zellspezifisches Protein. Im Folgenden werden deshalb mögliche Phänotypen diskutiert, die aus einer verminderten *LCK* Expression resultieren könnten und zwar in B- und T-Zellen.

3.3.1 Einfluss von NBS1 auf die Expression von *LCK* in Jurkat Zellen

In T-Zellen übernimmt die LCK Tyrosinkinase eine zentrale Rolle in der Signaltransduktionskaskade bei der Aktivierung der Zelle über den T-Zellrezeptor. Sie ist mit den T-Zell-Corezeptoren CD4/ CD8 assoziiert und wird nach Bindung des T-Zellrezeptors an einen MHC-Antigenkomplex dephosphoryliert und somit aktiviert. Die aktive LCK Kinase phosphoryliert nun spezielle Aminosäuren der CD3 Kette des T-Zellrezeptorkomplexes („immunoreceptor tyrosine activation motifs“ (ITAMs)) und weitere Kinasen, wodurch die T-Zelle letztendlich in einen aktiven Status überführt wird (Huang und Wange 2004). Dies könnte die in der Einleitung erwähnte Beobachtung erklären, dass Lymphozyten eines *NBS* Patienten mit α-CD3 Antikörpern nur schlecht zu stimulieren sind.

Um den Einfluss von NBS1 auf die LCK Expression zu untersuchen, wurde in Jurkat-Zellen die *NBS1* Expression mittels RNAi herunterreguliert. Da die Jurkat-Zellen mit synthetischer siRNA zur Herunterregulation der *NBS1* Expression nur schlecht zu transfizieren sind, wurden die Zellen mit dem Vektor pMA4 transfiziert. Bei Verwendung des in Material und Methoden beschriebenen Elektroporationsprotokolls werden im Idealfall Effizienzen von bis zu 30 % erreicht, meistens wird allerdings nur eine Effizienz von ca. 10 % erreicht. Der Vektor pMA4 (konstruiert von M. Angermeier (Angermeier 2004)) enthält neben der Expressionskassette für die regulatorische RNA noch einen *EGFP* Leserahmen. Dadurch wird eine Sortierung der Zellen mittels FACS ermöglicht. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion auf grün fluoreszierende Zellen sortiert (in Zusammenarbeit mit W. Beisker, Institut für Toxikologie, M. Haag, Institut für Stammzellforschung) und Aliquots nach den in der Abbildung 19 angegebenen Zeiten entnommen. Parallel wurden Zellen mit dem Vektor pMA3 transfiziert, der wie pMA4 aufgebaut ist, allerdings nicht für eine regulatorische RNA codiert. Die relativen Transkriptmengen (relativ zur Transkriptmenge in den mit pMA3 transfizierten Zellen) wurde mit Hilfe von quantitativer PCR für die Transkripte *NBS1* und *LCK* bestimmt. Wie die Abbildung 19 zeigt, hat eine Verminderung der *NBS1* Expression keinen signifikanten Einfluss auf die *LCK* Expression. Während die *NBS1* Expression 48 Stunden nach der Transfektion auf 10 % der Transkription in den mit pMA3 transfizierten Zellen zurückgeht, bleibt die *LCK* Expression unverändert. In Jurkat Zellen ist die Expression des *LCK* Gens offensichtlich nicht abhängig von *NBS1*.

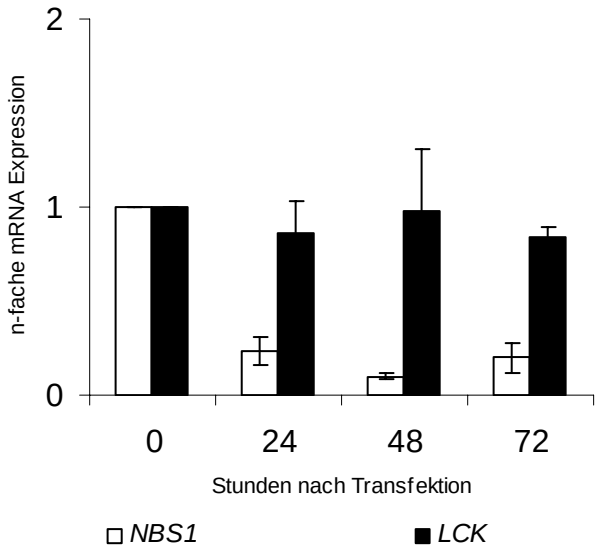


Abbildung 19: In Jurkat Zellen führt eine verminderte *NBS1* Expression nicht zu einer Verminderung der *LCK* Expression. Jurkat Zellen wurden mit Vektoren (pMA3 (zur Kontrolle) oder pMA4) transfiziert. Die Vektoren enthalten einen *EGFP* ORF, was ein Aussortieren der transfizierten Zellen mittels FACS ermöglicht. Nach den im Diagramm angegebenen Zeiten wurde die *NBS1* und *LCK* Expression mit quantitativer PCR analysiert und auf die Expression nach Transfektion mit dem Kontrollvektor pMA3 normalisiert.

Die mögliche Rolle von *NBS1* auf die *LCK* Expression in verschiedenen Zelltypen wird genauer im Diskussionsteil betrachtet.

3.3.2 Apoptoseverhalten

Besonders im Hinblick auf die erhöhte Strahlensensitivität ist das Apoptoseverhalten der *NBS1*$^{-/-}$ Zellen interessant. *LCK* ist an der Regulation der Apoptose beteiligt und zwar insbesondere in T-Zellen. So ist die Kinase essentiell für den „activation-induced T cell death (AICD)“, eine Form von Apoptose, die nach Aktivierung von T-Zellen induziert werden kann (Yu, Levin et al. 2004). Weniger T-zellspezifisch scheint die Rolle von *LCK* in der Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Zytostatika wie Taxol oder 5-Fluorouracil (5-FU) zu sein. *LCK* defiziente Jurkat Zellen induzieren nur noch vermindert/ verlangsamt Apoptose nach der Behandlung mit diesen Chemikalien (Gruber, Henkel et al. 2004). Zunächst wurden deshalb für das Zellpaar P111/ P112 Zeitkinetiken (wie in Gruber *et al.*(Gruber, Henkel et al. 2004); (0 h- 48 h nach Behandlung) für den Verlauf der Apoptoseinduktion gemessen, und zwar nach Behandlung mit Taxol und 5-FU.

Nach Behandlung mit Taxol ist kein Unterschied in der Apoptoseinduktion festzustellen, nach 5-FU Behandlung induzieren die *NBS1*$^{+/-}$ Zellen die Apoptose früher als die *NBS1*$^{-/-}$ Zellen. 24 h nach Behandlung habe 3 % der *NBS1*$^{-/-}$ Zellen Apoptose induziert, jedoch bereits 12 % der *NBS1*$^{+/-}$ Zellen (Daten nicht gezeigt).

Um zu analysieren, ob die *NBS1*$^{-/-}$ Zellen möglicherweise auf Grund ihrer verminderten *LCK* Expression nach 5-FU Behandlung eine reduzierte Induktion von Apoptose zeigen, wurde die Induktion der Apoptose in Abhängigkeit von der 5-FU Konzentration bestimmt (siehe Abbildung 20). 48 h nach der Behandlung befinden sich 7 % der Zellen der Linie P112 in Apoptose, in der Linie P111 16 %. Im Zellpaar P306/ P247 ist kein signifikanter Unterschied in der Induktion der Apoptose nach 5-FU Behandlung festzustellen. Die verminderte LCK Expression in B-Zellen führt also nicht zu dem in der Literatur für T-Zellen beschriebenen Phänotyp.

Ebenfalls wurde für T-Zellen gezeigt, dass eine fehlende *LCK* Expression die Einleitung von Apoptose nach ionisierender Bestrahlung inhibiert (Belka, Gruber et al. 2003). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass gerade die strahlensensitiven *NBS1*$^{-/-}$ Zellen nach γ-Bestrahlung vermehrt in Apoptose gehen (siehe nächstes Kapitel).

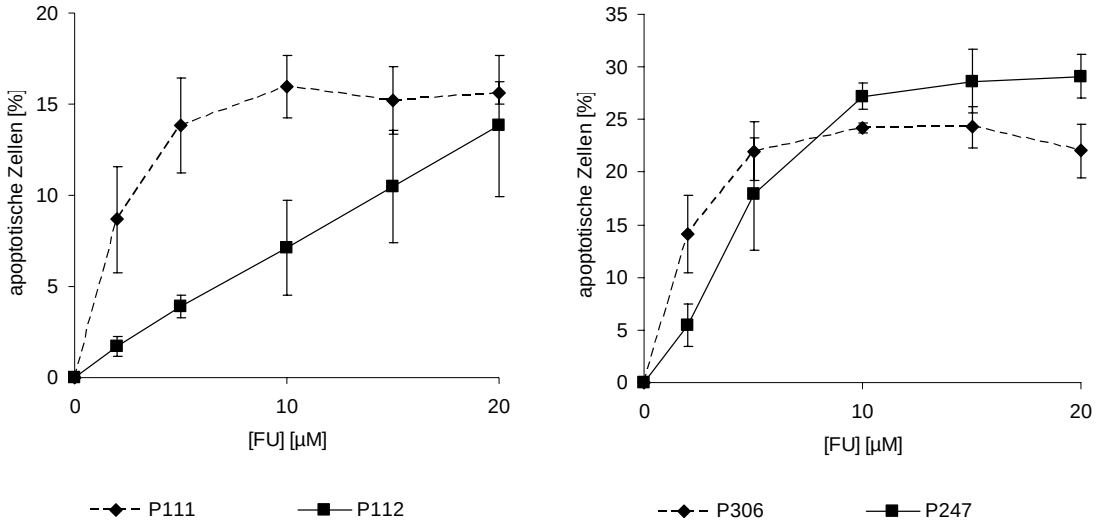


Abbildung 20: Die beiden Zellpaare verhalten sich unterschiedlich in der Induktion der Apoptose nach 5-FU Behandlung. Die Zellen der Linie P111 (*NBS1*$^{+/-}$) reagieren sensitiver auf Behandlung mit 5-FU im Vergleich zu Zellen der Linie P112 (*NBS1*$^{-/-}$) in Bezug auf die Apoptoseinduktion. Im anderen Zellpaar sind zwischen den Linien keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Die unterschiedliche Reaktion auf 5-FU Behandlung der Linien P111/ P112 ist also nicht auf die *NBS1* Mutation und die mit ihr verbundene verminderte *LCK* Expression zurückzuführen. Die Zahl der apoptotischen Zellen wurde 48 h nach Behandlung durchflußzytometrisch als SubG1-Population bestimmt.

3.4 Strahleninduzierte Apoptose als eine Ursache für die erhöhte Strahlensensitivität in NBS Zellen

3.4.1 Strahleninduzierte Apoptose in *NBS1$^{-/-}$* Zellen

Wie in der Einleitung erwähnt, wird die Strahlensensitivität einer Zelle von unterschiedlichen Faktoren, wie der Reparaturkapazität von DNA Schäden, Zellzyklusregulation, aber auch durch die Einleitung des programmierten Zelltods nach Bestrahlung bestimmt.

Um das Apoptoseverhalten nach ^{137}Cs–γ-Bestrahlung zu untersuchen, wurden alle vier Zelllinien mit einer Dosis von 0- 6 Gy bestrahlt und die apoptotischen Zellen als SubG1-Population durchflußzytometrisch bestimmt (siehe Abbildung 21). Die SubG1-Methode erwies sich gegenüber der Färbung apoptotischer Zellen mit FITC-markierten AnnexinV und Propidiumiodid als geeigneter, da bei der AnnexinV Färbung gerade bei den *NBS1$^{+/-}$* lymphoblastoiden Zelllinien keine deutliche Trennung der drei Populationen (gesund, apoptotisch, nekrotisch) zu erhalten ist.

Aus der Abbildung 21 wird ersichtlich, dass die *NBS1$^{-/-}$* Zellen nach Bestrahlung stärker Apoptose induzieren, als die verwandten *NBS1$^{+/-}$* Zellen. Für die Dosis 4 Gy ist beim Zellpaar P111/ P112 die Anzahl der apoptotischen Zellen in der Kultur der P112 Zellen gegenüber der Zahl der apoptotischen Zellen in der Kultur der P111 Zellen um den Faktor 2,5 erhöht. Für das andere Zellpaar (P306/ P247) ergibt sich ein Faktor von 1,8.

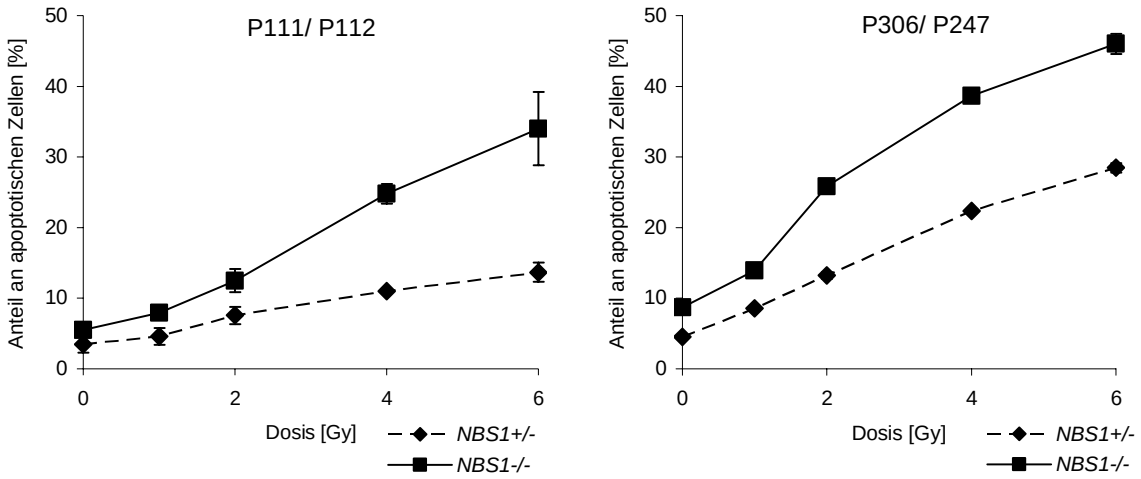


Abbildung 21: Induktion der Apoptose nach Bestrahlung: In beiden Zellpaaren induzieren die *NBS1*$^{-/-}$ Zellen nach γ-Bestrahlung vermehrt Apoptose. Die apoptotischen Zellen wurden als SubG1 Population durchflußzytometrisch 48 h nach der Bestrahlung analysiert.

Um den apoptotischen Phänotyp der Zellen der SubG1 Population zu verifizieren, wurden zwei weitere biochemische Marker für diesen Phänotyp analysiert: Caspase-3 Aktivität und PARP-1 Spaltung. Die Effektorcaspase Caspase-3 wird im Rahmen der Einleitung der Apoptose von Initiatorcaspasen, wie Caspase-8 und -9 aktiviert. Ihre Aktivität ist ein Kennzeichen apoptotischer Zellen (Philchenkov 2004; Riedl und Shi 2004). Wie aus Abbildung 22(A) erkenntlich, ist die Aktivität dieser Caspase in zellulären Zellextrakten der *NBS1*$^{-/-}$ Zellen 24 h nach der Bestrahlung gegenüber der Aktivität in Extrakten der *NBS1*$^{+/-}$ Zellen deutlich erhöht. Es ergibt sich für die Extrakte der P112 Zellen eine 3-fache Erhöhung der Aktivität gegenüber den Extrakten der P111 Zellen, für die Extrakte der P247 Zellen eine 5-fache Erhöhung der Aktivität gegenüber den Extrakten der P306 Zellen.

Ein weiterer Marker für Apoptose ist die Spaltung des PARP-1 Proteins (Soldani und Scovassi 2002). Das Auftreten eines Spaltproduktes (80 kDa) kann 4 h und 24 h nach der Bestrahlung in Extrakten der *NBS1*$^{-/-}$ Zellen nachgewiesen werden, nicht jedoch in Extrakten der *NBS1*$^{+/-}$ Zellen. Die Abbildung 22(B) zeigt ein typisches Westernblot Experiment für das Zellpaar P111/ P112 (Daten für das andere Zellpaar nicht gezeigt).

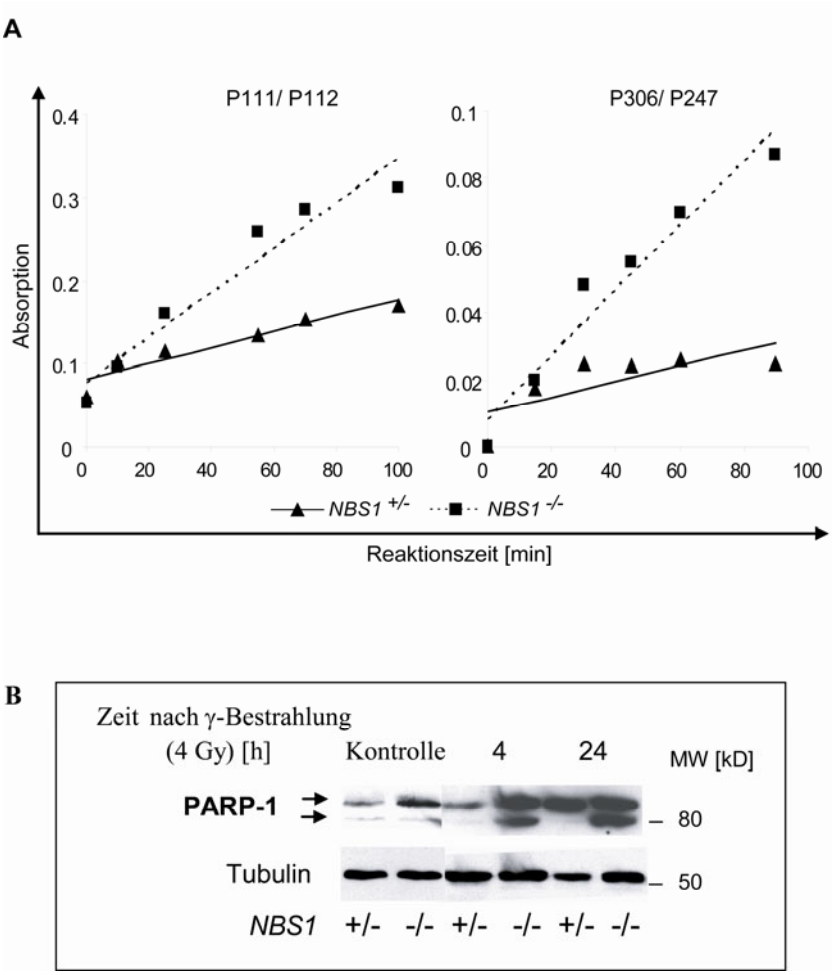


Abbildung 22: Verifizierung des apoptotischen Phänotyps durch zwei unabhängige, biochemische Methoden: Caspase-3 Aktivität (A) und PARP-1 Spaltung (B). 24 h nach Bestrahlung mit 4 Gy ist die Aktivität der Caspase-3 in Extrakten der *NBS1*$^{-/-}$ Zellen gegenüber Extrakten der *NBS1*$^{+/-}$ Zellen deutlich erhöht, was an dem Steigungsunterschied der beiden Geraden zu erkennen ist (A). Bereits 4 h nach der Bestrahlung ist in den *NBS1*$^{-/-}$ Zelllinien (hier für die Linie P112 gezeigt) das gespaltene PARP-1 Protein nachweisbar, nicht aber in den *NBS1*$^{+/-}$ Linien. Die Detektion des Proteins Tubulin dient als Ladekontrolle (B).

3.4.2 Beteiligung eines p53-vermittelten Weges

Strahleninduzierte Apoptose kann durch einen p53 vermittelten Weg induziert werden, der abhängig von ATM ist. Dieser Weg scheint aber laut Literatur in *NBS* Zellen gestört zu sein (Jongmans, Vuillaume et al. 1997; Matsuura, Balmukhanov et al. 1998; Little, Nagasawa et al. 2002). Abweichend von diesen Daten, können wir zeigen, dass nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy das Tumorsuppressorprotein p53 sowohl in den *NBS1*$^{-/-}$ Linien, als auch in den *NBS1*$^{+/-}$stabilisiert und phosphoryliert (siehe Abbildung 23A).

Werden die Zellen 2 h vor der Bestrahlung mit dem Transkriptionsinhibitor Actinomycin D behandelt, so induzieren die *NBS1*$^{-/-}$ Linien nach Bestrahlung weiterhin vermehrt Apoptose. Die wirksame Konzentration des Inhibitors wurde an Zellen der Linie P111 ermittelt, wobei die Induktion des Gens *CDKN1A*, dessen Expression in den *NBS1*$^{+/-}$ Zellen nach Bestrahlung induziert wird, als Reporter dient. Bei der verwendeten Konzentration von 0,1 µg/ml findet keine Induktion des Gens mehr statt (Abbildung 23B). Der Unterschied in der Aktivierung der Caspase-3 in den *NBS1*$^{-/-}$ und *NBS1*$^{+/-}$ Zellen bleibt aber bestehen, was an den Aktivitäten in den zellulären Extrakten der Zellen gemessen werden kann (Abbildung 23C). Nach Actinomycin D Behandlung und Bestrahlung ist die Caspase-3 Aktivität in zellulären Extrakten der P112 Zellen verglichen mit Extrakten der P111 Zellen um den Faktor 7 erhöht (Faktor 16 für das andere Zellpaar).

Der Unterschied in der Induktion der Apoptose nach Bestrahlung ist also offensichtlich unanhängig von der Stabilisierung oder Phosphorylierung von p53 und von einer möglichen Induktion von p53 kontrollierten Genen.

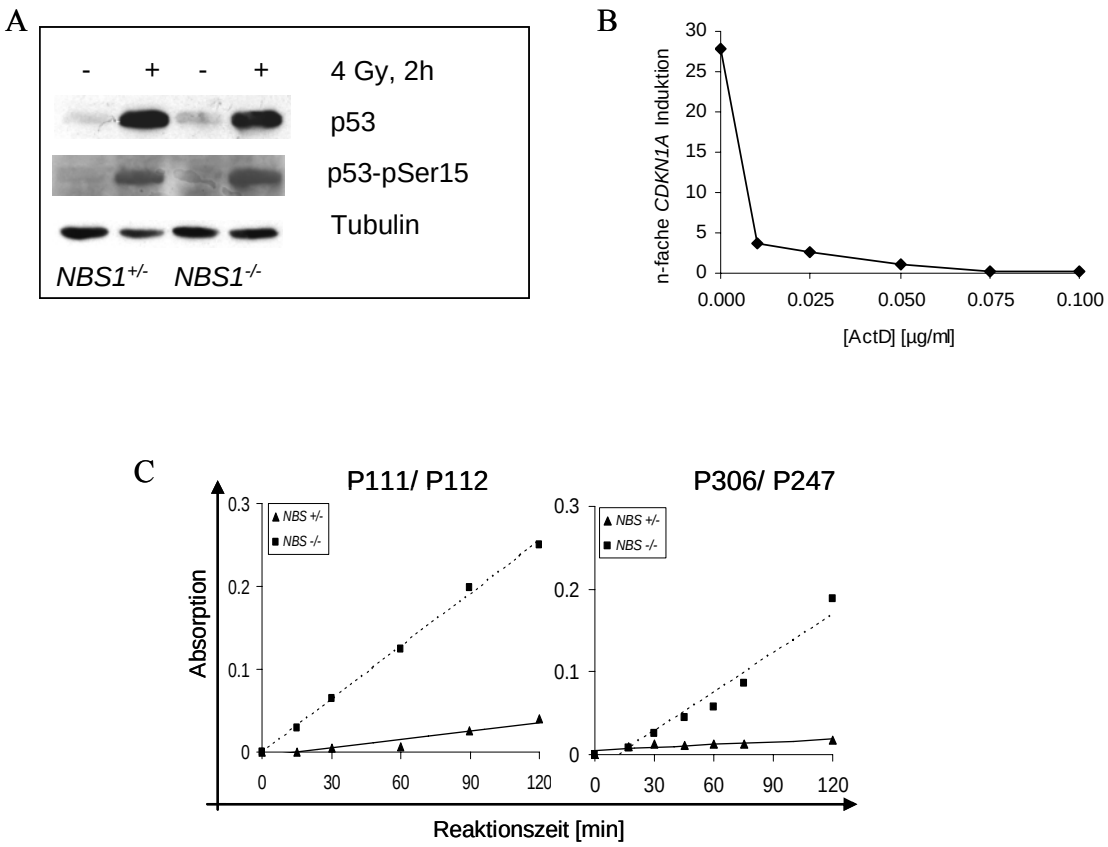


Abbildung 23: Das Protein p53 wird 2 h nach Bestrahlung mit 4 Gy sowohl in den *NBS1*$^{-/-}$ Linien stabilisiert und phosphoryliert, als auch in den *NBS1*$^{+/-}$ Linien (A). Um auszuschließen, dass das unterschiedliche apoptotische Verhalten der *NBS1*$^{+/-}$ und *NBS1*$^{-/-}$ Zellen von der Transkription p53 kontrollierter Gene abhängt, wurde die Caspase-3 Aktivität in zellulären Extrakten 24 h nach Bestrahlung mit 4 Gy gemessen, wobei die Zellen 2 h vor der Bestrahlung mit 0,1 µg/ml des Transkriptionsinhibitors Actinomycin D behandelt wurden (C). Die Wirksamkeit des Inhibitors ist exemplarisch für die Zelllinie P111 gezeigt, wobei die Induktion der Expression von *CDKN1A* nach Bestrahlung als Reporter dient (B). Actinomycin D induziert bereits ohne Bestrahlung Apoptose, so dass die hier (C) gezeigten Werte der Absorption die Werte der Absorption sind, die sich nach rechnerischer Korrektur um die Werte der Absorption ohne Bestrahlung ergeben.

3.4.3 Beteiligung der Todesrezeptoren

Da der p53 abhängige, mitochondriale Weg zur Einleitung der Apoptose offensichtlich nicht für den beobachteten Unterschied verantwortlich ist, wurde eine mögliche Beteiligung der Todesrezeptoren an der Vermittlung der strahleninduzierten Apoptose untersucht.

Einen Hinweis auf eine Beteiligung der Todesrezeptoren ist die Aktivität der über diese Rezeptoren aktivierte Caspase-8. Wie die Abbildung 24A zeigt, ist die Caspase-8 Aktivität 24 h nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy in zellulären Extrakten der *NBS1*$^{-/-}$ Zellen gegenüber der Aktivität in Extrakten der *NBS1*$^{+/-}$ Zellen signifikant erhöht. Die gemessene Aktivität ist spezifisch für Caspase-8, weil sie durch Zugabe eines Caspase-8 Inhibitors zum Reaktionsansatz inhibiert werden kann (Abbildung 24B).

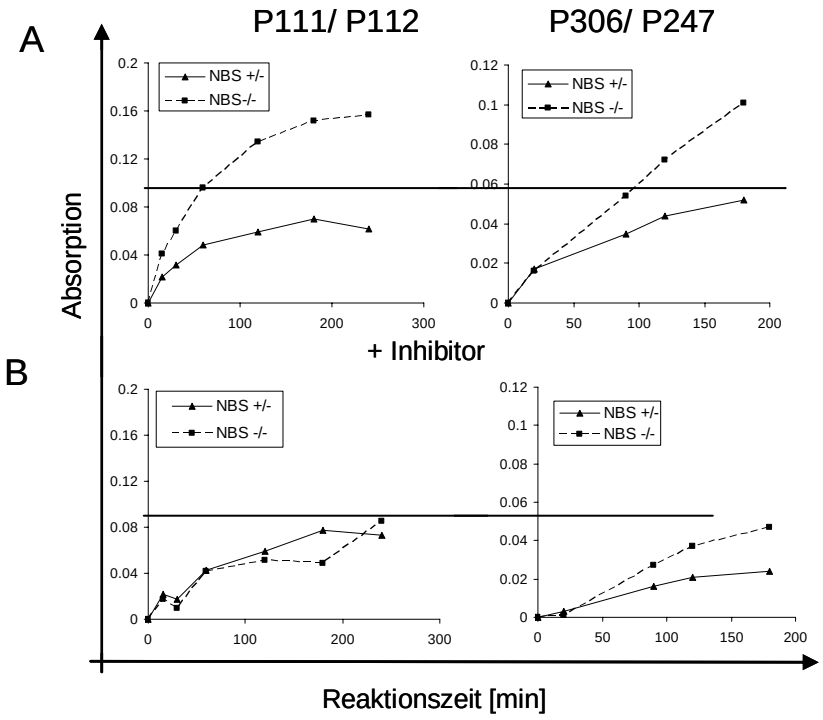


Abbildung 24: Messung der Aktivität der todesrezeptorassoziierten Caspase-8. 24 h nach Bestrahlung mit 4 Gy ist die Aktivität der Caspase-8 in zellulären Extrakten der *NBS1*$^{-/-}$ Zellen gegenüber Extrakten der *NBS1*$^{+/-}$ Zellen erhöht (A). Durch Zugabe eines Caspase-8 Inhibitors lässt sich der Anteil der unspezifischen Spaltung des Substrats ausmachen (B). Die waagrechten Linien markieren die Schwelle, die auch durch Umsetzung des Substrats durch unspezifische Reaktionen erreicht wird. Ohne Inhibitorbehandlung wird diese Schwelle 100 min nach Start der Reaktion in Extrakten der *NBS1*$^{-/-}$ Linien überschritten.

Werden die Zellen 2 h vor der Bestrahlung mit einem zellpermeablen Caspase-8 Inhibitor behandelt, so kann die strahleninduzierte Spaltung des PARP-1 Proteins verhindert werden, was die Bedeutung der Caspase-8 Aktivität für den Apoptoseweg in den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen verdeutlicht (Abbildung 25).

