Etablierung eines neuen Rekombinations-Meßsystems

und

Nachweis der Störung homologer Rekombination in *Atm*- und *Rad51C*-defizienten Säugerzell-Mutanten.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

an der Ludwig-Maximilians-Universität

München

Vorgelegt von

Guido Drexler

Mai 2002

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp
2. Berichterstatter: PD Dr. B. Salmons

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 2002

Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner „Doktormutter“, Prof. Dr. Friederike Eckardt-Schupp. Ihr außergewöhnliches Interesse am Fortgang der Arbeit, das große Engagement und das außerordentliche Vertrauen, das sie mir entgegengebracht hat, werden mir in dankbarer Erinnerung bleiben. Auch der von ihr angeregte Auslandsaufenthalt war eine wertvolle Erfahrung, für die ich ihr sehr dankbar bin.

Für die vorbildliche Betreuung und die geduldige Bereitschaft, auf alle Fragen und Vorschläge einzugehen, möchte ich mich bei Dr. Eberhard Fritz herzlichst bedanken. Seine fachliche Kompetenz, experimentelle Erfahrung, Souveränität, sowie sein Ideenreichtum verdienen meine größte Hochachtung. Seine Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit war für mich von unschätzbarem Wert.

Ein sehr großes Dankeschön möchte ich an Dr. Wolfgang Beisker (GSF, AG Zytometrie) aussprechen, dessen fachliche Kompetenz und Experimentierfreudigkeit die durchflusszytometrischen Analysen in der erreichten Güte erst ermöglichten, die ein sehr wichtiger Bestandteil dieser Arbeit waren. Auch für das vermittelte Wissen möchte ich ihm danken.

Dr. Anna Friedl möchte ich herzlich danken für Ideen, Anregungen, Kritik und die allzeit große Bereitschaft bei Fragen und Problemen zeigte, und mit ihrer Expertise und Erfahrung half.

Für die Unterstützung bei vielen Experimenten und Zellkultur-Arbeiten gebührt Ulrike Hamm und Klaudia Winkler großer Dank. Für viele interessante Diskussionen und Ratschläge möchte ich mich bei Dr. Markus Kiechle, Dr. Horst Lohrer, Dr. Simone Mörtl und Dr. Lucie Wolz bedanken. Der ganzen Arbeitsgruppe ein großes Dankeschön für Hilfsbereitschaft, Menschlichkeit und Spaß in der Zeit, während diese Arbeit entstand. Für durchflusszytometrische Analysen in der Anfangsphase des Projekts bedanke ich mich herzlich bei Dr. Michael Nüsse (GSF, Zytometrie) und Dr. Jochen Ellwart (GSF, Hämatologikum).

Einen großen Dank möchte ich an Prof. Dr. Margaret Zdzienicka aussprechen. In ihrem Labor im Leiden University Medical Center ist ein Teil dieser Arbeit entstanden. Ganz besonders auch an Dr. Barbara Godthelp, die bereit war, mir die von ihr hergestellte und charakterisierte Zelllinie CL-V4B für Experimente zur Verfügung zu stellen. Auch an die anderen Labor-Mitarbeiter großen Dank für Ihre Hilfsbereitschaft und Kollegialität. In diesem Zusammenhan ein herzliches Dankeschön an den Neuherberger Forschungsförderung e.V., der mit einem Reisestipendium den dortigen Aufenthalt ermöglichte.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich sehr für ihre Unterstützung und Geduld danken.

1 Einleitung 6
1.1 Die Bedeutung der DNA-Reparatur 6
1.2 Nicht-homologe Endverknüpfung 7
1.3 Homologe Rekombination (HR) 9
1.3.1 Proteine, die an der HR beteiligt sind 10
1.3.1.1 Rad51 10
1.3.1.2 Die Rad51-paralogen Proteine 11
1.3.2 Mechanismen der homologen Rekombination 12
1.3.2.1 Das HR Modell von Szostak 13
1.3.2.2 Das SDSA-Modell 13
1.4 Single Strand Annealing 14
1.4.1 SSA in S. cerevisiae 15
1.4.2 SSA in Säugerzellen 16
1.5 Beteiligung von HR an klinischen Syndromen 17
1.6 HR-Meßsysteme in Säugerzellen 19
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit 21
2 Material 23
2.1 Geräte und Computerprogramme 23
2.1.1 Geräte, Membranen und Filme 23
2.1.2 Computerprogramme 24
2.2 Chemikalien, Enzyme, Antikörper und andere Materialien 24
2.2.1 Chemikalien 24
2.2.2 Enzyme 25
2.2.3 Antikörper 25
2.2.4 Längenstandards 25
2.2.5 Kits 26
2.3 Häufig benutzte Lösungen und Puffer 26
2.4 Oligonukleotide und Vektoren 26
2.4.1 Oligonukleotide 26
2.4.2 Vektoren 27
2.4.2.1 pRep5 27

2.4.2.2 pFred25 28

2.4.2.3 pCR™II 29

2.5 Nährmedien 30

2.5.1 Medium für die Aufzucht von *E. coli* 30

2.5.2 Medium für die Aufzucht von Säugerzellen 31

2.6 Bakterienstamm und Zelllinien 31

2.6.1 Bakterienstamm 31

2.6.2 Säugerzelllinien 31

3 Methoden 32

3.1 Mikrobiologische Methoden 32

3.1.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli* 32

3.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen, Kompetenzinduktion nach der Kalziumchlorid-Methode 32

3.1.3 Transformation von *E. coli*-Zellen 32

3.2 Zellbiologische Methoden 33

3.2.1 Zellkultur und Ernte der Zellen 33

3.2.2 Zellzahlbestimmung 33

3.2.3 Ermittlung der Generationszeit 34

3.2.4 Transfektion von Säugerzellen 34

3.2.5 Kolonie-Überlebenstest nach γ-Bestrahlung 35

3.2.6 Bestimmung der Rekombinationsrate durch Fluktuationsanalysen und durchflusszytometrische Detektion der GFP^+-Zellen 36

3.2.7 Bestimmung der Rekombinationsfrequenz in Kolonie-Tests 38

3.2.8 Gefrierkulturen von Säugerzellen 38

3.3 Standardmethoden der Molekularbiologie 39

3.3.1 Isolierung und Charakterisierung von DNA 39

3.3.1.1 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* 39

3.3.1.2 Phenolextraktion von DNA 39

3.3.1.3 Präzipitation von DNA 39

3.3.1.4 Isolierung von genomischer DNA aus Säugerzellen 40

3.3.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen 40

3.3.1.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten 41
3.3.1.7 Isolation und Aufreinigung einzelner DNA-Fragmente aus Agarosegelen 41
3.3.1.8 Reinigung von PCR-Produkten mit Hilfe von Mikrosäulen 41
3.3.1.9 Sequenzanalyse von Nukleinsäuren 41
3.3.2 Klonierung und Subklonierung 42
3.3.2.1 Abspaltung der 5´-Phosphate mittels alkalischer Phosphatase 42
3.3.2.2 Erzeugung glatter Enden 42
3.3.2.3 Ligation von Restriktionsfragmenten und Vektoren 42
3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 43
3.3.4 Hybridisierung und Nachweis von Nukleinsäuren 43
3.3.4.1 Transfer von DNA-Molekülen auf Nylonmembranen 43
3.3.4.2 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten 44
3.3.4.2.1 Markierung der Probe 44
3.3.4.2.2 Hybridisierung 44
3.3.4.3 Entfernung gebundener Sonde 45
3.4 Arbeiten mit Proteinen 46
3.4.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen 46
3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford 46
3.4.2.1 Erstellung der Eichkurve 46
3.4.2.2 Probenbehandlung 47
3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen nach Lämmli 47
3.4.4 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitro-zellulose 48
3.4.5 Immunodetektion von Proteinen 48
3.4.6 Chemolumineszenz Reaktion 49
4 Ergebnisse 50
4.1 Etablierung des pGrec Vektorsystems 50
4.1.1 Klonierung 50
4.1.1.1 Klonierung und Expression des konstitutiven *GFP*-Expressionsplasmids 50
4.1.1.2 Klonierung der HR-Kassette 52
4.1.1.3 Klonierung des 3’ mutierten *GFP-FS*-Allels und *GFP-FS*- Expressionsvektors 52
4.1.1.4 Klonierung des 5’ mutierten *GFPΔ*-Allels und *GFPΔ*-Expressionsvektors 54

4.1.1.5 Herstellung der HR-Kassette 55

4.1.1.6 Herstellung des genomisch integrierenden pGrec-Vektors (*pGrec-integrating*) 56

4.1.2 Charakterisierung des pGrec Vektorsystems 58

4.1.2.1 Nachweis der funktionellen Inaktivierung der mutierten *GFP*-Allele 58

4.1.2.2 Funktioneller Nachweis der HR-Kassette 60

4.1.2.2.1 Mikroskopische Detektion rekombinanter GFP^+-Zellen eines pGrec-transfizierten Einzelklons 60

4.1.2.2.2 Detektion und Isolation rekombinanter Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers 62

4.1.2.3 Nachweis von HR auf molekularer Ebene in durchflusszytometrisch isolierten GFP^+-Subklonen 63

4.1.2.3.1 Biochemischer Nachweis 63

4.1.2.3.2 Nachweis der homologen Rekombination auf DNA-Ebene mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) 64

4.2 Anwendung des Systems 67

4.2.1 Experimentelle Ansätze zur Quantifizierung von Rekombinationsereignissen 69

4.2.2 Ermittlung der chromosomalen Rekombinationsfrequenz in *Rad51C*-Mutanten des Hamsters durch Kolonie-Test 71

4.2.3 Ermittlung der chromosomalen Rekombinationsrate in *Rad51C*-Mutanten durch Fluktuationsanalysen 77

4.2.3.1 Optimierung der Auflösungsgrenze des Durchflusszytometers für seltene GFP^+-Ereignisse innerhalb einer großen GFP-negativen Zellpopulation 77

4.2.3.2 Chromosomaler pGrec HR-Kassetten Status der verwendeten Klone 82

4.2.3.3 Fluktuationsanalysen 83

4.2.4 Ermittlung der extrachromosomalen Rekombinationsfrequenz in *Atm*-Mutanten durch Kolonie-Test-Experimente 87

4.2.5 Ermittlung von extrachromosomalen Rekombinationsraten in *Atm*-Mutanten durch Fluktuationsanalysen 90

5 Diskussion 96

5.1 Etablierung des Systems 96

5.1.1 Expression der funktionellen und mutierten *GFP*-Allele 96

5.1.2 Funktionalität der HR-Kassette 98

5.1.3 Sensitivität und Vorteile des pGrec-Systems 98

5.2 Anwendung des Systems 101

5.2.1 Suppression chromosomaler HR-Ereignisse in *Rad51C*-defekten Zellen.....101

5.2.2 Erhöhte extrachromosomale Rekombinationsraten in *Atm*-defekten Zellen.....104

6 Zusammenfassung 109

7 Literaturverzeichnis 111

Anhang 125

Sequenz der HR-Kassette des pGrec Plasmids..... 125

Abkürzungen 128

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung der DNA-Reparatur

Die DNA einer Zelle enthält die Erbinformation eines Organismus. In ihr ist der Bauplan für die gesamten in der Zelle benötigten Moleküle, meist Proteine gespeichert. Teilt sich die Zelle, wird eine Kopie der DNA an die Tochterzelle weitergeben. Aus diesen Gründen ist es notwendig, Schädigungen an der DNA möglichst korrekt zu reparieren. DNA-Schäden können durch innere (Zellmetabolismus) oder äußere (Chemikalien, energiereiche Strahlung) Einflüsse verursacht werden. Aufgrund der chemischen Komplexizität der DNA ist ein großes Spektrum an Schädigungen möglich. So kann es beispielsweise zum Verlust des Basenanteils kommen, benachbarte Basen können durch kovalente Bindungen dimerisieren, Basenfehlpaarungen können während der Replikation eingeführt werden und die Kontinuität des Phosphat-Zuckerrückgrats kann zerstört werden. Um die Integrität der Information trotz auftretender Schäden zu erhalten, haben Zellen äußerst spezialisierte DNA-Reparaturmechanismen entwickelt. Viele dieser Reparaturmechanismen sind in der Evolution hoch konserviert.

Eine besonders schwerwiegende Art der DNA-Schädigung ist der DNA-Doppelstrangbruch (DSB). Ein DSB kann durch Einwirkung exogener Noxen wie ionisierende Strahlung (*ionizing radiation*, IR) entstehen, die die DNA entweder direkt angreifen, oder über die Erzeugung freier Radikale, wie reaktive Sauerstoffspezies die Kontinuität des Zucker-Phosphatrückgrats der DNA zerstören. Ein DSB kann auch spontan entstehen, z.B. bei der Replikation der DNA, wenn die Replikationsgabel einen DNA-Einzelstrangbruch erreicht. Ein Einzelstrangbruch kann z. B. aufgrund einer nicht erfolgten Verknüpfung von Okazaki-Fragmenten vorhanden sein. Eine weitere Möglichkeit für das Entstehen eines Einzelstrangbruches ist, dass im Zuge eines DNA-Reparaturprozesses ein oder mehrere Nukleotide aus dem DNA-Strang entfernt wurden und die Lücke noch nicht durch DNA-Synthese und Ligation verschlossen wurde (Übersicht bei Marians, 2000). Schätzungen gehen von 5 - 10 spontanen DSBs pro Zelle und Zellzyklus aus (Übersicht bei Haber, 1999; Marians, 2000). Zudem werden DSBs im Zuge normaler Prozesse im DNA-Metabolismus gezielt generiert,

z. B. während der meiotischen Rekombination und während rekombinativer Prozesse an den Immungenen.

Die Reparatur von DSBs ist für Zellen von großer Bedeutung, da ein unreparierter DSB gewöhnlich letal für die Zelle ist. Wird der DSB falsch repariert, kann dies zu genomischer Instabilität und in mehrzelligen Organismen zu Krebs führen (zusammengefasst in Hoeijmakers, 2001; Pastink *et al.*, 2001). DSB-Reparaturwege in eukaryontischen Zellen kann man in zwei Hauptwege unterteilen, die in den folgenden Kapiteln detaillierter dargestellt werden: Die nicht-homologe Endverknüpfung und die homologe Rekombination.

1.2 Nicht-homologe Endverknüpfung

Eine recht unaufwendige Art und Weise einen DSB zu reparieren, ist die mehr oder weniger direkte Verknüpfung beider Bruchenden durch die sogenannte nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* spielt dieser DSB-Reparaturprozess eine deutlich untergeordnete Rolle. In Säugerzellen hingegen ist NHEJ ein wichtiger Mechanismus für die Reparatur eines DSB, und NHEJ-Mutanten sind überempfindlich gegenüber ionisierender Strahlung. NHEJ-Prozesse sind auch an der V(D)J-Rekombination der Immungene in B- und T-Zellen und am Immunglobulin-Klassenwechsel beteiligt. Die immunologischen Prozesse weisen jedoch molekulare Unterschiede zur normalen DSB-Reparatur durch NHEJ auf.

Eine wichtige Funktion bei NHEJ-Prozessen spielen die KU70- und KU80-Proteine, die zusammen das KU-Hetereodimer bilden. KU-Heterodimere binden an Bruchenden (Ramsden und Gellert, 1998). Sie können mit sich selbst assoziieren und auf diese Weise die beiden Bruchenden zusammenbringen (Abbildung 1). Die Bindung des KU-Heterodimers an die DNA-Enden erleichtert in Säugerzellen zusätzlich die Rekrutierung der katalytischen Untereinheit des DNA-PK-Komplexes (*DNA-PK catalytic subunit*, DNA-PK_{CS}), einer Serin/Threonin Proteinkinase. Während Homologe bzw. Vorläufermoleküle zu den KU-Proteinen der Säugerzellen in allen bisher untersuchten Organismen (inklusive Archaebakterien, Eubakterien, Hefen, Pflanzen, Invertebraten) identifiziert werden konnten, konnten Homologe zur DNA-PK_{CS} bisher nur in Vertebraten gefunden werden. In diesen ist die katalytische Untereinheit aber ähnlich wichtig für die NHEJ-Reaktion wie die KU-Proteine.

Weiterhin wird durch die Bindung des KU-Heterodimers der Ligase IV/XRCC4-Komplex an den Ort der DNA-Schädigung rekrutiert (McElhinny *et al.*, 2000). Ligase IV ist eine spezifische Ligase, die offenbar nur an NHEJ-Prozessen beteiligt ist. Die Funktion von XRCC4 ist zur Zeit noch nicht völlig aufgeklärt. Es stimuliert die Aktivität von Ligase IV *in vitro* (Grawunder *et al.*, 1997), allerdings wird auch eine Adapterfunktion zwischen dem DNA-PK-Komplex und Ligase IV diskutiert, da in Säugerzell-Extrakten schwache Interaktionen zwischen XRCC4 und DNA-PK gefunden wurden (Critchlow *et al.*, 1997).

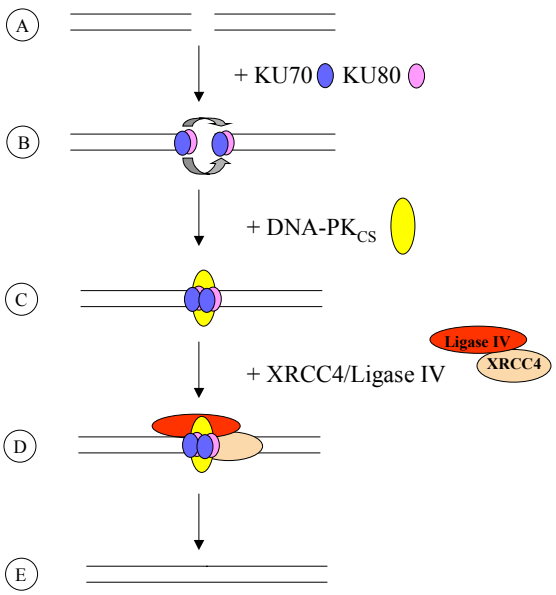


Abbildung 1: Schematische Darstellung der DSB-Reparatur durch NHEJ

KU70p und KU80p binden an beide Bruchenden. Durch die Fähigkeit zur Selbstassoziation der Ku-Heterodimere werden die Bruchenden zusammengeführt (B). Die KU-Heterodimere rekrutieren weiterhin DNA-PK$_{CS}$ zum Ort der DNA-Schädigung, und es kommt zur Bildung eines aktivierten DNA-PK-Komplexes (C). Im folgenden wird der LigaseIV/XRCC4-Komplex zum DSB rekrutiert (D) und die Stränge durch Ligase IV verknüpft (E).
(Abbildung nach Karran, 2000; Kanaar *et al.*, 1998, modifiziert)

Viele Erkenntnisse über den molekularen Ablauf der NHEJ wurden durch Versuche mit enzymatisch generierten DSBs in geeigneten Reporter-Plasmiden in Hefe oder Säugerzellen gewonnen. Im Gegensatz zu solchen Modell-DSBs sind natürlich vorkommende DSBs meist nicht ohne vorherige Prozessierung reparierbar. Die zur Zeit gültige Modellvorstellung (zusammengefasst in Critchlow und Jackson, 1998; Karran, 2000; Pastink *et al.*, 2001) geht davon aus, dass die beiden Bruchenden prozessiert werden. Die Prozessierung kann zu glatten Enden oder zu kurzen überhängenden Enden führen (1-5 Basen) (Phillips und Morgan, 1994; Verkaik *et al.*, 2002), die zueinander Mikrohomologien besitzen. Durch welche Komplexe die Prozessierung erfolgt, ist bisher unbekannt. Es gibt Hinweise, dass in der Hefe der Rad50/Mre11/Xrs2-Komplex eine wichtige Rolle in den frühen Schritten des NHEJ-Reparaturweges spielt. Allerdings bestehen noch Kontroversen darüber, ob der Komplex die

Enden gegen exzessiven nukleolytischen Abbau geschützt (Moore und Haber, 1996) oder aktiv an der Prozessierung der Enden beteiligt ist (Critchlow und Jackson, 1998). Bei der Reparatur eines DSBs durch NHEJ kommt es, aufgrund der Prozessierungen, oft es zum Verlust einiger Nukleotide in der DNA-Sequenz (Pfeiffer *et al.*, 1994; Roth, 1998). In manchen Systemen beobachtet man auch einen Einbau von neuen Nukleotiden. Der NHEJ-Mechanismus wird daher als in der Regel fehlerhaft betrachtet.

1.3 Homologe Rekombination (HR)

In der Meiose ermöglicht die homologe Rekombination (HR) den Austausch von DNA-Abschnitten zwischen homologen Chromosomen, wodurch neue Allelkonstellationen in den Keimzellen entstehen (Übersicht bei van Heemst und Heyting, 2000). In der Hefe *S. cerevisiae* ist HR auch in mitotisch replizierenden Zellen sehr effizient, weshalb sich dieser Organismus gut als Modellorganismus zur Untersuchung der der HR zugrundeliegenden molekularen Mechanismen eignet. Zum Beispiel wurde schon früh festgestellt, dass transformierte DNA, die homologe Sequenzen zum Genom aufweist, sehr häufig genomisch an dem entsprechenden Lokus durch HR-Mechanismen integriert wird (Orr-Weaver *et al.*, 1981; Orr-Weaver *et al.*, 1983; Szostak und Wu, 1979) . Mutanten der Gene, deren Proteine an der HR beteiligt sind (*RAD52*-Epistasisgruppe), sind deutlich sensitiv gegenüber DSB-Induktion nach ionisierender Strahlung (Game und Mortimer, 1974) und HR ist der wichtigste Mechanismus zur DSB-Reparatur in *S. cerevisiae* (Übersichten bei Kupiec, 2000; Pastink *et al.*, 2001).

In mitotischen Säugerzellen ist HR bisher noch nicht gut untersucht. Es wurde bis vor kurzem angenommen, dass in Säugerzellen DSBs fast ausschließlich durch NHEJ-Mechanismen repariert werden und HR hierbei kaum eine Rolle spielt (Weaver, 1995). Liang und Ko-Autoren hingegen konnten kürzlich mit Modellsubstraten zeigen, dass ca. 50 % der DSBs durch HR repariert werden (Liang *et al.*, 1998). Bezüglich der Reparatur von strahlen-induzierten DSB wird angenommen, dass HR nur in der späten S- und in der G2-Phase des Zellzyklus effizient ist (Takata *et al.*, 1998; Johnson und Jasin, 2001), wo in Form des Schwesterchromatids eine identische Kopie des gebrochenen Bereichs in unmittelbarer Nähe vorliegt. Wird das Schwesterchromatid als Reparaturmatrize verwendet, so kann der Schaden fehlerfrei repariert werden, ohne dass es zu Mutationen oder Aberrationen kommt.

Aufgrund dieser fehlerfreien Möglichkeit zur Reparatur leistet HR einen wichtigen Beitrag zur Erhaltung der genomischen Stabilität. Ist HR gestört, korreliert der Phänotyp in den meisten Fällen mit genomischer Instabilität.

1.3.1 Proteine, die an der HR beteiligt sind

Da es den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, alle an der HR beteiligten Proteine umfassend darzustellen, wird hier nur auf Rad51p und die RAD51-paralogen Proteine detailliert eingegangen. Rad51p wird ausführlich vorgestellt, da es das mechanistische Schlüsselprotein der HR ist. Auf die RAD51-paralogen Proteine wird eingegangen, da Experimente dieser Arbeit mit einer *Rad51C*-Mutante durchgeführt wurden. Die weiteren Komponenten werden später bei den vorgestellten DSB-Reparaturmodellen abgehandelt.

1.3.1.1 Rad51

Rad51p ist, wie viele der an HR beteiligten Proteine, in der Evolution hochkonserviert. ScRad51p der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein strukturelles und funktionales Homolog zu *E. coli* RecAp (Shinohara *et al.*, 1992; Ogawa *et al.*, 1993; Sung, 1994). *RAD51* höherer Eukaryoten zeigt einen hohen Grad an Sequenzhomologie zu *RecA* (Baumann *et al.*, 1996; Baumann und West, 1998) . Im Gegensatz zu *RecA* und *ScRAD51* ist *RAD51* in Säugerzellen essentiell. Die Disruption beider *RAD51* Allele führt bei Mäusen zur frühen embryonalen Letalität (Lim und Hasty, 1996; Tsuzuki *et al.*, 1996) .

Rad51p ist wie RecAp die zentrale Rekombinase, da es die Strangaustauschreaktion zwischen homologen DNA-Sequenzen katalysiert. Rad51p polymerisiert an einzelsträngiger DNA (*single stranded DNA*, ssDNA) und formiert in ATP-abhängiger Weise mit der ssDNA Nukleoproteinfilamente. Die Rad51 Proteine des Nukleoproteinfilaments vermitteln die Stranginvasion der ssDNA in die homologe doppelsträngige DNA (*double stranded DNA*, dsDNA) und die Paarung der homologen Sequenzabschnitte (Sung, 1994; Baumann *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 1997). Die Nukleoproteinfilamentbildung wird *in vitro* stimuliert durch die Zugabe des ssDNA-bindenden Replikationsprotein A (*replication protein A*, RPA) (Sugiyama *et al.*, 1997) . Dieses (Sugiyama *et al.*, 1997) und Rad52p (Benson *et al.*, 1998) stimulieren *in vitro* auch die Stranginvasion. In Zellkulturen normaler Zellen können mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern in einigen wenigen Zellen diskrete nukleäre RAD51-Foci nachgewiesen werden, die vermutlich auf post-replikative Reparaturprozesse hindeuten

(Tashiro *et al.*, 2000) . *In vivo* ko-lokalisieren RPA und RAD52p in den RAD51-Foci (Golub *et al.*, 1998; Liu und Maizels, 2000), zusammen mit den Proteinen RAD54 (Tan *et al.*, 1999), BRCA1 (Scully *et al.*, 1997), BRCA2 (Sharan *et al.*, 1997), den RAD51-Paralogen XRCC2 (O'Regan *et al.*, 2001) und XRCC3 (Bishop *et al.*, 1998). Bei Mutation der Gene, die die Ko-Lokalisationspartner kodieren, ist die RAD51-Foci Formation gestört (Bishop *et al.*, 1998; O'Regan *et al.*, 2001; Tan*, et al.*, 1999; Takata *et al.*, 2001).

Nach dem Einfluss DNA-schädigender Noxen steigt sowohl der Anteil der Foci-positiven Zellen als auch die Anzahl der Foci pro Zelle in Zeit- und Dosis-abhängiger Weise. RAD51-Foci-positive Zellen sind im Zellzyklus arretiert und betreiben DNA-Synthese zur Reparatur (Haaf *et al.*, 1995). Die Foci sind lokalisiert an der schadensinduzierten ssDNA (Raderschall *et al.*, 1999) und ko-lokalisieren mit den oben genannten Proteinen. Aufgrund dieser Beobachtungen wird angenommen, dass die schadensinduzierten RAD51-Foci mit anderen Proteinen einen DNA-DSB Reparaturkomplex darstellen. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Formierung Rad51-enthaltender DSB-Reparaturkomplexe durch eine Induktion des p21-Proteins direkt mit der Kontrolle des Zellzyklus' verknüpft ist (Raderschall *et al.*, 2002).

Weitere direkte Interaktionspartner von RAD51p sind die Tumorsupressoren ATMp (Chen *et al.*, 1999), p53 (Sturzbecher *et al.*, 1996; Buchhop *et al.*, 1997), das Onkogenprodukt c-ABLp (Yuan *et al.*, 1998) und die Blooms Syndrom Helikase BLMp (Wu *et al.*, 2001).

1.3.1.2 Die Rad51-paralogen Proteine

Paraloge eines Gens entstehen durch Duplikation eines gemeinsamen Vorläufergens und entwickeln sich parallel weiter. Die sechs bisher entdeckten RAD51-paralogen Proteine XRCC2 (Cartwright *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998), XRCC3 (Liu *et al.*, 1998), RAD51B/RAD51L1 (Albala *et al.*, 1997), RAD51C/RAD51L2 (Dosanjh *et al.*, 1998) und RAD51D/RAD51L3 (Pittman *et al.*, 1998), sowie das meiosespezifische DMC1p in Säugern besitzen relativ geringe Homologie zu RAD51p (20 – 30 % identische AS). Auch untereinander ist die Homologie gering (> 30 %). Zwischen Säugerzellen und Hühner DT-40 Zellen beobachtet man eine ausgeprägte Konservierung (Takata *et al.*, 2000; Takata *et al.*, 2001). Durch Immunoprezipitationsexperimente mit humanen Zell-Extrakten konnte gezeigt werden, dass zwei Protein-Komplexe der RAD51-Paralogen existieren. Einer besteht aus RAD51Bp, RAD51Cp, RAD51Dp und XRCC2p (kurz BCDX2 genannt) (Masson *et al.*, 2001), der zweite wird von XRCC3p mit RAD51Cp gebildet (Masson *et al.*, 2001) möglicherweise zusammen mit RAD51p (Liu *et al.*, 2002). In Nager-Zellen werden diese

Komplexe ebenfalls gefunden (French *et al.*, 2002). Beide Komplexe binden in vitro an ssDNA, der BCDX2-Komplex zusätzlich an Einzelstrangbrüche und -Lücken innerhalb einer sonst intakten DNA-Doppelhelix (French *et al.*, 2002).

Für XRCC2p und XRCC3p gibt es direkte experimentelle Befunde für eine Beteiligung an der DSB-Reparatur. So ist die Rekombinationsfrequenz eines geeigneten HR-Substrates nach DSB-Induktion mit der sequenzspezifischen Endonuklease I-*Sce*I bei *Xrcc2*$^{-/-}$ Hamster-mutanten ca. um den Faktor 100 reduziert (Johnson *et al.*, 1999), bei *Xrcc3*$^{-/-}$ Hamster-mutanten um den Faktor 25 (Pierce *et al.*, 1999).

Gezielte Zerstörung (*knock out*) von *XRCC2*, *RAD51B* und *RAD51D* in der Maus führen, wie bei *RAD51*, zu früher embryonaler Letalität. In Zellkultur sowohl von Säugerzellen als auch von Hühner DT-40 Zellen lassen sich jedoch *knock out* Mutanten aller *RAD51*-Paralogen herstellen (jedoch nicht von *RAD51*). Alle Mutanten der *RAD51*-Paralogen in der DT-40 Hühner-Zelllinie zeigen genomische Instabilität (Takata *et al.*, 2000), ebenso wie Mutanten der Gene *Xrcc2*, *Xrcc3* und *Rad51C* in Hamster-Zelllinien (Tebbs *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1998; Godthelp *et al.*, 2002).

1.3.2 Mechanismen der homologen Rekombination

Nach der Entstehung eines DSB und Prozessierung der Bruchenden bindet RPA an die ssDNA. Anschließend bilden sich die Rad51-Nukleoproteinfilamente aus, die die zentralen Reaktionen der HR ausführen: die Stranginvasion in die intakte DNA-Duplex, die Suche nach homologer Matrizen-DNA und die Ausbildung einer Heteroduplex-DNA. Zusätzlich zu Rad51p ist hierfür das koordinierte Zusammenwirken vieler Rekombinationsproteine nötig, z.B. RPA, Rad52p (Mortensen *et al.*, 1996; Van Dyck *et al.*, 1998; Hiom, 1999), Rad54p (Petukhova *et al.*, 1998; Mazin *et al.*, 2000), sowie die Rad51-Paralogen. Es wird diskutiert, dass Rad54p durch Topologieveränderung der DNA-Helix diese partiell lokal entwindet, wodurch das RAD51-Nukleoproteinfilament leichter in die ungebrochene DNA-Helix einwandern und homologe Sequenzen finden kann (Ristic *et al.*, 2001).

Die durch die Einwanderung des Nukleoproteinfilaments in die intakte DNA-Helix entstandene Überkreuzung der DNA-Stränge wird als Holliday-Struktur bezeichnet (Holliday 1964). Nachdem die homologen Abschnitte gefunden sind, kommt es zur Basenpaarung zwischen dem gebrochenen und dem intakten Strang. Das 3´-Ende des gebrochenen DNA-Strangs in der basengepaarten Heteroduplexregion stellt ein Substrat für DNA-Polymerasen

dar, wodurch die verlorengegangene Sequenzinformation wieder hergestellt werden kann. Die Replikationsgabel wandert während der Synthese an der Matrize entlang, wobei die Überkreuzungsstelle der beiden DNA-Moleküle wandert (sog. *branch migration*).

1.3.2.1 Das HR Modell von Szostak

Nach dem Modell von Szostak (Szostak *et al.*, 1983) dringen beide prozessierten 3´-Enden des Bruchs in die intakte DNA-Helix ein, und die Reparatursynthese erfolgt vollständig auf dem ungebrochenen Matrizenstrang (Abbildung 2). Nach Vollendung der DNA-Synthese und Ligation der zusammengehörigen Stränge beider Bruchenden ergeben sich zwei Möglichkeiten der endonukleolytischen Spaltung der Holliday-Strukturen durch einen noch nicht identifizierten Resolvase-Komplex. Dabei kommt es zu Genkonversion ohne Cross-Over (graue Pfeile in Abbildung 2, C) oder zu Genkonversion mit Cross-Over (schwarze Pfeile in Abbildung 2, C).

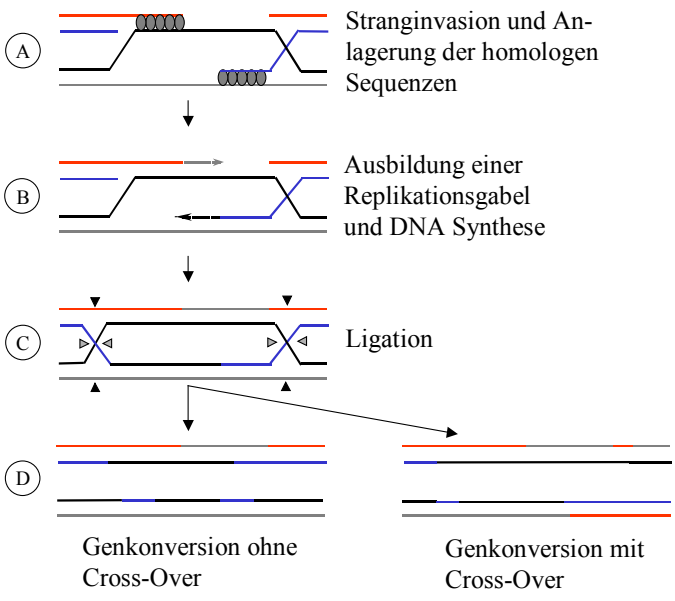


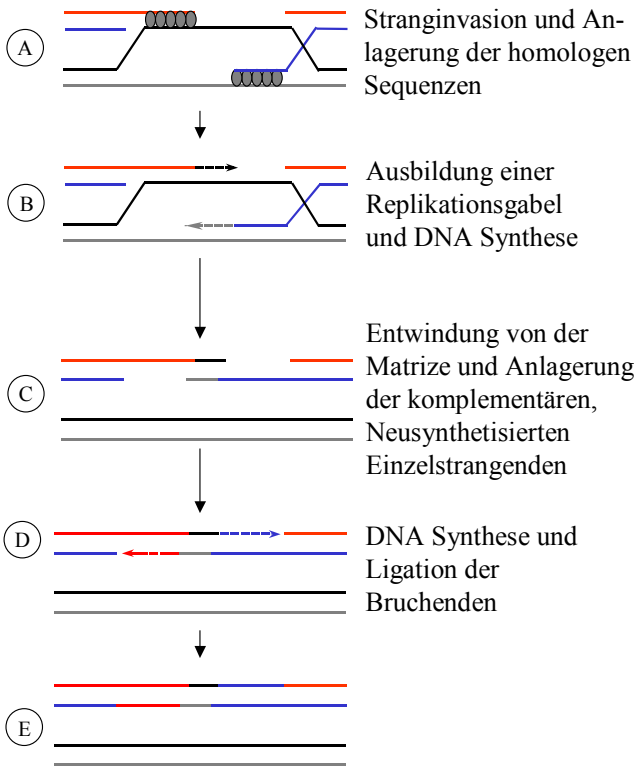
Abbildung 2: Das Szostak-Modell

Nach der Stranginvasion der beiden 3´-Enden des gebrochenen DNA-Doppelstranges, lagern sich die Enden an die homologen Bereiche der zur Reparatur als Matrize verwendeten dsDNA an (A). Die 3´-OH Enden dienen als Startpunkt für die Reparatursynthese, die sich über die gesamte entstandene Lücke erstreckt (B). Nach Beendigung der DNA-Synthese wandert eines der 5´- Enden in die Heteroduplex zur Ligation mit dem zugehörigen 3´- Ende ein (C). Die in (A) und (C) entstandenen Überkreuzungen der DNA-Stränge werden Holliday-Strukturen genannt. Je nachdem, wie diese Überkreuzungen nach der Ligation durch einen noch nicht identifizierten Resolvase-Komplex aufgelöst werden, liegt als Reparaturresultat ein Genkonversionsereignis ohne (graue Pfeile in (C)), bzw. mit Cross-Over vor (schwarze Pfeile in (C)) (D).

1.3.2.2 Das SDSA-Modell

Nach dem SDSA-Modell (Nassif *et al.*, 1994) (Abbildung 3) erfolgt die Reparatursynthese der beiden gebrochenen Stränge auf der ungebrochenen Matrize nur bis zu Bereichen, an

denen beide neusynthetisierte Strangabschnitte Homologien zueinander besitzen. Anschließend entwinden sich die unterbrochenen Stränge von der Matrize und lagern sich komplementär aneinander an. Die Reparatursynthese wird dann mit jeweils dem komplementären gebrochenen Strang als Matrize fortgesetzt. Nach vollständiger DNA-Synthese werden die Bruchenden durch Ligase verknüpft. Hierbei kommt es nur zur Genkonversion ohne Cross-Over. Allerdings wurden Modifikationen des SDSA-Modells entwickelt, die auch Cross-Over Ereignisse erklären können (Paques *et al.*, 1998).



Genkonversion ohne Cross-Over

Abbildung 3: Das SDSA-Modell

Nach dem Modell kommt es nach der Stranginvasion beider freien 3´-Enden und Anlagerung an die homologen Sequenzen (A) zur DNA-Reparatursynthese, die nur einen Teil der durch die Resektion entstandenen Lücke abdeckt, allerdings soweit gehen muss, bis beide 3´-Enden wieder homologe Sequenzen zueinander besitzen (B). Die Stränge entwinden sich nach erfolgter DNA Synthese von der intakten Matrize, die homologen Sequenzen der komplementären Stränge lagern sich aneinander an (C) und das 3´-OH Ende beider noch unterbrochenen Stränge dient als DNA-Synthese Startpunkt für die weitere Reparatursynthese mit dem jeweiligen komplementären Strang als Matrize (D). Nach dem Abschluss der DNA-Neusynthese wird die Lücke im Phosphat-Zuckerrückgrat der DNA durch Ligase verknüpft (E). Das so bestehende Modell kann nur Genkonversionsereignisse ohne Cross-Over erklären.

1.4 Single Strand Annealing

Beim *Single Strand Annealing* (SSA) werden homologe Abschnitte, die einen DSB in direkter Orientierung flankieren, zur Reparatur benutzt (Abbildung 4). Dieser Reparaturweg wird oft als eine Unterklasse der HR angesehen, da homologe DNA-Abschnitte dabei eine große Rolle spielen. Auch bindet Rad52p und nicht das KU70/80p-Heterodimer an die Bruchenden. Er ist

allerdings unabhängig von anderen Proteinen der *RAD52*-Epistasisgruppe wie z. B. Rad51p und Rad54p (Ivanov *et al.*, 1996). Im Zuge der Reparatur geht die zwischen den homologen Bereichen liegende Sequenzinformation ebenso verloren wie eine Kopie der homologen Abschnitte. Das Modell des SSA wurde erstmals beschrieben, um Ergebnisse der intramolekularen Rekombination zu erklären, die bei Versuchen mit Plasmid-Substraten in *Xenopus leavis* Oocyten und Säugerzellen erhalten wurden (Lin *et al.*, 1984; Lin *et al.*, 1990; Maryon und Carroll, 1991; Jeong Yu und Carroll, 1992).

Nach den gegenwärtigen Modellen läuft SSA folgendermaßen ab (Ivanov *et al.*, 1996; Karran, 2000; Pastink *et al.*, 2001), wobei die daran beteiligten Faktoren bisher nur in *S. cerevisiae* identifiziert wurden:

- Prozessierung der Bruchenden zu 3´-überhängenden Enden, wodurch die homologen Bereiche exponiert werden
- Anlagerung der homologen Bereiche
- Entfernung überhängender ssDNA Enden und Ligation

1.4.1 SSA in S. cerevisiae

Nach der Entstehung des DSBs bindet vermutlich Rad52p an beide Enden des Bruchs. Die dsDNA wird durch Degradation eines Stranges in 5´→3´ Richtung von den Bruchenden weg in ssDNA überführt, wodurch die homologen Bereiche freigelegt werden. Die Resektion der 5´-Enden erfolgt höchstwahrscheinlich durch den Rad50/Xrs2/Mre11-Komplex (Pastink *et al.*, 2001), dessen Fehlen SSA zwar nicht unmöglich macht, aber die Rate signifikant reduziert (Ivanov *et al.*, 1996). Nach der Exposition der homologen Bereiche der beiden Bruchenden lagern diese aneinander an, wobei Rad52p die Anlagerungsreaktion begünstigt (Mortensen *et al.*, 1996; Shinohara *et al.*, 1998). Rad52p ist bis zu einer Länge der homologen Sequenz von 2 kb für SSA absolut essentiell (Fishman-Lobell *et al.*, 1992; Rudin und Haber, 1988; Sugawara und Haber, 1992). *In vivo* Daten zeigen, dass *RAD52*-Überexpression den Phänotyp von *rad59* Mutanten abschwächt (Bai und Symington, 1996). Daher gehen Vermutungen in die Richtung, dass auch Rad59p bei der Anlagerungsreaktion der komplementären Stränge unterstützend beteiligt ist (Bai und Symington, 1996; Petukhova *et al.*, 1999) . Ist der Homologieabschnitt kleiner als 205 bp scheinen auch Msh2p und Msh3p wichtig (Fishman-Lobell *et al.*, 1992; Sugawara*, et al.*, 1995). Die 3`-Enden ohne

Homologie-Bereiche hängen nach der Anlagerung über. Sie werden durch den Rad1/Rad10 Proteinkomplex mit Endonukleaseaktivität, evtl. unter Beteiligung von Rad59p, Msh2p und Msh3p, entfernt (sog. *trimming)* (Ivanov und Haber, 1995; Saparbaev *et al.*, 1996; Sugawara *et al.*, 1997; Sugawara *et al.*, 2000). Nach dem *trimming* wird die Kontinuität des DNA-Strangs durch DNA LigaseI wieder hergestellt.