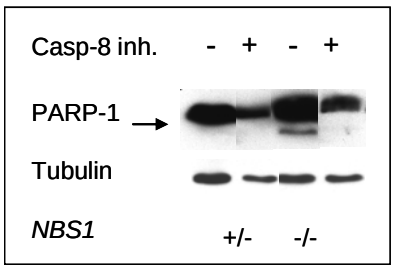


Abbildung 25: Die Spaltung von PARP-1 kann durch die Zugabe eines zellpermeablen Caspase-8 Inhibitors (Casp-8 inh.) vor der Bestrahlung verhindert werden. In den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen (hier für die Linie P112 gezeigt) ist die Spaltung des PARP-1 Proteins 24 h nach Bestrahlung zu erkennen. Diese Spaltung lässt sich durch Zugabe des Inhibitors verhindern.

3.4.4 Rolle von CD95 an der Induktion der Apoptose

Die Rolle der zwei prominentesten Vertreter der Todesrezeptoren (TNFR1 und CD95) für die Induktion der Apoptose wurde in dieser Arbeit untersucht. Alleine bei Behandlung mit einem stimulierenden CD95 Antikörper reagieren die *NBS1*$^{-/-}$ Zellen mit einer höheren Induktion der Apoptose als die verwandten *NBS1*$^{+/-}$ Zellen (Abbildung 26A). Dies ist nicht der Fall bei der Behandlung mit TNFα (Ligand für TNFR1 (Bhardwaj und Aggarwal 2003)). Mit diesem Cytokin kann Apoptose in den verwendeten lymphoblastoiden Zellen nicht induziert werden. Deshalb wurde die Rolle des CD95 Rezeptors für die Induktion der strahleninduzierten Apoptose untersucht.

Für die Konzentration 100 ng/ml des agonistischen CD95 Antikörpers ist in dem Zellpaar P111/ P112 die Apoptose 24 h nach Behandlung in den P112 Zellen um den Faktor 2,0 erhöht, in dem Zellpaar P306/ P247 um den Faktor 2,6 (Daten nicht gezeigt). Jedoch ist der Unterschied in der Induktion der Apoptose mit einem stimulierenden CD95 Antikörper sehr gering, wenn der hohe relative Standardfehler von 58% für die P111 Zellen einbezogen wird.

Allerdings zeigt sich in einer zweiten unabhängigen Methode, dass ein deutlicher Unterschied im Zeitpunkt der Einleitung der CD95 vermittelten Apoptose besteht. 1 h nach Behandlung mit dem agonistischen Antikörper ist das gespaltenen PARP-1 Fragment in den Extrakten der Zellen der Linie P112 (*NBS1*$^{-/-}$) zu detektieren, in den Extrakten der Zellen der Linie P111 (*NBS1*$^{+/-}$) erst 2 h nach der Behandlung (Abbildung 26B).

Werden die Zellen 2 h vor der Bestrahlung mit einem inhibitorischen Antikörper gegen den CD95 Rezeptor behandelt und 24 h nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy die Aktivität der Caspase-8 in den zellulären Extrakten bestimmt, so ist keine spezifische Aktivität dieser Caspase mehr zu messen (Abbildung 26C). Ebenfalls ist eine PARP-1 Spaltung verhindert (Abbildung 26D).

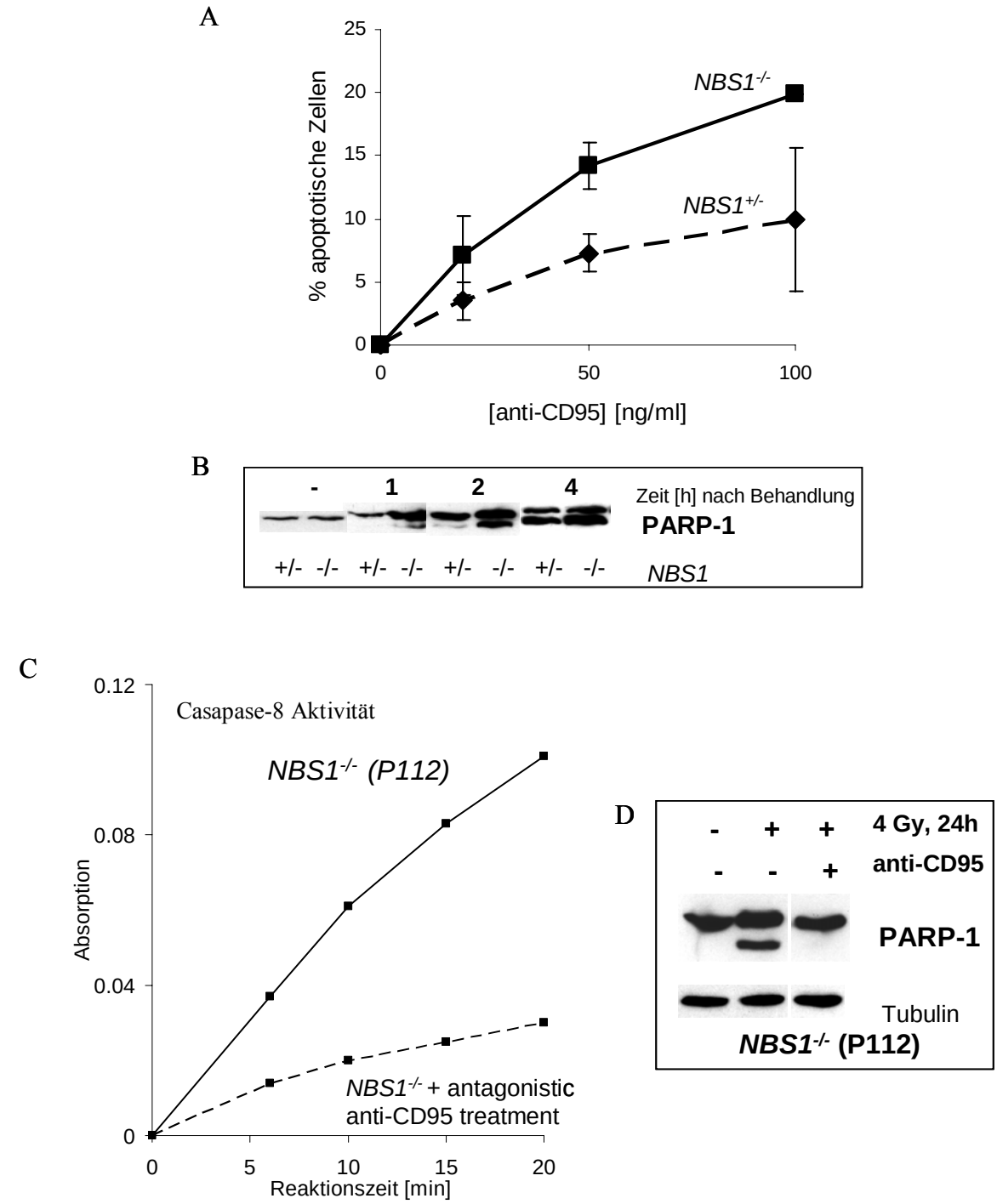


Abbildung 26: Der CD95 Rezeptor ist an der erhöhten strahleninduzierten Apoptose in *NBS1*$^{-/-}$ Zellen beteiligt. Bereits nach Behandlung mit einem den Rezeptor stimulierenden Antikörper reagieren die P112 Zellen mit vermehrter Einleitung der Apoptose (A). Die Apoptose wird zusätzlich noch früher als in den P111 Zellen eingeleitet, was an dem ersten Auftreten der PARP-1 Spaltung gesehen werden kann (B). Eine Behandlung der Zellen vor der Bestrahlung mit einem antagonistischen Antikörper gegen den CD95 Rezeptor resultiert in einer Inhibition der Caspase-8 Aktivität (C). Insbesondere ist durch Behandlung mit einem antagonistischen Antikörper die strahlungsinduzierte Spaltung des PARP1-Proteins vollständig inhibierbar (D).

Um eine direkte Beteiligung des CD95 Rezeptors bei der strahleninduzierten Apoptose nachzuweisen, wurde in Zusammenarbeit mit S. Mörtl, Institut für Strahlenbiologie, das Clustering des CD95 Rezeptors nach Bestrahlung (4 Gy, 1 h) fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen (Abbildung 27), was die Aktivierung dieses Rezeptors nach der Bestrahlung in den *NBS1*$^{-/-}$ Linien zeigt.

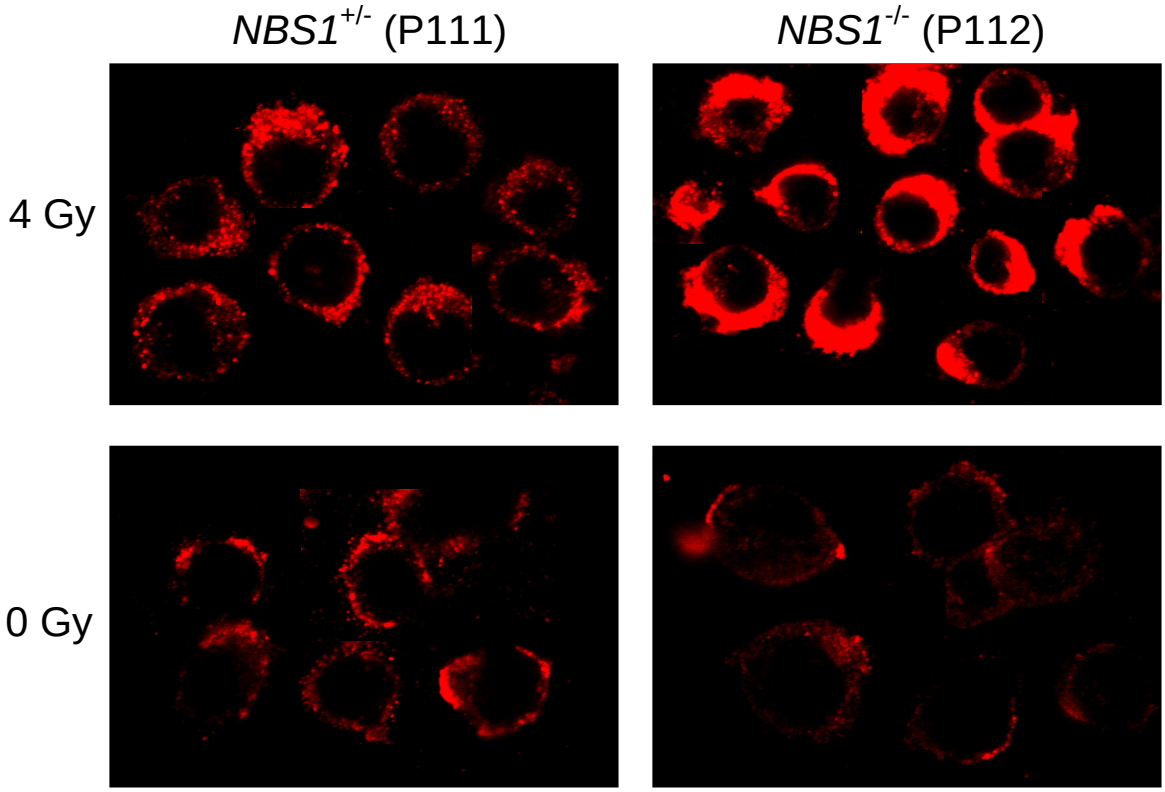


Abbildung 27: Der Rezeptor CD95 aggregiert nach Bestrahlung in den Zellen der Linie P112 zu stark fluoreszierenden Aggregaten. 1 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy wurde in den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen und *NBS1*$^{+/-}$ Zellen das Clustering des Rezeptors CD95 mit einer Immunfärbung detektiert. Es sind nur die Bilder für das P111/ P112 Paar gezeigt, das andere Zellpaar verhält sich analog.

Eine und zwei Stunden nach der Bestrahlung wurde die Expression des Gens für CD95 (*TNFRSF6*) mit quantitativer PCR bestimmt, um festzustellen, ob die beschriebene Aggregierung des Rezeptors auf eine strahleninduzierte, erhöhte Expression von *TNFRSF6* zurückzuführen ist. Eine Stunde nach der Bestrahlung ist in allen vier Zelllinien keine signifikante Erhöhung der *TNFRSF6* Expression festzustellen (eher eine leichte Abnahme), mit Ausnahme der Linie P306, deren Zellen eine leichte Induktion der Expression um den Faktor 1,7 zeigen. Dieses wird allerdings als nicht signifikant angesehen. Für die Zellen der Linie P111 beträgt der Induktionsfaktor 0,9, für die Zellen der Linie P112 0,5 und für Zellen der Linie P247 1,0. Allerdings beginnen sich die Zellpaare nach längerer Zeit

(ab 2 h) voneinander in der *TNFRSF6* Expression zu unterscheiden, was in Abbildung 28 dargestellt ist.

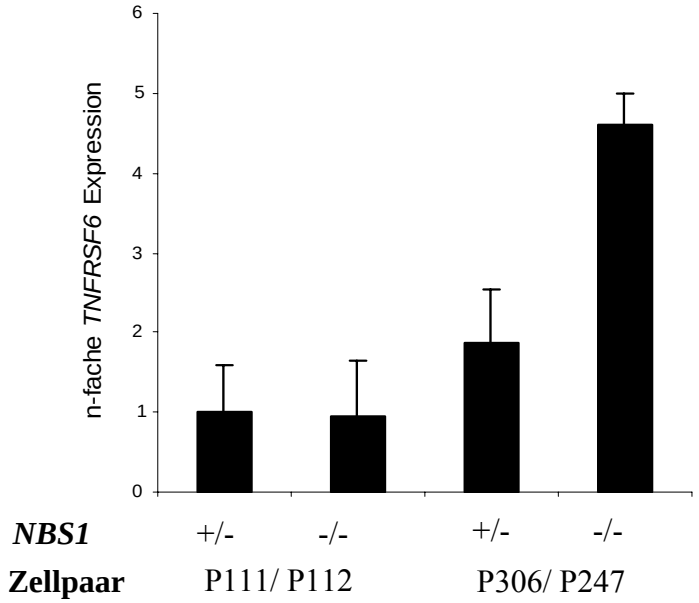


Abbildung 28: Zwei Stunden nach Bestrahlung (4 Gy) beginnen sich die Zellpaare zu unterscheiden. Eine Stunde nach der Bestrahlung ist in allen vier Zelllinien keine Induktion der *TNFRSF6* Expression zu detektieren (siehe Text). Zwei Stunden nach Bestrahlung ist ein Unterschied in der Regulation der *TNFRSF6* Expression zwischen den Paaren festzustellen. Während beim Zellpaar P111/ P112 auch zwei Stunden nach der Bestrahlung in keiner Linie eine Induktion des *TNFRSF6* Gens festzustellen ist, ist eine signifikante Induktion in Zellen der Linie P247 festzustellen.

In den *NBS1*$^{-/-}$ Linien wird der CD95 Rezeptor nach γ-Bestrahlung also stärker aktiviert als in den *NBS1*$^{+/-}$ Linien, was zu einer erhöhten Apoptoserate in den *NBS1*$^{-/-}$ Zelllinien führt.

3.5 Entwicklung eines Vektorsystems zur simultanen Bestimmung der Reparaturvorgänge an einem sequenzspezifisch induziertem Doppelstrangbruch

3.5.1 Vorüberlegungen

Beide schon in der Einleitung (siehe S. 22ff) erwähnten Systeme basieren auf zwei unterschiedlich mutierten *egfp* Allelen, die durch ein homologes Rekombinationsereignis zu einem *EGFP* Allel rekombiniert werden können, welches für ein funktionelles, grün fluoreszierendes Protein codiert. Die beiden Allele werden durch eine Puromycinresistenzkassette mit einem SV40 Promotor getrennt (pGrec). Das Gen, welches für die Puromycinresistenz codiert, wurde durch einen HindIII-Verdau aus dem Vektor unter Beibehaltung des Promotors entfernt und durch einen Reporter für ein NHEJ Ereignis

ersetzt. Gleichzeitig wurden hierbei zwei Erkennungssequenzen für die I-SceI Endonuklease generiert.
Bei dem Reportergen für ein NHEJ Ereignis handelt es sich um ein Gen für ein rot fluoreszierendes Protein (DsRed2), welches als SmaI/ HpaI Fragment aus dem Vektor pDsRed2-N1 (Firma *Clontech*) verwendet wurde.

Beim „OFF-System“ (pDSOFF) ist das *DsRed2* Allel direkt von zwei I-SceI Erkennungsstellen flankiert, durch *I-SceI* Expression geht das Allel verloren und die Zellen verlieren ihre rote Fluoreszenz.

Beim „ON-System“ ist nicht das DsRed2 Allel direkt von zwei I-SceI Erkennungsstellen flankiert, sondern das Allel wird von dem SV40 Promotor durch einen kurzen Non-Sense ORF getrennt, welcher die Translation des DsRed2 Proteins verhindert. Dieser Non-Sense ORF enthält zwei I-SceI-Erkennungsstellen. Durch *I-SceI* Expression wird der kurze ORF zerstört und die Zellen können nach einem NHEJ Ereignis das rot fluoreszierende Protein translatieren.

Damit der Reporter nicht mit den beiden *egfp* Allelen durch ein HR Ereignis interferiert, darf er keine Sequenzhomologie zu diesen aufweisen, weshalb auch keine *YFP* („yellow fluorescent protein“) oder *BFP* („blue fluorescent protein“) ORFs als Reporter eingesetzt wurden. Wie das Sequenzalignment in Abbildung 29 zeigt, besteht keine erkennbare Homologie zwischen einem *EGFP* Allel und einem *DsRed2* Allel.

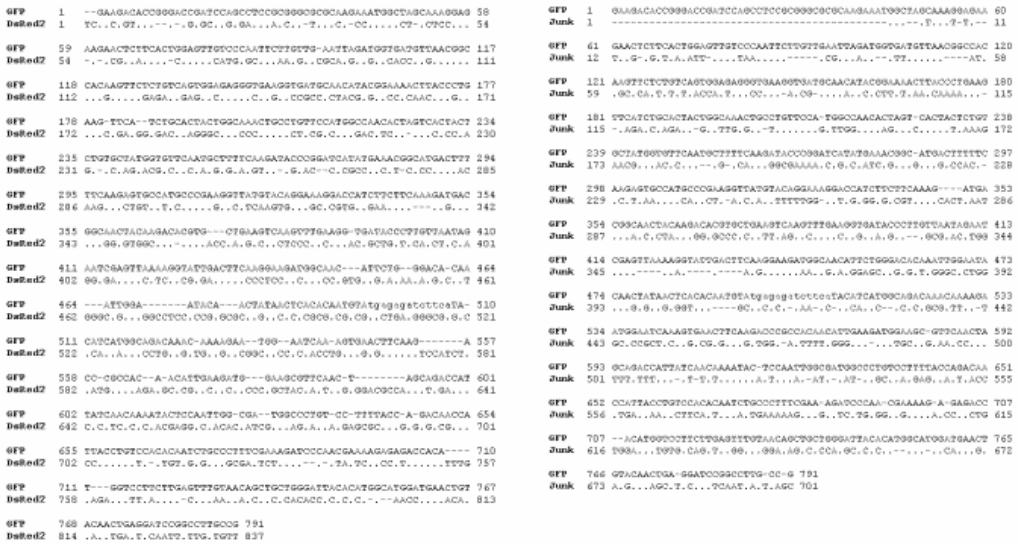


Abbildung 29: Sequenzalignment der ORFs für *EGFP* und *DsRed2*, zur Demonstration, dass keine Abschnitte größerer Homologien zwischen diesen beiden ORFs bestehen. Links ist das Alignment der Sequenzen der *EGFP* (GFP) und *DsRed2* Allele dargestellt, rechst ein Alignment eines *EGFP* Allels und einer zufälligen Vektorsequenz, zur Verdeutlichung, dass keine Homologie zwischen den *EGFP* und *DsRed2* Allelen besteht.

Insbesondere für das „ON-System“ ist es wichtig, dass nach der Induktion der Doppelstrangbrüche die Enden nicht soweit degradiert werden, dass beispielsweise der SV40 Promotor verloren geht. Um das Ausmaß der Degradation abzuschätzen, wurde der Vektor pGrec mit HindIII linearisiert und humane Fibroblasten (GM637) mit dem gelgereinigten Vektorrückrat transfiziert. Der Vektor pGrec enthält EBNA-1/ OriP Elemente, die ein episomales Halten des Konstruktes in der Zelle ermöglichen (diese Elemente sind in den Vektoren des „ON-Systems“ und des „OFF-Systems“ nicht mehr vorhanden). Eine Hygromycinresistenzkassette ermöglicht die Selektion auf plasmidtragende Zellen. 18 solcher Klone wurden vereinzelt weiter expandiert, die genomische DNA wurde extrahiert. Die DNA wurde in eine PCR Reaktion eingesetzt. Dabei waren die Oligonukleotide so beschaffen, dass bei verlustfreier Endverknüpfung der beiden Enden ein Produkt mit der Länge von ca. 500 Basenpaaren entsteht. Dieses Produkt lässt sich bei korrekter Endverknüpfung mit HindIII in zwei Produkte mit einer Länge von ca. 260 und ca. 240 Basenpaaren schneiden. Die Abbildung 30 zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments. Von 18 expandierten Klonen kann bei 16 Klonen das erwartete PCR Produkt mit einer Länge von 500 bp detektiert werden. Die drei Klone, von denen kein PCR Produkt nachgewiesen werden kann, haben das Plasmid entweder über homologe Rekombination repariert, haben es in das Genom integriert, oder haben die Enden so weit degradiert, dass die Oligonukleotidbindungsstellen verloren gehen. Die Qualität der DNA Präparation wurde über die mögliche Amplifikation der Hygromycinresistenzkassette überprüft (Daten nicht gezeigt).

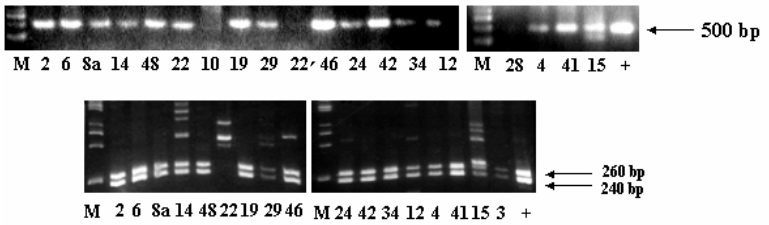


Abbildung 30: PCR-Produkte der linearisiert in Fibroblasten eingebrachten Plasmide. Oben ist das unverdaute 500 bp lange Fragment gezeigt, unten der HindIII Verdau der Produkte. In den meisten Fällen kann das PCR Produkt vollständig verdaut werden. M: Größenmarker. Zahlen unter den Spuren geben die Nummer des expandierten Klons an (Klon 22': Ladefehler), +: Positivkontrolle (*in vitro* endverknüpftes Plasmid)

Die Abbildung zeigt, dass die meisten Plasmide völlig korrekt verknüpft worden sind, was in einem totalen Verdau des PCR Produktes zu erkennen ist. Nur in einem Fall scheint eine kleine Deletion den Verdau des PCR Produktes zu verhindern (Klon 22). In einigen Fällen (Klone 14, 46, 15) kann das PCR Produkt nicht vollständig verdaut werden, was wahrscheinlich mit einem in der Zelle vorkommenden Pool von Plasmiden erklärt werden kann, die unterschiedlich repariert wurden.

Eine ausgedehnte Degradierung über den SV40 Promotor bis hin zu den *eGFP* Allelen ist also nicht zu erwarten.

3.5.2 Das „OFF-System"

Da es auch nach mehrmaligen Versuchen nicht gelungen ist, Vektoren in das Genom der GM637 oder in die lymphoblastoiden Zellen zu integrieren, wurde zur Etablierung des Systems die Hamsterfibroblastenlinie V79B verwendet.

Zunächst wurde in einem Vorversuch überprüft, ob das pDSOFF Konstrukt *in vivo* I-SceI vermittelt geschnitten werden kann. Dazu wurden V79B-Zellen mit dem pDSoff Plasmid transfiziert und zwar gleichzeitig entweder mit einem *I-SceI* Expressionsplasmid (I-SceI(+)) oder mit einem *I-SceI* Scheinexpressionsplasmid (I-SceI(-)) in unterschiedlichen molaren Verhältnissen. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen durchflußzytometrisch auf den Anteil an roten Zellen überprüft. Wird der *DsRed2* Leserahmen I-SceI vermittelt herausgeschnitten, so werden weniger rote Zellen erwartet als in dem Kontrollansatz. Dass dies tatsächlich der Fall ist, zeigt die Abbildung 31.

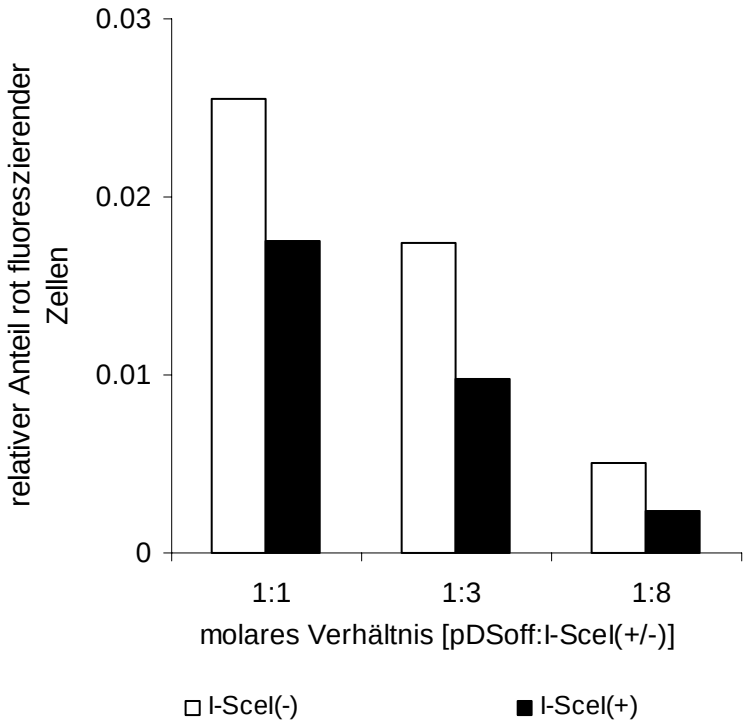


Abbildung 31: Der Leserahmen für das rot fluoreszierende Protein kann *I-SceI* vermittelt *in vivo* aus dem Konstrukt pDSoff herausgeschnitten werden. Im gezeigten Versuch wurden Hamsterfibroblasten (V79B) mit pDSoff und einem Expressionsplasmid für *I-SceI* (I-SceI(+)), bzw. mit einem Kontrollplasmid (I-SceI(-)) cotransfiziert und 48 h später die relative Anzahl der roten Zellen in der Population bestimmt. Die Transfektionseffizienz bei diesem Versuch betrug 4,9 %. Die Plasmide wurde in unterschiedlichen molaren Verhältnissen eingesetzt, die Gesamtmasse wurde konstant gehalten (3,1 µg). Die eingesetzten Mengen im Detail, immer pDSoff/ I-SceI(+/-) in fmol/ fmol: 0,3/ 0,3; 0,2/ 0,6; 0,1/0,8.

Das System ist allerdings nicht geeignet, um NHEJ Ereignisse zu detektieren, wie die Abbildung 32 zeigt. V79B Zellen, die mit dem XmnI linearisierten Vektor transfiziert wurden, wurden auf Hygromycinresistenz selektiert. Die Kolonien wurden vereinzelt expandiert und da die Kolonie schon bei mikroskopischer Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop nicht einheitlich rot fluoreszierte, wurden die rot fluoreszierenden Zellen in Zusammenarbeit mit W. Beisker (Institut für Toxikologie) durchflußzytometrisch aussortiert und erneut klonal expandiert. Die Abbildung zeigt die anschließende durchflußzytometrische Analyse der erneut expandierten Klone. Hier sind erneut maximal 55% der Zellen der Kolonie (Klon V79B C9) rot fluoreszierend. Der Anteil an rot fluoreszierenden Zellen liegt in den anderen Klonen bei 48%-50%.

Anzunehmen ist, dass die Expression des rot fluoreszierenden Proteins toxisch ist und deshalb Zellen in der Kultur einen Selektionsvorteil besitzen, sobald sie das Protein nicht

mehr exprimieren. Für die Toxizität spricht, dass es erst 2004 gelungen ist, eine transgene Maus zu generieren, die eine Variante des rot fluoreszierenden Proteins ubiquitär exprimiert. Dies ist mit dem ursprünglichen DsRed Protein, vermutlich wegen seiner Toxizität, nicht gelungen (Vintersten, Monetti et al. 2004). Deshalb wurde mit diesem System nicht weitergearbeitet und ein System entwickelt, bei dem erst nach einem NHEJ Ereignis die Expression des rot fluoreszierenden Proteins induziert wird.

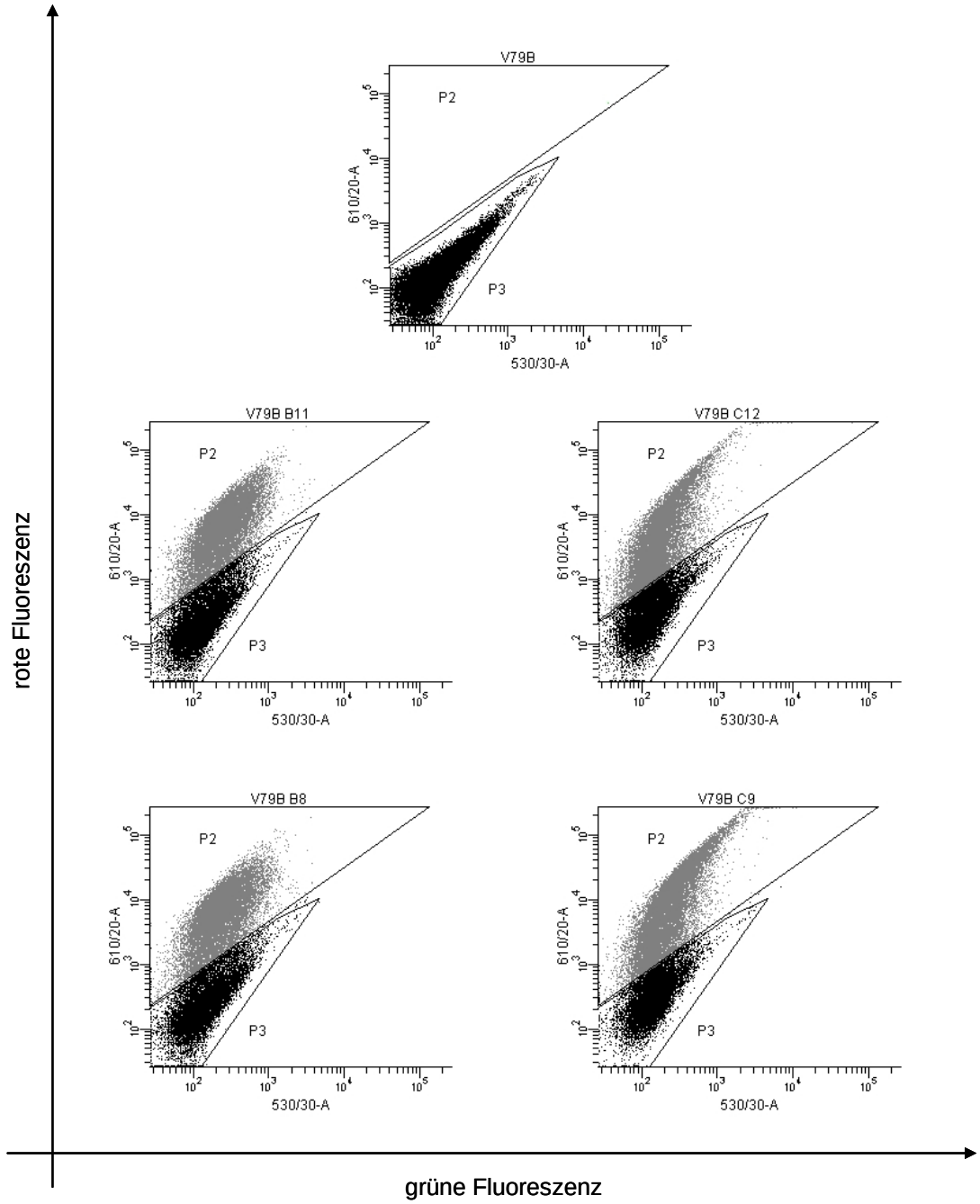


Abbildung 32: Durchflußzytometrische Analyse von vier Klonen mit integriertem pDSOFF Konstrukt. Nicht alle Zellen, sondern nur ca. 50% exprimieren das rot fluoreszierende Protein auch tatsächlich (P2), die anderen nicht (P3). Das ist der Fall in allen vier gezeigten Klonen. Als Negativkontrolle zur Einstellung des Gerätes wurden V79B Zellen verwendet (ganz oben).

3.5.3 Das „ON-System“

Zur Etablierung des „ON-Systems“ wurden ebenfalls Hamsterfibroblasten der Linie V79B mit dem durch einen XmnI Verdau linearisiertem Vektor pDSON transfiziert und auf Hygromycinresistenz selektiert. Die so erhaltenen Kolonien wurden klonal expandiert und die genomische DNA präpariert. Die DNA wurde als Matrize in eine PCR Reaktion eingesetzt, wobei die Oligonukleotide so gewählt wurden, dass eine Region aus den *egfp* Allelen amplifiziert wird. Die so identifizierten positiven Kolonien wurden weiterverwendet.

Die Zellen der Kolonien wurden mit dem I-SceI Expressionsplasmid, bzw. mit dem Kontrollplasmid transfiziert und das Vorhandensein von rot fluoreszierenden Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Von 7 Kolonien zeigten 5 Kolonien eine I-SceI vermittelte Expression des *DsRed2* Gens (siehe Abbildung 33).

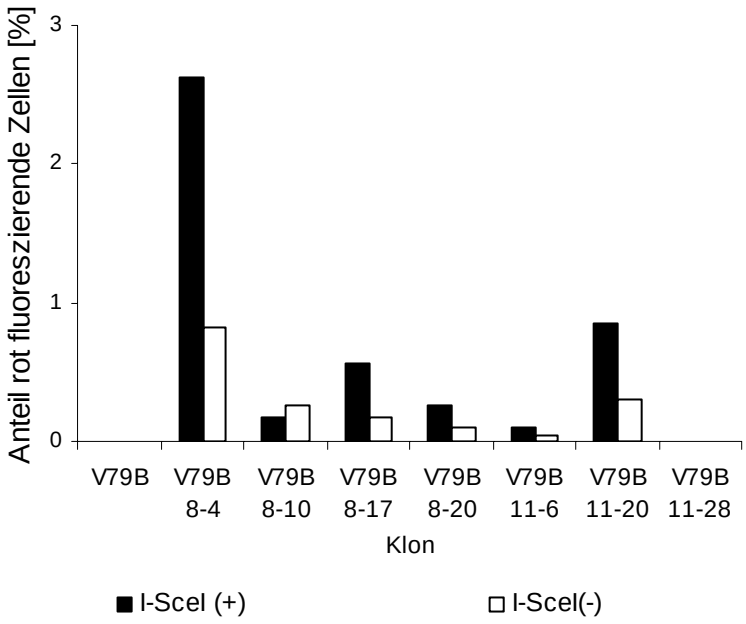


Abbildung 33: Transfektion der Klone mit genomisch integriertem pDSON Konstrukt mit dem I-SceI Expressionsplasmid (I-SceI (+)), bzw. mit dem Kontrollplasmid (I-SceI (-)) und Detektion der roten Zellen 7 Tage nach der Transfektion. Von 7 analysierten Kolonien zeigen 5 eine I-SceI vermittelte Induktion der roten Fluoreszenz. Zur Kontrolle und zur Einstellung der Geräteparameter wurde die Ausgangszelllinie V79B ebenfalls mit den Plasmiden transfiziert. Durch ein homologes Rekombinationsereignis entstehende grün fluoreszierende Zellen konnten nicht detektiert werden, da es sich hierbei um ein sehr seltenes Ereignis handelt und zudem die Transfektionseffizienz sehr gering war (ca. 1 %). Die Zellen des Klons 11-28 zeigen keine Expression des rot fluoreszierenden Proteins, wahrscheinlich ist das Konstrukt an einen transkriptionell inaktiven Chromatinlocus integriert worden.

Da die Sequenz des homologen Hamstergens für *NBS1* nicht bekannt ist, kann dieses System so für die Analyse des Einflusses von *NBS1* auf das Reparaturverhalten eines Doppelstrangbruches nicht verwendet werden. Deshalb wurde in Zusammenarbeit mit S. Mörtl (Institut für Strahlenbiologie) der in Abbildung 34 erklärte Versuch durchgeführt. In humanen, durch h*TERT1* Expression immortalisierte Epithelzellen (RPE) wurde mit der RNAi Technologie die *NBS1* Expression herunterreguliert. Die herunterregulierten Zellen wurden anschließend mit dem Vektor pDSON und einem Expressionsplasmid für *I-SceI* cotransfiziert, um den Doppelstrangbruch in vivo zu erzeugen, oder mit einem *in vitro* mit I-SceI verdautem und gelgereinigtem pDSON Plasmid. Durch ein Religationsereignis in der Zelle wird die *DSRed2* Expression ermöglicht, welche sich phänotypisch in rot fluoreszierenden Zellen zeigt. Die durchflußzytometrische Analyse 48 h nach der Transfektion zeigte in beiden Ansätzen eine Reduktion der Verknüpfung des Plasmids um den Faktor 2. Offensichtlich beeinflusst *NBS1* die Endverknüpfung der Plasmidenden miteinander.

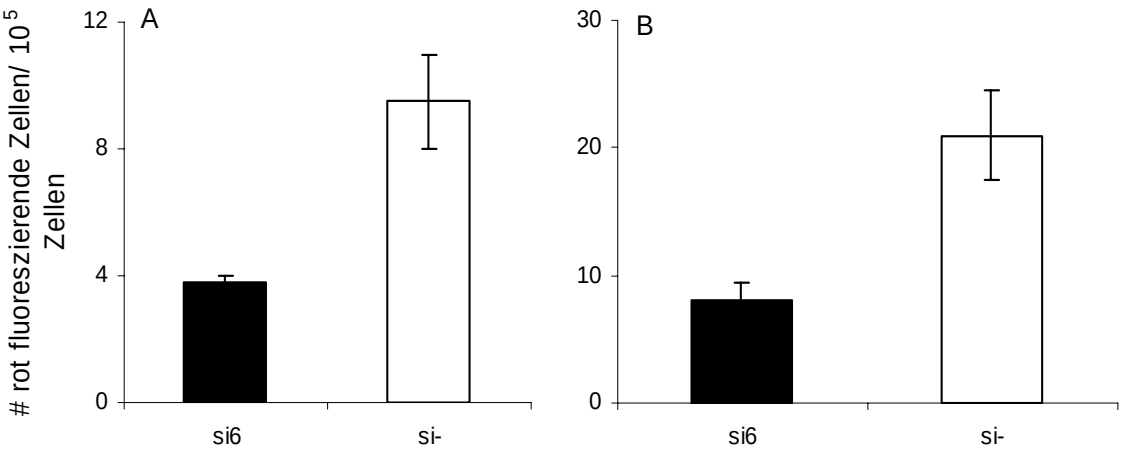


Abbildung 34: Quantifizierung rot fluoreszierender Zellen 48 Stunden nach Transfektion von *NBS1* herunterregulierten (si6) oder schein-herunterregulierten (si-) RPE Zellen mit den Vektoren pDSON und dem I-SceI Expressionsplasmid (A) oder einem mit I-SceI *in vitro* verdautem pDSON Vektor (B). In beiden Versuchsansätzen treten in den *NBS1* herunterregulierten Zellen signifikant weniger rot fluoreszierende Zellen auf. Dies ist ein Hinweis auf eine verminderte Endverknüpfung der Vektorenden nach der Induktion des Doppelstrangbruches durch I-SceI, sowohl *in vivo* (A), als auch *in vitro* (B). Grünfluoreszierende Zellen konnten aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz nicht detektiert werden.

4 Diskussion

Für die Expressionsanalysen und anschließender Untersuchung der Apoptose wurden zunächst zwei *NBS1*$^{-/-}$ Zelllinien auf Expressionsunterschiede im Vergleich zu ihren zugehörigen *NBS1*$^{+/-}$ Linien untersucht. Hierbei wurde ein vornehmlich T-zellspezifisch exprimiertes Gen identifiziert, welches in den *NBS1*$^{-/-}$ Linien vermindert exprimiert ist. Anschließend wurde der Einfluss des *NBS1* Status auf die Expression dieses Gens in T-Zellen untersucht. Da es u. a. auch an der Regulation der strahleninduzierten Apoptose beteiligt ist, wurde das Apoptoseverhalten der *NBS1*$^{-/-}$ Linien nach γ-Bestrahlung analysiert und es konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Strahlensensitivität der *NBS1*$^{-/-}$ Zellen u. a. durch eine erhöhte Apoptoserate nach Bestrahlung verursacht wird. Da *NBS* Zellen keinen signifikanten Defekt in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen aufweisen, wurde ein Vektorsystem etabliert, welches die Analyse des ausgewählten Mechanismus (NHEJ oder HR) für die Reparatur eines Doppelstrangbruches an einem sequenzspezifisch induziertem Doppelstrangbruch ermöglicht. Ein verändertes Verhältnis in der Wahl der beiden Wege kann eine erhöhte Strahlensensitivität bei nahezu gleicher Reparaturkinetik der Doppelstrangbrüche begründen.

4.1 Verwendung der Zelllinien

Durch die Verwendung zweier, miteinander nicht verwandter Zellpaare mit jeweils zwei Zelllinien, die von blutsverwandten Personen generiert wurden, ist es möglich, *NBS1* spezifische Effekte zu beschreiben. In dieser Arbeit sind nur Effekte erwähnt, die in beiden Zellpaaren in gleicher Weise auftreten. Dies ist eine wichtige Überlegung, da die Zelllinien eines Zellpaares nicht isogen sind, sondern nur von blutsverwandten Familienmitgliedern abgeleitet wurden. Das verwendete System wäre deutlich zu verbessern, wenn es gelungen wäre, die *NBS1*$^{-/-}$ Linien mit einer *NBS1* Wildtyp Expressionskassette zu komplementieren. Obwohl in dieser Arbeit ein Protokoll etabliert werden konnte, mit der die Zellen mit einer durchschnittlichen Transfektionseffizienz von 10% transfiziert werden können (Elektroporation), ist es auch nach mehrmaligen Versuchen nicht gelungen, proliferierende Zellen zu erhalten, die ein eingebrachtes Gen auch exprimieren (Daten nicht gezeigt). In Zukunft soll deshalb ein lentivirales Transduktionssystem verwendet werden (Lois, Hong et al. 2002), das bereits weitgehend hergestellt ist. Ein lentivirales System hat im Vergleich zu herkömmlichen Transfektionsmethoden zwei entscheidende Vorteile. Zum Einen ist zu erwarten, dass ein sehr viel höherer Anteil an Zellen viral transduziert wird, als über herkömmliche Ansätze transfiziert werden können, zum Anderen ist die Integration des

lentiviralen Vektors ein natürlicher Vorgang, weswegen genügend stabile rekombinante Zellen mit integrierter *NBS1* Expressionskassette erwartet werden. Allerdings ist auch bei diesem Ansatz immer eine Maskierung *NBS1* abhängiger Effekte durch die in den mutierten Zelllinien exprimierten NBS1 Fragmente p26 und p70 zu rechnen (siehe S. 19f).

Eine mögliche Lösung des Problems ist die Verwendung von Zelllinien, in denen die *NBS1* Expression mittels RNAi Technologie herunterreguliert ist. Angesichts der in der Einleitung genannten Tatsache, dass es bisher keine lebensfähige *NBS1* Knockout Maus gibt und die Zellen mit einer konditionalen Deletion des *NBS1* Gens in Kultur verloren gehen, ist nicht zu erwarten, dass stabile Zellen erhalten werden, bei denen die *NBS1* Expression auf Dauer auf ein niedriges Niveau herunterreguliert ist. Erfolgreich ist die vorübergehende Herrunterregulierung von *NBS1* mit synthetischer siRNA oder transienter Expression einer regulatorischen dsRNA mit Hilfe eines Vektors. Dies wurde zur Verifikation der verminderten *LCK* Expression in Zellen der RPE Zelllinie und zur Herunterregulation der *NBS1* Expression in Jurkat Zellen bereits durchgeführt.

Die Verwendung von EBV-immortalisierten Zelllinien hat gegenüber der Verwendung primärer Zellen den großen Vorteil, dass Untersuchungsmaterial in nahezu unbegrenztem Umfang zu Verfügung steht. Jedoch ist nicht bekannt, in wieweit die *NBS1* Mutation die EBV Immortalisierung beeinflusst und möglicherweise einige Effekte auf einen möglichen unterschiedlichen Status der EBV Immortalisierung zurückzuführen sind. So interferiert beispielsweise das *WRN* Gen mit der Transformation durch das EB-Virus (Sugimoto, Tahara et al. 2004). Zurzeit gibt es allerdings keinen Hinweis, dass *NBS1* die EBV Immortalisierung beeinflusst. Daher wird vorausgesetzt, dass alle vier Zelllinien in gleicher Weise auf die EBV Infektion reagieren und dass diese völlig unabhängig von *NBS1* erfolgt. Wir gehen daher von dem Postulat aus, dass alle beschriebenen Unterschiede somit auf die *NBS1* Mutation zurückgehen. Diese Annahme ist deshalb wichtig, da die viralen Genprodukte (*EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C* und *–LP; LMP1, 2A* und *2B*), die in viral transformierten Linien transkribiert werden (Rowe 1999; Young und Rickinson 2004), in beachtlicher Weise mit den verschiedensten Signaltransduktionskaskaden der Wirtszelle interagieren. Das *EBNA2* Genprodukt induziert beispielsweise die Expression von *CDKN1A* und *MDM2* und induziert eine Phosphorylierung des Proteins p53 (Lin, Kuo et al. 2000). Das *LMP1* Genprodukt ist ein integrales Membranprotein, welches den Transkriptionsfator NF-$_{\kappa}$B aktivieren kann, das virale Membranprotein LMP2A blockiert

die B-Zellrezeptorsignalkaskade und trägt möglicherweise zur Aktivierung von JUN bei (Rowe 1999; Young und Rickinson 2004). Tatsächlich ist ein Effekt von *ATM* auf die B-Zellaktivierung über den Rezeptor beschrieben worden, von dem fünf Jahre später gezeigt wurde, dass dieser Effekt auf die EBV Infektion zurückzuführen ist (Speck, Ikeda et al. 2002).

Ein weiteres Problem der EBV Immortalisierung kann die erhöhte genomische Instabilität der infizierten Zellen sein, die z. B. als spontane Bildung von Mikronuklei gemessen wird (Gualandi, Giselico et al. 2001). Dieses ist in unserem System jedoch nicht zu erkennen (S.26). Die von uns verwendeten *NBS1*$^{+/-}$ Zellen (P111, P306) haben einen nahezu normalen Karyotyp. Die in den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen beobachteten chromosomalen Aberrationen sind Folge der chromosomalen Instabilität dieser Zellen auf Grund des *NBS1* Gendefekts. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die durchgeführte Genexpressionsanalyse von Bedeutung, da ein veränderter Chromosomensatz wahrscheinlich die Expression der betroffenen Gene ändern kann.

Das in dieser Arbeit verwendete zelluläre System immortalisierter lymphoblastoider Zellen ist insgesamt für die Analyse *NBS1* abhängiger Effekte geeignet, weil Zelllinien miteinander verglichen werden, die in gleicher Weise mit EBV immortalisiert wurden. Somit ist ein EBV abhängiges, unterschiedliches Verhalten der Linien nur dann zu erwarten, falls *NBS1* einen Einfluss auf die EBV Infektion hat. Nach derzeitigem Erkenntnisstand gibt es keinen Grund zu dieser Annahme.

4.2 Expressionsanalyse

Die Analyse der Genexpression in den vier Zelllinien mit Hilfe der in Kooperation mit dem Institut für Pathologie hergestellten Microarrays sollte klären, ob einer der zahlreichen Phänotypen des *Nijmegen Breakage Syndroms* und insbesondere die erhöhte Strahlensensitivität mit Expressionsunterschieden in den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen, verglichen mit *NBS1*$^{+/-}$ Zellen erklärt werden kann. Vor Beginn der Analysen wurde bei der Auswahl der Gene darauf geachtet, möglichst viele an der DNA Doppelstrangbruchreparatur beteiligten Gene zu untersuchen, um zu klären, ob die erhöhte Strahlenempfindlichkeit von *NBS* Zellen auf einem möglichen Expressionsunterschied dieser Reparaturgene liegt. Mit dem hier verwendeten System konnte weder in unbestrahlten Zellen, noch 2 Stunden nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy ein Expressionsunterschied in den Zellen festgestellt werden (S.33ff). Der Zeitpunkt 2 h wurde deshalb gewählt, weil nach dieser Zeit für das

Zellpaar P111/ P112 eine deutliche Induktion der Expression des *CDKN1A* Gens festzustellen ist, welches hauptsächlich den Zellzyklusarrest nach Bestrahlung (Samuel, Weber et al. 2002) vermittelt. Mit Hilfe von quantitativer PCR ergibt sich in den Zellen der Linie P111 ein Induktionsfaktor von 3,1 ± 0,85 für die Expression dieses Gens, nicht aber für Zellen der Linie P112 (Faktor 1,2 ± 1,1). In Zellen der Linie P306 war die Induktion mit einem Faktor von 8,5 2 h nach der Bestrahlung am höchsten. In Zellen der Linie P247 wurde die *CDKN1A* Expression nicht induziert (Faktor: 0,83). Allerdings wäre auch eine Analyse zu einem späteren Zeitpunkt nach Bestrahlung denkbar. Wir haben jedoch diesen kurzen Zeitpunkt gewählt, da wir glauben, dass die Funktion von NBS1 im MRN Komplex die frühe Detektion des DNA Schadens ist.

Leider ist die Sensitivität der verwendeten Microarrays sehr gering. Expressionsunterschiede können im Mittel erst ab einem Faktor von <0,50, bzw. >1,9 detektiert werden. Hinzu kommt die hohe Varianz des Hybridisierungssignals auf dem Array. Alle Gene wurden als Duplikat auf die Glasoberfläche aufgebracht und die Intensitäten der Duplikate bei der Auswertung miteinander verrechnet. Nur wenn der Mittelwert eine Standardabweichung von den Grenzen entfernt ist, wird ein Expressionsunterschied angenommen. Schon bei den Duplikaten auf einem Array treten hierbei deutliche Unterschiede in der Hybridisierung auf, was sich in einer hohen Standardabweichung des Mittelwertes für die Intensitäten der Duplikate äußert. Da das Resultat erheblich von der mechanischen Handhabung des Arrays abhängt (es ergibt sich beispielsweise ein deutlich erkennbarer Gradient in der Intensität des Hintergrundes von der Position der Auflage des Deckglases bis zur gegenüberliegende Seite), wäre dies sicherlich durch Verwendung voll automatischer Systeme zum Waschen und Hybridisieren der Arrays verbesserbar.

Zu dieser hohen technisch begründeten Varianz addiert sich die Varianz der biologischen Systeme. Das kann alleine durch Betrachtung der Standardabweichungen der Induktionsfaktoren für die *CDKN1A* Expression verdeutlicht werden. Für den Faktor der Linie P111 ergibt sich eine relative Standardabweichung von 27%, für die Linie P112 eine relative Abweichung von 92%, wobei die technischen Abweichungen, die sich alleine durch Unzulänglichkeiten bei der quantitativen PCR (Pipettierfehler) ergeben, vernachlässigbar sind (zum Abschätzen der erreichten Pipettiergenauigkeit siehe Abbildung 43, S.92 für die Bestimmung der Effizienz der PCR). Die Abweichung wird für

den Faktor der Linie P111 ebenfalls sehr viel höher, wenn zusätzlich die Daten zur *CDKN1A* Expression aus der Abbildung 23B berücksichtigt werden, da sich bei diesem Versuch ein sehr viel höherer Induktionsfaktor für die *CDKN1A* Expression ergibt als der hier beschriebene mittlere Faktor von 3,1.

Zusammenfassend ist deshalb festzuhalten, dass Gene, die in der Microarrayanalyse nicht als differentiell exprimiert angesehen werden, nicht notwendigerweise gleich exprimiert werden. Sie sind nur nicht so erheblich dereguliert, dass sie mit der hier beschriebenen Methode als differentiell exprimiert klassifiziert werden können.

Dennoch ist es durchaus gelungen, Gene zu identifizieren, die wiederholt reproduzierbar differentiell exprimiert werden (siehe Abbildung 16 (S.35) und Abbildung 17 (S.36)). Mit der Ausnahme des LCK Gens, das eine Tyrosinkinase codiert, sind alle Gene, nur in dem einen oder anderen Zellpaar differentiell exprimiert und somit für diese Arbeit nicht interessant, weil ihre Regulation unabhängig von *NBS1* ist. Die differentielle *LCK* Expression konnte mit Hilfe quantitativer PCR verifiziert werden und resultiert in den *NBS1*$^{-/-}$ Zelllinien in einem nicht mehr zu detektierendem Genprodukt LCK im Western Blot.

Die von dem *LCK* Gen codierte Tyrosinkinase hat eine wichtige Rolle bei der antigenvermittelten Aktivierung von T-Zellen, allerdings wird sie auch in vielen nicht-lymphoiden Tumorzelllinien exprimiert (Veillette, Foss et al. 1987). Um eine möglicherweise T-zellspezifische Funktion des *NBS1* Gens zu erkennen, wurde in Jurkat Zellen (einer T-Zelllinie) die *NBS1* Expression mittels Expression einer kurzen, episomal exprimierten dsRNA herunterreguliert (Vektor pMA4 (Angermeier 2004)). Durch Aussortieren der transient transfizierten Zellen, über den coexprimierten *EGFP* Marker, konnte eine signifikante Herunterregulation der *NBS1* Expression erreicht werden. Allerdings ist in den Jurkat Zellen kein Einfluss auf die *LCK* Expression festzustellen (Abbildung 19, S. 40), obwohl in Epithelzellen (RPE) eine reduzierte *LCK* Expression mit einer durch RNAi reduzierten *NBS1* Expression korreliert ist. Eine Erklärung für diesen offensichtlichen Widerspruch liefert die Betrachtung des *LCK* Promotors.

Die *LCK* Expression wird von zwei Promotoren aus gesteuert (Abbildung 35) (Voronova, Adler et al. 1987; Takadera, Leung et al. 1989; Yamada, Takaki et al. 2001). Dies ermöglicht eine Erklärung des zellspezifischen Einflusses von *NBS1* auf die Expression dieses Gens. Sowohl in humanen, als auch in murinen Zellen gibt es einen dem Startcodon ATG nahen Promotor (Mensch: „downstream“, Transkript I, Maus: „proximal“) und einen weiter stromaufwärts gelegenen Promotor (Mensch „upstream“, Transkript II, Maus „distal“.

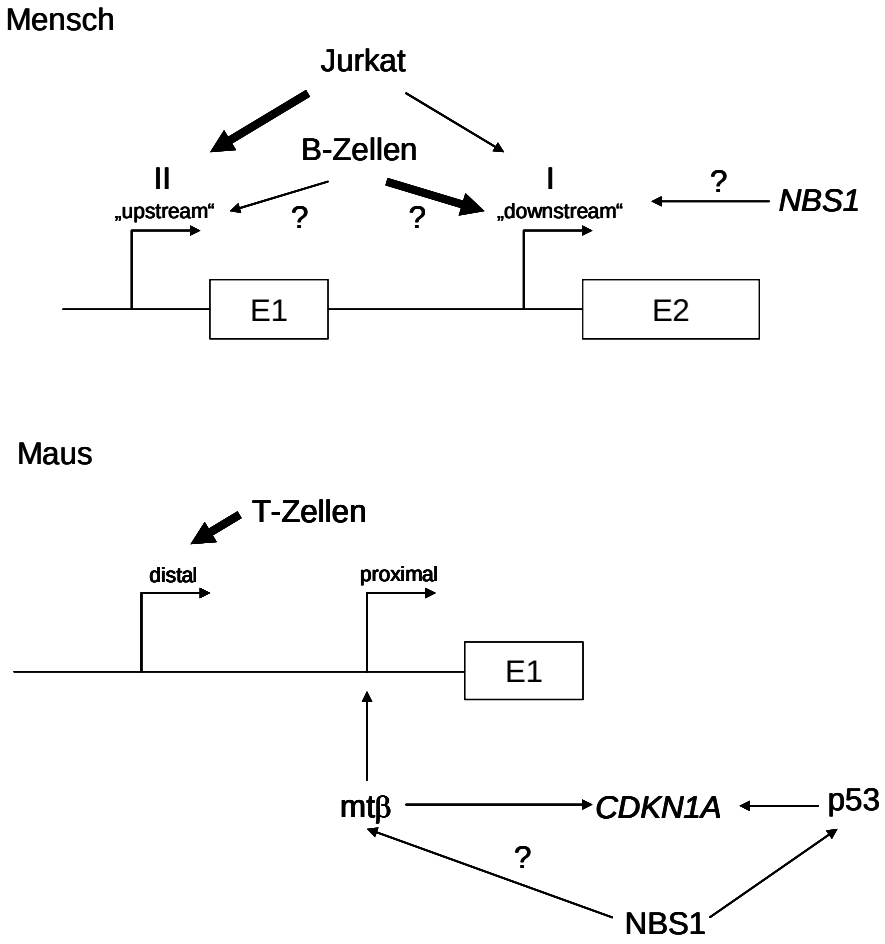


Abbildung 35: Die Transkription des *LCK* Gens wird von zwei Promotoren kontrolliert. Sowohl beim Menschen, als auch bei der Maus ist der „upstream“, bzw. distale Promotor für die *LCK* Expression in T-Zellen verantwortlich. In Jurkat Zellen sind beide Promotoren aktiv, es wird allerdings mehr Transkript vom Typ II gefunden. Möglicherweise beeinflusst das *NBS1* Gen den „downstream“ Promotor von *LCK* positiv. In der Maus ist der Transkriptionsfaktor mtβ für die Aktivierung des proximalen Promotors mitverantwortlich. Dieser Transkriptionsfaktor hat auch Einfluss auf die *CDKN1A* Expression. Für *NBS1* ist der Einfluss auf die *CDKN1A* Expression im Menschen über den p53 vermittelten Weg zu erklären, aber möglicherweise existiert ein weiterer Weg über den Transkriptionsfaktor mtβ, bzw. über das humane, homologe Protein htβ. E1, E2: Exon 1, Exon 2; spekulative Wege sind mit „?“ versehen.

Die *LCK* Expression erfolgt in allen Stadien der T-Zellentwicklung bei der Maus vom distalen Promotor aus. Allerdings ist der proximale Promotor an der Expression ebenfalls beteiligt. Insbesondere in Thymocyten und in T-Zellen des Thymus lassen sich die Transkripte des proximalen Promotors nachweisen. Im fetalen Thymus finden sich mehr Transkripte des proximalen Promotors als vom distalen Promotor. Im adulten Thymus finden sich die beiden unterschiedlichen Transkripte in gleichen Mengen. In peripheren T-Zellen dominieren allerdings die Transkripte des distalen Promotors (Reynolds, Lesley et al. 1990; Wildin, Garvin et al. 1991).

Beim Menschen lassen sich in peripheren T-Zellen keine Transkripte des Typ I nachweisen. In Jurkat Zellen lassen sich beide Transkripte detektieren, allerdings die Typ II Transkripte in einer höheren Menge (Takadera, Leung et al. 1989). Der distale Promotor ist also offensichtlich für die generelle *LCK* Expression zuständig, wohingegen der proximale Promotor sich an der *LCK* Expression in frühen Entwicklungsstadien beteiligt.

Für den proximalen Promotor des murinen *LCK* Gens wurde ein Regulator für die Transkription identifiziert: mtß (Yamada, Takaki et al. 2001). Interessanterweise kann dieser Faktor auch an den *CDKN1A* Promotor binden (Hasegawa, Xiao et al. 1999).