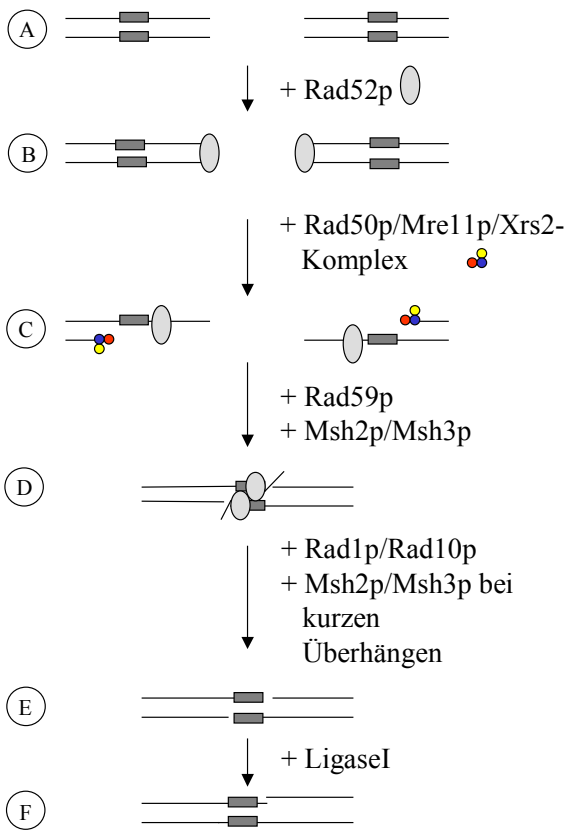


Abbildung 4: Schematische Darstellung des SSA Modells der DSB-Reparatur in der Hefe *S. cerevisiae*

Nach einen DSB (A) kommt es zur Rad52p Bindung an die Bruchenden (B) und zur Prozessierung beider Enden zu freien 3´-Enden (C). Es existieren noch keine eindeutigen Beweise, dass die Resektion der 5´-Enden (C) tatsächlich durch den Rad50/Mre11/Xrs2-Komplex bewerkstelligt wird.
Wenn die freien 3´-Enden vorliegen kommt es zur Rad52p vermittelten Anlagerung der homologen Bereiche, evtl. in Kooperation mit Rad59p. Der Bereich wird durch Rad52p und bei kleinen Homologieabschnitten durch Msh2p und Msh3p stabilisiert (D). Anschließend werden die überhängenden DNA-Enden durch den Rad1/Rad10-Komplex abgespalten. Bei kurzen Überhängen sind hierfür Msh1p und Msh2p notwendig. Abschließend werden die unterbrochenen Stränge durch Ligase verknüpft.
Für Säugerzellen wird ein analoges Modell angenommen, allerdings ist die Reihenfolge der Schritte B und C zur Zeit noch unklar. Xrs2p wird in dem Rad50/Mre11/Xrs2-Komplex (C) durch das Säugerhomolog Nibrin (NBS1p) ersetzt. Für die Beteiligung von humanen MSH2p und MSH3p an SSA existieren keine Beweise. Die Abspaltung der überhängenden Enden (E) wird durch den XPF/ERCC1-Komplex vollzogen.
Abbildung nach: P. Karran, 2000; A. Pastink *et al.*, 2001

1.4.2 SSA in Säugerzellen

Für Säugerzellen wird ein analoges Modell angenommen. E. van Dyck und Ko-Autoren konnten 1999 zeigen, dass humanes RAD52p *in vitro* an DNA-Enden bindet. Hierbei war eine höhere Affinität für ssDNA als für dsDNA zu beobachten (Benson *et al.*, 1998; Van Dyck *et al.*, 1998; Van Dyck *et al.*, 1999), wohingegen ScRad52p nur an doppelsträngige DNA Enden bindet. Ferner konnten E. van Dyck und Ko-Autoren zeigen, dass lineare DNA

Fragmente, an deren Enden HsRAD52p gebunden ist, End-zu-End-Assoziationen eingehen, die RAD52p vermittelt sind. In Säugerzellen ist bisher der Zeitpunkt der RAD52p-Bindung (vor, während oder nach der Resektion der 5´-Enden) an die DNA *in vivo* noch ungeklärt. Es wird weiter angenommen, dass die Homologen von Rad50p, Mre11p und Xrs2p auch in höheren Eukaryoten die Resektion der 5´-DNA Enden bewerkstelligen (Kanaar *et al.*, 1998). Für die Beteiligung von hMSH2p und/oder hMSH3p an SSA existieren zur Zeit keine Beweise (Karran, 2000). Es wird angenommen, dass das *trimming* durch die Homologen von Rad1p und Rad10p, den XPFp/ERCC1p Komplex erfolgt (Karran, 2000; Pastink *et al.*, 2001).

1.5 Beteiligung von HR an klinischen Syndromen

Es existieren eine Reihe von autosomal rezessiven Erbkranheiten, die als Chromosomen-Instabilitäts-Syndrome zusammengefasst werden. Dazu gehören Ataxia-telangiectasia (A-T), Nijmegen Breakage Syndrom (NBS), Rothmund-Thomson Syndrom (RTS), Werner's Syndrom (WS) und Bloom's Syndrom (BS). Kultivierte Zellen der Patienten zeigen eine deutlich erhöhte Rate an spontanen sowie DNA-schadensinduzierten Chromosomen Aberrationen. Die betroffenen Patienten weisen alle, neben weiteren klinischen Phänotypen, eine ausgeprägte Krebs-Prädisposition auf, deren Ursache in der genomischen Instabilität vermutet wird.

Die Analyse der Effizienz und Korrektheit der Doppelstrangbruch-Reparatur (DSBR) durch Pulsfeld-Gelelektrophorese und andere Methoden konnte in AT- und NBS-Zellen (Übersicht in (Fritz und Digweed, 2002) keine oder bestenfalls sehr geringe Defizienzen aufdecken. Außerdem konnten die offensichtlich auftretenden Zellzyklusdefekte experimentell von der chromosomalen Instabilität entkoppelt werden. Es wird daher zur Zeit noch diskutiert, ob in A-T die genomische Instabilität durch Zellzyklus-Defekte oder durch DSBR-Defekte entsteht bzw. durch Synergie beider Defekte (Zusammengefasst in Jeggo *et al.*, 1998). Schon 1993 konnte aber für A-T eine spontane Hyperrekombination der Zellen gezeigt werden, die die Ursache der genomischen Instabilität teilweise erklären könnte (Meyn, 1993).

Für die Genprodukte der bei BS (BLM-Helikase) und WS (WRN-Helikase) mutierten Gene, ebenso wie für das bei RTS betroffene Gen, konnte gezeigt werden, dass sie der RecQ Helikase-Familie zugeordnet sind (Übersichten in Enomoto, 2001; Furuichi, 2001; Mohaghegh und Hickson, 2001). Die RecQ-Helikasen niederer Organismen sind durch

funktionelle Kooperationen mit TypI-Topoisomerasen direkt an homologen Rekombinationsprozessen beteiligt. Auch in Zellen der genannten menschlichen Syndrome mehren sich die experimentellen Befunde, dass HR gestört ist. So ist in kultivierten Zellen von BS-Patienten eine erhöhte Rate an Schwesterchromatid-Austauschen zu beobachten (Ellis *et al.*, 1999). Zudem interagiert BLM mit Proteinen, die bei HR funktionell beteiligt sind, wie z.B. RAD51p (Wu *et al.*, 2001) und RPA (Brosh *et al.*, 2000), sowie der humanen Topoisomerase IIIα (TOP3α) (Wu *et al.*, 2000), für deren Homolog in Hefe eine Rolle in der HR bestätigt wurde, und die auch in menschlichen Zellen die Anzahl meßbarer HR-Ereignisse beeinflußt (Meyn *et al.*, 1993; Fritz *et al.*, 1997). Die chromosomale Analyse kultivierter Zellen von WS-Patienten hatte schon früh auffällig vermehrte Deletionen aufgedeckt, die mit rekombinativen Mechanismen in Verbindung gebracht wurden. Eine neue Analyse der HR erbrachte jedoch gleiche Rekombinationsraten in WS-Zellen und den entsprechenden Kontrollen. Allerdings konnte in WS-Zellen, die HR vollzogen hatten, kein klonales Wachstum bei Verwendung eines *LacZ*-basierenden HR-Reportersystems beobachtet werden. Es wurden also immer nur einzelne bzw. sehr wenige Zellen eines klonalen HR-Ereignisses detektiert (Prince *et al.*, 2001). Die Daten wurden so gedeutet, dass die WRN-Helikase für die Auflösung von Rekombinationsstrukturen der DNA, und somit für die weitere Proliferationsfähigkeit der Zellen notwendig ist. Auch für WRN ist bekannt, dass es mit RPA (Brosh *et al.*, 1999) und anderen Proteinen interagiert, deren Funktion in der DSBR gezeigt sind (KU70 und KU80 (Li und Comai, 2000) oder die mit DNA-schadensabhängiger Zellzyklus-Kontrolle assoziiert sind (p53 (Blander *et al.*, 1999)).

Für die Produkte der *BRCA1*- und *BRCA2*-Gene, die in 10 - 15 % der erblichen Brustkrebs-Fälle mutiert sind (Übersicht in Venkitaraman, 2002), konnte eine Beteiligung an HR kürzlich gezeigt werden. Die DSBR durch HR ist in $BRCA1^{(-/-)}$ und $BRCA2^{(-/-)}$ Zellen deutlich vermindert und die Reparatur des *I-Sce*I induzierten DSB wird hauptsächlich durch NHEJ bewerkstelligt (Moynahan *et al.*, 1999; Moynahan *et al.*, 2001; Tutt *et al.*, 2001). Es ist allerdings noch unklar, ob die BRCA-Proteine an der Schadenserkennung, an der Determination des einzuschlagenden Reparaturweges oder direkt an HR beteiligt sind. BRCA2p bindet direkt an RAD51p (Sharan *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997), und es wird angenommen, dass BRCA2p für Rad51p als akzessorischer Faktor bei der Nuleoproteinfilament-Bildung wirkt (Davies *et al.*, 2001). BRCA1p ist der zentrale Bestandteil des BRCA1-assoziierten Genom-Überwachungskomplexes (*BRCA1-associated genome surveillance complex*, BASC), der unter anderem ATMp (das Produkt des in A-T

mutierten Gens), RAD50p und BLMp umfasst (Wang *et al.*, 2000). Auch in *BRCA1*- bzw. *BRCA2*-defizienten Zellen wird in Kultur genomische Instabilität beobachtet.

1.6 HR-Meßsysteme in Säugerzellen

Um die molekularen Prozesse der HR in Säugerzellen zu erforschen, wurden von bisher wenigen Arbeitsgruppen Systeme zur HR-Messung entwickelt (Übersicht bei Lambert *et al.*, 1999). Prinzipell basieren sie auf zwei mutierten Kopien eines Reportergens, die durch Mutation an unterschiedlichen Stellen funktionell inaktiviert werden und in gleicher Orientierung (sog. *direct repeats*), oder in gegenläufiger Orientierung angeordnet sind (Abbildung 5). Nur durch fehlerfrei abgelaufene Rekombinationsvorgänge zwischen den Reportergen-Allelen kann ein funktionell aktives Reportergen rekonstituiert werden. Um eine konstitutive und somit messbare Expression des aktiven Reportergens zu gewährleisten enthält die Rekombinationskassette einen geeigneten Promotor. Je nach Anwendungszweck wird diese Kassette episomal stabil in die Zellen transformiert oder singulär genomisch integriert.

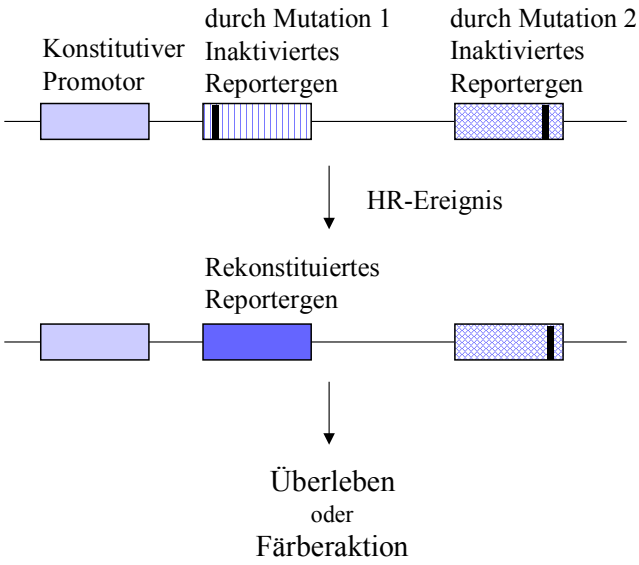


Abbildung 5: prinzipieller Aufbau eines HR-Meßsytems

Die beiden Allele des Reportergens sind durch differenzielle Mutagenese so inaktiviert, dass nur ein HR-Ereignis an dem Locus das Wildtyp-Allel rekonstituieren kann. Der Promotor bewirkt konstitutive Expression des Reportergens.

Als Reportergene wurden bisher Gene für Enzyme verwendet. Diese vermitteln entweder Resistenz gegen Selektionsagentien, wie z. B. die Neomycin-Phosphotransferase, oder setzen

Substrate in Farbstoffe um, wie z. B. die β-Galaktosidase. Sie haben generell den experimentellen Nachteil, dass die Verwendung der HR-Meßsysteme in nicht-adhärent wachsenden Zellen stark eingeschränkt ist. Ihr Vorteil besteht jedoch darin, dass durch die enzymatische Reaktion des Reporterproteins das erwartete Signal verstärkt wird, relativ unabhängig von der Expressionsstärke des Reportergens.

Bei der Verwendung von Selektionsmarkern als Reportergen wird jede überlebende Kolonien nach Selektion mit dem entsprechenden Agens auf ein individuelles Rekombinationsereignis zurückgeführt. Der Vorteil dieser Systeme ist, dass ohne Probleme rekombinante Einzelzellklone erhalten werden, die als solche für weitere Analysen etabliert werden können. Der Nachteil besteht darin, dass erst Kolonien ab einer gewissen Größe detektiert werden können. Daher müssen rekombinante Zellen weiterhin replizieren, um als HR-Ereignis sichtbar zu werden. Einzelne, z. B. im Zellzyklus arretierte, rekombinante Zellen gehen also nicht in das Ergebnis mit ein. Ein weiterer Nachteil dieser Systeme ist, dass die Zellen zweimal selektioniert werden müssen (einmal für die Aufnahme der HR-Kassette und einmal für das Rekombinationsexperiment an sich), was einen stark erhöhten zeitlichen und auch finanziellen Aufwand bedeutet.

In den letzten Jahren wurde eine neue Generation von HR-Meßsystemen etabliert. In diesen wird durch die I-*Sce*I-Endonuklease gezielt ein DSB in eines der inaktivierten Reportergen-Allele eingeführt (Übersicht in Jasin, 1996). Die I-*Sce*I Endonuklease erkennt im Genom von Säugerzellen höchstwahrscheinlich keine weitere Restriktionsschnittstelle und ist daher für diesen Zweck sehr gut geeignet. Diese Selektionsmarker-basierten Systeme sind sehr effizient, da durch die Lokus-spezifische DSB-Induktion im HR-Substrat die messbare HR-Frequenz bis zu 200-fach erhöht wird (Liang *et al.*, 1996). Allerdings wird mit diesen Systemen die HR an künstlich induzierten DSBs gemessen, die entsprechend der I-*SceI*-Schnittstelle 4 bp-überhängende DNA-Enden erzeugt. Die Messung von HR-Ereignissen an spontanen und auch induzierten, physiologisch auftretenden DSBs wird in diesen Systemen nicht berücksichtigt.

Werden Gene verwendet, deren Produkte (z.B. β-Galaktosidase) eine enzymatische Färbereaktion mit einem geeigneten Substrat durchführen, so können die rekombinanten Zellen nach histochemischer Färbung auf der Kulturplatte mikroskopisch gezählt werden. Diese Systeme sind sehr sensitv, und es werden alle rekombinanten Zellen erfasst. Hierbei benötigt die Auswertung allerdings sehr viel Zeit. Der größere Nachteil dieser Systeme ist, dass die Zellen meist fixiert werden müssen, um die Membran permeabel für das Substrat zu

machen. Fluoreszenz-basierende Färbungsprotokolle zur Detektion lebender, rekombinanter Zellen funktionieren hier nur ungenügend. Somit erfordert es einen sehr hohen Aufwand, mit diesen Systemen vitale, rekombinante Einzelzellklone zu etablieren.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Trotz der Existenz detaillierter Modelle sind die molekularen Abläufe der homologen Rekombination (HR) noch nicht wirklich aufgeklärt. Das Verständnis von HR ist wichtig, da während des zellulären Metabolismus relativ häufig spontane und induzierte Brüche der DNA auftreten. Immer mehr experimentelle Daten belegen, dass Mutationen in Genen, deren Proteine regulatorisch oder mechanistisch an der HR beteiligt sind, in Säugerzellen zu einer sehr hohen Krebs-Prädisposition, erblichen Tumoren, genomischer Instabilität und ausgeprägter Sensitivität gegenüber DSB-induzierenden Noxen führen.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines verbesserten Vektorsystems zur Messung von spontaner HR an physiologisch erzeugten DSBs in Säugerzellen, um das Verständnis dieses wichtigen Mechanismus der Doppelstrangbruch-Reparatur zu verbessern. Es sollte folgende Kriterien erfüllen:

- hohe Sensitivität auch auf Einzelzellniveau
- Verwendbarkeit in episomalen und integrierenden Vektoren
- einfache Umklonierbarkeit in virale Vektoren, um primäre Zellen untersuchen zu können
- prinzipielle Anwendbarkeit in adhärent und nicht-adhärent wachsenden Zellen
- Messung von HR in vitalen Zellen
- einfache klonale Anreicherung rekombinanter Zellen zur weiteren Analyse

Um diese Kriterien zu erfüllen, wurde als Reportergen eine verbesserte Version des Gens für das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) verwendet. Das GFP-Protein enthält eine Chromophor-Domäne, die die Eigenschaft besitzt, bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (λ= 476 nm) Licht einer anderen Wellenlänge (λ= 509 nm) zu

emittieren. Diese spezifische Fluoreszenz, die keinen Substrat-Zusatz benötigt, ist fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch in vitalen Zellen detektierbar. Die Nukleotidsequenz des in dieser Arbeit verwendeten *GFP*-Gens ist an die in Säugerzellen bei der Translation bevorzugten mRNA-Kodons angepasst. Intaktes GFP ist ein äußerst stabiles Protein, es sollte sich also bei konstitutiver Expression in der Zelle anreichern und somit gut detektierbar sein. Wird also GFP als Reportergen in einem HR-Meßsystem eingesetzt, sollten mit Hilfe des Durchflusszytometers seltene, rekombinante GFP-exprimierende (GFP^+) Zellen in einer großen GFP-negativen Population gemessen und sortiert werden können. Somit wäre die quantitative Erfassung von HR-Ereignissen möglich und die Etablierung rekombinanter Subklone für weitere Analysen außerordentlich erleichtert.

Nach Etablierung des neuen Meßsystems sollte es an geeigneten Zellinien angewandt werden um einerseits validiert werden zu können und andererseits erste experimentelle Daten zur direkten Messung homologer Rekombination in genetischen Mutanten zu erzielen.

2 Material

2.1 Geräte und Computerprogramme

2.1.1 Geräte, Membranen und Filme

Agarosegelelektophorese-Apparatur	Biorad, München
Blotting-Papier	Whatmann 3mm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Brutschrank	Memmert, Schwabach
CO_2-Incubator	NUAIRE US autoflow, ZAPF Instrumente, Sarstedt
Cryoröhrchen	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden Greiner Labortechnik Bio-One GmbH, Solingen jeweils der billigste bzw. verfügbare Anbieter
Durchflusszytometer	FACSTARPLUS, Becton Dickinson, Mountain View, USA
Elektroporationsapparatur	Gene Pulser™ und Puls Controler, Biorad, München
Fluoreszenzmikroskop	BH-2 RCA, Olympus Optical Co., Hamburg
Fotofilme	Ektachrome 64T EPY-36, Kodak, Stuttgart Polaroid 667 Positiv, SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Hybridisierungsofen	HYBAID, MWG Biotech GmbH, Ebersberg
Kameras	SC36 Type 12, Olympus Optical Co., Hamburg Polaroid MP4-Land Camera, Cambridge, England
Mili-Pore-Anlage	Millipore GmbH, Eschborn
Nitrozellulose Membranen	QIAbrane, Qiagen GmbH, Hilden Protran® 0,2mm, Schleicher &Schuell GmbH, Dassel
PAGE-Apparatur	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
PCR-Geräte	GeneAmp-PCR-System 2400, Perkin Elmar, Norwalk, USA Thermo Cycler, Perkin Elmar, Norwalk, USA Cyclone gradient, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Röntgenfilme	X RAY 90, Fuji-Medical-Films, Tokyo, Japan
Scannergerät	Epson GT-900, Epson GmbH, Düsseldorf
UV-Transilluminator	T-20S, Herolab, Wiesloch
Zellkulturschalen	diverse, Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden diverse, Greiner Labortechnik Bio-One GmbH, Solingen
Zellzahl-Messgerät	Coulter Z1, Beckman Coulter GmbH, Krefeld

2.1.2 Computerprogramme

für Abbildungen	Power Point, Microsoft
für EDV der durchflusszytometrischen Analysen	DAS, Data Analysing Software, von Dr. W. Beisker (GSF, AG Durchflusszytometrie) modifizierte Version
für Literaturrecherchen	http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/ PubMed/ http://research.bmn.com/medline
für Literaturzitate	Endnote 4.0.1 ISI ResearchSoft
für Plasmiddarstellungen	WinPlas 2.5, Goldstein Software
für Tabellenkalkulation und Graphen	Excel 5.0, Microsoft SigmaPlot 4.0, SPSS Inc.
für die Textverarbeitung	Microsoft® Word 2000, Microsoft

2.2 Chemikalien, Enzyme, Antikörper und andere Materialien

2.2.1 Chemikalien

[α-^{32}P] dCTP	ICN, Eschwege
Agarose SeaKem LE	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumacetat	Merk KG aA, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
ATP	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Bacto-Agar	Difco, Hamburg
Bacto-Trypton	Difco, Hamburg
Bacto-Yeast Extract	Difco, Hamburg
Bromphenolblau	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
DMSO	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Desoxycholin (DOC)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ficoll 400	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Giemsa	Merck KgaA, Darmstadt
Glycerin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Heringssperma	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Hygromycin B	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt
Magermilch-Pulver	Töpfer GmbH, Dietmannsried
Mineralöl (heavy white oil)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck KG aA, Darmstadt

Natriumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KG aA, Darmstadt
Nonidet P-40 (NP-40)	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyacrylamid	National Diagnostics, Atlanta, USA
Penicilin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Puromycin	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Natriumlaurylsulfat	Merck KG aA, Darmstadt
TEMED	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Triton X-100	Merck KG aA, Darmstadt
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

2.2.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
Klenow Enzym	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
T4-DNA Ligase	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim MBI Fermentas, Vilnius, Litauen New England Biolabs, Frankfurt a. Main
RnaseA	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
*Pfu*I DNA-Polymerase	Stratagene GmbH, Heidelberg

2.2.3 Antikörper

Anti-GFP polyklonaler AK, Kaninchen (konjugiert mit alkalischer Phosphatase)	Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA
Anti-Tubulin Ab-2 (Klon DM1A), Maus	NeoMarkers, Union City, USA
Ziege anti-Kaninchen HRPT konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
Anti-Maus IG HRPT konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA

2.2.4 Längenstandards

1 kb ladder (DNA)	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
HMW (high molecular weight) Standard (Protein)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
LMW (low molecular weight) Standard (Protein)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

2.2.5 Kits

QIAprep 8 Mini Prep Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Midi Prep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Gene Porter Transfection Reagent	Gene Therapy Systems Inc., San Diego, USA

2.3 Häufig benutzte Lösungen und Puffer

1 x PBS
0,9 mM $CaCl_2$
2,7 mM KCl
1,5 mM KH_2PO_4
0,5 mM $MgCl_2$
136,9 mM NaCl
8,1 mM Na_2HPO_4
pH 7,4

10 x TBE
0,45 M Tris
0,45 M Borsäure
0,01 mM EDTA
pH 8,0

10 x TBS
0,1 M Tris
1,5 M NaCl
pH 7,5

20 x SSC
3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
pH 7,0 mit NaOH einstellen

2.4 Oligonukleotide und Vektoren

2.4.1 Oligonukleotide

		T_M
Link-*Bgl*II	TGA AGA TCT CTC A M=3934 g/mol	36,0°C
Link2-*Bgl*II	TGA GAG ATC TTC A M=3974 g/mol	36,0°C

		T_M
pRep5-*forward*	CAT TGG TGT GCA CCT CC M=5137 g/mol	55,2°C
pRep5-*reverse*	ATG GAC CGC ATG TAC TGG M=5540 g/mol	56,0°C
pRep5-*reverse-2*	ATT CTA GTT GTG GTT TGT CC M= 6120 g/mol	53,2 °C
GFP-*upstream out*	TTG TGG CCG TTA ACA TCA CC M=6068 g/mol	57,3°C
GFP-*in*	ATG GCT AGC AAA GGA GAA G M=5935 g/mol	54,5°C
GFP-*reverse*	AGT TGT ACA GTT CAT CCA TG M=6107 g/mol	53,2°C

Die Oligonukleotide Link-*Bgl*II und Link2-*Bgl*II stellen das reverse Komplement zueinander dar. Sie wurden aneinander gelagert und ergeben in doppelsträngiger Form das Leseraster-verschiebende Oligonukleotid LRV-*Bgl*II, welches zur Herstellung des Leseraster-verschobenen *GFP*-Gens verwendet wurde.