Zusammenfassend ist folgende Arbeitshypothese denkbar: *NBS1* beeinflusst die Transkription des „downstream“ Promotors. Falls die *LCK* Transkription in den lymphoblastoiden Zelllinien und in den RPE Zellen vom „downstream“ Promotor aus erfolgt, erklärt dies den Zusammenhang zwischen fehlender *NBS1* Expression und fehlender *LCK* Expression in diesen Zelllinien. In Jurkat Zellen erfolgt die Expression des *LCK* Gens von beiden Promotoren aus, wahrscheinlich vermehrt sogar vom „upstream“ Promotor, so dass der Effekt der Herunterregulation der *NBS1* Expression auf die *LCK* Expression nicht beobachtet werden kann, da der „upstream“ Promotor die *LCK* Expression unabhängig von *NBS1* treibt.

Die postulierte Einflussnahme von *NBS1* auf den „downstream“ Promotor erlaubt eine weitere Überlegung, ob der in der Einleitung beschriebene Defekt in der Induktion der *CDKN1A* Expression in *NBS1* Zellen immer mit dem ATM/ p53 vermittelten Weg erklärt werden kann (Jongmans, Vuillaume et al. 1997; Matsuura, Balmukhanov et al. 1998; Little, Nagasawa et al. 2002), oder ob eine Einflussnahme von *NBS1* über htβ (dem

humanen Homolog zu mtβ) auf die *CDKN1A* Transkription erfolgt. Wie die Abbildung 5 (S. 10) zeigt, ist zurzeit bereits ein Transkriptionsfaktor (ATF2) beschrieben, der mit *NBS1* interagiert (Bhoumik, Takahashi et al. 2005).

Experimentell müsste zunächst geklärt werden, von welchen Promotoren die *LCK* Transkription in den hier verwendeten Zellsystemen erfolgt, dann kann die mögliche Einflussnahme von *NBS1* auf die beiden Promotoren studiert werden.

Mit dem Microarrayansatz wurde nur ein Gen unter mehr als 1300 analysierten Genen mit Funktionen in DNA Reparatur, Signaltransduktion, Zelladhäsion und Apoptose identifiziert, dessen Expression als *NBS1* reguliert bezeichnet werden kann. Entweder hat *NBS1* keinen Einfluss auf die Expression weiterer Gene, oder der Einfluss ist zu gering, als dass er mit den hier verwendeten Microarrays detektiert werden kann. Weitere Analysen der veränderten *LCK* Expression werden möglicherweise neue Funktionen von *NBS1* speziell in T-Zellen aufdecken.

4.3 Strahleninduzierte Apoptose

Für beide Zellpaare konnte mit Hilfe der SubG1 Methode eine deutlich erhöhte strahleninduzierte Apoptose in den *NBS1*$^{-/-}$ Zelllinien gezeigt werden. Obwohl die für Thymocyten beschriebene SubG1 Methode keine nekrotischen Zellen erfassen sollte (Nicoletti, Migliorati et al. 1991), wurde der apoptotische Phänotyp durch die weiteren biochemischen Marker, wie Caspase-3 Aktivität und PARP-1 Spaltung verifiziert. Damit sollte sichergestellt werden, dass tatsächlich apoptotische Zellen und nicht nekrotische Zellen detektiert wurden. Die hier beschriebene erhöhte Induktion der strahleninduzierte Apoptose (siehe 3.4.1, S. 42) ist neben dem gut beschriebenen Einfluss von *NBS1* auf den Zellzyklus nach Bestrahlung (siehe 2.6.2.2, S. 16) eine weitere Erklärung für die erhöhte Strahlensensitivität von *NBS* Zellen.

Die Aufklärung des molekularen Mechanismus der strahleninduzierten Apoptose in *NBS* Zellen ist von besonderem Interesse, da *NBS1* über die Aktivierung der ATM Kinase direkt in den Signaltransduktionsprozess vom DNA Schaden zur Initiation der Apoptose eingebunden ist. Bemerkenswerterweise sind die Befunde über die Induktion der Apoptose in A-T Zellen widersprüchlich. In humanen A-T Lymphocyten ist die Apoptoserate nach ionisierender Bestrahlung *nicht erhöht* (Albanese und Dainiak 2000). Andere Autoren

berichten hingegen über eine *verringerte* Apoptoserate nach γ-Bestrahlung in EBV immortalisierten lymphoblastoiden A-T Zelllinien (Bebb, Warrington et al. 2001). Im Gegensatz dazu reagieren *ATM* defiziente DT40 Zellen auf die Behandlung mit DNA schädigenden Reagenzien mit einer *erhöhten* Einleitung der Apoptose (Takao, Li et al. 2000). DT40 Zellen exprimieren kein p53 und bieten sich deshalb zur Beschreibung von Effekten in einem p53 freien Hintergrund an (Takao, Kato et al. 1999). Daher muss die Einleitung der Apoptose in DT40 Zellen p53 unabhängig sein.

Auch in unserem lymphoblastoiden Zellsystem ist der Unterschied in der Induktion der strahleninduzierten Apoptose in den *NBS1*$^{+/-}$ und *NBS1*$^{-/-}$ Zelllinien nicht p53 abhängig (siehe 3.4.2, S. 45). In den *NBS1*$^{-/-}$ Zellen wird das Protein p53 genau wie in den *NBS1*$^{+/-}$ Linien stabilisiert und an dem als wichtig angesehen Ser-15 Rest phosphoryliert (Banin, Moyal et al. 1998; Dumaz und Meek 1999). Die Phosphorylierung und Stabilisierung des p53 Proteins ist entweder unabhängig von ATM oder die ATM Kinase benötigt nicht in jedem Fall zur Aktivierung den MRN Komplex und somit ein funktionsfähiges NBS1 Protein (siehe 2.3, S. 6). Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass zur p53 Stabilisierung eine Phosphorylierung des Proteins nicht unbedingt nötig ist (Blattner, Tobiasch et al. 1999). Neuere Daten beschreiben eine ATM abhängige Phosphorylierung von p53 an Ser-15 in einem *NBS* defizienten Hintergrund sowohl in neuronalen Zellen (Frappart, Tong et al. 2005), als auch in B-Zellen (Difilippantonio, Celeste et al. 2005). Zudem ist eine erhöhte p21 Expression in neuronalen Zellen festzustellen, wenn diese kein *NBS1* mehr exprimieren. In diesen Zellen sieht es so aus, als wäre der ATM/ p53 vermittelte Weg, welcher normalerweise nach DNA-Schädigung aktiviert wird, bereits ohne Bestrahlung aktiv (Frappart, Tong et al. 2005). Durch Inhibierung der Transkription kann der Unterschied in der Aktivierung der strahleninduzierten Apoptose in den *NBS1*$^{+/-}$ und *NBS1*$^{-/-}$ nicht aufgehoben werden, was bei einer Beteiligung von p53 induzierten proapoptotischen Genen zu erwarten gewesen wäre. Nach der Behandlung mit Actinomycin D und Bestrahlung ist der Unterschied zwischen den Extrakten der *NBS1*$^{-/-}$ und *NBS1*$^{+/-}$ Zellen in der Aktivierung der Caspase-3 sogar noch höher, was eventuell an der nun auch fehlenden Induktion von Überlebensfaktoren liegen mag (Abbildung 23B und C, S. 46). Es ist somit in Frage zu stellen, ob weiterhin die Notwendigkeit der Aktivierung der ATM Kinase durch den MRN Komplex und die damit verbundene Störung der Einleitung der p53 vermittelte Antwort auf Bestrahlung, generell angenommen werden kann.

Die Analyse der rezeptorspezifischen Caspase-8 Aktivität in zellulären Extrakten lässt auf eine erhöhte Aktivierung eines Todesrezeptors in den *NBS1*$^{-/-}$ Linien schließen, da nur in Extrakten dieser Linien eine Caspase-8 Aktivität gemessen werden kann (Abbildung 24, S. 47). Wird die Caspase-8 Aktivität durch einen zellpermeablen Inhibitor vor der Bestrahlung gehemmt, so ist keine PARP-1 Spaltung mehr zu detektieren (Abbildung 25, S. 47), was eindeutig für eine Abhängigkeit der Induktion der strahleninduzierten Apoptose von Caspase-8 und somit von der Aktivierung eines Todesrezeptors spricht.

Die *NBS1*$^{-/-}$ Zellen reagieren bereits ohne Bestrahlung mit einer leicht erhöhten und früheren Induktion der CD95 vermittelten Apoptose auf die Behandlung mit einem agonistischen anti-CD95 Antikörper (Abbildung 26A und B, S. 49). Deshalb wurde die Rolle des CD95 Rezeptors für die strahleninduzierte Apoptose untersucht. Diese Entscheidung wurde unterstützt durch den Befund, dass die Behandlung mit TNFα keinen Effekt zeigt (Daten nicht gezeigt), so dass es unwahrscheinlich erscheint, dass die Aktivierung des Todesrezeptors TNFR1 eine Rolle spielt (Lavrik, Golks et al. 2005). Im Fluoreszenzmikroskop kann die Aktivierung des CD95 Rezeptor in den *NBS1*$^{-/-}$ Zelllinien als Aggregation des Rezeptors an der Zellmembran der *NBS1*$^{-/-}$ Zellen eine Stunde nach der Bestrahlung nachgewiesen werden, jedoch nicht in den *NBS1*$^{+/-}$ Linien (Abbildung 27, S. 50). Die erhöhte Fluoreszenz ist nicht mit einer p53 abhängige Induktion des *TNFRSF6* Gens zu erklären (Owen-Schaub, Zhang et al. 1995), wie durch quantitative PCR gezeigt wurde (3.4.4, S. 48ff). Die Immunfluoreszenzbilder wurden eine Stunde nach der Bestrahlung aufgenommen, wenn in allen vier Zelllinien noch keine signifikante Erhöhung der *TNFRSF6* Expression festzustellen ist. Durch Inhibierung des CD95 Rezeptors mit einem antagonistischen Antikörper vor der Bestrahlung wird die PARP-1 Spaltung verhindert (Abbildung 26D, S. 49). Auch diese Daten sind ein starker Beweis für die Beteiligung des CD95 Rezeptors an der Induktion der Apoptose in den in dieser Arbeit verwendeten lymphoblastoiden *NBS1*$^{-/-}$ Zellen.

Zusammenfassend kann folgendes Modell (Abbildung 36) formuliert werden:

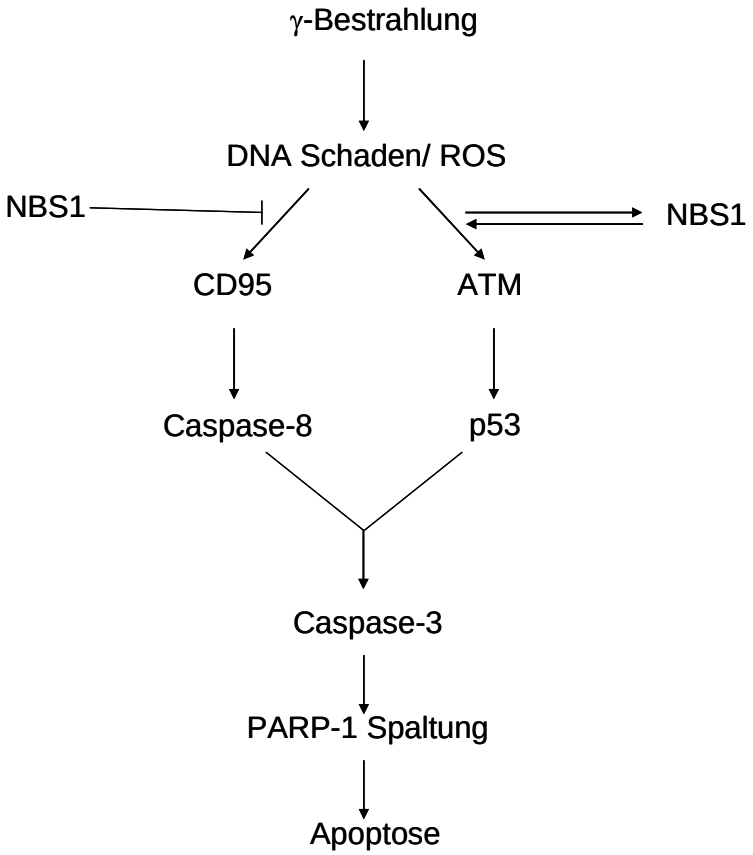


Abbildung 36: Durch die γ-Bestrahlung werden in den Zellen DNA Schäden induziert, als auch oxidativer Stress durch Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verursacht. Die Schädigung der DNA führt zur Aktivierung der ATM Kinase und letztendlich zur Apoptose über einen p53 vermittelten Weg. Da dieser Weg von NBS1 positiv beeinflusst wird, wäre bei alleiniger Induktion der strahleninduzierten Apoptose über diesen Weg eine reduzierte Apoptose nach Bestrahlung zu erwarten. Es existiert allerdings noch mindestens ein weiterer, von *NBS1* negativ beeinflusster Weg. Dieser CD95 regulierte Weg ist für den beobachteten Unterschied in der strahleninduzierten Apoptose verantwortlich und *NBS1* hemmt die Aktivierung dieses Weges nach der Bestrahlung.

NBS1 hat einen direkt oder indirekt hemmenden Einfluss auf die Regulation der CD95 vermittelten Apoptose, welche auf noch unbekanntem Weg nach der Bestrahlung induziert wird. Die Aktivierung des membranständigen Todesrezeptors setzt eine gut charakterisierte Signalkaskade in Gang, wobei zunächst Caspase-8 aktiviert wird und schließlich Caspase-3, was zu dem erhöhten apoptotischen Phänotyp der bestrahlten *NBS1*$^{-/-}$ Zellen führt. Hingegen ist ein p53 abhängiger Weg nicht verantwortlich für den beobachteten *NBS1* abhängigen Unterschied in der Apoptoseinduktion nach γ-Bestrahlung.

Im Moment ist ungeklärt, ob für die Initiierung der CD95 abhängigen Apoptosekaskade induzierte DNA Schäden oder die nach γ-Bestrahlung induzierte ROS als Auslöser dienen. Es wurde nachgewiesen, dass ROS den CD95 Rezeptor aktivieren können (Huang, Fang et al. 2003). Ebenso wurde für A-T Zellen ein erhöhter spontaner oxidativer Stress beschrieben (Barzilai, Rotman et al. 2002).

Weitere Versuche werden zeigen, ob die Aktivierung des Rezeptors nach Bestrahlung über den Liganden CD95L erfolgt. Dies kann angenommen werden, da die strahleninduzierte Apoptose mit Hilfe eines antagonistischen Antikörpers gegen CD95 blockiert werden kann. Dies wäre nicht zu erwarten, falls der Rezeptor ligandenunabhängig trimerisieren würde.

Weiterhin stellt sich die Frage, welche Rolle *NBS1* bei der Aktivierung des CD95 Rezeptors spielt. Zum Beispiel ist für das verwendete Zellsystem die Rolle von Ceramid als „second messenger" für die Einleitung der strahleninduzierten Apoptose zu klären (Kolesnick und Fuks 2003). Nach γ-Bestrahlung kommt es in Lymphoblasten zu einem Anstieg der Ceramidkonzentration. Der Anstieg wird einige Minuten nach der Bestrahlung von der sauren Sphingomyelinase vermittelt, die Ceramid durch die Hydrolyse von Sphingomyelin bereitstellt. Einige Stunden (bis 24 h) nach der Bestrahlung wird die Zunahme der Ceramidkonzentration durch die Ceramidsynthase vermittelte *de novo* Synthese von Ceramid erzeugt (Kolesnick und Fuks 2003; Vit und Rosselli 2003). Die Ceramidsynthase wird vom *ATM* Genprodukt gehemmt (Liao, Haimovitz-Friedman et al. 1999) und daher sollte auch die Rolle von *NBS1* im Ceramidweg analysiert werden, insbesondere, da Ceramid speziell in der CD95 vermittelten Apoptose eine Rolle spielt. Durch die Trimerisierung des CD95 Rezeptors wird zunächst die saure Sphingomyelinase aktiviert und an die Zelloberfläche rekrutiert, wo sie die Herstellung von Ceramid aus Sphingomyelin katalysiert (Gulbins und Grassme 2002; Kolesnick und Fuks 2003). Das produzierte Ceramid dient als Plattform für die weitere Aggregation der CD95 Moleküle und dies führt zur vollen Aktivierung der von CD95 ausgehenden Signalkaskade (Gulbins und Grassme 2002). Es bleibt also zu klären, ob das *NBS1* Genprodukt analog zum *ATM* Genprodukt in den Ceramidstoffwechsel eingreift und somit den beobachteten anti-apoptotischen Effekt vermittelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NBS1 offensichtlich einen anti-apoptotischen Effekt auf den CD95 rezeptorabhängigen Apoptoseweg vermittelt. Es bildet somit zusammen mit den Proteinen ATM, BRCA1, BLM und p53 eine Gruppe von Proteinen, die sowohl eine Funktion in der DNA Reparatur haben, als auch die Apoptose regulieren (Bernstein, Bernstein et al. 2002). Der molekulare Angriffspunkt von NBS1 für die Regulation der strahleninduzierten Apoptose muss allerdings noch identifiziert werden.

4.4 Vektorsysteme zur Bestimmung von NHEJ und HR

Die Analyse von Reparaturereignissen an sequenzspezifisch, endonukleolytisch induzierten DSB hat den Vorteil, dass Effekte untersucht werden können, die spezifisch durch einen einzigen DSB hervorgerufen werden. Die Induktion von DNA Brüchen über γ-Bestrahlung erzeugt in den Zellen eine ganze Reihe von anderen Schäden und induziert z. B. auch oxidativen Stress (Huang, Fang et al. 2003; Wan, Zhou et al. 2003; Wan, Zhou et al. 2005). Die Verwendung der I-SceI Endonuklease hat sich zur Induktion von Doppelstrangbrüchen in Säugerzellen etabliert (Colleaux, d'Auriol et al. 1986; Rouet, Smih et al. 1994; Rouet, Smih et al. 1994; Liang, Han et al. 1998; Belka, Marini et al. 1999; Richardson und Jasin 2000; Johnson und Jasin 2001; Stark und Jasin 2003).

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Vektorsystem lassen sich *in vivo* sequenzspezifisch Doppelstrangbrüche induzieren, an denen das Reparaturverhalten der transfizierten Zellen studiert werden kann. Beide Systeme verwenden die I-SceI Endonuklease zur Induktion von DSB. In beiden Systeme werden HR Ereignisse durch die Rekonstitution eines funktionellen *EGFP* Allels begleitet. Beim OFF-System werden NHEJ Ereignisse durch den Verlust eines roten Fluoreszenzmarkers angezeigt, beim ON System durch die Expression dieses Markers nach einem NHEJ Ereignis (siehe 2.7.4, S. 22). Die I-SceI Endonuklease erkennt eine Sequenz mit einer Länge von 18 nt (Rouet, Smih et al. 1994; Belfort und Roberts 1997). Somit ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese Sequenz im humanen Genom vorkommt:

$$\frac{3 \cdot 10^9}{4^{18}} = 0{,}04\,,$$

wobei die humane Genomgröße mit $3x10^9$ nt eingesetzt wird.

Eine Induktion eines Doppelstrangbruches durch die Expression der I-SceI Endonuklease alleine ist also sehr unwahrscheinlich und eine Erkennungsstelle muss erst gentechnisch in das Wirtsgenom eingeführt werden, wie es in dieser Arbeit durch Integration der

Konstrukte pDSON und pDSOFF für Hamsterzellen geschehen ist (siehe 3.5.2, S. 54ff; 3.5.3 S. 57ff.)
Die meisten Systeme zur Analyse des Reparaturverhaltens basieren auf Resistenzmarkern zur Detektion der Reparaturereignisse, vorwiegend für homologe Rekombination (Rouet, Smih et al. 1994; Liang, Han et al. 1998; Richardson und Jasin 2000; Johnson und Jasin 2001; Stark und Jasin 2003). Die Verwendung von Fluoreszenzmarkern, wie in dem hier vorgestellten System, bietet die Möglichkeit einer sehr viel schnelleren Detektion der Reparaturereignisse, da nicht auf das Heranwachsen von Kolonien resistenter Zellen gewartet werden muss. Außerdem setzen die herkömmlichen Systeme eine Proliferation der Zellen voraus. Zellen, die nach dem Reparaturereignis nur noch eingeschränkt, bzw. gar nicht mehr proliferieren können, werden nicht erfasst. Die Verwendung von Fluoreszenzmarkern setzt eine Proliferation der Zellen nicht mehr voraus.

Das „ON-System“ ist gegenüber dem „OFF-System“ besser zur Analyse der Reparaturereignisse geeignet, da es beim „OFF-System“ nicht gelungen ist, eine Population von stabil rot fluoreszierenden Zellen zu erhalten. Dies kann z. B. an einem Selektionsnachteil für *DSRed2* exprimierende Zellen in der Kultur liegen, so dass Zellen bevorzugt wachsen, die den *DSRed2* Leserahmen verloren haben oder auf Grund von Silencing Effekten das Gen nicht mehr transkribieren (Vintersten, Monetti et al. 2004). Allerdings zeigt eine geringe Anzahl der Zellen des „ON-Systems“ auch ohne I-SceI Expression eine rote Fluoreszenz (Abbildung 33, S. 57). Diese Zellen haben entweder den kurzen non-sense ORF spontan eliminiert oder initiieren die Translation nicht am ersten ATG des non-sense ORFs, sondern am nun internen Startcodon für das rot fluoreszierende Protein DSRed2.

Bisher wurden in dieser Arbeit nur I-SceI vermittelte End-Joining Ereignisse mit Hilfe des „ON-Systems“ gezeigt. Für die Detektion von viel seltener erwarteten HR Ereignissen ist die Analyse einer viel größeren Anzahl I-SceI transfizierter Zellen nötig. Bisher wurden allerdings nur Transfektionseffizienzen von ca. 3 % in den Hamsterfibroblasten erreicht. Der Unterschied zwischen dem Anteil der rot fluoreszierenden Zellen in I-SceI exprimierenden Zellen und nicht exprimierenden Zellen würde durch eine verbesserte Transfektionseffizienz ebenfalls positiv beeinflusst, da bei einer Transfektionseffizienz von 3 % maximal 3 % rot fluoreszierende Zellen zu erwarten sind. Dieser theoretisch maximal

zu erwartende Wert ist bei dem Klon V79B 8-4 (siehe Abbildung 33, S. 57) zu 90% erreicht worden.

Da das System zur Zeit in humanen, durch Telomerase Expression immortalisierten Epithelzellen Anwendung findet, wird für dieses Projekt ein lentivirales Transduktionsprotokoll erarbeitet, mit dem möglichst alle Zellen mit einem I-SceI Expressionsvektor transduziert werden können.

Um die Expression der Fluoreszenzmarker auf einen eingeschlagenen Reparaturweg zurückzuführen, ist eine Betrachtung der möglichen Rekombinationsprodukte nach Reparatur der DSB notwendig. Zunächst werden die Systeme in der G1 Phase des Zellzyklus betrachtet. Für das DSOFF System ergeben sich nach der Induktion der DSB vier Möglichkeiten unter Verlust des *DSRed2* Leserahmens den DSB zu reparieren (Abbildung 37). Für das DSON System ergeben sich die gleichen Möglichkeiten zur Reparatur, allerdings ist die Verteilung der fluoreszenten Marker anders als beim DSOFF System (Abbildung 38). Generell entstehen durch homologiegetriebene Mechanismen in beiden Systemen grün fluoreszierende Zellen, durch homologieunahängige Mechanismen entstehen beim DSOFF System Zellen, die nicht mehr fluoreszieren und beim DSON System rot fluoreszierende Zellen. Problematisch ist das Auftreten von Genkonversionsereignissen, die mit einem NHEJ Ereignis zur Reparatur des DSB gekoppelt sind. Im DSOFF System lassen sich diese Ereignisse anhand der Fluoreszenzmarker nicht von klassischen HR Ereignissen unterscheiden, beim DSON System kann ein Genkonversionsereignis unentdeckt bleiben, weil es zwar zur Rekonstitution eines funktionellen *EGFP* Allels führt, dieses aber nicht unter der Kontrolle eines Promotors steht, was die *EGFP* Transkription ermöglichen würde.

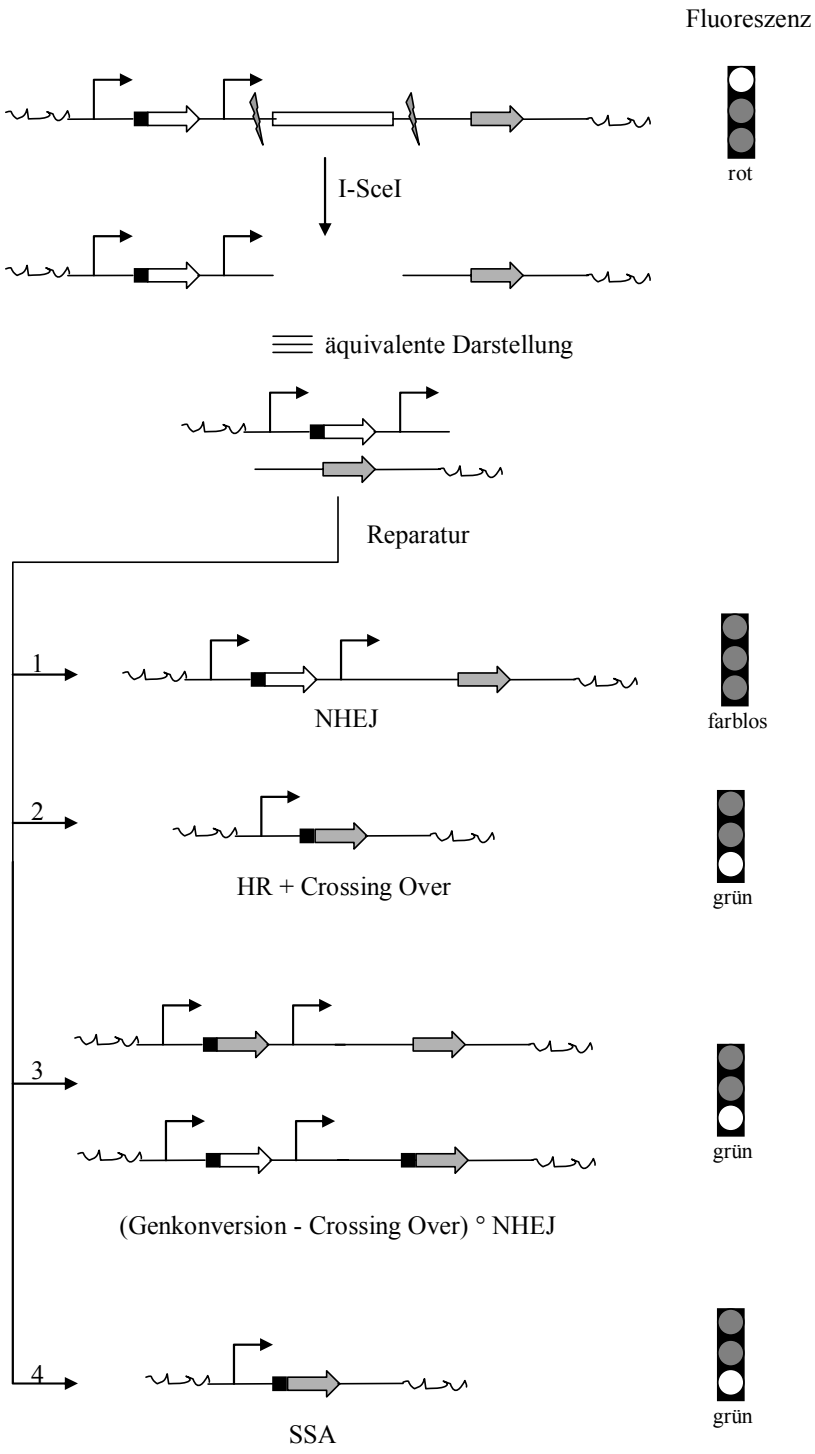


Abbildung 37: Beim DSOFF System wird in einer anfänglich roten Zellpopulation die Endonuklease I-SceI zur Induktion der Doppelstrangbrüche links und rechts von *DSRed2* ORF exprimiert (Rechteck). Durch ein einfaches NHEJ Ereignis werden die beiden Chromosomenenden wieder miteinander verknüpft und nicht fluoreszierende Zellen (farblos) entstehen (1). Durch ein homologes Rekombinationsereignis zwischen den beiden *egfp* Loci (Pfeile), geht der Chromatidabschnitt mit dem Doppelstrangbruch verloren, und ein funktionelles *EGFP* Allel entsteht, so dass die Zellen grün fluoreszieren (2). Durch ein Genkonversionsereignis zwischen den beiden *egfp* Allelen entsteht ebenfalls ein funktionelles *EGFP* Allel, allerdings wird dadurch der DSB nicht repariert. Zur Reparatur des DSB muss dieses Ereignis mit einem NHEJ Ereignis verknüpft sein (3). Durch ein SSA Ereignis kann ebenfalls unter Reparatur des DSB ein funktionelles *EGFP* Allel entstehen (4).

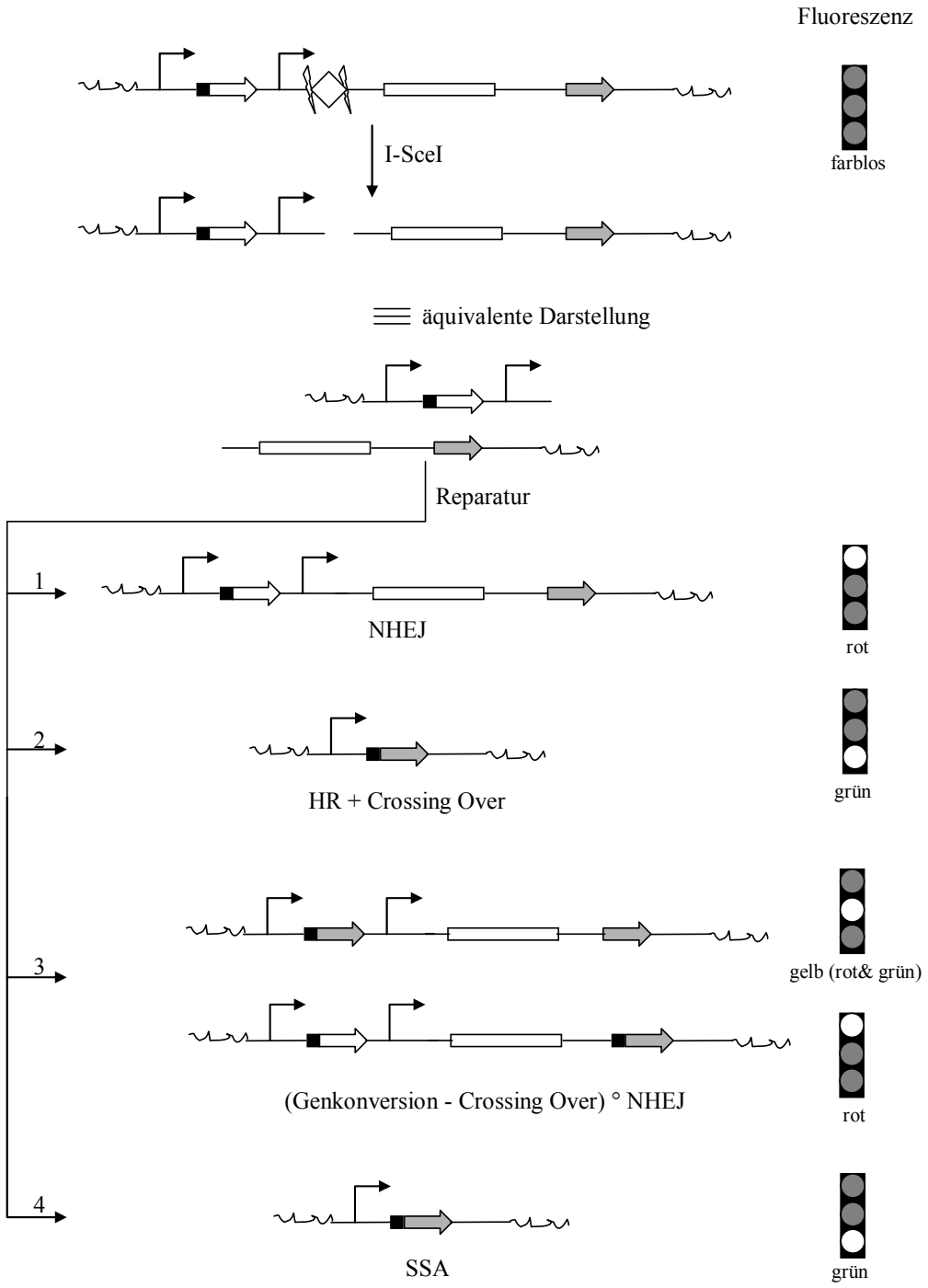


Abbildung 38: Beim DSON System wird in einer anfänglich nicht fluoreszierenden Zellpopulation die Endonuklease I-SceI zur Induktion der Doppelstrangbrüche links und rechts vom non-sense ORF, welcher die Translation des DSRed2 Proteins verhindert, exprimiert (*DSRed2* ORF als Rechteck dargestellt). Die Reparaturereignisse (1), (2) und (4) verlaufen analog zu den Ereignissen im DSOFF System. Allerdings entstehen in diesem System durch ein NHEJ Ereignis rote Zellen (1). Durch ein Genkonversionsereignis, welches zur Reparatur des DSB mit einem NHEJ Ereignis verknüpft ist, können nun gelb fluoreszierende Zellen entstehen (3, oben) oder rot fluoreszierende Zellen, da das Genkonversionsereignis nicht zu einer Rekonstitution eines funktionellen *EGFP* Allels führen muss, welches dann von einem Promotor auch transkribiert wird. (3, unten). Es wird also ein homologieabhängiges Ereignis, nämlich das Genkonversionsereignis, übersehen und nur das NHEJ Ereignis detektiert.

In der G2 Phase des Zellzyklus steht durch das homologe Schwesterchromatid ein weiterer Partner für die homologe Rekombination zu Verfügung. Die Analyse der möglichen Rekombinationsprodukte ist deshalb weitaus komplexer. Die Abbildung 39 zeigt mögliche Vorgänge in der G2 Phase für das DSOFF System. In der Abbildung 40 sind die analogen Vorgänge für das DSON System erklärt. Auch in diesem Fall werden, mit den für die G1 Phase erklärten Einschränkungen, NHEJ Ereignisse durch nicht fluoreszierende, bzw. rot fluoreszierende Zellen angezeigt, HR Ereignisse durch grün fluoreszierende Zellen.

Werden in der G2 Phase in nur einem Chromatid die Doppelstrangbrüche induziert, so können die resultierenden Reparaturereignisse aufgrund der Fluoreszenzmarker nicht bemerkt werden (Abbildung 41). Beim DSOFF System bleiben die Zellen durch ein Genkonversionsereignis rot fluoreszierend, obwohl ein homologieabhängiges Reparaturereignis stattgefunden hat. Beim DSON System bleiben die Zellen weiterhin nicht fluoreszierend, obwohl ebenfalls ein Reparaturereignis stattgefunden hat. Idealerweise sollten sich daher möglichst alle Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus befinden, um eine erschöpfende Erfassung der Reparaturvorgänge zu ermöglichen. Da die Analyse der Reparaturereignisse zukünftig in RPE Zellen erfolgen soll und 85 % der Zellen dieser Linie sich bereits ohne Synchronisation der Kultur in G1 befinden, bzw. aber gegebenenfalls mit Aphidicolin synchronisiert werden (A. Hematulin, pers. Mitteilung, 2005) können, ist diese Bedingung erfüllbar.

Grundsätzlich sollte es also zukünftig möglich sein, NHEJ- und HR-vermittelte Reparaturereignisse über die Analyse der Fluoreszenzmaker mittels FACS zu quantifizieren. Obwohl in unseren Systemen der DSB nicht direkt in einem zur homologen Rekombination verwendeten *egfp* Allel induziert wird, kann dennoch mit einer erhöhten Rekombination zwischen den *egfp* Allelen nach Induktion des DSB gerechnet werden, da durch den DSB die Reparaturmaschinerie in die Nähe dieser Loci gebracht wird. Die Daten, die bis zur Fertigstellung der Arbeit in *NBS1* herunterregulierten Zellen gewonnen wurden, deuten auf eine Notwendigkeit des NBS1 Proteins für die Endverknüpfung von I-SceI geschnittenen DNA Enden hin (siehe Abbildung 34, S. 58). Dies unterstreicht die Bedeutung des MRN Komplexes für über NHEJ gesteuerte Reparaturwege. In einem *in vitro* Ansatz wurde die Bedeutung dieses Komplexes für genau diesen Weg demonstriert (Huang und Dynan 2002).

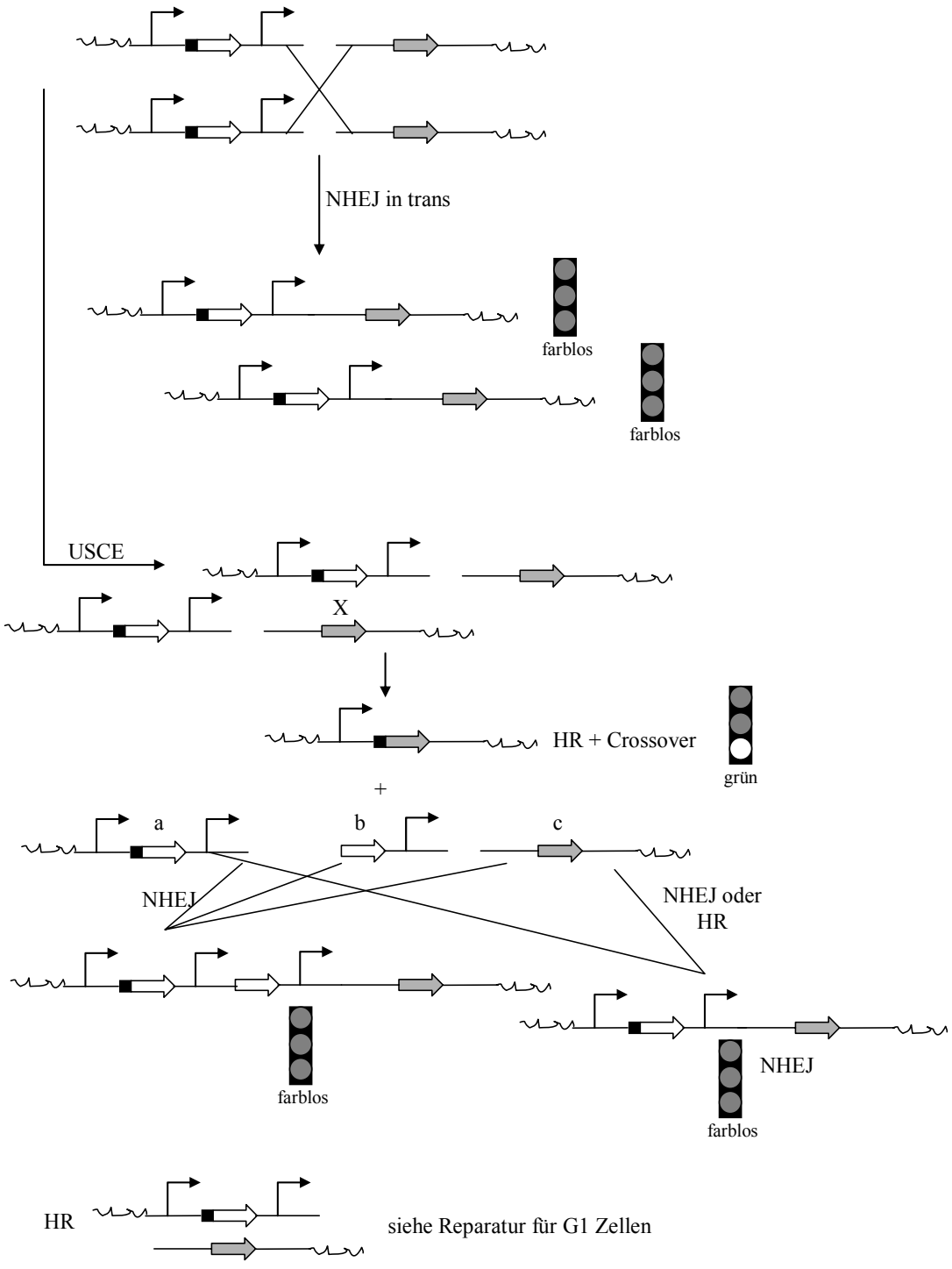


Abbildung 39: In der G2 Phase (<15% der Zellen) gibt es durch das nun vorhandene Schwesterchromatid mehr Möglichkeiten zur Reparatur des DSB – hier für das DSOFF System gezeigt. Durch ein NHEJ Ereignis in trans entstehen nicht fluoreszierende Zellen. Durch einen ungleichen Schwesterchromatidaustausch (USCE) zwischen den unterschiedlich mutierten *egfp* Allelen entsteht ein funktionelles *EGFP* Allel. Die Zelle, die dieses Chromatid erhält fluoresziert grün. Das andere Chromatid muss noch repariert werden, damit es das Überleben der Tochterzelle ermöglicht. Dies kann entweder durch zwei NHEJ Ereignisse zwischen den Fragmenten a, b, und c geschehen, oder unter Verlust des Fragments c durch nur ein NHEJ Ereignis zwischen den Fragmenten a und b. Zwischen den Fragmenten a und b kann auch, wie in Abbildung 37 beschrieben, ein HR Ereignis/ Genkonversionsereignis, gekoppelt mit einem NHEJ Ereignis stattfinden, um den DSB zu reparieren.

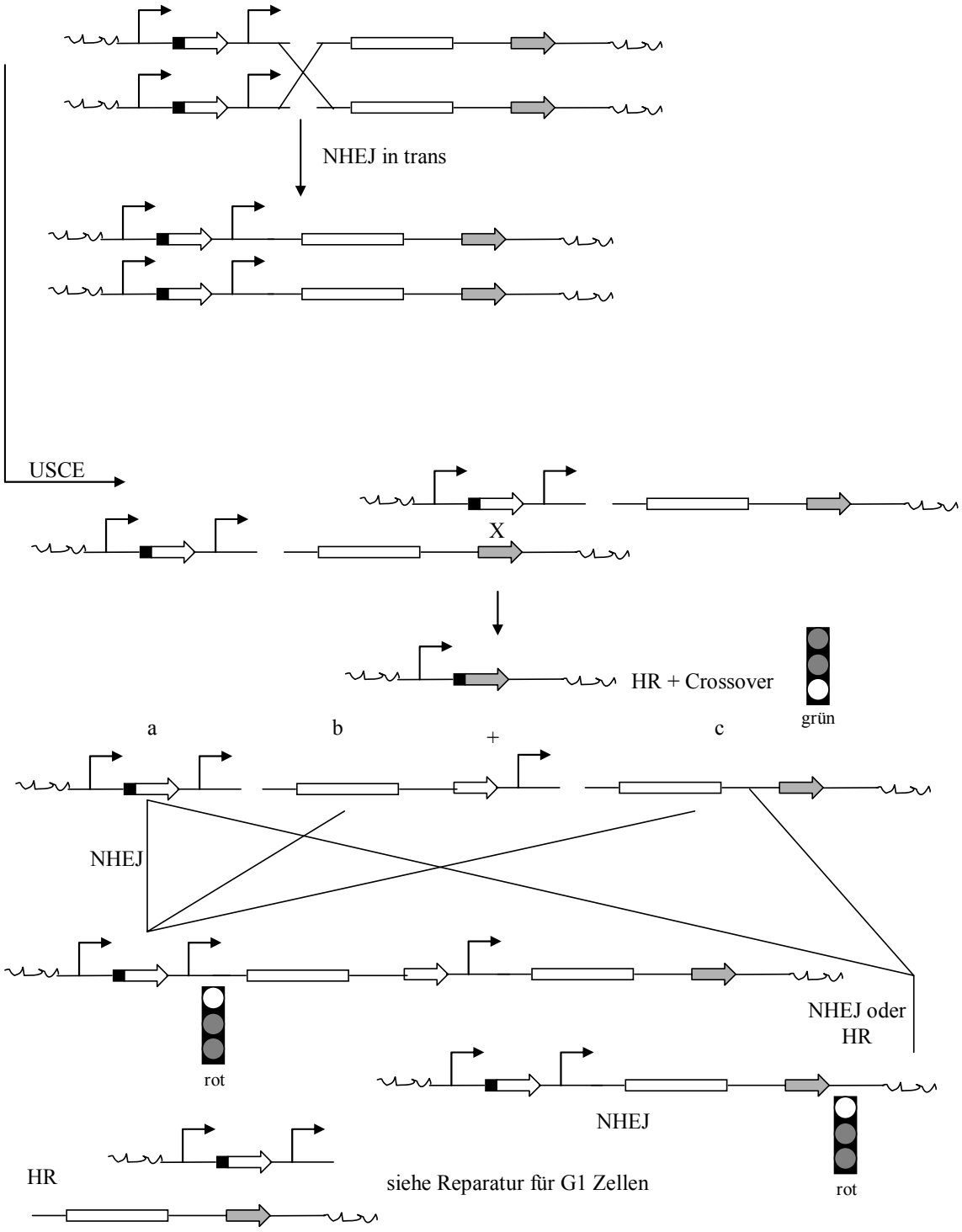


Abbildung 40: In der G2 Phase (<15% der Zellen) gibt es durch das nun vorhandene Schwesterchromatid mehr Möglichkeiten zur Reparatur des DSB – hier für das DSON System gezeigt. Es existieren die gleichen Möglichkeiten wie beim DSOFF System. Ein NHEJ Ereignis in trans resultiert in diesem System in rot fluoreszierenden Zellen. Ein ungleicher Schwesterchromatidaustausch führt zu einem Chromatid, welches das funktionelle *EGFP* Allel trägt. Das andere Chromatid muss analog zum DSOFF System über NHEJ Ereignisse oder ein HR Ereignis/ Genkonversionsereignis, gekoppelt mit einem NHEJ Ereignis (siehe Abbildung 38), repariert werden.

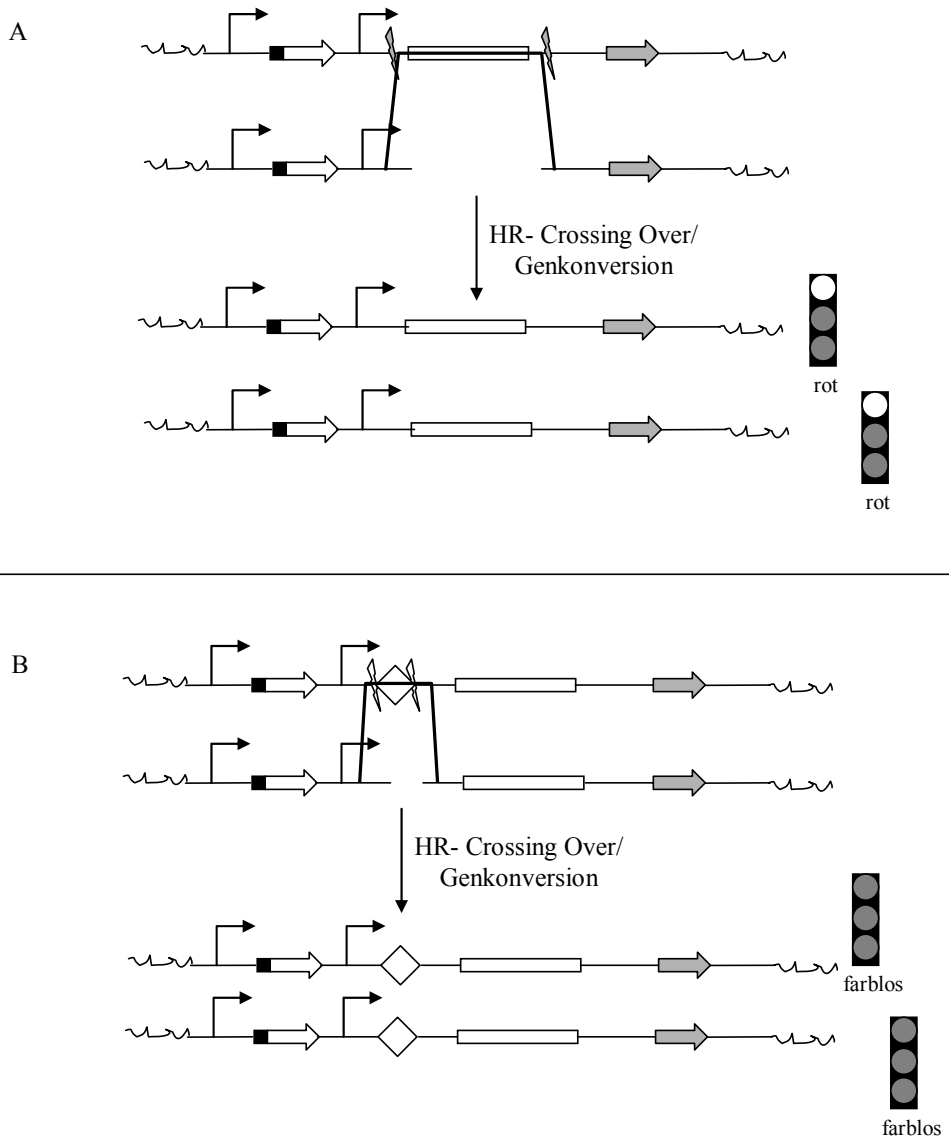


Abbildung 41: Werden in nur einem Chromatid die DSB erzeugt, so werden homologieabhängige Genkonversionsereignisse nicht detektiert. Im DSOFF System bleiben die Zellen nach einem solchen Ereignis weiterhin rot fluoreszierend (A). Im DSON System wird ein solches Ereignis ebenfalls nicht bemerkt, da die Zellen nach diesem Reparaturweg weiterhin nicht fluoreszent bleiben (B).

5 Material und Methoden

5.1 Beschreibung der Versuche

5.1.1 Zellkultur

5.1.1.1 V79B

Zellen der adherenten Hamsterfibroblastenlinie wurden in Nutrient Mixture F-10 (Ham) Medium mit 10% FCS (v/v) und 10 U/ ml Pen/Strep bei 37°C, 5% (v/v) CO_2 kultiviert und 1-2 x in der Woche passagiert. Zur Passsage wurden die Zellen zunächst 1x mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsinlösung vom Boden der Schale abgelöst und ein Aliquot in neues Medium überführt. Zur Selektion auf Hygromycinresistenz wurde dem Medium Hygromycin bis zu einer Endkonzentration von 150 µg/ml zugesetzt.

5.1.1.2 lymphoblastoide Zelllinien

5.1.1.2.1 Kultur

Die vier lymphoblastoiden Zelllinien P111, P112, P306 und P247 wurden in RPMI 1640 Medium mit 15% FCS (v/v) und 10 U/ ml Pen/Strep bei 37°C, 5% (v/v) CO_2 kultiviert. Die Passage erfolgte zweimal in der Woche. Für die Versuche wurden Zellen mit einem Titer von $0{,}7x10^6$/ ml verwendet. Die Bestimmung des Zelltiters erfolgte mit dem *CoulterCounter,* wobei die Verdünnung der Zellsuspension mit 0,9 % (w/v) NaCl Lösung angesetzt wurde.

5.1.1.2.2 Überprüfung der Identität

Zur Überprüfung der Identität der Zellkulturen (*NBS1*$^{-/-}$ oder *NBS1*$^{+/-}$*)* wurde die genomische DNA aus ca. 10^6 Zellen isoliert (*Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega*). Die DNA wurde in 50 µl beigelegtem Hydratationspuffer gelöst und 0,2 µl der DNA Lösung wurde in die PCR Reaktion (20 µl Reaktionsvolumen) eingesetzt. 10 µl der PCR Reaktion wurden mit 2 µl 6x DNA-Auftragspuffer versetzt und auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt.

Reaktionsablauf der PCR:

Reaktionspuffer	1x	95°C, 3 min	
[dNTP]	2 µM	95°C, 20 s	35 Wiederholungen
[$MgCl_2$]	1,5 mM	50°C, 20 s	
Taq-Polymerase	0,5 U	72°C, 15 s	
[Oligonukleotide]	0,25 µM	72°C, 7 min	

5.1.1.3 Jurkat

Jurkatzellen wurden bei 37°C, 5% CO_2 (v/v) in RPMI 1640 Medium mit 10 % (v/v) FCS und 10 U/ ml Pen/ Strep kultiviert. Die Passage erfolge 1-2 x in der Woche analog zu den lymphoblastoiden Zelllinien.

5.1.1.4 Gefrierkultur der Zellen

Zur dauerhaften Aufbewahrung der Zellen wurden Kulturen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Suspensionszellen wurden dazu durch Zentrifugation bei 300 g für 5 min pelletiert und in Kulturmedium mit einem Zusatz von 10 % (v/v) DMSO resuspendiert (bis $5x10^6$ Zellen/ ml). Die Suspension wurde in Cryoröhrchen überführt und die Röhrchen im *Nalgene ®Cryo 1°C Freezing Container* über Nacht bei -80°C inkubiert. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff zur dauerhaften Aufbewahrung überführt. Adherente Zellen wurden zunächst durch eine Trypsinbehandlung in Suspension gebracht und die Supsension in eine PBS/ 10 % FCS Lösung überführt. Die Suspension wurde bei 300 g für 5 min zentrifuguiert und das Zellpellet in Kulturmedium mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert und die Zellsuspension wurde anschließend in Cryoröhrchen überführt und wie die Suspensionszellen weiterverarbeitet.

5.1.2 Behandlung der Zellen

5.1.2.1 γ-Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte an einer γ-Quelle mit ^{137}Cs als Quantenquelle bei Raumtemperatur in Luftatmosphäre bei einer Dosis von 0,7 Gy/ min.

5.1.2.2 Caspase-8 Inhibition *in vivo*

2 h vor der Bestrahlung wurden die Zellen mit 100 µM eines Caspase-8 Inhibitors (*Z-IETD-FMK*) behandelt.

5.1.2.3 CD95 vermittelte Apoptose

5.1.2.3.1 agonistischer Antikörper

CD95 vermittelte Apoptose wurde durch Zugabe des agonistischen anti-CD95 Antikörpers, Klon CH11, zum Medium induziert. Die Konzentration im Medium war 0-100 ng/ml. Für die Analyse der Apoptosedetektion wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet.

5.1.2.3.2 antagonistischen Antikörper

Um die CD95 vermittelte Apoptose zu blockieren, wurde 2 h vor Bestrahlung ein antagonistischer anti-CD95 Antikörper, Klon ZB4, in das Medium pipettiert (Endkonzentration 200 ng/ ml). Anschließend wurden die Zellen wie gewohnt bestrahlt.

5.1.3 Zelltransfektionen

5.1.3.1 V79B Zellen

Für die Transfektionen wurden verschiedene Reagenzien (*X-Treme, Effectene, SuperFect)* und Protokolle ausprobiert. Die Transfektionseffizienz wurde durch die Transfektion der Zellen mit einem Plasmid zur Expression des rot fluoreszierenden DSRed2 Proteins 48 h nach der Transfektion entweder durchflußzytometrisch oder durch Auszählen im Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Dabei erwies sich *X-Treme* als am effektivsten und wurde für die weiteren Versuche weiterverwendet.

Die Transfektion erfolgte in 6-Lochplatten. 16 h vor der Transfektion wurden $0{,}3 \times 10^6$ Zellen je Loch ausgesät. Der Ablauf der Transfektion erfolgte wie im beigelegten Protokoll angegeben. Eine DNA Menge von 2,3 µg und ein Verhältnis von DNA-Menge/ Transfektionsreagenz von 1µg/ 2,0 µl erwies sich dabei als optimal.

5.1.3.2 Jurkat Zellen

Jurkat Zellen wurden mittels Elektroporation transfiziert. Pro Transfektionsansatz wurden 10^7 exponentiell wachsende Zellen pelletiert (300 g, 5 min) und 1x mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 400 µl Medium (incl. Serum, Pen/ Strep) resuspendiert und die Suspension in eine 4 mm Elektroporationskuvette überführt, in die 40 µg DNA vorgelegt wurden.

Die Elektroporation erfolgte bei 310 V und einer Kapazität von 950 µF. Nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension in 10 ml frisches Medium überführt. 18 h nach der Transfektion mit einem Kontrollplasmid, welches für ein grün fluoreszierendes Protein codiert, können bereits grüne Zellen beobachtet werden. Im Mittel wird mit diesem Protokoll eine Effizienz von 10 % erreicht, allerdings konnte im besten Fall eine Effizienz von 40 % erreicht werden.

5.1.4 Durchflußzytometrie

5.1.4.1 Apoptose

In der Arbeit wurde Apoptose durchflußzytometrisch mit zwei Methoden analysiert: Annexin-V-Fluos Färbung und SubG1 Peak Bestimmung. Für die lymphoblastoiden Zellen P111, P112, P306 und P247 erwies sich die SubG1 Methode als verlässlicher, da mit der Annexin-V-Fluos Färbung die nekrotischen und apoptotischen Zellen auch bei ausreichender Kompensation der sich überlagernden Spektren, nicht gut voneinander getrennt werden konnten.

5.1.4.1.1 Annexin-V-Fluos Färbung

Für die Annexin-V-Fluos Färbung wurden 1- 2x 10^6 Zellen pelletiert (200 g, 5 min) und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wird dann in 50 µl Annexin-V-Fluos Färbelösung resuspendiert und der Ansatz 10- 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden die Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Die grüne Fluoreszenz (Annexin-V-Fluos) wurde mit einem Bandpassfilter für Wellenlängen um 530 nm aufgenommen, die rote Fluoreszenz (PI) wurde mit einem Langpassfilter für Wellenlängen >600 nm detektiert. Die Anregungswellenlänge war 488 nm. Nekrotische Zellen sind Annexin-V-Fluos/ PI positiv, apoptotische Zellen sind Annexin-V-Fluos positiv, aber PI negativ, gesunde Zellen sind für beide Farbmarker negativ.

5.1.4.1.2 SubG1 Peak

Mit der Bestimmung der SubG1 Population (nach http://www.molbio.princeton.edu/facility/flowcyt/Apoptosis.html) lassen sich apoptotische Zellen quantifizieren, da diese durch den Abbau der DNA weniger DNA enthalten, als die gesunden Zellen in G1 des Zellzyklus. Ungefähr 2x 10^6 Zellen werden durch Zentrifugation (300g, 5 min) geerntet und 1x mit PBS+ 0,1 % (w/v) BSA (PBS+) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS+ resuspendiert und zur Suspension wurden 3 ml eiskalter Ethanol pipettiert und sofort gemischt. Die Zellen wurden so für mindestens 1 h bis über Nacht bei 4°C fixiert und anschließend bei -20°C aufbewahrt, bzw. gleich weiterverarbeitet. Nach der Fixierung

wurden die Zellen 2x mit PBS+ gewaschen und in 500 µl PBS suspendiert. Zur Suspension wurden 500 µl DNA Extraktionspuffer gegeben und gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen abzentrifugiert und das Zellpellet in 500 µl PI-Färbelösung mit RNAse A resuspendiert. Der Ansatz wurde vor der Analyse mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und kann dann einige Tage bei 4°C aufbewahrt werden, bzw. wird sofort analysiert.

Zur durchflußzytometrischen Analyse wurden die Zellen anhand von Zellen einer unbehandelten Kontrollkultur über die Fluoreszenzeigenschaften der FSC/ SSC Kanäle detektiert und der DNA Gehalt der Zellen bei einer Fluoreszenz von >600 nm auf einer linearen Skala quantifiziert. Die Anregungswellenlänge war 488 nm. Durch Analyse der Spannungsabfallkurve am Fluoreszenzdetektor (Peakhöhe, Peakbreite des Fluoreszenzsignals über die Zeit) wurden Zelldubletten, die die Auswertung stören, nicht miterfasst. Alle Zellen die eine geringere Fluoreszenz als Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus hatten, wurden als apoptotisch klassifiziert.