Sämtliche synthetische Oligonukleotide wurden von Metabion GmbH, Martinsried bezogen.

2.4.2 Vektoren

2.4.2.1 pRep5

Der Vektor pRep5 (Abbildung 6) (Groger *et al.*, 1989) ist ein in humanen Säugerzellen mit ca. 10 - 30 Kopien episomal persistierendes Expressionsplasmid.

Durch den als konstitutiven Promotor fungierenden RSV-LTR (*Rous-Sarcoma-Virus Long Terminal Repeat*) und den SV40-polyA (Simian Virus)-Schwanz als Terminationssignal bei der Transkription wird die Expression einer zwischen diesen beiden Bereichen einklonierten Gensequenz in geeigneten Zellen gewährleistet. Die EBNA-1 Sequenz (*Epstein-Barr Nuclear Antigen 1*) ist verantwortlich für das episomale Vorliegen des Plasmids in humanen Säugerzellen (Yates *et al.*, 1985). Der OriP Bereich ist notwendig für die Replikation des

Plasmids in Säugerzellen. Durch das Hygromycinresistenzgen können die mit diesem Plasmid transfizierten Zellen selektioniert werden.

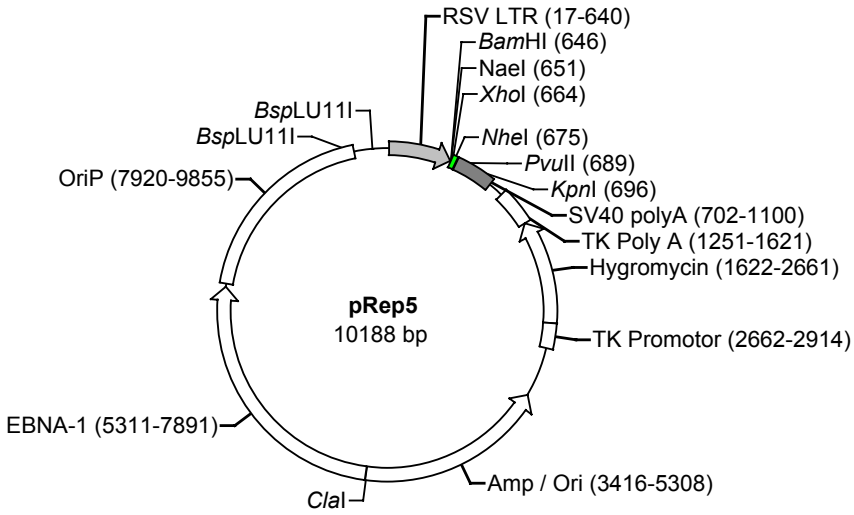


Abbildung 6: Schematische Abbildung des Vektors pRep5.

Eingezeichnet sind die funktionellen Bereiche des Plasmids und die für die Klonierungen wichtigen Restriktionsschnittstellen mit Ortsangabe in bp.

Das episomale Plasmid kann durch einen *Cla*I- und *BspLU11*I-Restriktions-Doppelverdau und Re-Ligation des großen Fragments in einen genomisch integrierenden Vektor umgewandelt werden. Der chromosomale Locus der genomischen Integration und die Anzahl der integrierten Kopien sind dann zufällig.

2.4.2.2 pFred25

Das Plasmid pFred25 (Abbildung 7) (Stauber *et al.*, 1998) wurde mir freundlicher Weise von Dr. Neumann (Institut für molekulare Virologie, GSF) zur Verfügung gestellt. Es diente als Donor für die in den Klonierungen verwendete Nukleotidsequenz des *enhanced fluorescent green protein* (eGFP, im weiteren Text nur GFP genannt).

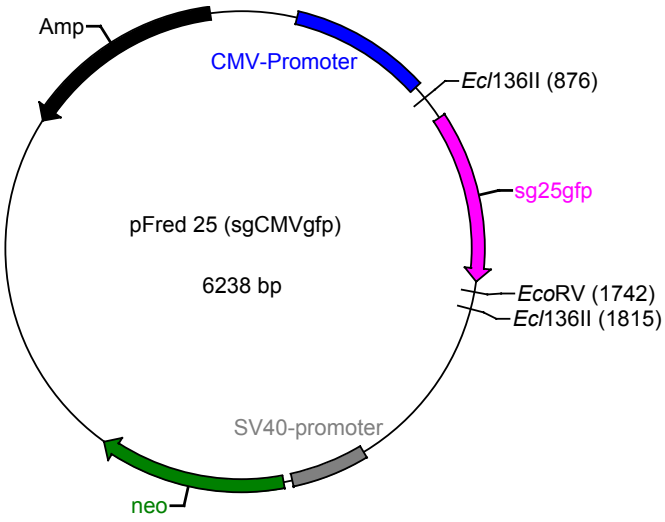


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Vektors pFred25

Aus dem Vektor pFred25 wurde die Gensequenz des GFP isoliert. Dargestellt sind die für die Isolation wichtigen Restriktionsschnittstellen.

2.4.2.3 pCR™II

Der Vektor pCR™II (Abbildung 8) ist ein kommerziell erhältliches Plasmid (Invitrogen Corporation, San Diego, USA). Es wurde in dieser Arbeit als geeignetes Plasmid zur Modifikation der GFP Nukleotidsequenzen verwendet.

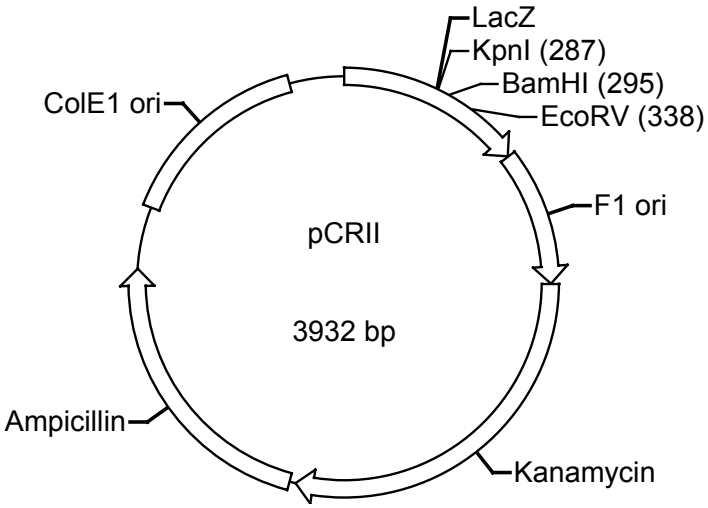


Abbildung 8: Schematische Abbildung des Vektors pCR™II

Eingezeichnet sind die zur Klonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen und die funktionellen Bereiche des Plasmids mit Ortsangabe in bp.

2.5 Nährmedien

2.5.1 Medium für die Aufzucht von *E. coli*

LB- Medium
1 % (w/v) Bacto-Trypton
1 % (w/v) NaCl
0,5 % Bacto-Yeast-Extract
2 % (w/v) Bacto-Agar
pH 7,0

Für Flüssigmedium entfiel die Zugabe von Bacto-Agar.

Gegebenenfalls wurde dem Medium nach Abkühlung auf 55°C Ampicillin, gelöst in MilliQ Wasser in einer Endkonzentration von 100 µg / ml zugesetzt.

2.5.2 Medium für die Aufzucht von Säugerzellen

Sämtliche Medien für die Kultur von Säugerzellen wurden von Gibco BRL, Eggenstein bezogen. Je nach Zelllinie wurde das Medium mit 10% (v/v) FCS (PAA Laboratories, Linz, Österreich) versetzt. Standartmäßig war das Medium mit 40 U / ml Penicillin und 40 µg / ml Streptomycin versetzt.

Eine Auflistung, welches Medium bei welcher Zelllinie verwendet wurde, findet sich unter 2.6.2.

2.6 Bakterienstamm und Zelllinien

2.6.1 Bakterienstamm

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

2.6.2 Säugerzelllinien

verwendete Zelllinie	Spezies	Gen-defekt	verwendetes Medium	FCS [%]	FCS bei transfi-zierten Zellen [%]	Hygromycin zur Selektion [µg/ml]	Puromycin zur Selektion [µg/ml]
GM0637	human	-	Dulbecco's DMEM mit Glutamax-I	10	15	30	0,4
AT5BIVA, Derivat 5L7 (Meyn M.S.)	human	*Atm*	Dulbecco's DMEM mit Glutamax-I	10	15	100	0,3
AT pEBS (Ziv *et al.*, 1997)	human	*Atm*	Dulbecco's DMEM mit Glutamax-I	15	15	100	0,3
AT YZ (Ziv *et al.*, 1997)	human	*ATM* komple-mentiert	Dulbecco's DMEM mit Glutamax-I	15	15	100	0,4
V-79B (Zdzienicka M.Z.)	Hamster	-	Nut. Mix F-10 (Ham) mit Glutamax-I	10	10	150	-
CL-V4B (Godthelp *et al.*, 2002)	Hamster	*Rad51C*	Nut. Mix F-10 (Ham) mit Glutamax-I	10	10	130	-

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

Um Bakterien aus einer Gefrierkultur anzuimpfen, wurde mit einer sterilen Impföse etwas Material von der gefrorenen Oberfläche der Gefrierkultur abgekratzt, auf einer Agarplatte ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Die so entstandenen Bakterien-Einzelkolonien wurden mit einer sterilen Impföse in das gewünschte Volumen LB-Medium überführt und 12-16 h mit 140-180 rpm bei 37°C geschüttelt. Handelte es sich um transformierte *E. coli* Zellen wurde das LB-Medium mit Ampicillin versetzt.

Zur kurzfristigen Aufbewahrung wurden die mit Parafilm verschlossenen Agarplatten bei 4°C bis zu 6 Wochen gelagert. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurde das gewünschte Volumen einer frischen Bakterien-Flüssigkultur mit 1 Vol 87 %igem, sterilen Glycerin versetzt, gründlich gemischt und umgehend bei –80°C eingefroren.

3.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen, Kompetenzinduktion nach der Kalziumchlorid-Methode

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Kalziumchlorid-Methode (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt und sofort in eine Transformation eingesetzt oder in Aliquots bei - 80°C eingefroren

3.1.3 Transformation von *E. coli*-Zellen

Zur Transformation mittels Hitzeschock (Lederberg und Cohen, 1974) wurden 50 µl kompetente Bakterien mit 1 ng unbehandeltem Vektor (Transformationskontrolle) bzw. 5 µl Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 2

min bei 42°C in einem Wasserbad inkubiert und danach sofort 1 ml LB-Medium zugegeben. Um die Ausbildung der Resistenz zu ermöglichen, wurden die Bakterien 1 h bei 37°C unter schütteln inkubiert, bevor 10 % bzw. 90 % des Transformationsansatzes auf je einer Agarplatte, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion enthielt, ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert wurde.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur und Ernte der Zellen

Die Säugerzellen wurden in Zellkulturschalen, deren Größe der ausgesäten Zellzahl angemessen war, kultiviert (96-, 24-, und 6-wells, sowie P60, P90 und P145). Medienwechsel erfolgte bei den humanen Zelllinien alle sieben Tage, bei den Nager-Zelllinien alle vier Tage.

Da es sich bei den hier verwendeten Zelllinien um adhärent wachsende Zellen handelt, mussten die Zellen vor dem Passagieren, Einfrieren und dem Pelletieren mittels einer Trypsinbehandlung von dem Schalenboden abgelöst werden. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Zur Beendigung der Trypsinreaktion wurde Medium mit 10 % FCS im minimalen Verhältnis von 4:1 zugegeben. Um alle Zellen von dem Boden zu lösen, wurde die Schale gut mit der Zellsuspension mittels einer sterilen Pipette gespült. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, und 5 min bei 1500 rpm pelletiert, bzw. ein Teil der Zellen wieder ausplattiert und weiter kultiviert.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml einer Zellsuspension wurden 500 µl der Suspension in 19,5 ml einer 0,9 M NaCl-Lösung gegeben, gut gemischt und die Zellzahl mittels dem Coulter Z1 bestimmt. Das Gerät verrechnet die gespeicherte Verdünnung der Zellen und gibt sofort die Zellzahl pro ml der Ausgangssuspension an. Die Messung erfolgte zweimal, und der daraus resultierende Mittelwert wurde als Zellzahl pro ml verwendet.

3.2.3 Ermittlung der Generationszeit

Zur Ermittlung der Generationszeit einer Zellinie wurden je 10 000 Zellen in die benötigte Anzahl Zellkulturschalen des 6-well-Formats ausgesäht und kultiviert. Die Anzahl der Kulturschalen ergab sich aus der geplanten Anzahl von Messpunkten. Zu einem Messpunkt wurden die Zellen einer Kulturschale trypsiniert, die Zellzahl bestimmt und der Messzeitpunkt notiert. Die Messung erfolgte zweimal täglich. Nach Abschluß der Messungen wurde die Zellzahl logarythmisch gegen die Wachstumszeit aufgetragen. Die Ermittlung der Generationszeit erfolgte durch Extrapolation aus einem Bereich der Kurve in dem die Zellen logarythmisches Wachstum aufwiesen.

3.2.4 Transfektion von Säugerzellen

Zu Beginn der Arbeit wurde Fremd-DNA mittels Elektroporation in die Zellen eingebracht (Potter*, et al.*, 1984).

Dazu wurden ca. 5 x 10^6 Zellen, semikonfluent gewachsen, verwendet. Die Zellen wurden trypsiniert, in ein Falcon-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min). Das Medium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurde das Zellpellet in 0,8 ml eiskaltem PBS resuspendiert und die Zellsuspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 0,4 mm Elektrodenabstand (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen), die bereits 10 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA enthielt, überführt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Elektroporation (0,7 V, 25 µF, 200 Ω) vorgenommen. Hierbei sollte die Zeitkonstante zwischen 0,7 und 1,0 sec betragen. Daran schloß sich eine weitere 10 minütige Inkubation auf Eis an. Anschließend wurde die Zellsuspension mit etwas Medium (ca. 0,8 ml) verdünnt und gleichmäßig auf mehrere P90-Zellkulturschalen verteilt und im CO_2-Inkubator inkubiert.

Nach ausreichend langem Wachstum ohne Selektionsdruck (humane Zelllinien 3 Tage, Nager-Zelllinien 2 Tage) wurde das zur Selektion benötigte Selektionsagens (Hygromycin B bzw. Puromycin) zugegeben und die Zellen bei regelmäßigem Medienwechsel so lange selektioniert, bis stabil transfizierte Einzelzellklone herangewachsen waren.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde später dazu übergegangen, die Zellen mit dem *Gene Porter Tranfection Kit* zu transfizieren. Dabei wurde nach dem beigefügten Protokoll des Herstellers vorgegangen.

Zur Isolation von Einzelklonen wurden die Zellen zweimal mit warmen PBS gewaschen, die zu isolierenden Klone mit einem Tropfen Trypsin für eine Minute antrypsiniert und anschließend mit einer partiell mit Trypsin gefüllten Pipettenspitze von der Platte gewaschen und in geeignete Zellkulturschalen überführt.

3.2.5 Kolonie-Überlebenstest nach γ-Bestrahlung

Zur Ermittlung der Stahlensensitivität einer Zelllinie wurden Kolonie-Überlebens-Tests nach γ-Bestrahlung angefertigt. Hierbei werden die Zellen mit ionisierenden Strahlen bestrahlt und die Anzahl der überlebenden Zellen, die zu einer Kolonie heranwachsen für einen Dosis-Punkt, mit der unbestrahlten Kontrolle und der Verwendeten Verdünnung in Verhältnis gesetzt.

Dazu wurde eine für die entsprechende Dosis geeignete Verdünnung der Zellen auf P60 Zellkulturschalen ausgesät. Nach dem Anheften der Zellen am Schalenboden wurden diese mit der entsprechenden Dosis bestrahlt. Nach zwei Wochen Wachstum wurden die entstandenen Kolonien fixiert, durch eine Giemsa-Färbung sichtbar gemacht und gezählt.

Zur Fixierung und Anfärbung der gewachsenen Kolonien wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 15 min mit 100 %igem Ethanol überschichtet. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit Giemsa (1 : 20 verdünnt mit PBS) gefärbt. Danach wurde durch ausreichendes Spülen der Zellkulturschale mit Wasser die überschüssige Giemsa-Lösung entfernt und die Zellkulturschalen mit den fixierten und angefärbten Kolonien an der Luft getrocknet.

Zur Auswertung wurden die ausgezählten Kolonien der unbestrahlten Kontrollen gleich 100 % Wachstum gesetzt. Die Kolonien der γ-bestrahlten Schalen wurden unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in Relation zu den Kontrollen gesetzt.

3.2.6 Bestimmung der Rekombinationsrate durch Fluktuationsanalysen und durchflusszytometrische Detektion der GFP$^+$-Zellen

Zur Bestimmung der Rekombinationsrate eines Einzelklons (analog zu Meyn (Meyn, 1993) wurden so wenige Zellen ausplattiert, dass nur ca. 100 Kolonien auf der Platte heranwuchsen. Damit wurde die Chance minimiert, dass während der weiteren Replikationsphase der Population bereits frühe spontane HR-Ereignisse angereichert werden. Die Zellen der gewachsenen Kolonien wurden weiter passagiert, bis die zu analysierende Zellzahl erreicht war. Zur Analyse wurden die Zellen trypsiniert, zweimal mit PBS gewaschen und in PBS aufgenommen. Die suspendierten Zellen wurden zur Detektion der GFP-Fluoreszenz von rekombinanten Zellen einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Dazu wurden die Zellen mit einem Laser der Wellenlänge 476 nm angeregt. Diese entspricht dem Exzitationsmaximum des verwendeten GFPs (Stauber *et al.*, 1998).

Um stark autofluoreszierende, falsch-positive Zellen von der Fluoreszenz GFP-exprimierender Zellen unterscheiden zu können, wurden zwei Wellenlängenbereiche des emittierten Lichts, rot (>560 nm) und grün (510 nm), seperat gemessen und die Fluoreszenz-Intensitäten gegeneinander aufgetragen. Stark autofluoreszierende Zellen weisen ein starkes Signal im roten und im grünen Bereich auf. Bei GFP-exprimierenden Zellen nimmt das grüne Signal stärker zu als das rote. Sie erscheinen somit deutlich abgesetzt von der Population der falsch-positiven Zellen.

Aus der Gesamtzahl der analysierten Zellen und der Anzahl der GFP$^+$-Zellen wurde die Rekombinationsrate an dem Lokus / Zelle / Generation nach Luria und Delbrück (Luria und Delbrück, 1943) aus Fluktuationstabellen von Capizzi und Jamesson nach folgenden Formeln (Capizzi und Jameson, 1973) errechnet.

aus Gleichung 8 von Luria und Delbrück ergibt sich:

$$r = \alpha N_t \ln(C\alpha N_t) \qquad (1)$$

wobei r = die durchschnittliche Anzahl der rekominanten Zellen, α = die Rekombinationsrate / Lokus / Generation, N_t = Anzahl der Zellen pro Probe zum Zeitpunkt der Analyse (die im Falle der gleichzeitigen Berechnung von mehreren Proben identisch sein muss), und C = die Anzahl der Proben.

r, N_t und C sind bekannte Werte. Durch Multiplikation beider Seiten der Gleichung mit C ergibt sich:

$$Cr = C\alpha N_t \ln(C\alpha N_t) \quad (2)$$

Aus Gleichung (2) geht hervor, dass *Cr* eine Funktion von $C\alpha N_t$ und *vice versa* ist. Capizzi und Jameson errechneten mit Hilfe eines Computeprgramms Fluktuationstabellen (Capizzi und Jameson, 1973). Aus diesen kann mit Hilfe des Produktes *Cr* für $C\alpha N_t$ der tatsächliche Zahlenwert durch lineare Interpolation entnommen werden. α wird dann durch die Formel

$$\alpha = C\alpha N_t / CN_t \quad (3)$$

erhalten.

Bei der Anwendung dieser Formel müssen alle gewachsenen Zellen analysiert werden. Da das Durchflusszytometer, das zur Analyse verwendet wurde, nicht jederzeit verfügbar war, schwanken in dieser Arbeit die Zahlen für N_t (analysierte Zellzahl) innerhalb eines Einzelklons (Probe). Wird die Rekombinationsrate aus mehreren Experimenten eines Einzelklons unter Verwendung dieser Formel in einem Rechendurchgang errechnet, muss die jeweils analysierte Zellzahl gleich sein. Sie kann bei abweichenden Anzahlen nicht einfach gemittelt werden, da sich sonst falsche Rekombinationsraten ergeben. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit jeweils für das durchgeführte Experiment die Rekombinationsrate des Einzelklons errechnet, und die Rekombinationsraten mehrerer Experimente eines Einzelklons gemittelt.

Parameter für die durchflusszytometrische Detektion rekombinanter GFP^+-Zellen:

Laser:

- 476 nm

Filterbestückung der Fluoreszenz-Detektoren:

- Fluoreszenz 1 (grün): 510 nm Bandpass-Filter
- Floureszenz 2 (rot): Transmission > 560 nm

3.2.7 Bestimmung der Rekombinationsfrequenz in Kolonie-Tests

Zur Bestimmung der Rekombinationsfrequenz wurden Kolonie-Tests durchgeführt (Fritz *et al.*, 2000). Dazu wurde ein genetisch isogenes Zellpärchen (Mutante und entsprechender Wildtyp) parallel mit dem pGrec Vektor transfiziert. Nach Selektion der Zellen auf die Aufnahme des Vektors lies man die Zellen zu Kolonien heranwachsen. Nach ausreichendem Wachstum der Kolonien wurden diese fluoreszenzmikroskopisch auf rekombinante GFP-exprimierende Zellen untersucht. Dabei wurde die Anzahl der Kolonien und die Anzahl der GFP-rekonstituierenden Ereignisse gezählt. Die GFP-rekonstituierenden Ereignisse wurden kategorisiert in:

- GFP^+-Einzelzelle
- GFP^+-Sektor einer Kolonie (definiert als Bereich einer Kolonie mit mindestens 2 GFP^+-Zellen)
- GFP^+-Kolonie (definiert als Kolonie mit mindestens 50% GFP^+-Zellen)

Diese Kategorien wurden eingeführt, um eventuelle Auffälligkeiten in der Verteilung zu ermitteln.

Die Rekombinationsfrequenz (RF) errechnet sich aus der Anzahl der GFP^+-rekonstituierenden Ereignisse und der Gesamtzahl der erfassten Kolonien in Prozent. Wurden in einem Experiment eine Zelllinie zu mehreren Zeitpunkten analysiert, ermittelte sich die als Gesamtergebnis angegebene RF des Experiments aus der Gesamtanzahl der untersuchten Kolonien und der Gesamtanzahl der detektierten GFP+-Ereignisse und nicht aus den für die Generationen errechneten RF-Werten.

Für die Ermittlung der durchschnittlichen RF einer Zelllinie wurden die Gesamtergebnisse der Einzelexperimente gemittelt.

3.2.8 Gefrierkulturen von Säugerzellen

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen von der Zellkulturschale abtrypsiniert, die Zellen abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min), der Mediumüberstand abgenommen und das Zell-pellet mit Einfriermedium (10 % FCS, 10 % DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension

wurde in Cryoröhrchen überführt und im *Nalgene® Cryo 1°C Freezing Container* ÜN bei -80°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Cryoröhrchen in flüssigen Stickstoff zur dauerhaften Aufbewahrung überführt.

3.3 Standardmethoden der Molekularbiologie

3.3.1 Isolierung und Charakterisierung von DNA

3.3.1.1 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Der Aufschluss der Zellen und die Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe der verschiedenen Kits zur DNA-Isolierung nach der Vorschrift des Herstellers (QIAgen GmbH, Hilden, Januar 1999).

3.3.1.2 Phenolextraktion von DNA

Zur Entfernung von Proteinen aus einer DNA Lösung wurde diese mit PCI im Verhältnis 1 : 1 versetzt, gründlich gemischt, und 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne Verunreinigung durch die proteinhaltige Interphase in ein neues Gefäß überführt.

3.3.1.3 Präzipitation von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 2,5 Volumina 100 %igem Ethanol gemischt. Alternativ wurde die DNA-Lösung nur mit 0,6 Volumina 100 %igem Isopropanol versetzt.

Die DNA wurde 1 h bei –20°C präzipitiert und anschließend durch Zentrifugation (15 min, 15000 rpm, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in dem gewünschten Volumen MilliQ Wasser gelöst.

3.3.1.4 Isolierung von genomischer DNA aus Säugerzellen

Von einer konfluent bewachsenen P90 Zellkulturschale wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen auf der Platte wurden dann mit 4 ml PBS überschichtet und mit einem Gummischaber von dem Boden abgeschabt. Die PBS-Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 1000 rpm, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 2 x TEN Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde ein ProteinaseK-Verdau (1 x TEN, 0,4 % SDS, 0,5 mg/ml ProteinaseK) für 3 h bei 37°C durchgeführt. Zur Entfernung der ProteinaseK erfolgte eine dreimalige PCI Extraktion, gefolgt von einer Ethanolpräzipitation der DNA. Nach kurzem Trocknen der gefällten DNA wurde das DNA-Pellet ÜN bei 4°C in TE Puffer gelöst. Zur Beseitigung der RNA wurde die Lösung einer RNAse Behandlung (Endkonzentration 0,1 mg/ml) für 1 h bei 37°C unterzogen. Anschließend wurde zur Entfernung der RNAse ein weiterer ProteinaseK-Verdau (0,4 % SDS, 0,5 mg/ml ProteinaseK) für 1 h bei 37°C durchgeführt. Die ProteinaseK wurde durch eine weitere dreimalige PCI-Extraktion entfernt, die DNA einer Ethanolfällung unterzogen, das Pellet kurz getrocknet und ÜN bei 4°C in 50 µl Tris, pH 7,4 gelöst. Zur Kontrolle der Qualität und Quantität der DNA wurde ein Aliquot einer Agarosegelelektophorese unterzogen.

Das Protokoll kann auch in abgewandelter Form zur DNA Isolierung verwendet werden. Dabei wird die DNA bei der Ethanolpräzipitation nicht durch Zentrifugation pelletiert, sondern mittels einer Pasteur-Pipette die mit einem Häkchen versehen ist (durch kurzes Schmelzen der Pipette im Bunsenbrenner) „gefischt“. Der RNase Schritt wird in diesem Protokoll ausgelassen und die DNA einfach einer zweiten Ethanolpräzipitation unterzogen.

2 x TEN:	20 mM Tris pH 7,5
	20 mM EDTA
	0,3 M NaCl

3.3.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung der DNA-Moleküle wurde nach den von den Herstellern gemachten Angaben und mit den beigefügten Puffern durchgeführt. Plasmid-DNA wurde für 1 – 5 h, genomische DNA ÜN bis zu 48 h unter weiterer Zugabe von dem entsprchendem Enzym, bei der für die Restriktionsendonuklease optimalen Temperatur inkubiert.

3.3.1.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Verwendet wurden 0,8 – 1 %ige Agarosegele, gelöst in 1 x TBE, gegossen in einer Horizontalapparatur. Als Laufpuffer diente 1 x TBE, die angelegte Spannung betrug 10 V/cm.

Die zu analysierende DNA-Lösung wurde mit 1/5 Ausgangsvolumen 6 x Gelauftragspuffer versetzt und zusammen mit einem DNA Längenstandard bekannter Konzentration gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Färbung der DNA, indem das Agarosegel für 30 min in einer Lösung aus gebrauchtem Laufpuffer, versetzt mit 150 µg/l EB inkubiert wurde. Die Fluoreszenz des in der DNA interkalierten EB ermöglichte die Visualisierung der DNA-Moleküle bei λ = 302 nm. Zur Dokumentation wurden Fotos angefertigt.

6 x Gelauftragspuffer:	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 30 % (v/v) Glycerin in H_2O gelöst

3.3.1.7 Isolation und Aufreinigung einzelner DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Zur Elution der DNA aus Agarose wurde der QIAquick Gel Extraction Kit angewendet. Vorgegangen wurde nach dem QIAquick Gel Extraction Protokoll aus dem QIAquick Spin Handbook, April 2000.

3.3.1.8 Reinigung von PCR-Produkten mit Hilfe von Mikrosäulen

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purifikation Kit aus dem PCR-Ansatz gereinigt. Dabei wurde nach dem QIAquick PCR Purification Protokoll aus dem QIAquick Spin Handbook, April 2000, vorgegangen.

3.3.1.9 Sequenzanalyse von Nukleinsäuren

Sämtliche Sequenzanalysen wurden von der Firma GATC GmbH, Konstanz durchgeführt.

3.3.2 Klonierung und Subklonierung

3.3.2.1 Abspaltung der 5´-Phosphate mittels alkalischer Phosphatase

Der Restriktionsansatz wurde mit 1/10 Endvolumen 10 x Dephosphorylierungspuffer und 1 U alkalischer Phosphatase je 30 µg linearisierter Plasmid-DNA versetzt und anschließend 60 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei 65°C. Durch eine Phenolextraktion wurde das inaktivierte Enzym aus der DNA Lösung entfernt. Zur Konzentrierung der DNA Lösung erfolgte eine Ethanolfällung.

3.3.2.2 Erzeugung glatter Enden

1 – 10 µg DNA wurden mit den gewünschten Enzymen in einem Volumen von 150 µl verdaut. Zur Entfernung der Restriktionsenzyme wurde anschließend eine Phenolextraktion mit nachfolgender Ethanolpräzipitation der DNA durchgeführt. Danach wurde die DNA-Lösung mit MilliQ Wasser auf ein Volumen von 84 µl eingestellt, 1 µl dNTP-Mischung (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1/10 Endvolumen 10 x Klenow-Puffer und 5 U Klenow-Polymerase zugesetzt und 15 min bei 30°C inkubiert. Abgebrochen wurde die Reaktion durch 10 minütige Inkubation bei 75°C. Durch Phenolextraktion und anschließender Ethanolpräzipitation wurde die Probe von Proteinen befreit.

10 x Klenow-Puffer:	130 mM Kaliumphosphat 6,5 mM $MgCl_2$ 33 µM dTTP 1 mM Dithiothreitol 0,032 mg/ml BSA 0,833 A_{260}/ml poly [d(A-T)] pH 7,4

3.3.2.3 Ligation von Restriktionsfragmenten und Vektoren

100 ng linearisierter Vektor wurde mit 1/10 Endvolumen 10 x Ligationspuffer und 1 µl 10 mM dATP vermischt. Zu diesem Ansatz wurde so viel Fragment pipetiert, dass das molare Verhältnis von Fragment zu Plasmid 1 : 1 – 3 : 1 betrug. Zum Schluss wurde die Probe mit MilliQ Wasser auf ein Endvolumen von 19 µl gebracht und 1 U T4-DNA-Ligase (1 U / µl) zugegeben. Der Ansatz wurde im Wasserbad bei 14°C ÜN inkubiert. Als Ligationskontrolle

diente eine Probe, bei der das Fragment durch das entsprechende Volumen MilliQ Wasser ersetzt worden war.

3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Es wurde folgender 50 µl Standard-Ansatz gewählt: 1/10 Endvolumen 10 x PCR Puffer (Gibco BRL), 1, 25 mM $MgCl_2$, je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 14 pmol des 3´- und 5´-Oligonukleotids und 1 U *Taq* DNA Polymerase, gemischt mit mindestens 200 ng genomischer DNA, bzw. 2 ng Plasmid-DNA. Sämtliche Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Bei der Verwendung eines PCR Geräts ohne Deckelheizung (Thermo Cycler, Perkin Elmer) wurde der PCR-Ansatz mit Mineralöl überschichtet.

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte nach folgendem Grundprogramm:

		95°C	10 min
30x	{	95°C	1 min (Denaturierung)
		T_A	1 min (Anlagerung)
		72°C	je nach Produktlänge, 30 sec je 500 bp (Kettensynthese)
		72°C	10 min (finale Kettenverlängerung)

T_A = Anlagerungstemperatur. Wiesen die beiden Oligonukleotide unterschiedliche Anlagerungstemperaturen auf, so wurde die niedrigere Temperatur gewählt.

3.3.4 Hybridisierung und Nachweis von Nukleinsäuren

3.3.4.1 Transfer von DNA-Molekülen auf Nylonmembranen

(nach Southern, 1974, modifiziert)

Das Agarosegel wurde zur partiellen Depurinierung der DNA-Moleküle (und somit zur Erhöhung der Transfereffizienz) so lange in 0,25 M HCl geschwenkt, bis sich das im Laufpuffer

enthaltene Xylencyanol gelb verfärbte. Zur Neutralisation wurde das Gel anschließend so lange in 0,4 M frisch angesetzter NaOH geschwenkt, bis der Farbstoff wieder seine ursprüngliche Blaufärbung hatte.

Der Blotaufbau erfolgte nach Standardvorschrift, wobei positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N^+ bzw. QIAbrane plus) verwendet wurden. Als Transferpuffer diente 0,4 M frisch angesetzte NaOH. Die Transferzeit betrug 18 h.

Nach der angegebenen Transferzeit wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen, um überschüssige Salze und Gelreste zu entfernen. Anschließend wurde die Membran zur UV-Quervernetzung der DNA-Moleküle mit der Membran 1 min bei λ = 320 nm auf dem Transilluminator bestrahlt.

3.3.4.2 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten

3.3.4.2.1 Markierung der Probe

Zur Herstellung der radioaktiv markierten Probe wurde eine Standard-PCR mit folgenden Modifikationen durchgeführt:

Statt 2 mM nicht-radioaktivem dCTP wurden nur 0,02 mM zugegeben. Dazu wurden 10 - 60 µCi radioaktives [α-^{32}P] dCTP zugegeben.

3.3.4.2.2 Hybridisierung

Die kurz in 2 x SSC geschwenkte Membran wurde mit 20 ml Prä-Hybridisierungslösung drei Stunden bei 68°C inkubiert. Anschließend wurde diese durch 10 ml Hybridisierungslösung ersetzt, die die denaturierte DNA-Sonde enthielt. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C ÜN. Um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, wurde bei 65°C zunächst zweimal je 15 min mit vorgewärmten Waschpuffer I, dann je zweimal je 15 min mit Waschpuffer II, dann zweimal je 15 min mit Waschpuffer III und abschließend zweimal je 15 min mit Waschpuffer IV gewaschen. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm ÜN bis zu 14 d exponiert.

Prä-Hybridisierungslösung:	5 x Denhardts 0,5 % (w/v) SDS 6 x SSC 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA
Hybridisierungslösung:	5 x Denhardts 0,5 % (w/v) SDS 6 x SSC 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA 10 ng/ml denaturierte radioaktive DNA-Sonde
Waschpuffer I:	0,5 % (w/v) SDS 2 x SSC
Waschpuffer II:	0,5 % (w/v) SDS 1 x SSC
Waschpuffer III:	0,5 % (w/v) SDS 0,5 x SSC
Waschpuffer IV:	0,5 % (w/v) SDS 0,1 x SSC

3.3.4.3 Entfernung gebundener Sonde

Sollte die Membran erneut mit einer anderen Sonde hybridisiert werden, wurde zunächst die gebundene, radioaktiv markierte Sonde entfernt. Dazu wurde die Membran für 2 h bei 75°C in mehreren hundert ml Waschlösung V geschwenkt, anschließend kurz bei RT in Waschlösung VI

Waschlösung V:	1 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0 0,1 x Denhardts
Waschlösung VI:	0,1 x SSPE
20 x SSPE:	3 M NaCl 200 mM NaH_2PO_4 x H_2O 20 mM EDTA

3.4 Arbeiten mit Proteinen

3.4.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen

Zur Herstellung von Gesamt-Zell-Protein-Extrakten wurde das Medium von der gut bewachsenen Kulturschale abgenommen, die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und gerade so viel RIPA-Puffer auf die Platte pipettiert, dass die Oberfläche mit einem Puffer-Film überzogen war. Nach Lyse der Zellen auf Eis wurde der Protein-Extrakt mit einem Gummischaber gesammelt und in ein vorgekühltes Eppendorf Gefäß überführt. Zur Denaturierung von Proteasen wurde der Gesamt-Zell-Protein-Extrakt sofort 10 min aufgekocht und anschließend bei –20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

RIPA-Buffer: 150 mM NaCl
1 % NP-40
10 mM DOC
0,1 % (w/v) SDS
50 mM Tris pH 8

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

3.4.2.1 Erstellung der Eichkurve

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zell-Extrakten wurde zuerst eine Eichkurve erstellt. Dazu wurde IgG mit den Konzentrationen 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 µg Protein/ml verwendet. Die Proteinlösung wurde mit dem zur Lyse der Zellen verwendeten Puffer auf 100 µl gebracht, dies mit 1000 µl Bradfordreagenz (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) welches 1:4 mit MilliQ-Wasser verdünnt war, versetzt und 5-30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die OD bei 595 nm photometrisch bestimmt. Das verwendete Photometer war aufgrund eines *Plug-Ins* in der Lage, die Eichkurve zu erstellen und darauf beruhend bei der Probenmessung die Proteinkonzentration der Probe zu bestimmen.

3.4.2.2 Probenbehandlung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration eines Zellextraktes wurden 5 µl der Probe verwendet. Diese wurden mit dem verwendeten Lysepuffer 1:10 verdünnt und davon 10 bzw. 2 µl zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Die beiden Aliquots wurden mit Lysepuffer auf ein Volumen von 100 µl gebracht und mit 1000 µl 1:4 verdünntem Bradfordreagenz versetzt, die gleiche Zeit wie die Proben der Eichkurve bei RT inkubiert und anschließend die OD bei 595 nm gemessen. Die vom Photometer ermittelte Konzentration wurde mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu erhalten.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen nach Lämmli

Die Auftrennung von Proteinen aus Zellextrakten erfolgte mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (Laemmli, 1970).

Alle Materialien für die Gelform wurden sorgfältigst erst mit Detergenz, dann mit bidest. Wasser und abschließend mit 70 %igem Ethanol geputzt.

Die Dicke der Abstandshalter betrug 0,75 mm, die Breite 10 mm, die Größe der Glasplatten B x H 165 mm x 125 mm.

Die Gelform wurde abgedichtet, das Trenngel hineingegossen und mit etwas Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung des Gels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel gegossen und der Kamm platziert. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wurde Laufpuffer in die Pufferkammern der Apparatur gegossen, der Kamm entfernt und die Proben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte vertikal bei 0,17 mA/cm^2, bis die Lauffront des Bromphenolblaus das Ende des Gels erreicht hatte.

Zur Gewichtsabschätzung der aufgetrennten Polypeptide wurden Proteine mit bekannten Gewicht eingesetzt (LMW- oder HMW-Marker).

1 x Gelauftragspuffer nach Lämmli:	60 mM Tris/Cl, pH 6,8 2 % (w/v) SDS 10 % Glycerin 0,02 (w/v) Bromphenolblau 5 % 2-Mercaptoethanol
1 x SDS-Elektrophoresepuffer:	50 mM Tris/Cl, pH 8,3

	830 mM Glycerin 0,1 % (w/v) SDS
Trenngel (16 %):	53 % (v/v) Protogel™ 380 mM Tris/Cl, pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (v/v) TEMED 0,05 % (w/v) APS
Sammelgel:	16,6 % (v/v) Protogel™ 60 mM Tris/Cl, pH 8,8 0,1 % (v/v) TEMED 0,05 % (w/v) APS
Protogel™ :	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) N,N,-Methlenbisacrylamid

3.4.4 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose

Western-Blot nach Towbin et al., (Towbin *et al.*, 1979).

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte nach dem Semi-Dry-Verfahren (Khyse-Anderson, 1984) mit 1 x Blotpuffer. Die Porengröße der verwendeten Nitrozellulosemembran betrug 0,2 µm. Der Transfer erfolgte durch das Anlegen einer Stromstärke von 1,7 mA/cm^2 für 1,5 h. Nach dem Transfer wurden die Proteine durch Färben mit Ponceau S-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % TCA) sichtbar gemacht. Überschüssige Ponceau S-Lösung wurde mit deionisiertem Wasser abgewaschen. Anschließend erfolgte eine Immunodetektion mit den entsprechenden Antikörpern.

1 x Blotpuffer:	20 mM Tris 150 mM Glycerin 20 % Methanol 0,05 % (w/v) SDS

3.4.5 Immunodetektion von Proteinen

Die auf eine Nitrozellulosemembran transferierten Proteine wurden durch Chemolumineszenz detektiert. Dazu wurden zuerst die unspezifischen AK-Bindungsstellen der Membran durch Inkubation mit Blockpuffer (0,3 % Tween-20, 4 % (w/v) Magermilch-Pulver in PBS) für 1 h

abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem anti-GFP AK (Living Colors® Peptide Antibody, Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA, Kaninchen anti-GFP, Verdünnung 1 : 1000 in Blockpuffer) für 1 h. Danach wurde der Blot dreimal 5 min mit Waschpuffer (0,3 % Tween-20 in PBS) gewaschen. Die Detektion des primären AK's erfolgte durch Inkubation für 1 h mit einem Ziege-Anti-Kaninchen AK, konjugiert mit HRP (Verdünnung 1 : 3000 in Blockpuffer). Nach der Inkubation wurde der Blot viermal 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Daran schloss sich die Chemolumineszenz-Reaktion an (siehe 3.4.6). Im Anschluss daran wurde der Blot viermal 10 min in 100 ml Waschpuffer gewaschen und entweder ÜN in Waschpuffer gelagert oder sofort für eine weitere Immunodetektion verwendet.

Zur Kontrolle der auf die Nitrozellulosemembran transferierten Proteinmenge wurde als Standard die detektierbare α-Tubulinmenge verwendet. Vorgegangen wurde wie oben beschrieben. Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler Maus-anti-α-Tubulin AK (NeoMarkers, Union City, USA) 1 : 500 verdünnt, verwendet. Als sekundärer AK fand ein anti-Maus IgG AK HRP konjugiert, 1 : 1500 verdünnt, Verwendung.

3.4.6 Chemolumineszenz Reaktion

Die durch die AK detektierten Proteine wurden durch eine Chemolumineszenz-Reaktion, bei der ein Röntgenfilm exponiert wurde, sichtbar gemacht. Dazu wurde der Blot mit einer Mischung vom Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1 : 1 für 1 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation ließ man die Flüssigkeit gut abtropfen, wickelte den Blot in Frischhaltefolie, um ein Austrocknen der Membran zu verhindern und exponierte einen Röntgenfilm für eine ausreichende Zeit.

Lösung A:	2,5 mM Luminol (gelöst in 1 ml DMSO) 0,4 mM p-Coumaninsäure (gelöst in 400 µl DMSO) 100 mM Tris/Cl, pH 8,5 in wässriger Lösung
Lösung B:	0,026 % (w/v) H_2O_2 100 mM Tris/Cl, pH 8,5

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung des pGrec Vektorsystems

4.1.1 Klonierung

4.1.1.1 Klonierung und Expression des konstitutiven *GFP*-Expressionsplasmids

Um überprüfen zu können, ob und in welchem Ausmaß in den verwendeten Zellsystemen eine stabile *GFP*-Expression möglich ist, wurde als positive Kontrolle das *eGFP*-Gen unter die Kontrolle des RSV-LTR-Promotors in ein Expressionsplasmid kloniert (Abbildung 9).

Dazu wurde die *eGFP* Nukleotidsequenz (*GFPsg25* (Stauber *et al.*, 1998)), verstärkte und optimierte Version des *GFPs*, im folgenden nur *GFP* genannt) durch einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *Ecl*136II (spaltet DNA *blunt,* so dass Enden ohne Überhänge entstehen) und *Pvu*II (*blunt*) aus dem Plasmid pFred 25 ausgeschnitten. Das entstandene Fragment mit dem *GFP*-Gen wurde mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese abgetrennt und aufgereinigt. Dieses Fragment wurde anschließend in den durch einen *Pvu*II-Restriktionsverdau geöffneten Vektor pRep5 (Groger *et al.*, 1989) kloniert (pRep5-*GFP*). Die singuläre Insertion und die Orientierung des Gens wurde durch mehrere Restriktionsverdaus kontrolliert.