5.1.4.2 Detektion der DSRed2 positiven Zellen

Die adherenten V79B- und RPE Zellen wurden vor der durchflußzytometrischen Analyse durch eine Trypsinbehandlung in eine Einzelzellsuspension überführt. Die Suspension wurde zu mindestens 4 Teile PBS/ 10% FCS Lösung gegeben und zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in einem geeigneten Volumen in PBS/ 10% FCS aufgenommen und analysiert. Als Negativkontrolle dienten jeweils scheintransfizierte Zellen. Die Fluoreszenz wurde mit einem Breitbandfilter für Wellenlängen um 610 nm aufgenommen. Die Anregungswellenlänge war 488 nm. Um durch starke Autofluoreszenz falsch positiv rot fluoreszierende Zellen auszuschließen, wurde gleichzeitig ein grüner Fluoreszenzkanal mit aufgenommen. Die Intensitäten der roten Fluoreszenz wurde gegen die Intensitäten der grünen Fluoreszenz aufgetragen, hohe Autofluoreszenz bedeutet ein hohes Signal in beiden Fluoreszenzkanälen, weswegen diese Zellen gut von den eigentlich rot fluoreszierenden Zellen unterschieden werden konnten.

5.1.5 Proteinbiochemie

5.1.5.1 Zellaufschluss

Für den LCK/ Tubulinnachweis wurden ca. 0,3x 10^6 Zellen (P111, P112, P247, P306) in Ripa Puffer aufgeschlossen. Dazu wurde die gewünschte Zellzahl durch abzentrifugieren (300g, 5 min) gewonnen, das Pellet 1x mit PBS gewaschen und anschließend in 20 µl Ripa Puffer resuspendiert. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert und hochtourig (15000 g, 15 min, 4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis zu einer Endkonzentration von 1x mit Lämmlipuffer versetzt.

Für den PARP-1 Nachweis wurden ca. 10^6 Zellen (P111, P112, P247, P306) geerntet, analog wie oben erklärt gewaschen und dann mit Lysispuffer II, wie oben erklärt, lysiert und mit Lämmlipuffer versetzt.

Die mit Lämmlipuffer versetzten Zellextrakte wurden bei 95°C 5 min lang gekocht und dann bei -20°C verwahrt, bzw. gleich weiterverarbeitet.

5.1.5.2 SDS-Page und Westernblot

Die Proteine wurden auf 10%igen Gelen aufgetrennt. Dabei fand das System nach Lämmli, also mit Sammel- und Trenngel Verwendung. Aufgetrennt wurde bei 130 V für ca. 1,5 h. Als Laufpuffer diente 1x SDS-Page Laufpuffer.

Zusammensetzung der Gele (Volumina sind für 1 Gel angegeben):

Sammelgel (5% PAA)

- 500 µl 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- 333 µl 30% (w/v) Acrylamid Lösung
- 1,13 ml Wasser bidest.
- 20 µl 10%ige (w/v) SDS Lösung
- 20 µl 10%ige (w/v) APS-Lösung
- 2 µl TEMED

Trenngel (10% PAA)

- 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- 1,66 ml 30% (w/v) Acrylamid Lösung
- 2,0 ml Wasser bidest.
- 50 µl 10%ige (w/v) SDS Lösung
- 50 µl 10%ige (w/v) APS-Lösung
- 5 µl TEMED

Der Transfer der Proteine erfolgte auf eine Nitrocellulosemembran im Semi-Dry-Blot-Verfahren. Der Blotaufbau erfolgte wie angegeben: Anode – Blotting Papier – Nitrocellulosemembran – Gel – Blotting Papier. Die Membran und das Blottingpapier wurden zuvor in Towbinpuffer getränkt. Das Gel wurde einige Minuten lang in Towbinpuffer inkubiert. Der Transfer erfolgte bei 10 V für 30 min. Nach dem Transfer wurden die Membranen in einer Lösung aus 3 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T geblockt. Die Membranen wurden bei 4°C über Nacht mit primären Antikörper dekoriert. Die Antikörper wurden dafür in 1x *Roti-Block* 1:1000 verdünnt und zu den in Autoklavierbeuteln eingeschweißten Membranen gegeben.
Die Inkubation mit zweitem Antikörper erfolgte nach 3x 10 min langen Waschschritten mit TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur. Der zweite Antikörper ist mit Meerrettichperoxidase gekoppelt und wurde in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Anschließend wurde erneut 3x für 10 min in TBS-T gewaschen und danach noch einmal kurz in PBS.
Die Chemilumineszenzdetektion erfolgte mit ECL-plus. Die Filme wurden nach ca. 1 min Belichtungszeit entwickelt.

5.1.5.3 Caspase Aktivitätsbestimmungen

Für die Aktivitätsbestimmungen wurden die Zellen in Lysispuffer II wie oben beschrieben aufgeschlossen. Ein 1-2x 10^6 Zellen entsprechendes Volumen Zellextrakt wurde in Caspaseassaypuffer suspendiert und die optische Dichte bei 405 nm gemessen (Zeitwert 0 min). Dann wurde das entsprechende Substrat (200 µM) hinzugegeben (siehe Material) und der Ansatz bei 37°C inkubiert und die optische Dichte des Ansatzes bei den angegebenen Zeitpunkten ermittelt. Zur Inhibierung der Caspaseaktivität wurden die Zellextrakte mit den Inhibitoren (siehe Material) 30 min vor dem Reaktionsansatz bei 37°C vorinkubiert. Die im Ergebnissteil angegeben Faktoren resultieren aus den Berechnungen der Aktivitäten mittels linearer Regressionsanalyse.

5.1.6 Quantifikationen auf RNA Ebene

5.1.6.1 Herstellung RNAse freier Lösungen durch DEPC Behandlung

Alle für die RNA Arbeiten verwendeten Lösungen (außer Tris-haltige Puffer) wurden vor ihrer Verwendung mit 0,1% (v/v) DEPC versetzt, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert.

5.1.6.2 RNA Isolation

Die Isolierung der gesamten RNA aus den Zellen erfolgte mit *Trizol.* Bei der Isolierung wurde wie im beigelegten Protokoll vorgeschlagen vorgegangen. Die RNA wurde in einem geeigneten Volumen DEPC-H_20 zurückgelöst. Zur Konzentrationsbestimmungen wurde eine geeignete Verdünnung in TE-Puffer hergestellt und die Absorption bei 260/ 280 nm im Filterphotometer gegen einen Leerwert gemessen. Dabei entspricht 1 OD A_{260} bei einer Schichtdicke von 1 cm einer RNA Konzentration von 40 µg/ ml. Die isolierte RNA kann bei -80°C längere Zeit aufbewahrt werden.

Zur Verwendung der RNA für die Microarrayexperimente wurde die möglicherweise noch enthaltende DNA in der RNA Präparation mithilfe einer DNAse Behandlung degradiert. Die RNA Lösungen wurden auf ein Volumen von 180 µl gebracht und 20 µl DNAse Puffer hinzugegeben. Dann wurden zum Anasatz 2 µl DNAse Lösung (1 U/ µl) pipettiert und der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNAse durch eine erneute *Trizol*extraktion aus dem Ansatz wieder entfernt.

5.1.6.3 RNA Qualitätskontrolle

Die RNA haltige Lösung wird als frei von Proteinkontaminationen betrachtet, wenn A_{260}/ A_{280}> 1,8. Mittels RNA Formaldehyd Agarose Gelelektrophorese wurde überprüft, ob die RNA intakt aus den Zellen isoliert wurde, oder ob eine Degradation stattgefunden hat. Dazu wurde ein Aliquot RNA Lösung mit ¼ Volumenteil 5x RNA Ladepuffer versetzt und auf ein Formaldehyd Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 110 V für 45 min in 1x FA-Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung gefärbt und fotografiert.

Herstellung des Gels (50 ml, 1,2%):

1,2 g Agarose

5 ml FA Gelpuffer

mit DEPC Wasser auf 50 ml auffüllen.

Die Suspension wurde in der Mikrowelle gekocht, bis sich die Agarose löst. Nach Abkühlung der Lösung auf 65°C im Wasserbad wurden 0,9 ml einer 37 %igen

Formaldehydlösung hinzugegeben und das Gel gegossen. Vor der Verwendung wurde es einige Minuten in FA-Laufpuffer äquilibriert.

5.1.6.4 quantitative PCR

Für die Quantifizierung der Transkriptmengen wurde ein quantitativer PCR Ansatz gewählt. Zunächst wurde hierfür wie oben beschrieben, die RNA aus den Zellen isoliert.

5.1.6.4.1 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte mit der reversen Transkriptase *SuperscriptII*. Der Ansatz und Ablauf der Reaktion erfolgte wie in der beiliegenden Anleitung beschrieben unter Verwendung von o$(dT)_{20}$ Oligonukleotiden. Für miteinander zu vergleichende Ansätze wurden gleiche RNA Mengen eingesetzt.

5.1.6.4.2 „Light Cycler“

Die quantitative PCR wurde im *Light Cycler* der Firma *Roche* ausgeführt. Für den Reaktionsansatz wurde ein fertiges Reagenzienkit dieser Firma verwendet. Bei der Auswahl der für die Amplifikation verwendeten Oligonukleotide wurde darauf geachtet, dass sie in unterschiedlichen Exons liegen, so dass eine Amplifikation der genomischen Sequenz sofort beim Betrachten der Schmelzkurve, bzw. der Analyse der Größe der Amplifikate aufgefallen wäre.

Ansatz für eine Reaktion:
7,1 µl H_2O
0,8 µl $MgCl_2$ (25 mM)
1,0 µl Roche-Mix (10x)
0,05 µl Oligonukleotid vorwärts (100 µM)
0,05 µl Oligonukleotid rückwärts (100 µM)

Reaktionsablauf:
Denaturieren 10 min bei 95°C

Amplifikation (55 Zyklen)

1 s 95°C

10 s 63°C

30 s 72°C (mit Beendigung des Schrittes wird die Fluoreszenz des Reationsansatzes gemessen)

Aufnahme der Schmelzkurve

10 s 70°C, dann Erhitzung auf 97°C mit einer Erhöhung der Temperatur um 0,1°C/ s. Die Fluoreszenz wird kontinuierlich gemessen.

Abkühlen auf 40°C für 15 s.

Nach Ablauf der Reaktion wurden zunächst die Schmelzkurven analysiert. Im idealen Fall entsteht nur ein PCR Produkt. Die Ableitung der Schmelzkurve nach der Temperatur zeigt deshalb nur ein Maximum, wie in der Abbildung 42 gezeigt. Dies war der Fall für die amplifizierten Transkripte der Gene *ACTB, LCK, CDKN1A, NBS1, ß2M*. Die Amplifikation des Transkriptes des *TNFRSF6* Genes ergibt einen verbreiterten Peak mit den in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotiden, da für dieses Gen verschiedene Transkripte existieren, die alle mit diesen Oligonukleotiden amplifiziert werden. Die anschließende Analyse der Produkte über Gelelektrophorese zeigt für die ersten fünf genannten Gene ein einheitliches PCR Produkt mit einer Größe von ca. 400 bp. Für *TNFRS6* ist ebenfalls ein vermeintlich einheitliches Produkt mit der Größe von ca. 700 bp zu erkennen, da sich die unterschiedlichen Transkripte in der Größe in nur wenigen bp voneinander unterscheiden.

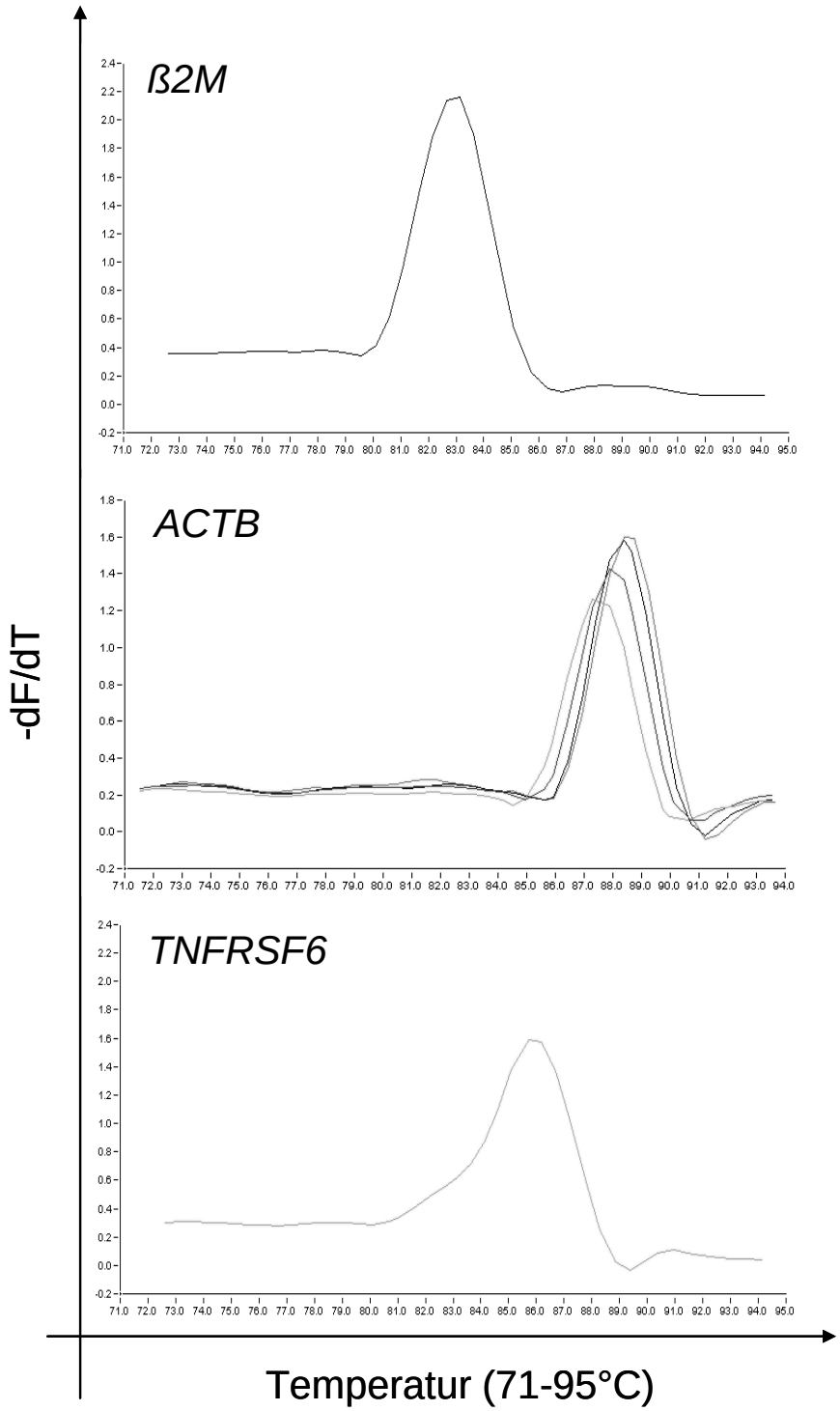


Abbildung 42: Analyse der Schmelzkurven der PCR Produkte. Aufgetragen ist die negative Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur. Im idealen Fall (*ß2M, ACTB*) zeigen die Schmelzkurven für ein Produkt nur einen Schmelzpunkt, d. h. ein Maximum im Kurvenverlauf. Für *ACTB* sind mehrere Schmelzkurven aus unterschiedlichen PCR Ansätzen übereinander dargestellt. Die Schmelzkurve für das *TNFRSF6* PCR Produkt zeigt einen verbreiterten Peak. Dies liegt daran, dass es für *TNFRSF6* verschiedene alternative Transkripte gibt, die mit dem Oligonukleotidpaar amplifiziert werden können.

Um die auf ein Haushaltsgen normalisierten Transkriptmengen bestimmen zu können, muss zunächst die Effizienz der PCR Reaktionen für jedes verwendete Oligonukleotidpaar bestimmt werden. Dazu wurde von einer vorherigen PCR das PCR Produkt wie folgt verdünnt und erneut als Matritze in eine quantitative PCR Reaktion eingesetzt: 10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7} und 10^{-9}. Die von der Software ausgegebenen „Crossingpoints“ CP wurden gegen den Logarithmus der Verdünungsstufe aufgetragen. Durch die Punkte lässt sich mittels Regressionsanalyse eine Gerade legen, aus deren Steigung s sich die Effizienz E der Reaktion berechnen lässt (Abbildung 43):

$$E = 10^{-1/s}$$

Herleitung:

Am CP gilt: m = const, wobei m die Masse der DNA bezeichnet,

deshalb gilt:

$$m = m_0 \cdot E^{CP},$$

wobei m_0 die Masse der DNA ist, die in die Reaktion eingesetzt wurde und nun E^{CP} mal amplifiziert wurde, bis der CP errreicht wurde.

Diese Gleichung ist äquivalent zu:

$$\log(m) = \log(m_0) + CP \cdot \log(E)$$

und kann umgeschrieben werden in:

$$CP = \frac{-1}{\log(E)} \cdot \log(m_0) + \frac{\log(m)}{\log(E)}$$

Werden nun die CP Werte gegen den Logarithmus der Verdünnung aufgetragen (also gegen $\log(m_0)$), so entspricht $\frac{-1}{\log(E)}$ die Steigung der Geraden, aus der sich, wie oben angegeben, die Effizienz berechnen lässt. Das Bestimmtheitsmaß der Geraden R^2 ist mit 0,9999 sehr gut, was auf einen nur minimalen Pipettierfehler bei dieser Methode schließen lässt, wobei diese Ungenauigkeit sicherlich die größte Fehlerquelle bei dieser Methode ist.

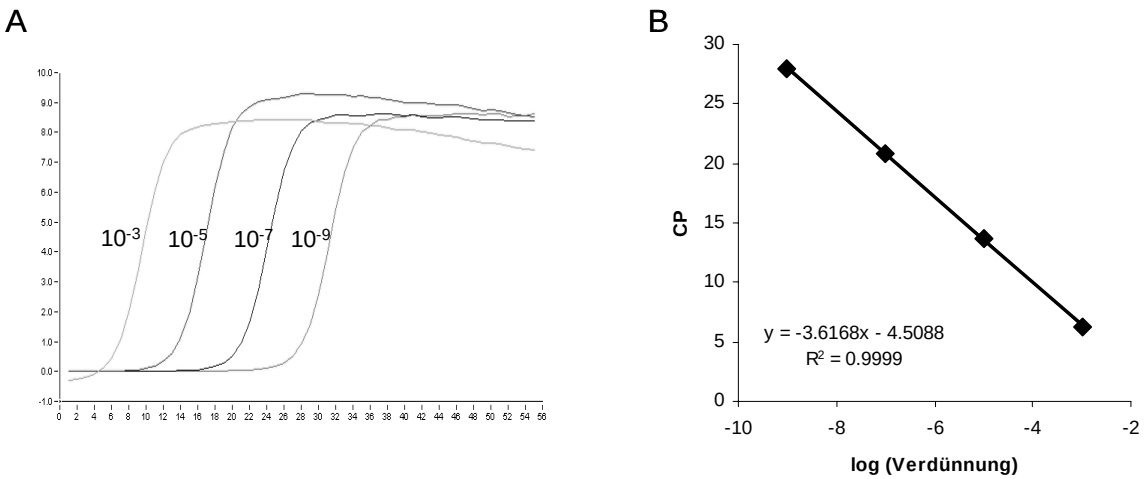


Abbildung 43: Die Berechnung der Effizienz der PCR Reaktion (beispielhaft für *ACTB* gezeigt) erfolgt über Regressionsanalyse. Es werden unterschiedliche, definierte Verdünnungen als Matritze in die PCR Reaktion eingesetzt (hier: 10^{-3}-10^{-9}). Die von der Software aus (A) (Fluoreszenz gegen Zykluszahl aufgetragen) ermittelten „Crossingpoints" werden wie in (B) gezeigt gegen den Logarithmus der Verdünnungsstufe aufgetragen. Durch sie kann eine Gerade gelegt werden, Begründung siehe Text. Aus der durch Regressionsanalyse ermittelten Steigung der Geraden lässt sich die Effizienz der Reaktion berechnen (siehe Text).

Für die in dieser Arbeit quantifizierten Transkripte wurden die in der Tabelle 4 notierten Effizienzen berechnet.

Genbezeichnung	Effizienz
ACTB	1,89
LCK	1,84
CDKN1A	1,83
NBS1	1,86 (Angermeier 2004)
ß2M	1,89
TNFRSF6	1,88

Tabelle 4: Die für die Berechnung verwendeten Effizienzen.

Mit den Effizienzen lässt sich nun die relative Transkriptmenge eines Gens (I) bezogen auf ein Haushaltsgen (H) berechnen, denn es gilt am CP:

$$m(I) = m_0(I) \cdot E(I)^{CP(I)} \quad \text{und} \quad m(H) = m_0(H) \cdot E(H)^{CP(H)}$$

und da ferner am CP gilt:

$$m(I) = m(H) = const$$

lässt sich formulieren:

$$1 = \frac{m_0(I)}{m_0(H)} \cdot \frac{E(I)^{CP(I)}}{E(H)^{CP(H)}}$$

woraus sich das gewünschte relative Verhältnis der Transkriptmenge eines Gens I zu einem Haushaltsgen H ergibt:

$$\frac{m_0(I)}{m_0(H)} = \frac{E(H)^{CP(H)}}{E(I)^{CP(I)}}$$

Meistens wird jedoch nicht dieses Verhältnis direkt angegeben, sondern das so ermittelte Verhältnis in einem Kontrollansatz wird gleich 1 gesetzt, und die anderen ermittelten Verhältnisse dazu in Relation gesetzt.

In dieser Arbeit wurden alle Daten – bis auf eine Ausnahme – auf die Haushaltsgene *ACTB* oder *ß2M* bezogen. Nur bei der *CDKN1A* Induktion nach Bestrahlung und Actinomycin D Behandlung wurde nicht auf ein Haushaltsgen normalisiert, weil durch die Behandlung mit diesen zwei Faktoren nicht sicher war, ob sie nicht auch die Transkriptmengen der Haushaltsgene beeinflussen.

5.1.6.5 Microarray

Bei der Produktion des Microarrays musste sichergestellt werden, dass es sich bei den auf die Glasoberfläche aufgebrachten PCR Produkte auch um die Amplifikate der gewünschten Gene handelte und das die PCR Reaktion ordnungsgemäß verlief und genügend PCR Produkt für das Aufbringen zu Verfügung stand. Ein Ablaufschema für diese Arbeiten zeigt das in Abbildung 44 dargestellte Flussdiagramm.

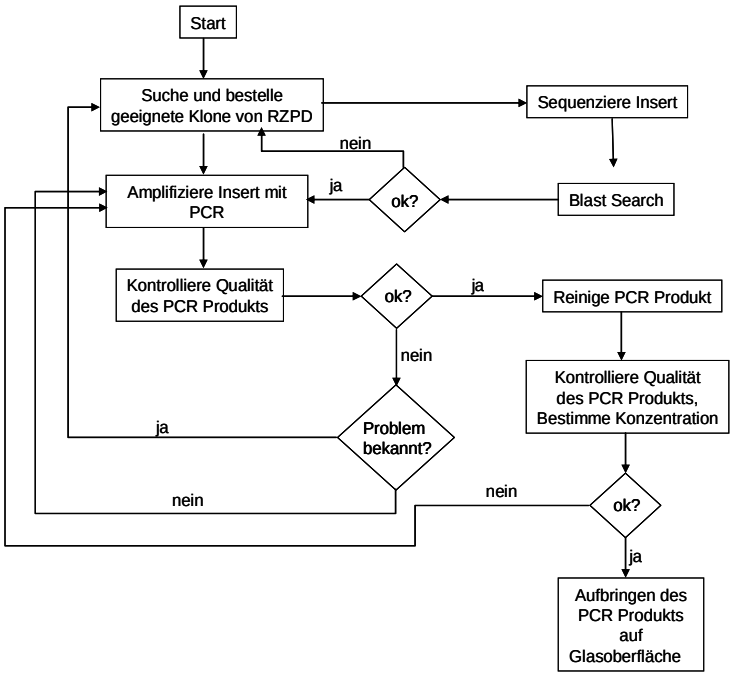


Abbildung 44: Ablauf der Microarrayproduktion von der Auswahl der geeigneten RZPD Klone bis zum Aufbringen des amplifizierten Inserts auf die Glasoberfläche.

5.1.6.5.1 Sequenzierung der Klone

Die angeforderten *E. coli* Klone wurden auf LB-Amp Platten ausgestrichen. Einzelne Kolonien wurden gepickt und mit ihnen 3 ml LB-Amp Flüssigmedium beimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Plasmide wurde mit einem *MiniPrep* Kit von *Qiagen* isoliert. Die Inserts der Plasmide wurden von beiden Seiten her sequenziert. Dabei wurden je nach Klon zwei der folgenden Oligonukleotide verwendet: T3, T7, -21M13, M13 reverse, SP6. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem *CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* nach Standardprotokoll durchgeführt. Die Sequenzierreaktion wurde nach Aufreinigung vollautomatisch im Sequenziergerät (*CEQ 3100, Beckman Coulter*) analysiert und die Sequenz wurde über eine *BLAST* Suche (http://www.pubmed.de/data/nlm.link.htm U/l) identifiziert.

5.1.6.5.2 Präparation der DNA und Amplifikation der Klone über PCR

Klone, die das gewünschte Insert enthalten, wurden in LB-Amp Flüssigmedium (ca. 2 ml) in 96-Lochplatten über Nacht schüttelnd inkubiert. Von der Bakterienkultur wurden 40 µl in eine neue Platte überführt und mit 200 µl H_2O aufgefüllt. Nach Versiegelung der Platte mit adhesiver PCR Abdeckfolie wurden die Platten 7 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten zehn Minuten bei 4500 rpm zentrifugiert und der DNA haltige Überstand in eine neue 96er Platte überführt und diese bei -20°C aufbewahrt.

Für die Amplifikation des cDNA Inserts mittels PCR wurden je 100 µl Reaktionsansatz 10 µl der so gewonnenen DNA als Matritze eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten ebenfalls im 96er Plattenformat unter Verwendung von universellen -21M13, M13 reverse Oligonukleotiden, die am 5' Ende jeweils eine 5' C6-Aminolinkergruppe trugen.

Reaktionsansatz (100 µl):

dNTP	0,2 mM	95°C, 7 min	
-21M13	0,5 µM	95°C, 30 s	
M13 reverse	0,5 µM	55-60°C, 1 min	40 Wiederholungen
PCR-Puffer	1x	60°C, 2 min	
Taq-Polymerase	0,025 U/µl	4°C, unendlich	

Für die Microarrayproduktion wurde jede Reaktion mindestens 4x durchgeführt.

Der Verlauf der PCR wurde über eine DNA Gelelektrophorese (1% Agarose) überprüft.

5.1.6.5.3 Aufreinigung der PCR Produkte

Die Aufreinigung der PCR Produkte erfolgte im 96er Hochdurchsatzformat mittels des Pipettierrobotersystems *Biomek 2000* unter Verwendung von *Multiscreen 96er Filtrationsplatten*. Das PCR Produkt wurde in 200 µl H_2O eluiert und die Konzentration mit einem 96er Spektrophotometer vermessen und das gereinigte Amplifikat zur Qualitätskontrolle nochmals auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen.

5.1.6.5.4 Spotten

Zunächst wurden die PCR Fragmente in einer Vakuumzentrifuge eingedampft und anschließend zunächst in H_2O gelöst. Dann wurde ein gleiches Volumen DMSO hinzupipettiert und die Mischung in 384er Platten transferiert. Die Arrays wurden mit dem *Affymetrix 417 Arrayer* hergestellt. Dabei wurde je Spot eine Menge von ca. 200 pl (ca. 75 fg DNA) auf die Glasoberfläche aufgebracht. Die Spotgröße beträgt 125 µm. Die fertigen Objektträger wurden drei Tage bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend unter Argonschutzatmosphäre eingeschweißt.

5.1.6.5.5 Herstellung der markierten cDNA

Zur Herstellung markierter cy3/ cy5 markierter cDNA aus isolierter RNA wurde das *Labelstar Array* Kit von *Qiagen* nach Anleitung verwendet. Allerdings wurde nach der Aufreinigung der markierten cDNA diese nicht im beigelegten Trishaltigem Puffer eluiert, sondern in H_2O, da die Trissalze des Puffers mit der Aldehydoberfläche der verwendeten Objektträger interagieren würden.

5.1.6.5.6 (Prä)Hybridisierung und Scannen der Microarrays

Vor der eigentlichen Hybridisierungsreaktion wurden die Microarrays zunächst einer Prähybridisierungsreaktion und zahlreichen Waschschritten unterzogen. Die Microarrays wurden 2x mit je 50 ml 0,2 % (w/v) SDS-Lösung für je 2 min gewaschen und anschließend nochmals 2x mit 50 ml H_2O für je 2 min. Dann wurden die Microarrays für 2 min zur Denaturierung der DNA in kochendes H_2O überführt. Nach Trocknung der Microarrays wurden diese für 5 min in eine immer frisch hergestellte Lösung aus 0,13 g $NaBH_4$, 40 ml PBS, 13 ml Ethanol zur Reduktion der noch freien Aldehydgruppen überführt, bevor sie erneut 3x mit 50 ml 0,2% SDS-Lösung und 2x mit 50 ml H_20 für 1 min je Waschschritt gewaschen wurden. Dann wurden die Objektträger bei 42°C für 1 h in einer Prähybridiserungslösung inkubiert und aschließend 2x kurz mit Wasser gewaschen. Vor der Hybridisierungsreaktion wurden die Microarrays erneut getrocknet.

Für die Hybridisierungsreaktion wurde die markierte cDNA Lösung auf ein Endvolumen von 7 µl in der Vakuumzentrifuge eingeengt und mit 7 µl 4x Hybridisierungspuffer (*Amersham*) versetzt. Anschließend wurden noch 14 µl deionisiertes Formamid und 0,3 µl Lachssperma-DNA Lösung (11,1 mg/ml) sowie 2 µl einer poly-dA-Lösung (1 U/ ml) hinzupipettiert. Der Ansatz wird bei 96°C für 4 min denaturiert und dann auf Eis gekühlt. Die Lösung wird auf ein Deckglas pipettiert und das Deckglas vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen auf den Microarray aufgelegt. In die Hybridisierungskammern werden ein paar Tropfen 0,2x SSC Lösung vorgelegt und der Microarray in die Kammer gelegt. Die Kammern wurden wasserdicht verschlossen und über Nacht unter Wasser im Wasserbad bei 42°C inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurden die Microarrays gewaschen und zwar wie folgt:

1. 0,5x SSC/ 0,01% SDS, 5min
2. 0,06x SSC/ 0,01% SDS, 5 min
3. 0,06x SSC, 2 min

Anschließend wurde der Microarray gut getrocknet und gescannt, um die Intensitäten der Spots zu ermitteln.