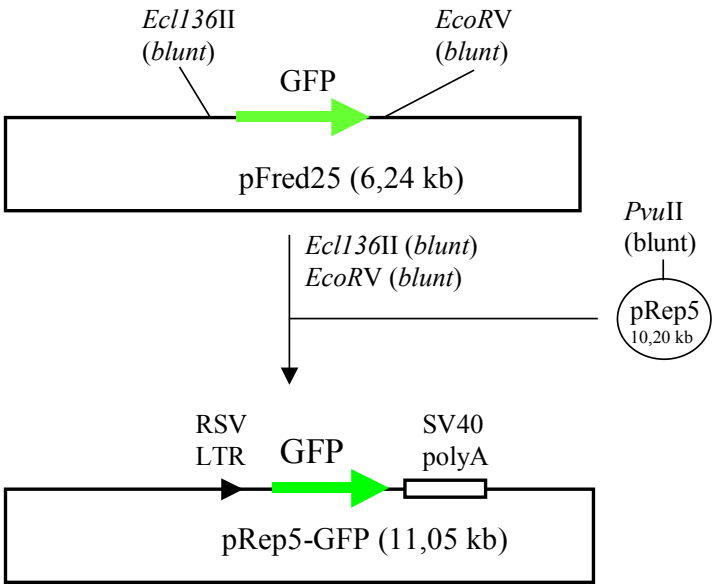


Abbildung 9: Klonierungsschema zur Konstruktion des konstitutiven *GFP*-Expressionsplasmids (pRep5-*GFP*).

Die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.

Der resultierende Expressionsvektor pRep5-*GFP* wurde in SV40-immortalisierte Zellen eines Ataxia telangiectasia (A-T)-Patienten (AT5BIVA) sowie eines unauffälligen Kontroll-Donors (GM0637) stabil transfiziert. Nach abgeschlossener Hygromycin-Selektion auf stabile Aufnahme des Plasmids wurden Einzelklone isoliert und fluoreszenzmikroskopisch auf die GFP-Expression untersucht. Die transfizierten Zellen wiesen, wie erwartet, meist ein starkes Fluoreszenzsignal mit der für GFP typischen Färbung auf, wenn auch mit intraklonalen Expressionsunterschieden. So waren selten 100 % der Zellen eines Klons GFP-positiv, in der Regel waren 30 - 80 % der Zellen einer Population GFP^+ bei mikroskopischer Analyse. Auch interklonale Unterschiede waren zu beobachten, von sehr schwacher GFP-Expression bis hin zu sehr starker GFP-Expression (Daten nicht gezeigt). Insgesamt zeigte sich, dass die Expression des *GFP* unter Kontrolle des RSV-LTR-Promotors zu befriedigenden Fluoreszenzintensitäten, auch bei mikroskopischer Betrachtung führte. In späteren Experimenten wurde deutlich, dass die Sensitivität des Durchflusszytometers deutlich höher war, und zwar auch für schwache GFP-Fluoreszenzintensitäten, die bei mikroskopischer Betrachtung nicht erkennbar waren.

In weiterführenden Experimenten wurde die *GFP*-Expression auch in den Zell-Paaren AT-pEBS und AT-YZ sowie den Hamster-Zelllinien V79B und CL-V4B (siehe Kapitel 4.2.2 –

4.2.5) getestet, die aufgrund ihres genetischen Defektes als geeignete Kandidaten für Messungen des Rekombinationsstatus ausgewählt wurden. In allen Fällen zeigte sich eine gute GFP-Fluoreszenz der Zellen, die auch während der weiteren Kultivierung stabil exprimiert wurde und keine offensichtlichen toxischen Effekte verursachte (Stauber *et al.*, 1998).

4.1.1.2 Klonierung der HR-Kassette

Da sich das GFP-Protein im pRep5-Vektor gut in verschiedenen Zellsystemen exprimieren lies, wurde es als Reporterprotein in dem entstehenden HR-Vektorsystem verwendet. Das System wurde analog zu dem von Herzing und Meyn (Herzing und Meyn, 1993) konzipiert: Es sollte ein Allel des *GFP*-Gens durch eine Leserasterverschiebung im 3'-Bereich, ein anderes Allel durch eine Deletion des 5´-Bereichs inaktiviert werden. Als Abstandshalter der ‚*head-to-tail'*-orientierten mutierten Allele sollte ein funktionelles Puromycin-Resistenzgen dienen. Die zwei resultierenden, mutierten Allele weisen einen zentralen Überlappungsbereich von 383 Nukleotiden (bp 70 - bp 452) auf, innerhalb dessen sich homologe Rekombination ereigenen und ein funktionelles Wildtyp-*GFP*-Allel rekonstituiert werden kann.

Das Wildtyp-*GFP*-Allel wurde aus dem Plasmid pFred25 durch einen *Ecl136*I-*EcoR*V-Doppelverdau isoliert. Zur einfacheren Manipulation wurde es zunächst in den durch *EcoR*V-Verdau geöffneten Vektor pCR™II (Invitrogen) kloniert. Die Orientierung und singuläre Insertion des *GFP*-Gens wurde durch mehrere Restriktionsverdaus überprüft.

Zur Klonierung der HR-Kassette wurden beide möglichen Orientierungen des in den pCR™II-Vektor einklonierten Gens verwendet (pCRII-*GFP*, pCRII-*GFP*-anti).

4.1.1.3 Klonierung des 3' mutierten *GFP-FS*-Allels und *GFP-FS*- Expressionsvektors

Um den Leserahmen zu verschieben, wurde das 13mer Oligonukleotid LRV-*Bgl*II in das *GFP*-Gen inseriert (Abb. 10). Dazu wurde der pCRII-*GFP* Vektor mit dem Restriktionsenzym *Bst1107*I bei bp 452 des *GFP*-ORF linearisiert und das Leseraster-verschiebende Oligonukleotid einkloniert. Hierbei wurde in dem Ligationsansatz ein molares Verhältnis Vektor : Oligonukleotid von 1 : 5000 gewählt. Zur leichteren Identifikation von Plasmiden,

die das Oligonukleotid inseriert hatten, wurde gezielt eine *Bgl*II-Restriktionsschnittstelle in das 13mer eingefügt. Aus ligierten Plasmiden dieser Klonierung, deren Sequenz diese zusätzliche Restriktionsschnittstelle im analytischen *Bgl*II-Restriktionsverdau aufwiesen, wurde das mutierte *GFP*-Gen dann isoliert. Dazu wurde das *GFP*-Gen mit dem verschobenen Leseraster (im folgenden *GFP-FS* genannt) durch einen *BamH*I-Restriktionsverdau aus dem Vektor ausgeschnitten, isoliert und aufgereinigt. Das isolierte *GFP-FS*-Allel wurde in einen *BamH*I geöffneten pRep5-Vektor kloniert (pRep5-*GFP-FS*). Die singuläre Insertion und Orientierung des *GFP-FS*-Allels wurden durch Restriktionsverdaus überprüft.

In den Vektor pRep5-*GFP-FS* wurden später die restlichen Bestandteile der HR-Kassette einkloniert. Weiterhin diente er zur Überprüfung, ob die funktionelle Inaktivierung des *GFP-FS*-Allels erfolgreich war.

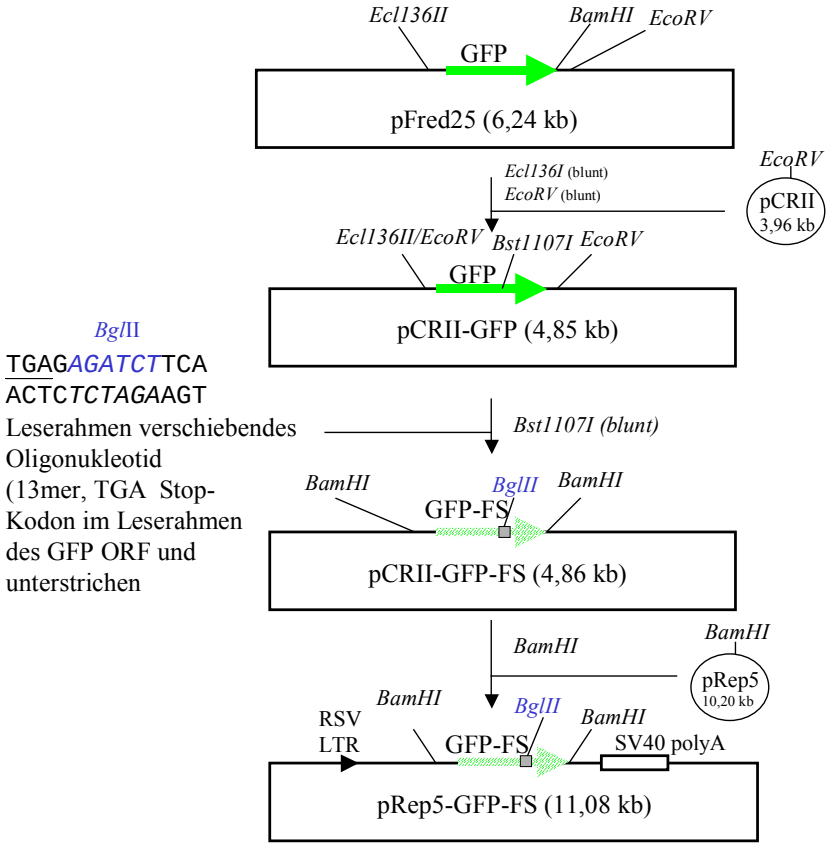


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Klonierung des Vektors pRep5-*GFP-FS*.

Der Vektor ist ein Vorläuferplasmid der Rekombinationskassette des pGrec Vektorsystems und ein Kontrollplasmid zur funktionalen Inaktivierung des *GFP-FS*-Allels.

4.1.1.4 Klonierung des 5' mutierten *GFPΔ*-Allels und *GFPΔ*-Expressionsvektors

Zur Herstellung des *GFP*-Gens mit einer Deletion im 5´-Bereich wurde der pCRII-*GFP-anti*-Vektor verwendet. Der *GFP*-ORF enthält bei bp 69 eine *Hpa*I-Restriktionsschnittstelle. Diese wurde verwendet, um ein 5´-deletiertes *GFP*-Allel herzustellen (im folgenden *GFPΔ*-Allel genannt) und gleichzeitig um das Allel mit Hilfe eines weiteren Restriktionsenzyms aus dem Plasmid zu isolieren. Dazu wurden die pCRII-*GFP-anti* Vektoren einem *Kpn*I-*Hpa*I-Doppelverdau unterzogen (Abb. 11). Das kleine Fragment wurde isoliert, aufgereinigt und in einen durch *Kpn*I-*Pvu*II geöffneten pRep5-Vektor ligiert (pRep5-*GFPΔ*).

Zur Einführung eines Abstandshalters zwischen den beiden mutierten, ‚*head-to-tail*-orientierten *GFP*-Allelen der vollständigen HR-Kassette wurde in dieses Plasmid ein Puromycin-Resistenzgen (*Puromycin*^{r}) 5´ vor das *GFPΔ* kloniert. Die Kassette mit dem Puromycin-Resistenzgen, sowie einem vorgeschalteten konstitutiven SV40-Promotor und der nachgeschalteten poly(A)-Sequenz, wurde aus dem Vektor pBabe (Morgenstern und Land, 1990) durch einen *Sal*I-*Nhe*I-Verdau ausgeschnitten, gelgereinigt und isoliert. Zur Klonierung der *Puromycin*^{r}-Kassette in den Vektor pRep5-*GFPΔ* wurde dieser durch einen *Xho*I-*Nhe*I-Verdau linearisiert und die Kassette in den Vektor ligiert (pRep5-*puro*-*GF-delta*). Die singuläre Insertion der *Puromycin*^{r}-Kassette und die Orientierung wurde durch mehrere Restriktionsverdaus überprüft. Mit dem Vektor pRep5-*puro*-*GFP-delta* wurde später gezeigt, dass durch die Deletion im 5´-Bereich das *GFP*-Gen funktionell inaktiviert wurde.

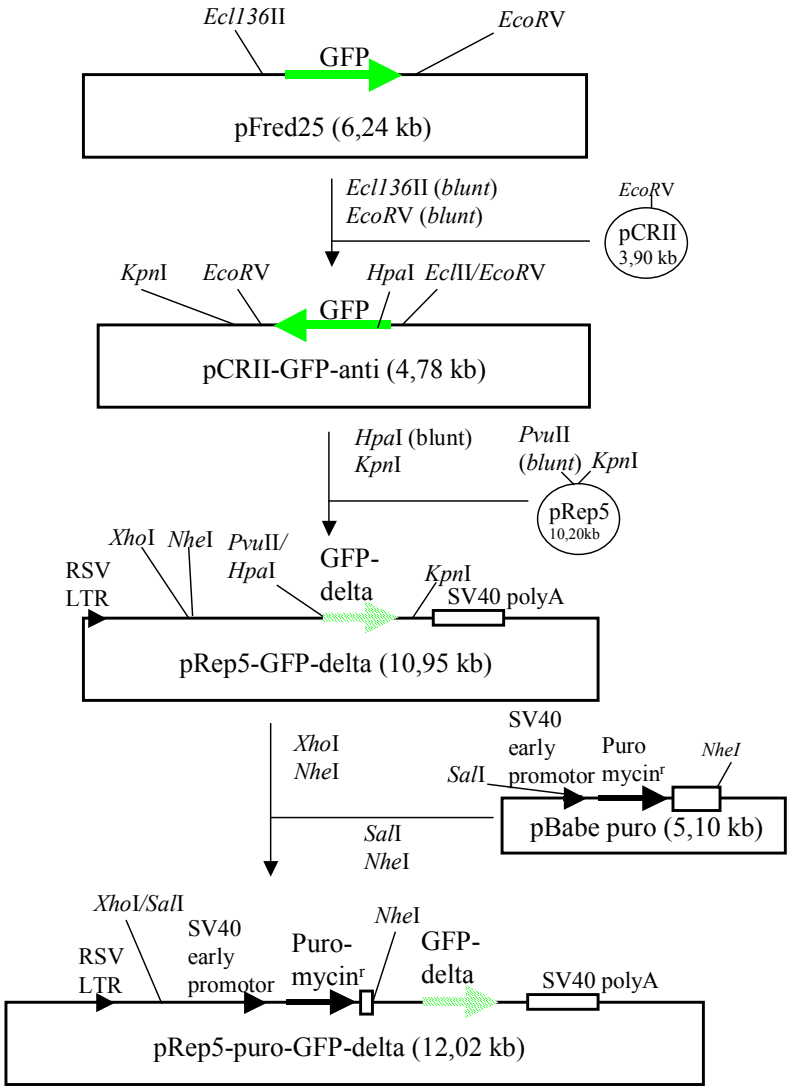


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Klonierung des Vektors pRep5-*puro-GFP-delta*.

Der Vektor ist ein Vorläuferplasmid der Rekombinationskassette des pGrec-Vektorsystems und ein Kontrollplasmid zur funktionellen Inaktivierung des *GFP-delta*-Allels.

4.1.1.5 Herstellung der HR-Kassette

Zur Herstellung der endgültigen Rekombinationskassette des pGrec-Vektorsystems wurde die *Puromycin*^{r}*-GFP-delta*-Kassette aus dem Plasmid pRep5-*puro-GFP-delta* durch einen *Kpn*I-*Nae*I-Restriktionsverdau isoliert (Abb. 12). Das aufgereinigte Fragment wurde in einen *Kpn*I-*Nae*I-geöffneten pRep5-*GFP-FS*-Vektor ligiert. Der Vektor mit der so erhaltenen vollständigen Rekombinationskassette wurde pGrec genannt. Die singuläre Insertion der *Puromycin*^{r}*-GFP-delta*-Kassette wurde durch mehrere Restriktionsverdaus überprüft.

Zusätzlich wurde die Nukleinsäuresequenz der HR-Kassette über 3017 nt bestimmt (GATC Biotech GmbH, Konstanz), die den Bereich der beiden mutierten *GFP*-Allele und des *Puromycin*^{r}-Gens abdecken (siehe Anlage, sequenzierter Bereich von nt 637 bis nt 3654). Die Sequenzierung erbrachte, dass die Klonierung fehlerfrei war, und insbesondere, dass die technisch anspruchsvolle Insertionsmutagenese des *GFP-FS*-Allels zu 100 % korrekt verlief.

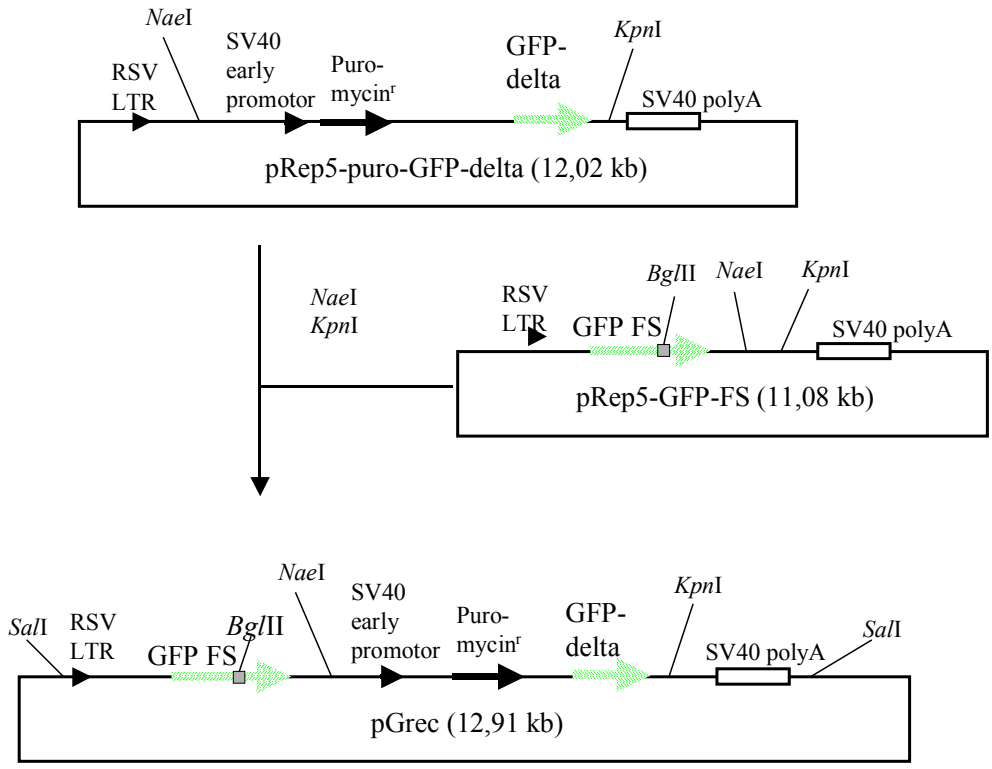


Abbildung 12: Schematische Darstellung des finalen Klonierungsschrittes zur Darstellung des Plasmids pGrec aus den Vorläuferplasmiden pRep5-*puro-GFP-delta* und pRep5-*GFP-FS*.

4.1.1.6 Herstellung des genomisch integrierenden pGrec-Vektors (*pGrec-integrating*)

Zusätzlich zur Anwendung des episomalen pGrec-Vektors, der extrachromosomale HR-Ereignisse messen kann, sollte ein integrierender Vektor geschaffen werden, mit dessen Hilfe intrachromosomale Rekombination detektierbar ist.

Für die episomale Persistenz des pRep5-Vektors und seiner Derivate in humanen Zellen ist der Sequenzabschnitt *EBNA-1* verantwortlich (Yates *et al.*, 1985). Der Bereich des *OriP* dient außerdem als Replikationsursprung des episomalen Plasmids. Ohne diese Abschnitte muss in einer stabil transfizierten humanen Zelle das Plasmid genomisch integrieren, um

während der Replikation weitervererbt zu werden, weshalb diese Bereiche nachfolgend aus pGrec deletiert wurden. Da alle hierfür in Frage kommenden Restriktionsenzyme jedoch auch in der HR-Kassette eine Schnittstelle besitzen, musste zuerst der Vektor pRep5 in ein genomisch integrierendes Plasmid umgewandelt werden (pRep5-*integrating*) (Abbildung 13). Anschließend wurden daraus die Expressionskassette (Promotor (RSV-LTR), die multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) und die poly-Adenylierungs-Sequenz (SV40-poly(A)) durch die aus dem Plasmid pGrec isolierte HR-Kassette ersetzt.

Zur Deletion der *EBNA-1*- und *OriP*-Sequenzen aus dem Plasmid pRep5 wurde der Vektor zuerst einem *Cla*I-Restriktionsverdau unterzogen. Nach vollständigem Verdau erfolgte eine Hitze-Inaktivierung des Enzyms. Daran schloss sich ein *BspLU11*I-Restriktionsverdau an. Das 5,8 kb lange Fragment, welches den erwünschten Vektorrest darstellt, wurde isoliert und re-ligiert. Aus dieser genomisch integrierenden Version des Vektors pRep5 wurde die Expressionskassette durch einen *Sal*I-Verdau herausgeschnitten. Aus dem Vektor pGrec wurde ebenfalls mit *Sal*I die HR-Kassette entfernt. Das Vektorrückgrat des pRep5-*integrating* Plasmids und die HR-Kassette des pGrec-Vektors wurden isoliert und aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Klonierung der HR-Kassette in das pRep5-Fragment. Die singuläre Insertion der HR-Kassette wurde mit Hilfe mehrerer Restriktionsverdaus überprüft.

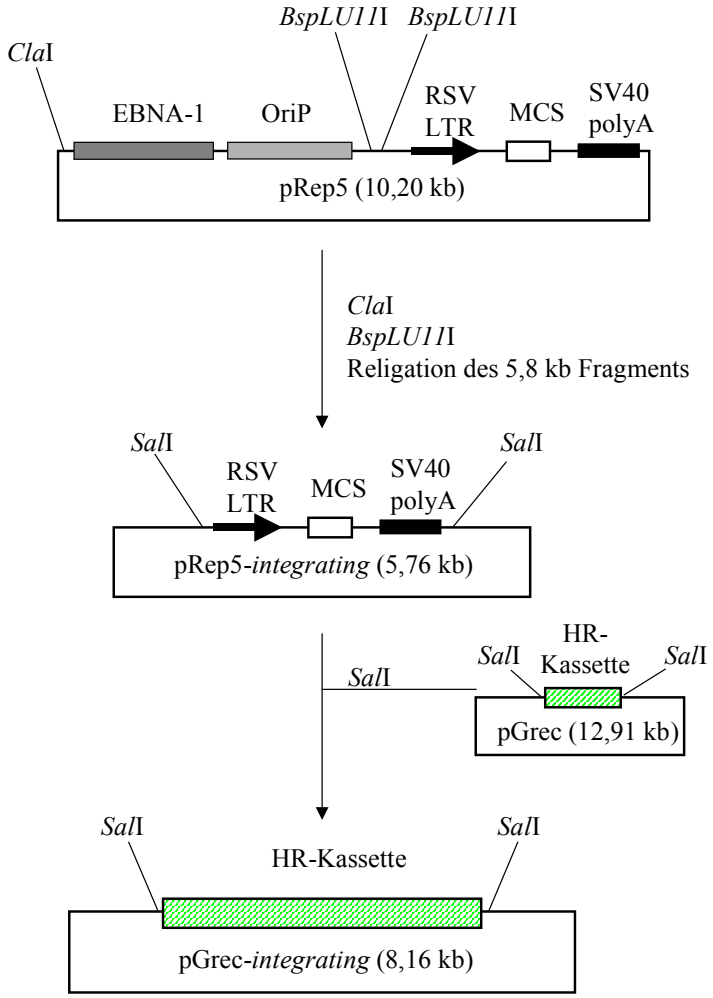


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Klonierung des genomisch integrierenden pGrec-Vektors:

Zur Klonierung des genomisch integrierenden Plasmids mussten zuerst die *EBNA-1*- und *OriP*-Sequenzabschnitte des ursprünglichen Plasmids pRep5 deletiert werden. Anschließend wurde die Expressionskassette des pRep5-Vektors durch die HR-Kassette des pGrec-Plasmids ersetzt.

4.1.2 Charakterisierung des pGrec Vektorsystems

4.1.2.1 Nachweis der funktionellen Inaktivierung der mutierten *GFP*-Allele

Zunächst musste überprüft werden, ob die eingeführten Mutationen der *GFPΔ*- und *GFP-FS*-Allele tatsächlich die spezifische Fluoreszenz des GFP-Proteins unterbinden. Dazu wurden AT5BIVA (Klon 5L7)-Zellen (siehe Kapitel 2.6.2) mit den entsprechenden episomalen *GFP*-Expressionsvektoren (mutierte Allele) und dem pGrec-Vektor stabil transfiziert. Als positive

Kontrolle wurde der Vektor pRep5-*GFP* verwendet. Nach der Selektion der Zellen auf stabile Plasmidaufnahme und Etablierung von je drei Einzelklonen wurden diese zunächst fluoreszenzmikroskopisch auf GFP-Expression überprüft.

Weder bei der Expression des *GFP-FS*-Allels, noch bei der Expression des *GFPΔ*-Allels ließ sich mikroskopisch GFP-spezifische Fluoreszenz in den Zellen der jeweiligen 3 Einzelklone feststellen. Auch bei der Expression beider Allele im Kontext der HR-Kassette von pGrec war visuell keine GFP-spezifische Fluoreszenz detektierbar. Im Gegensatz dazu zeigten die pRep5-*GFP*-transfizierten Zellen deutliche Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt).

Zur Erhöhung der Detektionsempfindlichkeit wurden die Zellen einzelner Klone zusätzlich einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Es zeigte sich hierbei, dass *GFPΔ*- (Abbildung 14, A) und *GFP-FS*- (Abbildung 14, B) transfizierte Zellen nicht unterscheidbar waren von der Gesamtpopulation pGrec-transfizierter Zellen (Abbildung 14, C). Die detektierte Fluoreszenz dieser Populationen ist auf Autofluoreszenz der Zellen zurückzuführen. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine eindeutige Rechtsverschiebung der Fluoreszenzintensität in den konstitutiv GFP-exprimierenden Zellen (Abbildung 14, D), die in der Überlagerung der verschiedenen Histogramme deutlich wird (Abbildung 14, E).

Insgesamt zeigte sich, dass die funktionelle Inaktivierung der *GFP*-Allele durch die eingeführten Mutationen erfolgreich war, da ihre Expression keine zelluläre GFP-Fluoreszenz erlaubt.

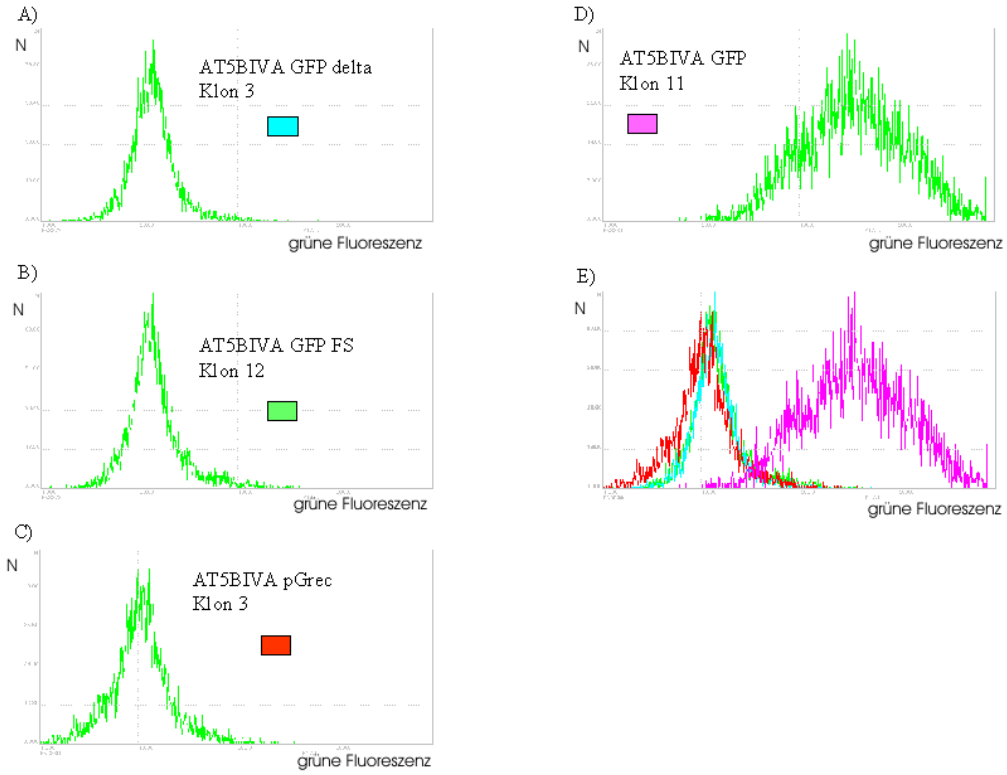


Abbildung 14: Durchflusszytometer-Histogramme

Durchflusszytometer-Histogramme von Einzelklonen der Zelllinie AT5BIVA, transfiziert mit den Vektoren pRep5-*GFPΔ* (A), pRep5-*GFP-FS* (B), pGrec (C) und pRep5-*GFP* (D). Panel E zeigt alle vier Histogramme übereinandergelegt. Die Farben der Kurven in (E) entsprechen den in den einzelnen Histogrammen angegebenen Farben. In der Ordinate ist die Zellzahl dargestellt, die Abszisse zeigt das grüne Fluoreszenzsignal. Die GFP-negativen Klone (Abb. A, B und C) weisen alle drei ein identisches Histogramm auf. Bei GFP-Expression (Abb. D) wird die Population in Folge der GFP-Fluoreszenz deutlich nach rechts verschoben.

4.1.2.2 Funktioneller Nachweis der HR-Kassette

4.1.2.2.1 Mikroskopische Detektion rekombinanter GFP$^+$-Zellen eines pGrec-transfizierten Einzelklons

Um zu zeigen, dass aus den zwei inaktivierten *GFP*-Allelen der HR-Kassette ein funktionelles *GFPwt*-Allel rekonstituiert werden kann, wurden stabil pGrec-transfizierte Zellen zunächst visuell untersucht. Dazu wurden in einem Fluktuationsexperiment (analog zu Meyn (Meyn,

1993)), etwa 250 Einzelzellen des stabil mit pGrec-transfizierten Klons AT5BIVA-pGrec3 ausplattiert und anfangs als Kolonien expandiert. Nach ca. vierwöchiger Kultivierung und Expansion erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der konfluent gewachsenen Zellen. Dabei konnten auf vier P145-Zellkulturschalen in etwa 3 x 10^7 Zellen nur sechs Zellen bzw. Zellareale mit GFP-Fluoreszenz detektiert werden. Abbildung 15 zeigt ein solches Areal (A und B), und eine einzelne Zelle (C und D). Die Frage, ob es sich in Abbildung A um mehrere unabhängige Ereignisse handelt, die zu fluoreszierenden Zellen führten, oder um die klonale Expansion einer einzelnen GFP^+-Zelle, ist nicht geklärt.

In Kontrollexperimenten mit *GFP-FS*- und *GFPΔ*-transfizierten AT5BIVA-Zellpopulationen konnten unter 2,5 x 10^7 Zellen keine GFP^+-Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt), was ein starkes Argument dafür ist, dass die GFP-Fluoreszenz nicht durch Mutation eines der beiden Allele entstanden sein kann. Daraus folgt, dass die GFP-Fluoreszenz der pGrec-transfizierten Populationen durch homologe Rekombinationsereignisse zwischen den mutierten Allelen des pGrec-Vektors entstanden sind.

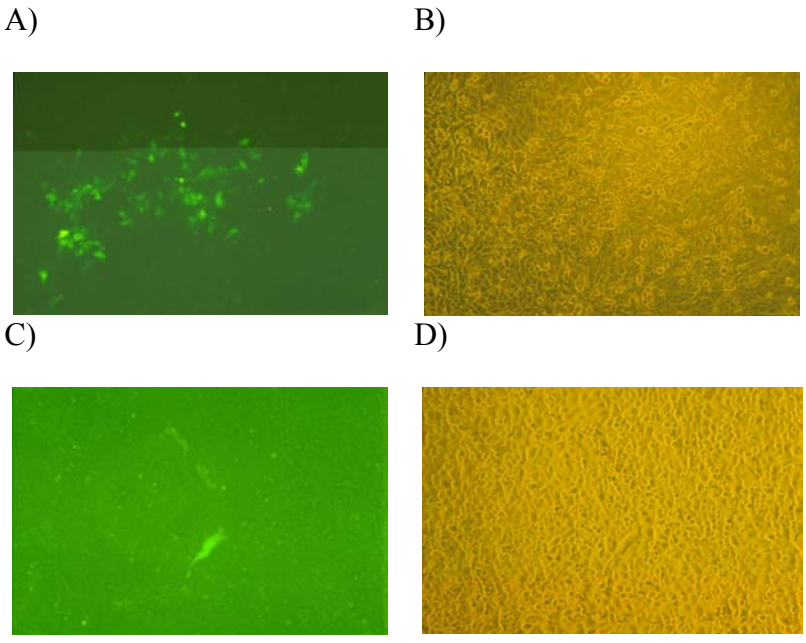


Abbildung 15: Rekombinante Zellen

Mikroskopische Durchlichtaufnahmen (B und D) humaner Fibroblasten. Die Zellen sind stabil mit dem episomalen Rekombinationsvektor pGrec transfiziert. Abbildungen A und C zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des gleichen Ausschnitts wie in B bzw. D. Die grüne Fluoreszenz entsteht durch die Expression eines intakten GFPs, welches nur durch ein Rekombinationsereignis entstehen kann.

4.1.2.2.2 Detektion und Isolation rekombinanter Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers

Als alternative Methode, um rekombinante Zellen in einer stabil mit dem Plasmid pGrec-transfizierten Population zu detektieren und gleichzeitig aus der GFP-negativen Zellen zu isolieren, wurde die durchflußzytometrische Analyse optimiert:

Bei typischen Durchflusszytometer-Anwendungen misst das Gerät die Fluoreszenzstärke einer bestimmten Farbe in einem relativ großen Wellenlängenbereich, z. B. für Grün von Dunkelgrün (λ=490 nm) bis Hellgrün (λ=550 nm), also in einem großen Bereich, in dem das Emissionsmaximum des GFPs (λ= 509 nm ± 10 nm) nur einen sehr kleinen Teil einnimmt (ca. 20 nm). Außerdem besitzen alle Zellen eine unterschiedlich starke, unspezifische Autofluoreszenz. Um den kleinen Anteil der GFP-spezifischen Fluoreszenz von der unspezifischen zellulären Autofluoreszenz zu differenzieren, wurde die Fluoreszenz eines zweiten Farbereichs (rot, λ=650 nm – 720 nm) als weiterer Parameter gemessen und gegen die Stärke des grünen Fluoreszenzsignals aufgetragen. Zellen, die eine starke Autofluoreszenz aufweisen, zeigen ein starkes Signal im roten und grünen Farbbereich. Bei GFP-exprimierenden Zellen nimmt die Emission im grünen Bereich stärker zu als im roten. Dadurch werden die Fluoreszenzsignale GFP-exprimierender Zellen aus der Streuung der stark autofluoreszierenden, und daher falsch-positiven Zellen graphisch abgehoben.

Zur Detektion und Isolierung rekombinanter Zellen wurde mit Zellen des Einzelklons AT5BIVA-pGrec3 ein Fluktuations-Experiment durchgeführt. Nach der Kultivierungsphase wurden die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst und mit Hilfe des Durchflusszytometers auf GFP-spezifische Fluoreszenz untersucht. In der durchflusszytometrischen Analyse wiesen nur ein äußerst geringer Anteil (150 - 200 Zellen) der 7 x 10^6 Zellen eine GFP-spezifische Fluoreszenz auf. Diese wenigen GFP^+-Zellen wurden während der durchflusszytometrischen Analyse aus der großen GFP-negativen Zellpopulation auf Mikrotiterplatten sortiert. 20 der so isolierten Zellen wurden klonal expandiert und als Subklone etabliert. Davon zeigten 17 Klone bei fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle eindeutig die charakteristische Fluoreszenz des GFPs und behielten sie stabil über längeren Zeitraum. Manche dieser Klone wurden außerdem für weitere molekulare Analysen verwendet.

Das Experiment bestätigt also, dass sehr selten auftretende GFP-positive Zellen des pGrec-transfizierten AT5BIVA-Einzelklons mit Hilfe des Durchflusszytometers erkannt und sortiert

werden können. Die klonale Expansion der sortierten Einzelzellen bestätigte den GFP^+-Status dieser Zellen.

4.1.2.3 Nachweis von HR auf molekularer Ebene in durchflusszytometrisch isolierten GFP^+- Subklonen

4.1.2.3.1 Biochemischer Nachweis

Um zu zeigen, dass die im Durchflusszytometer gemessene Fluoreszenz sowie die Fluoreszenz-abhängige Sortierung von Einzelzellen tatsächlich auf spezifischer GFP-Expression beruht, wurde biochemisch das GFP-Protein in durchflusszytometrisch isolierten Subklonen nachgewiesen.

Dazu wurde von den entsprechenden Klonen und Kontrollen ein Gesamtzell-Proteinextrakt hergestellt. Die Proteinextrakte wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt, anschließend durch die *Western-Blot*-Technik auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und dort einer Immunodetektion unterzogen. Das GFP-Protein wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen anti-GFP-Antikörpers (Clonetech) und Chemolumineszenz detektiert (siehe Abb. 16)

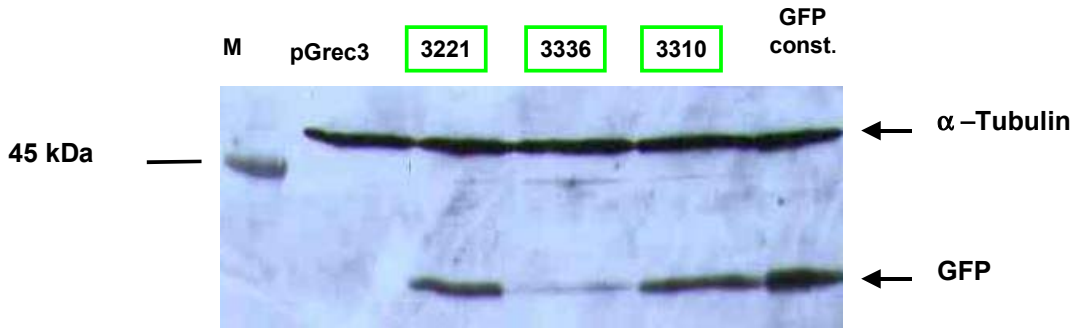


Abbildung 16: *Western Blot* von Gesamtzell-Extrakten aus transfizierten A-T-Zellen

Gesamtzell-Proteinextrakte eines pGrec-transfizierten Einzelklons (pGrec3), sowie von Subklonen dieses Einzelklons, die aus durchflusszytometrisch isolierten, mutmaßlichen GFP^+-Einzelzellen der pGrec3-Population nach Rekombination entstanden waren (3221, 3336 und 3310), wurden in *Western-Blots* analysiert. Als positive Kontrolle (GFP const.) wurde der Extrakt eines konstitutiv GFP-exprimierenden Einzelklons (transfiziert mit pRep5-*GFP*) verwendet. Die Immunodetektion mit einem spezifischen anti-GFP-Antikörper zeigt, dass der parentale Ausgangsklon pGrec3 kein detektierbares GFP exprimiert, wohingegen die mutmaßlich rekombinanten

Subklone GFP-Protein in unterschiedlicher Menge enthalten. Als interner Standard für die aufgetragenen Proteinmengen wurde nachträglich α-Tubulin detektiert. M: Molekulargewichtsmarker.

In der Positiv-Kontrolle ist nach Inkubation mit dem GFP-Antikörper eine einzelne Bande mit der Größe von etwa 29 kDa zu sehen, die aufgrund der Größe des GFP-Proteins (240 Aminosäuren) und der Angaben des Antikörper-Herstellers spezifisch für GFP ist. Die mit Hilfe des Durchflusszytometers isolierten, rekombinanten Subklone (3221, 3336 und 3310) zeigen bei der Immunodetektion mit dem anti-GFP-Antikörper eine entsprechende Bande, deren Intensität aber zwischen den Klonen variiert. Der ursprüngliche Einzelklon, AT5BIVA-pGrec3, aus dem die rekombinanten Zellen isoliert worden waren, zeigt bei der Immunodetektion des GFP kein Signal. Die Kontroll-Immunodetektion mit einem anti-α-Tubulin Antikörper ergibt bei allen aufgetragenen Extrakten ein Signal (57 kDa) mit ähnlicher Intensität und bestätigt somit, dass annähernd gleiche Proteinmengen aufgetragen und transferiert worden waren.

Das Ergebnis zeigt somit, dass die durchflusszytometrisch isolierten Subklone tatsächlich GFP exprimieren und somit aufgrund ihrer spezifischen GFP-Fluoreszenz (und nicht z.B. durch unspezifische Autofluoreszenz) als echte GFP-positive Subklone sortiert worden waren, wenngleich die Menge an GFP und die Intensität der GFP-Fluoreszenz in unterschiedlichen Subklonen variiert. In Kombination mit den Befunden, dass in den Negativkontrollen der Rekombinationsanalysen (siehe Punkt 4.1.3.1.1) keine GFP-positiven Zellen aus den GFP-FS- und GFP-delta-transfizierten AT-Populationen detektiert wurden, kann geschlossen werden, dass die hier nachgewiesene GFP-Expression durch homologe Rekombinations-ereignisse in pGrec entstanden sein muss.

4.1.2.3.2 Nachweis der homologen Rekombination auf DNA-Ebene mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Durch die Einführung des Leseraster-verschiebenden Oligonukleotids in die Gensequenz des *GFPwt*-Allels wurde die *Bst1107*I-Restriktionsschnittstelle bei bp 452 der Wildtyp-Sequenz zerstört und statt dessen eine neue *Bgl*II-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Diese Tatsache wurde für eine Unterscheidung zwischen Wildtyp-*GFP*-Allelen und mutierten *GFP*-Allelen in PCR-Analysen ausgenutzt: Zunächst wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass nur *GFP*-Allele, die keine 5´-Deletion enthalten (*GFPwt*, 720 bp oder *GFP-FS*, 733bp), amplifiziert

werden (siehe grüne Pfeile in Abbildung 17). Aus so entstandenen PCR-Produkten können durch einen anschließenden Restriktionsverdau mit *Bgl*II bzw. *Bst1107*I die Allele voneinander unterschieden werden.

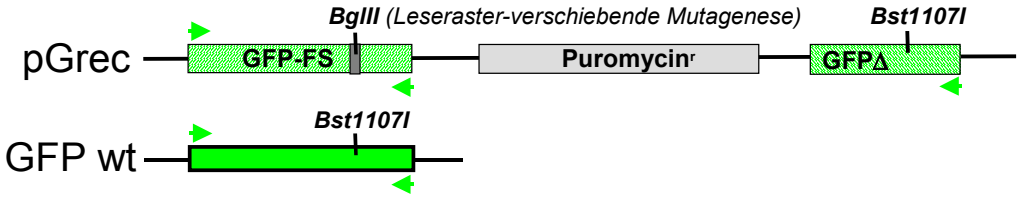


Abbildung 17: Darstellung der Allel-spezifischen Restriktionsschnittstellen und PCR-primer in den verschiedenen *GFP*-Allelen

Schematische Darstellung der Anordnung der *Bst1107*I- und *Bgl*II-Restriktionsschnittstellen auf den drei *GFP*-Allelen *GFP-FS*, *GFPΔ* (beide enthalten in pGrec) und *GFPwt*, sowie die Anlagerungsstellen für die in der PCR verwendeten Oligonukleotide *GFP-in* und *GFP-reverse* (grüne Pfeile). In einer PCR wird nur ein vollständiges *GFP*-Allel (*GFP-FS* oder *GFPwt*) amplifiziert, da dem *GFPΔ*-Allel die 5´-Sequenz für die Anlagerung des Oligonukleotids *GFP-in* fehlt. Durch das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Restriktionsschnittstellen an der fast gleichen Position können die PCR-Produkte durch einen Restriktionsverdau mit *Bst1107*I bzw. mit *Bgl*II eindeutig einem Allel zu geordnet werden (RFLP).