5.1.6.5.7 Datenerhebung und Ermittlung der Grenzen

Die Auswertung des Arrays und insbesondere die Ermittlung der Grenzen erfolgte nach folgendem Algorithmus:

1. Definitionen:
   - $I_{a,b}$ bezeichnet die Intensität des Spots *b* auf dem Chip *a*.
   - Background $B_{a,b}$ bezeichnet den lokalen Hintergrund um den Spot *b* auf dem Chip *a*
   - Signal $S_{a,b}$ bezeichnet das Signal des Spots b auf dem Chip a, wobei gilt : $S_{a,b} = I_{a,b} - B_{a,b}$
   - *n* bezeichnet die gesamte Anzahl der Spots auf dem Chip

2. Berechnungen
   - Ermittle $I_{a,b}$ und $B_{a,b}$ mit dem Programm „ArrayPro“
   - Berechne daraus $S_{a,b}$
   - Entscheide wie hoch ein Signal über dem Hintergrund liegen muss, damit es als exprimiert gilt: Hilfe: Schaue die Spikes an, diese sollten nach der Entscheidungsfindung nicht als exprimiert auftreten.
   - Berechne für jeden Chip *a* die Summe der Signale $GS_a = \sum_{b=1}^{n} S_{a,b}$
   - Berechne für einen Chip den Korrekturfaktor *k*, so dass gilt: $GS_a = k\, GS_b$ (Normalisierung)
   - Berechne $KS_{b,b}$ auf folgende Weise: $KS_{b,,b} = k\, S_{b,b}$
   - Berechne den Quotienten $R_z = KS_{b,z} / S_{a,z}$, wobei *z* die Spotnummer ist
   - Berechne $\log_2(R_z)$
   - Sortiere die Liste nach aufsteigendem $\log_2(R_z)$

- Nummeriere diese Liste von 1..n neu durch, der Spot mit dem kleinsten $\log_2(R_z)$ erhält die neue Ordnungsnummer o=1, der Spot mit dem höchsten $\log_2(R_z)$ erhält die neue Ordnungsnummer o=n.
- Stelle $\log_2(R_z)$ über *o* graphisch dar
- Berechne für den Graphen eine Ausgleichsgerade und ermittle die Steigung, sowie den y-Abschnitt
- Berechne als untere Schwelle den theoretischen $\log_2(R_1)$ für den Spot Nr. 1
- Berechne als obere Schwelle den theoretischen $\log_2(R_n)$ für den Spot Nr. *n*
- Betrachte nur noch die Spots, die unterhalb der unteren Schwelle oder oberhalb der oberen Schwelle liegen
- Suche zu diesen Spots das zugehörige Duplikat und berechne den Mittelwert sowie die Standardabweichung der Werte
- Betrachte nun nur noch Gene, die mehr als eine Standardabweichung von den Grenzen abweichen
- Schaue die Spots an und achte darauf, dass sie zumindest auf einem Chip als exprimiert gekennzeichnet wurden

Die Ermittlung der Grenzen ist anschaulich noch mal in Abbildung 45 dargestellt.

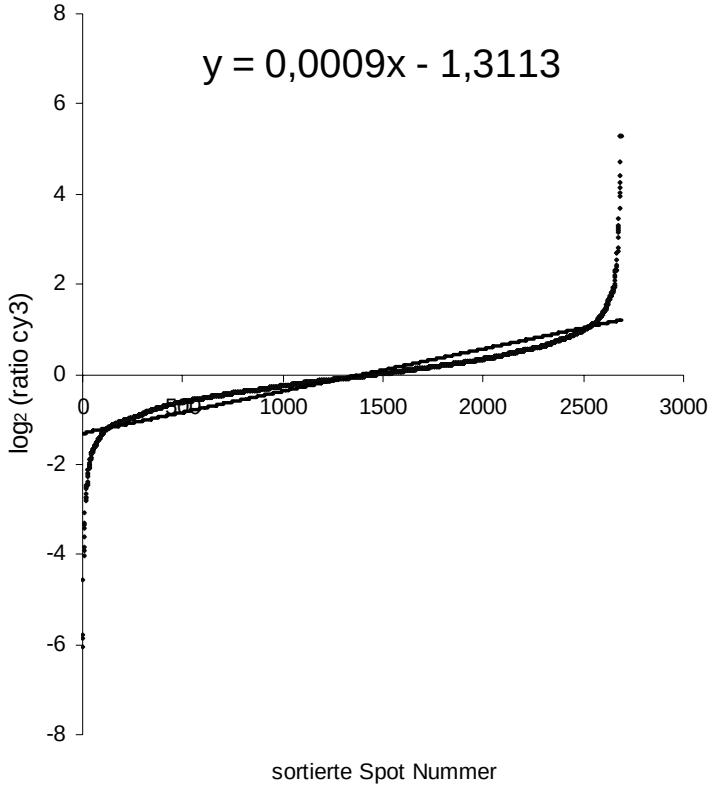


Abbildung 45: Die Ermittlung der Grenzen erfolgte über lineare Regressionsanalyse. Dazu wurden die $\log_2$(ratios) der Intensitäten über die sortierten Spot-Nummern aufgetragen. Um die sortierten Spot-Nummern zu erhalten, wurde zunächst eine Relation mit Spot-Nummer und Intensität erzeugt. Die Liste wurde dann nach der Größe des Zahlenwertes der log2(ratios) der Intensitäten sortiert, wobei die Liste anschließend neu nummeriert wurde und zwar so, dass der Spot mit dem niedrigsten Wert die Nummer 1 zugewiesen bekam, der Spot mit dem höchsten Wert die Nummer 2688. Durch die Punkte wurde eine Regressionsgerade gelegt über deren Gleichung die Grenzen ermittelt werden können. Für den hier dargestellten Verlauf gilt als Untergrenze = 0,0009x1 -1,3113 = -1,3 und als Obergrenze = 0,0009x2688-1,3113 = 1,1.

So wurden alle Gene ermittelt, die unterschiedlich exprimiert waren. Die Ermittlung der Gensymbole und Verrechnung der Duplikate erfolgte in der relationalen Datenbankabfragesprachen SQL mit Hilfe der in *MS-Access* integrierten SQL Schnittstelle.

Programmierung der Abfragen:
Alle PCR Produkte wurden auf dem Array doppelt aufgebracht und zwar in einem Abstand von 12 Spots. Deshalb enthält beispielsweise der Spot 13 das gleiche PCR Produkt wie der Spot 1. Oder allgemein ausgedrückt, der Spot n+12 das gleiche Produkt wie der Spot n. Zur Verrechnung der Duplikate wurden zunächst zwei Listen erstellt und zwar eine Liste für jeden Spot eines Duplikats, um die zur Basis 2 logarithmierten Intensitätsverhältnisse (log2Ratio) miteinander verrechnen zu können.

1. Verrechnung der Duplikate:
    - Erstelle die Liste mit dem ersten Spot der Duplikate (Ordnungsnummern 1-12; 25-36; ...; 2665-2676) mit :

      Duplikat1

      SELECT * FROM Tabelle1

      WHERE

      (INT((SpotNr-1)/12))/2=INT((INT((SpotNr-1)/12))/2);

    - und mit dem zweiten Spot der Duplikate (Ordnungsnummern 13-24; 37-48;...; 2677-2688) mit:

      Duplikat2

      SELECT * FROM Tabelle1

      WHERE

      (INT((SpotNr-1)/12))/2<>(INT((INT((SpotNr-1)/12))/2));

      SpotNr ist die fortlaufende Spotnummer der PCR-Produkte auf dem Array, Tabelle1 enthält die Einträge für die Ordnungsnummern der PCR-Produkte (1-2688), die gemessene Intensität und das Gensymbol für das PCR-Produkt.

Das Resultat der beiden Abfragen *Duplikat1* und *Duplikat2* ist wiederum eine Tabelle. Durch Bildung des Kreuzproduktes *Duplikat1 X Duplikat2* und Selektion der Tupel, für die gilt: Duplikat2.SpotNr = Duplikat1.SpotNr+12 entsteht eine Tabelle, in denen die Intensitäten der Spots der Duplikate in einer Zeile stehen und die sich deshalb einfach miteinander verrechnen lassen.

DuplikatJoin

```
SELECT Duplikat1.Symbol, Duplikat2.Symbol, Duplikat1.SpotNr,
Duplikat1.log2Ratio, Duplikat2.SpotNr, Duplikat2.log2Ratio,
((Duplikat1.log2Ratio+Duplikat2.log2Ratio)/2) AS AvgLog2Ratio
FROM Duplikat1, Duplikat2
WHERE
    Duplikat2.SpotNr=Duplikat1.SpotNr+12;
```

In der resultierenden Tabelle wird zusätzlich ein neues Attribut eingeführt, nämlich der Mittelwert der Intensitätsverhältnisse der beiden Punkte eines Duplikats (AvgLog2Ratio).

2. Selektion der Tupel mit differentiell exprimierten Gene
   - Die folgende Abfrage ermittelt nur Zeilen in der von *DuplikatJoin* zurückgegebenen Tabelle, deren Mittelwerte der log2ratios (AvgLog2Ratio) außerhalb der ermittelten Grenzen (Grenze_unten/ Grenze_oben) liegen.

```
SELECT *
FROM DuplikatJoin
WHERE
    (((DuplikatJoin.AvgLog2Ratio)<Grenze_unten Or
    (DuplikatJoin.AvgLog2Ratio)>Grenze_oben));
```

Die von dieser Abfrage zurückgegebene Tabelle wurde in *MS-Excel* zur weiteren Analyse exportiert.

5.1.7 Herstellung und Umgang mit (rekombinanter) DNA

5.1.7.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

500 ml LB Medium wurde mit einer *E. coli* Vorkultur bis zu einer Dichte von OD^{1}_{600} = 0,020-0,050 angeimpft und bei 37°C in einem 2 l Schikanekolben bei 37°C bis zu einer OD^{1}_{600} = 0,300-0,400 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch 15 min Zentrifugation mit 4000 rpm bei 4°C geerntet. Das Pellet wurde in 245 ml eiskalter $CaCl_2$/ Tris-Lösung gründlich resuspendiert und die Suspension 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 5 ml $CaCl_2$/ Tris-Lösung resuspendiert und nun 2 h auf Eis inkubiert. Dann wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15% (v/v) zugegeben und die Bakteriensuspension in 200 µl Aliquots aufgeteilt. Die Zellen wurden bei –80°C gelagert.

5.1.7.2 *E. coli* Transformation

E. coli Zellen wurden mit der $CaCl_2$-Methode transformiert. Pro Transformationsansatz wurden 100 µl kompetente Zellen eingesetzt. Zu den auf Eis aufgetauten Zellen wurde der Ligationsansatz gegeben und 30 min auf Eis inkubiert (bei Retransformationen wurde diese Zeit auf 5- 10 min verringert). Anschließend wurde der Ansatz für 2 min bei 42°C inkubiert, und die Zellen für 5 min auf Eis gestellt. Zu dem Ansatz wurden 900 µl LB-Medium gegeben und abzentrifugiert. Ein Großteil der Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Zellen im verbleibenden Rest suspendiert und auf Selektivplatten plattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.1.7.3 Plasmidisolation

Plasmide wurden mit entsprechenden Kits der Firma *Qiagen* nach Standardprotokoll isoliert.

5.1.7.4 Isolierung genomischer DNA aus Säugerzellen

Genomische DNA aus Säugerzellen wurde mit dem *Genomic DNA Wizard* Kit der Firma *Promega* isoliert.

5.1.7.5 Restriktionsverdau

5 µl Miniprep-DNA

1 µl Puffer (wird mit dem Restriktionsenzym geliefert)

0,5-0,7 µl Restriktionsenzym (gelieferte Enzyme haben eine Konzentration von 10 U/µl)

mit H_2O auf 10 µl auffüllen; evtl. musste noch nach Herstellerangaben BSA zugesetzt werden.

Inkubation erfolgte 2 h bei der angegebenen Temperatur, bzw. über Nacht. Bei Doppelverdaus wurde das Volumen entsprechend erhöht.

5.1.7.6 DNA Gelelektrophorese

DNA Fragmente wurden zur Analyse auf Agarosegele aufgetragen, die Elektrophorese erfolgte bei 100 – 140 V für 0,75 – 1 h in 1x TBE Puffer. Die Gele wurden anschließend in TBE Puffer mit Ethidiumbromid für ca. 20 min gefärbt (Endkonzentration ca. 1 µg/ ml) und digital fotografiert. Vor dem Auftragen der DNA-Lösungen auf das Gel wurden diese mit 1/5 Volumenteil 6x DNA Auftragspuffer versetzt.

5.1.7.7 Aufreinigung und Fällung von DNA

Die DNA haltigen, wässrigen Lösungen wurden mit einem Volumenteil PCI (25:24:1) versetzt und die Mischung gevortext. Anschließend wurde der Ansatz 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Dazu wurde ein Volumenteil Chloroform/ Isoamylalkohol (79:1) gegeben und erneut gut gemischt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wird wiederum in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Zur Fällung der DNA wurde die Lösung mit 0,1 Volumenteil Natriumacetatlösung und 2,5 Volumenteile Ethanol versetzt und die DNA für ca. 20 min bei -20°C gefällt. Die Fällung wird bei 13000 rpm, 4°C 15 min lang abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und die Suspension erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet getrocknet. Anschließend wurde die DNA in Wasser oder TE gelöst.

5.1.7.8 Ligation

Die Ligationsreaktionen erfolgten ein einem Ansatz von 20 µl Gesamtvolumen bei 16°C über Nacht. Es wird im Falle von Klonierungen mit DNA Fragmenten ein ungefähres molares Verhältnis von Vektor: Insert = 1: 3 angestrebt. Die Reaktion erfolgte in 1x Ligasepuffer mit 1 U *T4-DNA-Ligase* der Firma *Invitrogen*. Für Klonierungen mit Hilfe

von hybridisierten Oligonukleotiden beträgt das Verhältnis von Vektor: Insert = 1: 1000 oder geringer.

5.1.7.9 Vektorkonstruktionen

Ausgehend von dem Vektor pGrec, dem durch ein ClaI/ BspLU11I Verdau die Elemente zur autonomen Replikation in humanen Säugerzellen entfernt wurde (Drexler 2002), wurden die beiden folgenden Vektoren konstruiert.

5.1.7.9.1 pDSOFF

Durch einen HindIII Verdau wurde der ORF für das Puromycinresistenzgen entfernt. Der SV 40 Promotor bliebt jedoch erhalten. In dieses Vektorrückrat wurden die hybridisierten Linker DSoff_link_fwd und DSoff_link_rev ligiert. Die Linker führen die beiden I-SceI Erkennungsstellen und eine SnaBI Schnittstelle in den Vektor ein. Unter Verwendung der SnaBI Schnittstelle wurde der ORF für *DSRed2* aus dem Vektor pDSRed2N1 der Firma *Clontech* als SmaI/HpaI Fragment kloniert.

5.1.7.9.2 pDSON

Wie bei der Konstruktion des vorigen Vektors wurde zunächst ebenfalls der ORF für das Puromycinresistenzgen entfernt. Durch Klonierung der hybridisierten Linker oDSon_link_fwd und oDSon_link_rev wurde der non-sense ORF, die beiden I-SceI-Schnittstellen und eine SnaBI Schnittstelle in den Vektor eingeführt. Über die SnaBI Schnittstelle wurde der ORF für *DSRed2* wiederum als SmaI/HpaI Fragment kloniert.

5.1.7.10 Verwendung von siRNA zur Herunterregulation der *NBS1* Expression

Diese Technik wurde von S. Mörtl/ M. Angermeier etabliert (Angermeier 2004).

5.1.8 Statistik

Die im Text angegebenen Faktoren sind mit ± einer Standardabweichung angegeben. In Diagrammen ist der Standardfehler eingezeichnet.

5.2 Zusammensetzung der Puffer

- **Annexin-V-Fluos Färbelösung**

  1 ml Inkubationspuffer:

  10 mM Hepes/ NaOH, pH 7,4

  140 mM NaCl

  5 mM $CaCl_2$

  20 µl Annexin-V-Fluos Markierugsreagenz (*Roche*)

  20 µl Propidiumiodidfärbelösung (50 µg/ ml)

- **$CaCl_2$/ Tris Lösung für kompetente *E.coli* Zellen**

  0,1 M $CaCl_2$

  0,01 M Tris

  pH 8,0

- **DEPC-Wasser**

  0,1 % (v/v) DEPC in bidest. Wasser,

  Inkubation bei 37°C über Nacht, dann autoklavieren

- **6 x DNA Auftragspuffer in TE Puffer**

  50 % (w/v) Saccharose

  0,1 % (w/v) Bromphenolblau

- **DNA Extraktionspuffer**

  192 ml 0,2 M Na_2HPO_4

  8 ml 0,1 M Zitronensäure

  pH 7,8

- **dNTP - Mix**

  dATP-, dCTP-, dGTP-, dTTP- Stammlösungen zu gleichen Teilen mischen

  Konzentrationen der dNTPs im Mix:

  [dATP] = [dCTP] = [dGTP] = [dTTP] = 10 mM

- **10 x FA Gelpuffer**

200 mM 3-[N-morpholino]propansulfonat (MOPS)
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
mit NaOH pH 7 einstellen

- **1 x FA Gellaufpuffer**
  100 ml 10 x FA Gelpuffer
  20 ml 37 % Formaldehyd
  880 ml DEPC- Wasser

- **5x Lämmli Auftragspuffer**
  250 mM Tris-HCl pH 6,8
  10 % (w/v) SDS
  0,1 % (w/v) Bromphenolblau
  10 % (v/v) Glycerin
  500 mM DTT immer frisch zugeben

- **5 x Lämmli Laufpuffer**
  25 mM Tris
  250 mM Glycin
  0,5 % SDS (w/v)

- **LB (Luria Bertani) Medium**
  10 g Trypton
  5 g Hefeextrakt
  10 g NaCl
  in Wasser lösen, pH 7 einstellen, auf 1 l auffüllen, autoklavieren
  Für Plattenmedium 20 g Bacto-Agar zugeben, autoklavieren, im Wasserbad auf 50 ºC abkühlen lassen
  Wenn benötigt, 1 ml Ampicillin (100 mg / ml) steril zugeben.

- **Lysispuffer II**
  1% (w/v) Triton-X-100
  Tris 25 mM, pH 7,4
  NaCl 120 mM

- **Prähybridisierungslösung**
  6x SSC
  0,5 %(w/v) SDS
  1% (w/c) BSA

- **Propidiumiodidfärbelösung**
  3,8 mM Natriumcitrat
  5 µg/ml Propidiumiodid
  mit PBS ansetzen

- **RIPA-Puffer – Lysepuffer für Säugerzellen**
  150 mM NaCl
  10 mM Tris-Lösung, pH 7.2
  0,1 % SDS
  1 % Triton X-100
  1 % Desoxycholat
  5 mM EDTA

- **RNAse A-Lösung**
  110 mg RNAse A zu 10 ml 0,01 M Natriumacetat, pH 5,2 lösen und 15 min bei 99°C inkubieren. Anschließend 1 ml 1 M Tris/HCl, pH 7.4 zugeben und bei -20°C aufbewahren.

- **3 M Natriumacetat**
  24,6 g NaAc in Wasser lösen, pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, auf 100 ml auffüllen.

- **NOV- Stammlösung (100 mM)**
  18,3 mg / ml Wasser

- **PBS (Phosphate buffered saline)**
  9,6 g PBS lösen in 1 l Wasser, autoklavieren

- **PMSF Stammlösung (100 mM)**
  17,4 mg PMSF / ml Isopropanol

- **PonceauRotS Färbelösung**
  0,2 % (w/v) PonceauRotS in 5 % Trichloressigsäure lösen.

- **5 x RNA Auftragspuffer**
  16 µl gesättigte Bromphenolblau Lösung
  80 µl 500 mM EDTA pH 8
  720 µl 37 % Formaldehyd
  2 ml 100 % Glycerin
  3,1 ml Formamid
  4 ml 10 x FA Gelpuffer
  mit RNase-freiem Wasser auf 10 ml auffüllen.

- **20x SSC**
  3 M NaCl
  0,3 M Natriumcitrat

- ***Stripping* Puffer**
  2 % SDS (20 g / l)
  62,5 mM Tris-HCl (9,9 g / l)
  100 mM ß-Mercaptoethanol (7 ml / l)

- **10x TBE**
  1 M Tris-Base (121,1 g / l)
  2 mM EDTA (0,8 g / l)
  Borsäure bis pH 8,3 zugeben, auf 1 l mit Wasser auffüllen

- **10x TBS-T**
  20 mM Tris-Base (2,4 g / l)
  137 mM NaCl (8 g / l)
  0,1 % Tween 20 (1 ml / l)
  pH 7,6

- **10x TE**
  50 ml 1 M Tris-Base
  10 ml 0,5 M EDTA
  auf 500 ml mit Wasser auffüllen

- **Towbin Puffer (für Western Blot)**
  3 g Tris-Base
  14,4 g Glycin
  in H_2O lösen
  200 ml Ethanol
  auf 1 l mit Wasser auffüllen

- **1M Tris** (pH je nach Wunsch)
  121,1 g Tris-Base auf 1 l mit Wasser auffüllen
  pH mit HCl einstellen

6 Aufstellung des verwendeten Materials

6.1 Zellen

- verwendeter Bakterienstamm:

  E. coli DH5α:

  F^- ϕ80δ*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-argF)U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1

  *hsd*R17(r_K-,m_{K+})*pho*A *sup*E44 λ^- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1

- Säugerzellen:

P111, P112, P247, P306	M. Digweed, Berlin
V79B	G. A. Drexler, München
RPE	M. Angermeier, München
GM637	G. A. Drexler, München

6.2 Vektoren

6.2.1 pGrec und pGrec_w/o_EBNA1/oriP

Der Vektor pGrec wurde von G. Drexler konstruiert (Drexler 2002).

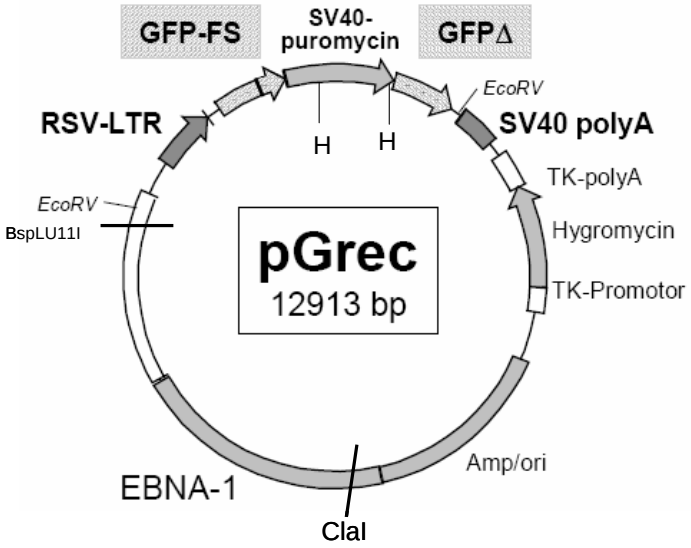


Abbildung 46: Der Vektor pGrec (Abbildung aus G. A. Drexler, 2002) ist das Ausgangsplasmid für die Konstruktionen der Vektoren pDSon und pDSoff (siehe Text). Die beiden HindIII-Schnittstellen sind mit H gekennzeichnet.

Für die weiteren Klonierungen wurde eine Version des Vektors verwendet, bei denen das BspLU11I/ ClaI Fragment entfernt wurde, damit der Vektor autonom nicht mehr replizieren kann.

6.2.2 pDsRed2N1

Der Vektor ist bei der Firma *Clontech* erhältlich und wurde uns freundlicherweise von Fr. Kempkes zu Verfügung gestellt und diente als Quelle für den *DsRed2* ORF.

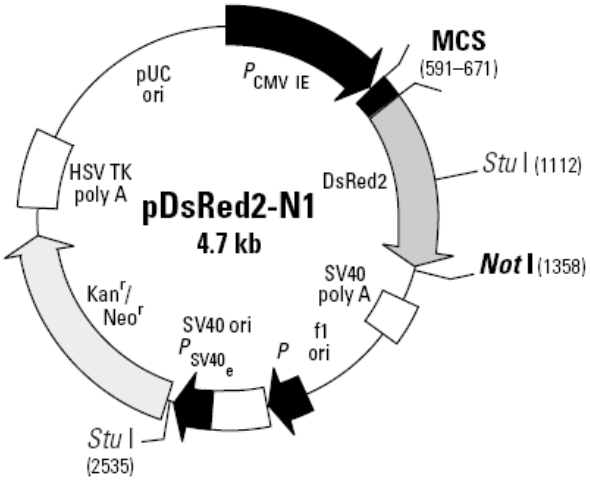


Abbildung 47: Das Plasmid pDsRed2-N1, aus dem der DsRed2 ORF für die Vektoren pDSON und pDSOFF stammt.

6.2.3 pDSON pDSOFF

Die Vektoren wurden unter Verwendung des pGrec Rückrats ohne das BspLU11I/ ClaI Fragment wie oben beschrieben kloniert.

6.2.4 pMA3, pMA4

Diese Vektoren wurden von M. Angermier konstruiert ((Angermeier 2004)

6.3 Chemikalien

Agarose SeaKem LE	Biozym, Hess. Oldendorf
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Merck KG aA, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, Hamburg
Bacto-Trypton	Difco, Hamburg
Bacto-Yeast Extract	Difco, Hamburg
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Biorad, München
Borsäure	Merck KG aA, Darmstadt
Bradfordreagenz	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	Molecular Diagnostics, Mannheim
BSA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Chloroform	Merck KG aA, Darmstadt
cy3-/cy5-markiertes dCTP	Amersham, Freiburg
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Desoxycholat	Merck KG aA, Darmstadt
DEPC	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DMEM	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DMSO	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DTT	Serva, Heidelberg
EDTA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Eisessig	Merck KG aA, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck KG aA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FCS	PAA Laboratories, Österreich
Glycin	Merck KG aA, Darmstadt
Glycerin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
4x Hybridisierungspuffer	Amersham
Isopropanol	Merck KG aA, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Methanol	Merck KG aA, Darmstadt
MOPS	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumorthovanadat	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Nut-Mix-F-10 (Ham) mit Glutamax	Gibco BRL, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Phosphate Buffered Saline	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
PMSF	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
poly(dA)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ponceau S	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Propidiumiodid	Sigma, USA
Protogel™	National Diagnostics, Atlanta, USA
RPMI 1640	PAA Laboratories, Österreich
Roti-Puffer	Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure	Merck KG aA, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Trichloressigsäure	Merck KG aA, Darmstadt
Tris	Merck KG aA, Darmstadt
Triton X-100	Merck KG aA, Darmstadt
Trizol	Invitrogen, Karslruhe
Trypsin	GibcoBRL, Karlsruhe
Tween-20	Merck KG aA, Darmstadt

6.4 Kits

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
QIAEX Agarose Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAprep 8 Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAprep Maxiprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAprep Midiprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
LabelStar Array Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
X-tremeGENE Q2 Transfecion Reagent	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

6.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a. Main
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen und zugehörige Puffer	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen New England Biolabs, Frankfurt a. Main Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
SuperScript Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA-Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
DNAse	Promega, Mannheim
RNAse A	Sigma, Deisenhofen

6.6 Antikörper

PARP-1	Cell Signaling Technology/ New England Biolabs, Frankfurt/ Main
PARP-1 cleaved	Cell Signaling Technology/ New England Biolabs, Frankfurt/ Main
LCK	Cell Signaling Technology/ New England Biolabs, Frankfurt/ Main
Tubulin	Santa Cruz, Hamburg
p53 (DO1)	Santa Cruz, Hamburg
p53-P-Ser15	Cell Signaling Technology/ New England Biolabs, Frankfurt/ Main
CD95 (antagonistisch) (ZB4)	StressGen/ Biomol, Hamburg
CD95 (agonistisch)	Upstate/ Biomol, Hamburg

6.7 Substrate und Inhibitoren für die Caspaseassays

Caspase-3 Substrat (*Ac-DEVD-pNA*)	Merck/ Calbiochem-Novabiochem, Darmstadt
Caspase-3 Inhibitor (*Ac-DEVD-CMK*)	Merck/ Calbiochem-Novabiochem, Darmstadt
Caspase-8 Substrat (*Ac-IETD-pNA)*	Merck/ Calbiochem-Novabiochem, Darmstadt
Caspase-8 Inhibitor (*Z-IETD-FMK*)	Merck/ Calbiochem-Novabiochem, Darmstadt

6.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma *Metabion*, Martinsried bezogen.

Ausnahme: ß2M von der Firma *Roche*, Sequenz unbekannt.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
LCK fwd	TTACCCAGGGATGACCAACC	RT-PCR
LCK rev	TGTGCAGAGTCCATATGTGCA	RT-PCR
CDKN1A fwd	GCATGGAACTTCGACTTTGTC	RT-PCR
CDKN1B rev	CTTCCTCTTGGAGAAGATCAGC	RT-PCR
TNFRSF6 fwd	ACCCTCCTACCTCTGGTTCTT	RT-PCR
TNFRSF6 rev	TGACTCCAGCAATAGTGGTGA	RT-PCR

ACTB fwd	CCATCATGAAGTGTGACGTGG	RT-PCR
ACTB rev	GCCATGCCAATCTCATCTTGT	RT-PCR
NBS1 fwd	CAGACCTTAATTCCTGACTGTC	RT-PCR
NBS1 rev	TTTACAGTGGGTGCATCTTGTG	RT-PCR
NBS1Intron6 rev	CGTTAACAACTACTGATAAGAG	Überprüfung *NBS1* Status
NBS1wt fwd	CGGCAGGAAAGAAAACAAATC	Überprüfung *NBS1* Status
NBS1Exon6 rev	TAGATGGTTCATCAAGAGGTG	Überprüfung *NBS1* Status
NBS1intron5 fwd	GTCACCTGCCACCATATTTC	Überprüfung *NBS1* Status
DSoff_link_fwd	AGCTTATTACCCTGTTATCCCTA TACGTAATTACCCTGTTATCCCT A	Klonierung pDSOff
DSoff_link_rev	AGCTTAGGGATAACAGGGTAAT TACGTATAGGGATAACAGGGTA ATA	Klonierung pDSOff
DSon_link_fwd	AGCTTAGGGATAACAGGGTAAT CCATGGCTAGGGATAACAGGGT AATCTAATACGTA	Klonierung pDSon
DSon_link_rev	AGCTTACGTATTAGATTACCCT GTTATCCCTAGCCATGGATTAC CCTGTTATCCCTA	Klonierung pDSon

6.9 Geräte, Membranen, Filter und Filme

Agarosegelelektophorese-Apparatur	(Wide-Mini-) Sub Cell GT, Biorad, München
Affymetrix 418 Arrayer	MWG-Biotech, Ebersberg
Blotting-Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad, München
Blotting-Papier	Whatmann 3 mm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
CO_2-Inkubator	Sanyo, Japan
Cryoröhrchen	Kisker-Biotech, Mühlhausen
Durchflusszytometer	BD LSRII (*Scanner*), Becton Dickinson, USA FACS-Scan, Becton Dickinson, USA FACStar Plus (*Sorter*), Becton Dickinson, USA FACSDiva (*Sorter*), Becton Dickinson, USA
Elektroporationsküvetten	Biorad, München
Elektroporatoren	Amaxa Biosystems, Köln Gene Pulser II, Biorad, München Gene Pulser Xcell, Biorad, München
Feinwaagen	Sartorius, Göttingen
Fotometer	BioFotometer, Eppendorf, Hamburg
Geldokumentation	GelDoc 2000, Biorad, München
Glaswaren	Braun, Melsungen Schott, Mainz
Inkubationsschränke	Heraeus, Hanau Memmert, Schwabach Sanyo, Japan

Kanülen	Braun, Melsungen
Kühl- und Gefriergeräte	Liebherr GmbH, Lienz
	Privileg, Quelle, Fürth
	Sanyo, Japan
Küvetten	Brand, Wertheim
	Uvette 220-1600 nm, Eppendorf, Hamburg
Light Cycler	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
Loch-Platten	96, 24, 6; Falcon, USA
Magnetrührer	Ikamag RCT, IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.
Mikroskope	Axiovert 25CF, Zeiss, Jena
	Olympus LH50A, Olympus Optical Co., Hamburg
Mikrowelle	Samsung, Schwalbach
Nitrozellulose Membranen	Protran 0,2 mm, Schleicher &Schuell GmbH, Dassel
PAGE-Apparaturen	Hoefer Mighty SmallTM SE245, Dual Gel Caster, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PCR-Geräte	Cyclone gradient, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
	Primus, MWG, Biolab, Ebersberg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Aerosol resistant, Molecular Bioproducts, USA
	Eppendorf, Hamburg
Pipettierroboter Biomek 2000	Beckmann Coulter, Krefeld
pH-Meter	InoLab pH Level 1, UK
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml Eppendorf Hamburg
	15 ml, 20 ml Falcon, USA
	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
	FACS-Röhrchen, Falcon, USA
	PCR-Gefäße, Biozym Diagnostik GmbH, Hess-Oldendorf
Röntgenfilme	X-Omat AR Film, Kodak, Stuttgart
Röntgenfilmentwicklermaschine	Optimax Typ TR, MS Laborgeräte, Wiesloch
Scanner	Umax, PowerLook 1000, Willich
Scanner (Affymetrix 418 Scanner) für die Microarrays	MWG-Biotech, Ebersberg
Schüttler	KS 250 Kreisschüttler, IKA Labortechnik,Staufen
	Roto-Shake Genial, Scientific Industries Inc., USA
	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
	Vortex, Bender & Hobein AG, Schweiz
Spannungsquellen	Biorad, München
	Consort electrophoresis power supply, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
	Elektrophoresis Power Supply – EPS600, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spritzen	Becton Dickinson, USA
Sterilbänke	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
	Laminar Flow, BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
UV-Transilluminator	Vilber lourmat, AGS, Heidelberg
Vakuumpumpe	VacUUbrad RS-4, F.Schultheiss, München
Vakuumtrockner	Speed Vac Concentrator, Bachhofer Laborgeräte, Reutlingen

Wasserbad	Frigomix U1, Braun, Melsungen
Wipptisch	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
Zellkulturflaschen	Greiner Labortechnik Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Nunc, Dänemark
Zellzahl-Messgerät	Coulter Z1, Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifugen	Eppendorf centrifuge 5415c, Eppendorf, Hamburg Multifuge 3SR, Heraeus, Hanau Sigma 2K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz Sigma 3K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

6.10 Software

MS-Office Pakete	Microsoft, Unterschleissheim
Array-Pro Analyzer	Media Cybernetics

7 Literaturverzeichnis

Albanese, J. und N. Dainiak (2000). "Regulation of TNFRSF6 (Fas) expression in ataxia telangiectasia cells by ionizing radiation." Radiat Res **154**(6): 616-24.

Angermeier, M. (2004). RNA-Interferenz zur Ausschaltung von DNA-Reparaturgenen in Telomerase- immortalisierten menschlichen Zelllinien. Department Biologie II. München, Ludwig-Maximilains-Universität.

Antoccia, A., A. di Masi, et al. (2002). "G2-phase radiation response in lymphoblastoid cell lines from Nijmegen breakage syndrome." Cell Prolif **35**(2): 93-104.

Aurias, A., J. L. Antoine, et al. (1985). "Radiation sensitivity of Bloom's syndrome lymphocytes during S und G2 phases." Cancer Genet Cytogenet **16**(2): 131-6.

Banin, S., L. Moyal, et al. (1998). "Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage." Science **281**(5383): 1674-7.

Barzilai, A., G. Rotman, et al. (2002). "ATM deficiency und oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage." DNA Repair (Amst) **1**(1): 3-25.

Bebb, D. G., P. J. Warrington, et al. (2001). "Radiation induced apoptosis in ataxia telangiectasia homozygote, heterozygote und normal cells." Mutat Res **476**(1-2): 13-20.

Belfort, M. und R. J. Roberts (1997). "Homing endonucleases: keeping the house in order." Nucleic Acids Res **25**(17): 3379-88.

Belka, C., C. Gruber, et al. (2003). "The tyrosine kinase Lck is involved in regulation of mitochondrial apoptosis pathways." Oncogene **22**(2): 176-85.

Belka, C., P. Marini, et al. (1999). "The tyrosine kinase lck is required for CD95-independent caspase-8 activation und apoptosis in response to ionizing radiation." Oncogene **18**(35): 4983-92.

Belli, M., O. Sapora, et al. (2002). "Molecular targets in cellular response to ionizing radiation und implications in space radiation protection." J Radiat Res (Tokyo) **43 Suppl**: S13-9.

Bernstein, C., H. Bernstein, et al. (2002). "DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis." Mutat Res **511**(2): 145-78.

Bhardwaj, A. und B. B. Aggarwal (2003). "Receptor-mediated choreography of life und death." J Clin Immunol **23**(5): 317-32.

Bhoumik, A., S. Takahashi, et al. (2005). "ATM-dependent phosphorylation of ATF2 is required for the DNA damage response." Mol Cell **18**(5): 577-87.

Bigelow, S. B., J. M. Rary, et al. (1979). "G2 chromosomal radiosensitivity in Fanconi's anemia." Mutat Res **63**(1): 189-99.

Blattner, C., E. Tobiasch, et al. (1999). "DNA damage induced p53 stabilization: no indication for an involvement of p53 phosphorylation." Oncogene **18**(9): 1723-32.

Breivik, J. (2005). "The evolutionary origin of genetic instability in cancer development." Semin Cancer Biol **15**(1): 51-60.

Buscemi, G., C. Savio, et al. (2001). "Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage." Mol Cell Biol **21**(15): 5214-22.

Chehab, N. H., A. Malikzay, et al. (1999). "Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13777-82.

Clatworthy, A. E., M. A. Valencia-Burton, et al. (2005). "The MRE11-RAD50-XRS2 complex, in addition to other non-homologous end-joining factors, is required for V(D)J joining in yeast." J Biol Chem **280**(21): 20247-52.

Colleaux, L., L. d'Auriol, et al. (1986). "Universal code equivalent of a yeast mitochondrial intron reading frame is expressed into E. coli as a specific double strand endonuclease." Cell **44**(4): 521-33.

Collis, S. J., T. L. DeWeese, et al. (2005). "The life und death of DNA-PK." Oncogene **24**(6): 949-61.

Crompton, N. E., Y. Q. Shi, et al. (2001). "Sources of variation in patient response to radiation treatment." Int J Radiat Oncol Biol Phys **49**(2): 547-54.

D'Amours, D. und S. P. Jackson (2002). "The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair und checkpoint signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(5): 317-27.

Demuth, I., P. O. Frappart, et al. (2004). "An inducible null mutant murine model of Nijmegen breakage syndrome proves the essential function of NBS1 in chromosomal stability und cell viability." Hum Mol Genet **13**(20): 2385-97.

Difilippantonio, S., A. Celeste, et al. (2005). "Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models." Nat Cell Biol **7**(7): 675-85.

Drexler, G. A. (2002). Etablierung eines neuen Rekombination-Meßsystems und Nachweis der Störung homologer Rekombination in Atm- und Rad51C-defizienten Säugerzell-Mutanten. Fakultät für Biologie. München, Ludwig-Maximilians-Universität.

Drexler, G. A., S. Rogge, et al. (2004). "Spontaneous homologous recombination is decreased in Rad51C-deficient hamster cells." DNA Repair (Amst) **3**(10): 1335-43.

Drexler, G. A., S. Wilde, et al. (2004). "The rate of extrachromosomal homologous recombination within a novel reporter plasmid is elevated in cells lacking functional ATM protein." DNA Repair (Amst) **3**(10): 1345-53.

Dudas, A. und M. Chovanec (2004). "DNA double-strand break repair by homologous recombination." Mutat Res **566**(2): 131-67.

Dumaz, N. und D. W. Meek (1999). "Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2." Embo J **18**(24): 7002-10.

Eyfjord, J. E. und S. K. Bodvarsdottir (2005). "Genomic instability und cancer: Networks involved in response to DNA damage." Mutat Res.

Falck, J., J. H. Petrini, et al. (2002). "The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways." Nat Genet **30**(3): 290-4.

Frappart, P. O., W. M. Tong, et al. (2005). "An essential function for NBS1 in the prevention of ataxia und cerebellar defects." Nat Med.

Fritz, E. und M. Digweed (2003). Chromosomal instability und aging. New York, Basel, Marcel Dekker, Inc.

Garcia-Perez, M. A., L. M. Allende, et al. (2001). "Role of Nijmegen breakage syndrome protein in specific T-lymphocyte activation pathways." Clin Diagn Lab Immunol **8**(4): 757-61.

Gluckman, E. (1990). "Radiosensitivity in Fanconi anemia: application to the conditioning for bone marrow transplantation." Radiother Oncol **18 Suppl 1**: 88-93.

Griffiths, A. J. F. M., Jeffrey H.; Suzuki, David T.; Lewontin, Richard C.; Gelbart, (1996). An Introduction to Genetic Analysis. New York, W. H. Freeman und Company.

Group, T. I. N. B. S. S. (2000). "Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group." Arch Dis Child **82**(5): 400-6.

Gruber, C., M. Henkel, et al. (2004). "Involvement of tyrosine kinase p56/Lck in apoptosis induction by anticancer drugs." Biochem Pharmacol **67**(10): 1859-72.

Gualandi, G., L. Giselico, et al. (2001). "Enhancement of genetic instability in human B cells by Epstein-Barr virus latent infection." Mutagenesis **16**(3): 203-8.

Guenet, J. L. (2004). "Chemical mutagenesis of the mouse genome: an overview." Genetica **122**(1): 9-24.

Gulbins, E. und H. Grassme (2002). "Ceramide und cell death receptor clustering." Biochim Biophys Acta **1585**(2-3): 139-45.

Hall, E. J. (2000). Radiobiology for the Radiologist. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Hasegawa, T., H. Xiao, et al. (1999). "Cloning of a GADD34-like gene that interacts with the zinc-finger transcription factor which binds to the p21(WAF) promoter." Biochem Biophys Res Commun **256**(1): 249-54.

Hoss, M., P. Robins, et al. (1999). "A human DNA editing enzyme homologous to the Escherichia coli DnaQ/MutD protein." Embo J **18**(13): 3868-75.

Houston, A. und J. O'Connell (2004). "The Fas signalling pathway und its role in the pathogenesis of cancer." Curr Opin Pharmacol **4**(4): 321-6.

Huang, H. L., L. W. Fang, et al. (2003). "DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation." Oncogene **22**(50): 8168-77.

Huang, J. und W. S. Dynan (2002). "Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction." Nucleic Acids Res **30**(3): 667-74.

Huang, Y. und R. L. Wange (2004). "T cell receptor signaling: beyond complex complexes." J Biol Chem **279**(28): 28827-30.

Jacobson, M. D., M. Weil, et al. (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-54.

Janeway, C. A. T., Paul; Hunt, Simon; Walport, Mark; (1997). Immunobiology: the immune systeme in health und disease. New York, Tokyo, Edinburgh, Current Biology Ltd./ Garland Publishing Inc.

Johnson, R. D. und M. Jasin (2001). "Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells." Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 196-201.

Jongmans, W., M. Vuillaume, et al. (1997). "Nijmegen breakage syndrome cells fail to induce the p53-mediated DNA damage response following exposure to ionizing radiation." Mol Cell Biol **17**(9): 5016-22.

Kaina, B. (2003). "DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation und signaling." Biochem Pharmacol **66**(8): 1547-54.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.

Kobayashi, J., A. Antoccia, et al. (2004). "NBS1 und its functional role in the DNA damage response." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 855-61.

Kobayashi, J., H. Tauchi, et al. (2002). "NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain." Curr Biol **12**(21): 1846-51.

Kolesnick, R. und Z. Fuks (2003). "Radiation und ceramide-induced apoptosis." Oncogene **22**(37): 5897-906.

Kraakman-van der Zwet, M., W. J. Overkamp, et al. (1999). "Immortalization und characterization of Nijmegen Breakage syndrome fibroblasts." Mutat Res **434**(1): 17-27.

Lahdesmaki, A., A. M. Taylor, et al. (2004). "Delineation of the role of the Mre11 complex in class switch recombination." J Biol Chem **279**(16): 16479-87.

Lavin, M. F., G. Birrell, et al. (2005). "ATM signaling und genomic stability in response to DNA damage." Mutat Res **569**(1-2): 123-32.

Lavin, M. F., K. K. Khanna, et al. (1995). "Relationship of the ataxia-telangiectasia protein ATM to phosphoinositide 3-kinase." Trends Biochem Sci **20**(10): 382-3.

Lavin, M. F. und Y. Shiloh (1997). "The genetic defect in ataxia-telangiectasia." Annu Rev Immunol **15**: 177-202.

Lavrik, I., A. Golks, et al. (2005). "Death receptor signaling." J Cell Sci **118**(Pt 2): 265-7.

Lee, J. H. und T. T. Paull (2004). "Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex." Science **304**(5667): 93-6.

Liang, F., M. Han, et al. (1998). "Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5172-7.

Liao, W. C., A. Haimovitz-Friedman, et al. (1999). "Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase." J Biol Chem **274**(25): 17908-17.

Lin, C. S., H. H. Kuo, et al. (2000). "Epstein-barr virus nuclear antigen 2 retards cell growth, induces p21(WAF1) expression, und modulates p53 activity post-translationally." J Mol Biol **303**(1): 7-23.

Lin, F. L., K. Sperle, et al. (1984). "Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process." Mol Cell Biol **4**(6): 1020-34.

Little, J. B., H. Nagasawa, et al. (2002). "Differing responses of Nijmegen breakage syndrome und ataxia telangiectasia cells to ionizing radiation." Radiat Res **158**(3): 319-26.

Lois, C., E. J. Hong, et al. (2002). "Germline transmission und tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors." Science **295**(5556): 868-72.

Majolini, M. B., M. M. D'Elios, et al. (1998). "Expression of the T-cell-specific tyrosine kinase Lck in normal B-1 cells und in chronic lymphocytic leukemia B cells." Blood **91**(9): 3390-6.

Maser, R. S., R. Zinkel, et al. (2001). "An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele." Nat Genet **27**(4): 417-21.

Matsuura, K., T. Balmukhanov, et al. (1998). "Radiation induction of p53 in cells from Nijmegen breakage syndrome is defective but not similar to ataxia-telangiectasia." Biochem Biophys Res Commun **242**(3): 602-7.

Maya, R., M. Balass, et al. (2001). "ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage." Genes Dev **15**(9): 1067-77.

McGowan, C. H. (2002). "Checking in on Cds1 (Chk2): A checkpoint kinase und tumor suppressor." Bioessays **24**(6): 502-11.

McKinnon, P. J. (2004). "ATM und ataxia telangiectasia." EMBO Rep **5**(8): 772-6.

Michalkiewicz, J., C. Barth, et al. (2003). "Abnormalities in the T und NK lymphocyte phenotype in patients with Nijmegen breakage syndrome." Clin Exp Immunol **134**(3): 482-90.

Moreau, S., E. A. Morgan, et al. (2001). "Overlapping functions of the Saccharomyces cerevisiae Mre11, Exo1 und Rad27 nucleases in DNA metabolism." Genetics **159**(4): 1423-33.

Nassif, N., J. Penney, et al. (1994). "Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair." Mol Cell Biol **14**(3): 1613-25.

Neitzel, H. (1986). "A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines." Hum Genet **73**(4): 320-6.

Nicoletti, I., G. Migliorati, et al. (1991). "A rapid und simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining und flow cytometry." J Immunol Methods **139**(2): 271-9.

Norbury, C. J. und B. Zhivotovsky (2004). "DNA damage-induced apoptosis." Oncogene **23**(16): 2797-808.

O'Connor, L., A. W. Harris, et al. (2000). "CD95 (Fas/APO-1) und p53 signal apoptosis independently in diverse cell types." Cancer Res **60**(5): 1217-20.

Owen-Schaub, L. B., W. Zhang, et al. (1995). "Wild-type human p53 und a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression." Mol Cell Biol **15**(6): 3032-40.

Pfeiffer, P., W. Goedecke, et al. (2000). "Mechanisms of DNA double-strand break repair und their potential to induce chromosomal aberrations." Mutagenesis **15**(4): 289-302.

Philchenkov, A. (2004). "Caspases: potential targets for regulating cell death." J Cell Mol Med **8**(4): 432-44.

Puchala, M., Z. Szweda-Lewandowska, et al. (2004). "The influence of radiation quality on radiation-induced hemolysis und hemoglobin oxidation of human erythrocytes." J Radiat Res (Tokyo) **45**(2): 275-9.

Resnick, M. A. (1976). "The repair of double-strand breaks in DNA; a model involving recombination." J Theor Biol **59**(1): 97-106.

Resnick, M. A. und B. S. Cox (2000). "Yeast as an honorary mammal." Mutat Res **451**(1-2): 1-11.

Reynolds, P. J., J. Lesley, et al. (1990). "Changes in the relative abundance of type I und type II lck mRNA transcripts suggest differential promoter usage during T-cell development." Mol Cell Biol **10**(8): 4266-70.

Richardson, C. und M. Jasin (2000). "Coupled homologous und nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells." Mol Cell Biol **20**(23): 9068-75.

Riedl, S. J. und Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 897-907.

Rouet, P., F. Smih, et al. (1994). "Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(13): 6064-8.

Rouet, P., F. Smih, et al. (1994). "Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease." Mol Cell Biol **14**(12): 8096-106.

Rowe, D. T. (1999). "Epstein-Barr virus immortalization und latency." Front Biosci **4**: D346-71.

Samuel, T., H. O. Weber, et al. (2002). "Linking DNA damage to cell cycle checkpoints." Cell Cycle **1**(3): 162-8.

Savitsky, K., A. Bar-Shira, et al. (1995). "A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase." Science **268**(5218): 1749-53.

Seo, J. H., J. W. Lee, et al. (2004). "Change of an egg allergen in a white layer cake containing gamma-irradiated egg white." J Food Prot **67**(8): 1725-30.

Sheard, M. A., S. Uldrijan, et al. (2003). "Role of p53 in regulating constitutive und X-radiation-inducible CD95 expression und function in carcinoma cells." Cancer Res **63**(21): 7176-84.

Shiloh, Y. (1997). "Ataxia-telangiectasia und the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart." Annu Rev Genet **31**: 635-62.

Shiloh, Y. (2003). "ATM und related protein kinases: safeguarding genome integrity." Nat Rev Cancer **3**(3): 155-68.

Soldani, C. und A. I. Scovassi (2002). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update." Apoptosis **7**(4): 321-8.

Speck, P., M. Ikeda, et al. (2002). "Signal transduction through the B cell antigen receptor is normal in ataxia-telangiectasia B lymphocytes." J Biol Chem **277**(6): 4123-7.

Stark, J. M. und M. Jasin (2003). "Extensive loss of heterozygosity is suppressed during homologous repair of chromosomal breaks." Mol Cell Biol **23**(2): 733-43.

Stewart, G. S., R. S. Maser, et al. (1999). "The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder." Cell **99**(6): 577-87.

Sugimoto, M., H. Tahara, et al. (2004). "WRN gene und other genetic factors affecting immortalization of human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus." Cancer Genet Cytogenet **152**(2): 95-100.

Takadera, T., S. Leung, et al. (1989). "Structure of the two promoters of the human lck gene: differential accumulation of two classes of lck transcripts in T cells." Mol Cell Biol **9**(5): 2173-80.

Takao, N., H. Kato, et al. (1999). "Disruption of ATM in p53-null cells causes multiple functional abnormalities in cellular response to ionizing radiation." Oncogene **18**(50): 7002-9.

Takao, N., Y. Li, et al. (2000). "Protective roles for ATM in cellular response to oxidative stress." FEBS Lett **472**(1): 133-6.

Tauchi, H. (2000). "Positional cloning und functional analysis of the gene responsible for Nijmegen breakage syndrome, NBS1." J Radiat Res (Tokyo) **41**(1): 9-17.

Tauchi, H., J. Kobayashi, et al. (2002). "Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells." Nature **420**(6911): 93-8.

Tauchi, H., S. Matsuura, et al. (2002). "Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, und molecular links to factors for genome stability." Oncogene **21**(58): 8967-80.

Taylor, A. M. (2001). "Chromosome instability syndromes." Best Pract Res Clin Haematol **14**(3): 631-44.

Taylor, A. M., A. Groom, et al. (2004). "Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation und molecular basis." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 1219-25.

Thornberry, N. A. und Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-6.

Uziel, T., Y. Lerenthal, et al. (2003). "Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage." Embo J **22**(20): 5612-21.

van Engelen, B. G., J. A. Hiel, et al. (2001). "Decreased immunoglobulin class switching in Nijmegen Breakage syndrome due to the DNA repair defect." Hum Immunol **62**(12): 1324-7.

Varon, R., C. Vissinga, et al. (1998). "Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome." Cell **93**(3): 467-76.

Veillette, A., F. M. Foss, et al. (1987). "Expression of the lck tyrosine kinase gene in human colon carcinoma und other non-lymphoid human tumor cell lines." Oncogene Res **1**(4): 357-74.

Verheij, M. und H. Bartelink (2000). "Radiation-induced apoptosis." Cell Tissue Res **301**(1): 133-42.

Vintersten, K., C. Monetti, et al. (2004). "Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, und adult animals." Genesis **40**(4): 241-6.

Vit, J. P. und F. Rosselli (2003). "Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis." Oncogene **22**(54): 8645-52.

Voronova, A. F., H. T. Adler, et al. (1987). "Two lck transcripts containing different 5' untranslated regions are present in T cells." Mol Cell Biol **7**(12): 4407-13.

Vousden, K. H. und X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.

Wan, X. S., Z. Zhou, et al. (2003). "Adaptation of the dichlorofluorescein assay for detection of radiation-induced oxidative stress in cultured cells." Radiat Res **160**(6): 622-30.

Wan, X. S., Z. Zhou, et al. (2005). "Standardization of a fluorometric assay for measuring oxidative stress in irradiated cells." Radiat Res **163**(2): 232-40.

Wildin, R. S., A. M. Garvin, et al. (1991). "Developmental regulation of lck gene expression in T lymphocytes." J Exp Med **173**(2): 383-93.

Wright, E. G. (1999). "Inherited und inducible chromosomal instability: a fragile bridge between genome integrity mechanisms und tumourigenesis." J Pathol **187**(1): 19-27.

Wunderlich, V. (2002). "JMM---past und present. Chromosomes und cancer: Theodor Boveri's predictions 100 years later." J Mol Med **80**(9): 545-8.

Yamada, A., S. Takaki, et al. (2001). "Identification und characterization of a transcriptional regulator for the lck proximal promoter." J Biol Chem **276**(21): 18082-9.

Yazdi, P. T., Y. Wang, et al. (2002). "SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint." Genes Dev **16**(5): 571-82.

Yeo, T. C., D. Xia, et al. (2000). "V(D)J rearrangement in Nijmegen breakage syndrome." Mol Immunol **37**(18): 1131-9.

Young, L. S. und A. B. Rickinson (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." Nat Rev Cancer **4**(10): 757-68.

Yu, X. Z., S. D. Levin, et al. (2004). "Lck is required for activation-induced T cell death after TCR ligation with partial agonists." J Immunol **172**(3): 1437-43.

8 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin -5´- triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Cp	*Crossing point*
cy3	Cyanine 3
cy5	Cyanine 5
d	Tage (*days*)
Da	Dalton
dATP	2´-Desoxy-Adenosin-5´-Triphosphat
dCTP	2´-Desoxy-Cytidin-5´-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dGTP	2´-Desoxy-Guanosin-5´-Triphosphat
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2´-Desoxy-Nukleosid-5´-Triphosphat
ds	doppelsträngig (*double stranded*)
DSB	Doppelstrangbruch (*double strand break)*
DTT	Dithiotheitol
dTTP	2´-Desoxy-Thymidin-5´-Triphosphat
eGFP	Grün fluoreszierendes Protein (*enhanced green fluorescent protein*)
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	*Fluorescent Activated Cell Scanner/Sorter*
FCS	fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)
fwd	*forward*
G	Guanin
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde (*hour*)
HCl	Salzsäure
HR	Homologe Rekombination
HRP	*horse redish peroxidase*
k	Kilo
l	Liter
λ	Wellenlänge (*lambda*)

LB	Luria-Bertani
M	Molar (mol/l)
m	Milli (10^{-3})
µ	Mikro (10^{-6})
min	Minute
MOPS	3-[N-morpholino]propansulfonat
n	Nano (10^{-9})
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natronlauge
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (*open reading frame*)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
rev	*reverse*
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*)
SKY	*Spectral Karyotyping*
s	Sekunde
ss	einzelsträngig (*single stranded*)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100®	Oktylphenylpoly-(ethylenglykolether)$_n$
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
U	*Unit*
ÜN	über Nacht
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen (*volume per volume*)
w/v	Gewicht pro Volumen (*weight per volume*)
g	Erdbeschleunigung

Publikationen und Teilnahme an Fachtagungen

Publikationen

D. Sagan, S. Moertl, F. Eckardt-Schupp, H. Eichholtz-Wirth:
Enhanced CD95-mediated apoptosis is responsible for radiation hypersensitivity of *NBS* lymphoblasts.
(Manuskript eingereicht)

H. Laux, R. Tomer, J. Smida, M. Blöchinger, N. Schütze, D. Sagan. U. Schnitzbauer, F. Eckardt-Schupp, H. Höfler, K. F. Becker:
E-cadherin effects the expression of wound healing genes in cancer cells.
(Manuskript in Vorbereitung)

Vorträge und Poster auf Fachtagungen

Institutsbegutachtung, 2005

D. Sagan, S. Mörtl, M. Angermeier, A. Hematulin, A. Rickinger, U. Hamm, F. Eckardt-Schupp, H. Eichholtz-Wirth:
Nijmegen Breakage Syndrome - Insights into and Explanations for a complex Syndrome

9th International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/ Oncology, 2005

D. Sagan, H. Eichholtz-Wirth, F. Eckardt-Schupp:
Enhanced radiosensitivity of NBS cells is associated with deregulated apoptosis

8th International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/ Oncology, 2005

D. Sagan, F. Eckardt-Schupp, E. Fritz, S. Mörtl, H. Eichholtz**:**
Molecular Analysis of New Cellular Functions of the Nbs1 Protein

Rekombinationsmeeting, Munich, 2003

D. Sagan, G. A. Drexler, F. Eckardt-Schupp, H. Eichholtz-Wirth, H. Laux, S. Mörtl, J. Smida:
Development of a cDNA Microarray for the Analysis of differentially expressed Genes involved in DNA Double Strand Break Repair

Lebenslauf

Name	Daniel Sagan
Geburtsdatum	17.02.1977
Geburtsort	Herford

Schulausbildung

Juni 1996	allgemeine Hochschulreife am Carl-Orff-Gymnasium in Unterschleißheim

Hochschulausbildung

September 1997- Mai 2002	Studium der Biologie an der Ludwig Maximilians Universität in München, Abschluss mit Diplom
September 2002-Oktober 2005	Promotion bei Frau Prof. F. Eckardt-Schupp am Institut für Strahlenbiologie, GSF-Forschungszentrum, Neuherberg

Erklärung

Diese Arbeit wurde am Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GSF, Neuherberg, im Institut für Strahlenbiologie unter der Leitung von Frau Prof. F. Eckardt-Schupp angefertigt.

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Neuherberg, den 25.10.2005 _____

Daniel Sagan