Zum Nachweis der HR auf DNA-Ebene wurden von dem ursprünglichen Einzelklon AT5BIVA-pGrec3 sowie von dem daraus isolierten Subklon AT5BIVA-pGrec3221 und einem mit dem Plasmid pRep5-*GFP*-transfizierten Einzelklon (konstitutive GFP-Expression) eine genomische DNA-Präparation durchgeführt, mit der die episomalen Plasmide ebenfalls erhalten wurden. Die isolierte DNA wurde als Matrize für eine PCR mit den Oligonukleotiden *GFP-in* und *GFP-reverse* eingesetzt. Die erhaltenen Fragmente wurden isoliert und einem Restriktionsverdau mit *Bst1107*I bzw. *Bgl*II unterzogen. Die Verdaus wurden anschließend auf einem Agarosegel analysiert (Abbildung 18).

Das PCR-Produkt des *GFPwt*-Allels wurde, wie erwartet, nur durch das Enzym *Bst1107*I in zwei Fragmente mit den Längen 452 bp und 268 bp gespalten, bei der Verwendung von *Bgl*II blieb das PCR-Produkt in seiner ursprünglichen Länge (720 bp) erhalten (Spuren 2 und 3). Für das PCR-Produkt, aus der DNA des GFP-negativen Ausgangsklons AT5BIVA-pGrec3 amplifiziert wurde, ergibt sich wie erwartet ein umgekehrtes Muster nach den Restriktionsverdaus. Das Enzym *Bgl*II kann das DNA-Fragment in zwei Fragmente spalten, *Bst1107*I hingegen nicht. Somit konnten die Positiv- und die Negativ-Kontrollen

experimentell bestätigt werden. Wird jedoch die DNA des rekombinanten Klons AT5BIVA-pGrec3221 als Matrize für die PCR eingesetzt und das isolierte Produkt den Restriktionsverdaus unterzogen, so zeigt sich, dass beide Enzyme in der Lage sind, einen Anteil der PCR-Produkte zu schneiden. Das PCR-Produkt liegt also in einer Mischung vor, bestehend aus dem *GFP-FS*-Allel und dem *GFPwt*-Allel. Das *GFP-FS*-Allel stammt offensichtlich aus episomalen pGrec-Plasmiden, die in diesem Subklon unverändert vorliegen. Das *GFPwt*-Allel muss aus einem oder mehreren Plasmiden des Klons entstammen, die an einem HR-Ereignis partizipiert und das *GFPwt*-Allel rekonstituiert haben. Die RFLP-Analysen zeigen also eindeutig die Präsenz eines Wildtyp-*GFP*-Allels in den putativ rekombinanten Subklonen, welches nur durch Rekombination entstehen kann. In den Zellen mit diesem rekonstituierten *GFP*-Allel konnte erwartungsgemäß auch die GFP-Expression biochemisch nachgewiesen werden (siehe voriges Kapitel).

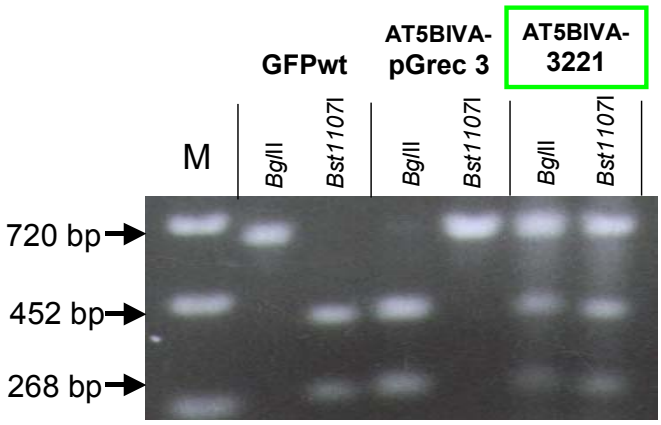


Abbildung 18: Bandenmuster restriktionsverdauter PCR-Produkte zur Identifikation der *GFP*-Allele

Das *GFPwt*-Allel wird nicht durch *Bgl*II, sonder nur durch *Bst1107*I gespalten. Hierbei entstehen zwei Fragmente (Spuren 2 und 3). Das *GFP-FS*-Allel der unveränderten HR-Kassette hingegen wird nur von *Bgl*II und nicht von *Bst1107*I gespalten (Spuren 4 und 5). Bei den mittels Furchflusszytometrie sortiertem rekombinanten Subklon AT5BIVA-pGrec3221 schneiden beide Enzyme das PCR-Produkt. (Spuren 6 und 7). Das Auftreten beider Restriktionsschnittstellen in dem PCR-Produkt erklärt sich aus der Existenz einer Mischpopulation von episomalen pGrec-Plasmiden die ein rekombinates *GFPwt*-Allel enthalten und ursprünglichen pGrec-Plasmiden die nicht an einem HR-Ereignis beteiligt waren.

4.2 Anwendung des Systems

Die in Abschnitt 4.1 gezeigten Daten zeigen, dass mit Hilfe des neu geschaffenen Rekombinationsvektors pGrec nach Transfektion in Säugerzellen seltene GFP^+-Zellen mit einer Sensitivität von 1 GFP^+-Zelle in 2,3 x 10^6 Zellen detektiert werden können, wobei die Sensitivitätsgrenze in dieser Arbeit noch nicht erreicht wurde. Anhand der mitgeführten Kontrollen und exemplarisch analysierter Einzelfälle wurde bestätigt, dass GFP^+-Zellen nach pGrec-Transfektion spezifisch durch homologe Rekombinationsereignisse entstehen.

Es existieren vier verschiedene HR-Mechanismen, die aus den inaktiven *GFP*-Allelen ein funktionelles *GFPwt*-Allel rekonstituieren können (siehe Abb. 19), und zwar bei episomalen, als auch bei chromosomal integrierten Plasmiden:

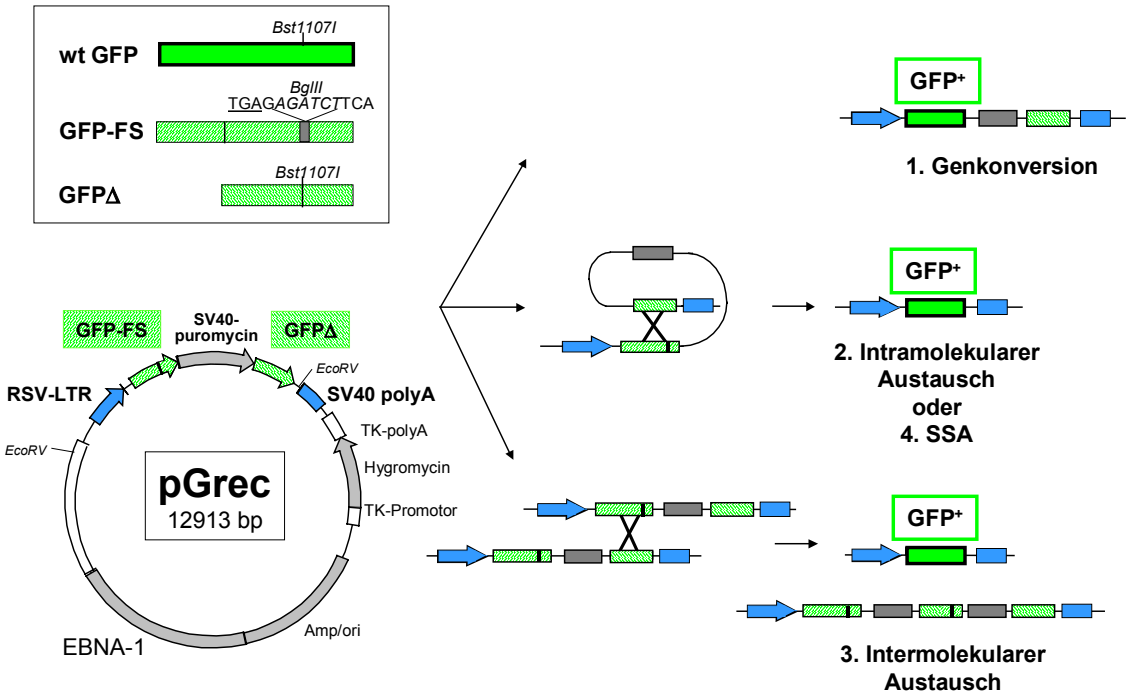


Abbildung 19: Schematisch Darstellung der Rekombinationsmechanismen des Plasmids pGrec zur Rekonstitution eines funktionellen *GFP*-Gens

Es existieren vier Möglichkeiten, ein funktionelles *GFP*-Gen zu erhalten. Die detailierte Erleuterung der Mechanismen befindet sich im Text.

- 1. Sequenzaustausch über kurze Bereiche mittels Genkonversion: Bei der Genkonversion findet ein nicht reziproker Sequenzaustausch zwischen den verschiedenen *GFP*-Allelen der beiden Schwesterchromatiden statt. Bei der Verwendung der episomalen Plasmide kann Genkonversion auch zwischen zwei Plasmiden erfolgen. Hierbei existiert ein Donorchromatid bzw. -Plasmid und ein Akzeptorchromatid bzw. Plasmid. Die ursprüngliche Länge der Rekombinationskassette, die weiterhin das *Puromycin*^{r}-Gen enthält, bleibt in GFP$^+$-Zellen erhalten.

- 2. Intramolekularer Austausch von Sequenzen: Beim Intramolekularen Austausch gelangen die beiden mutierten *GFP*-Allele eines Chromatids oder Plasmids in räumliche Nähe zueinander, so dass ein reziproker Sequenzaustausch, das heißt ein Rekombinationsereignis zwischen ihnen stattfinden kann. Hierbei kommt es zur Verkürzung der Rekombinationskassette, da das *Puromycin*-Resistenzgen und ein mutiertes *GFP*-Allel, welches die 5´-Deletion und die Leseraster-Verschiebung enthält, durch den HR-Vorgang deletiert werden.

- 3. Intermolekularer Austausch von Sequenzen zwischen zwei Plasmiden, bzw. ungleicher Schwesterchromatid Austausch (*unequal sisterchromatid exchange*, USCE): Der Intermolekulare Austausch zur Rekonstituierung des *GFPwt*-Allels kann zwischen zwei Plasmiden, oder bei chromosomaler pGrec-Integration zwischen den Schwesterchromatiden stattfinden. Im letzteren Fall wird der Vorgang als ungleicher Schwesterchromatid-Austausch (USCE) bezeichnet. In beiden Fällen ist das Produkt eine verkürzte Rekombinationskassette, analog zum Intramolekularen Austausch, die das *GFPwt*-Allel enthält. Als zweites Produkt entsteht eine verlängerte Kassette. Sie enthält zusätzlich zu der ursprünglichen HR-Kassette ein weiteres Puromycin-Resistenzgen und ein *GFPΔ-GFP-FS*-Hybrid-Allel. Wurde die HR-Kassette episomal in die Zelle eingebracht, ist es sehr wahrscheinlich, dass die verlängerte Version der HR-Kassette in der GFP$^+$-Zelle verbleibt. Bei chromosomaler Integration der Kassette wird die verkürzte Kassette in der Mitose auf eine Zelle, und die verlängerte Version auf die andere Zelle verteilt. Die GFP$^+$-Zellen werden also in diesem Fall die verkürzte Version der Kassette, ohne das Puromycin^r-Gen enthalten.

- 4. Single Strand Annealing (SSA): Bei Rekonstitution des *GFPwt*-Allels durch SSA (siehe Kapitel 1.4 SSA) kommt es zur Verkürzung der HR-Kassette auf die gleiche Länge wie bei dem intramolekularen Austausch, somit auch zum Verlust des *Puromycin*^{r}-Gens.

4.2.1 Experimentelle Ansätze zur Quantifizierung von Rekombinationsereignissen

Das pGrec System ermöglicht verschiedene experimentelle Ansätze, Daten zur homologen Rekombination in unterschiedlichen Zelllinien, in Abhängigkeit bestimmter Gene oder bezüglich spezifischer Rekombinations-Mechanismen zu analysieren (siehe Abb. 20).

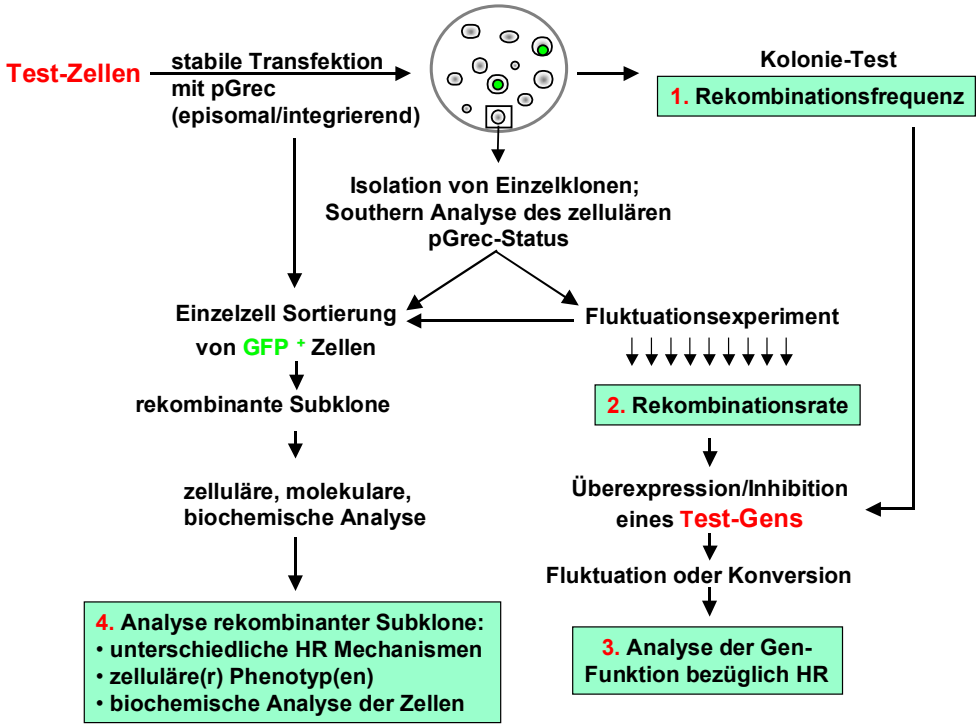


Abbildung 20: Schematische Darstellung der experimentellen Ansätze, die das pGrec-Vektorsystem ermöglicht.

- 1. Messung der Rekombinationsfrequenz in Kolonie-Test-Experimenten: Zur Ermittlung der Rekombinationsfrequenz (RF = Anzahl der GFP^+-rekonstituierenden Ereignisse / Gesamtzahl der analysierten Kolonien [%]) nach pGrec-Transfektion wird die transfizierte Zellpopulation zunächst auf Aufnahme des Plasmids resistenz-selektioniert. Nach abgeschlossener Selektion sind dann Kolonien herangewachsen, die jede für sich ein unabhängiges genetisches Transfektions-Ereignis darstellen. Diese Kolonien werden mittels Fluoreszenzmikroskopie auf GFP^+-Zellen untersucht. Dabei wird die Anzahl der GFP-rekonstituierenden Ereignisse (siehe Kapitel 3.2.7, S38) erfasst und mit der Gesamtzahl der analysierten Kolonien verrechnet, woraus sich die Rekombinationsfrequenz ergibt (Fritz *et al.*, 2000). Die Isolierung von GFP^+-Zellen ist hierbei nicht möglich.

Bei dem Kolonie-Test ist die Anzahl der zellulären pGrec-Kassetten in den Einzelklonen der Population unbekannt. Es wird die Gesamtheit der genetisch individuellen Transfektionsereignisse, die genetisch unterschiedlich sind betrachtet, nicht aber genetisch definierte Einzelklone. Zum Beispiel kann die Anzahl der zellulären HR-Kassetten einen Einfluss auf die HR-Frequenz haben. Daher ist es wichtig, genetisch isogene Zellpärchen, die sich nur in der Expression eines definierten Gens unterscheiden (Mutante vs. Wildtyp), unter möglichst identischen Transfektions- und Experimentalbedingungen zu vergleichen.

Alternativ, zur Isolierung von GFP-exprimierenden Zellen, wird die Population der Transfektanten-Kolonien vereinigt (*pool*), weiter expandiert und einer durchflusszytometrischen Analyse zur Detektion und rekombinanter GFP^+-Zellen unterzogen. Diese können aus der GFP-negativen Zellpopulation heraussortiert werden und als Subklone zur weiteren Analyse etabliert werden. Eine Bestimmung der RF wie oben beschrieben, ist hierbei nicht möglich. Allerdings kann hier z. B. der Rekombinationsmechanismus analysiert werden.

- 2. Messung der Rekombinationsrate in Fluktuationsexperimenten: Die Rekombinationsrate (HR an dem Lokus / Zelle / Generation, Berechnung siehe Kapitel 3.2.6, S 36) einer Zelllinie lässt sich durch Fluktuationsexperimente bestimmen. Dazu ist es nötig, pGrec-transfizierte Einzelklone zu etablieren und deren zellulären pGrec-Status durch *Southern*-Analysen zu ermitteln. Wird das episomale Plasmid verwendet, so ist es anzustreben, Einzelklone mit gleicher Kopienzahl zu untersuchen. Für die integrierte Version des Plasmids sollte möglichst eine Einzelintegration des pGrec vorhanden sein. In beiden Fällen sollten mehrere unabhängige Einzelklone untersucht werden. Von dem bezüglich der Anzahl der integrierten pGrec-Kassetten genetisch charakterisierten Einzelklon werden wenige Zellen ausplattiert, so dass ca. 100 Kolonien heranwachsen. Diese werden dann vereinigt und weiter expandiert, bis die gewünschte Zellzahl erreicht ist, und anschließend einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Aus der Gesamtzahl der Zellen und der Anzahl der GFP^+-Zellen lässt sich die Rekombinationsrate nach Luria & Delbrück (Luria und Delbrück, 1943) aus Fluktuationstabellen von Capizzi und Jameson (Capizzi und Jameson, 1973) berechnen. Bei der Ermittlung der Rekombinationsrate lassen sich mit Hilfe des Durchflusszytometers die GFP^+-Zellen isolieren und als Subklone etablieren.

- 3. Funktionsanalyse bestimmter Test-Gene bezüglich HR durch Messung der Rekombinationsfrequenz oder –rate: Das pGrec-Vektorsystem ermöglicht es, die Auswirkung der Überexpression bzw. Inhibition eines durch stabile Transfektion in die Zelle eingebrachten Test-Gens auf HR zu analysieren. Dies wird durch zwei Vorteile des Systems

erleichtert: erstens durch die zwei vorhanden funktionellen Resistenzgene in pGrec. Zweitens durch die Möglichkeit der einfachen Umklonierung der HR-Kassette in einem Schritt, falls die zwei Selektionsmarker schon durch das andere transfizierte Plasmid belegt sein sollten.

- 4. Analyse rekombinanter Subklone bzgl. unterschiedlicher Rekombinations-Mechanismen, assoziierter zellulärer Phänotypen und biochemischer Parameter: Bei allen 3 genannten experimentellen Ansätzen besteht die Möglichkeit, mit Hilfe des Durchfluss-zytometers isolierte Einzelzellen als rekombinante Subklone zu etablieren. So kann z. B. molekularbiologisch der genaue Rekombinations-Mechanismus auf DNA-Ebene ermittelt werden. Biochemische Analysen können Aufschluss darüber geben, ob die rekombinanten Zellen z. B bezüglich der Expression von Rekombinationsproteinen verändert sind. Weiterhin kann in phänotypischen Analysen die Korrelation des HR-Status z. B. mit genomischer Instabilität, DNA-Reparaturkapazität, Strahlenempfindlichkeit, Telomermetabolismus und Transformation der Zellen untersucht werden.

Im weiterführenden Teil dieser Arbeit wurden zur Anwendung des pGrec-Systems 2 Zellsysteme gewählt, deren spezifische Mutationen zu vermuteten oder nachgewiesenen Defekten in der HR führen. Es wurde die Wildtyp-Zelllinie V79B des Hamsters und die davon abgeleitete isogene Zelllinie CL-V4B mit einer Mutation im *Rad51C*-Gen (Godthelp *et al.*, 2002) nach pGrec-Transfektion analysiert, sowie eine humane Zelllinie, AT-pEBS, die einen Defekt im *Atm*-Gen trägt. Da es zu dieser menschlichen Zelllinie keine isogene Wildtyp-Zelllinie gibt, wurde als Kontrolle dieselbe Linie verwendet, die jedoch durch ektopische Expression des Wildtyp-*ATM*-Gens komplementiert ist (Ziv *et al.*, 1997).

4.2.2 Ermittlung der chromosomalen Rekombinationsfrequenz in *Rad51C*-Mutanten des Hamsters durch Kolonie-Test

V79B ist eine Wildtyp-Zellinie vom Hamster, aus der die Zelllinie CL-V4B durch chemisch induzierte Mutagenese generiert wurde (Godthelp *et al.*, 2002). CL-V4B-Zellen weisen eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber Behandlung mit dem DNA-quervernetzenden Agens Mitomycin C (MMC) und eine hohe Rate spontaner Chromosomen-Aberrationen des Chromatid-Typs auf. Trotzdem zeigen die Zellen kaum erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung in Kolonie-Überlebenstests (Faktor 1,3). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression humaner *RAD51C*-cDNA in CL-V4B-Zellen sowohl die MMC-

Sensitivität als auch die spontane genomische Instabilität komplementiert. Die Expression humaner *RAD51*-, *RAD51B*- bzw. *RAD51D*-cDNA komplementierte diese Defekte nicht. Die phänotypischen Defekte und deren genetische Komplementation durch *RAD51C*–cDNA legen nahe, dass die Zelllinie CL-V4B eine Mutation im *RAD51*-paralogen Gen *RAD51C* trägt. Die *Rad51C*-Mutation konnte neuerdings in Sequenzanalysen bestätigt werden (Godthelp *et al.*, 2002). Diese Mutation führt offensichtlich zu spontanen Chromosomen-Aberrationen, deren Ursache gegebenenfalls in defekter HR begründet sein kann. Das durch *Rad51C*-Mutation möglicherweise beeinflusste Rekombinationsverhalten sollte in dieser Arbeit durch Anwendung des pGrec Systems erstmalig direkt analysiert werden. Die Rekombinationsraten und -frequenzen der parentalen V79B-Zellen und deren *Rad51C*-defekten Derivate CL-V4B sollten miteinander verglichen werden.

Zur Ermittlung der chromosomalen Rekombinationsfrequenz (CRF) wurden beide Zelllinien zunächst stabil mit pGrec transfiziert. Der *EBNA-1* Sequenzabschnitt des pGrec-Plasmids ist in Nager-Zellen wirkungslos, pGrec muss also in Nager-Zellen genomisch integrieren, um während der Replikation stabil weitervererbt zu werden. Für die genomische Integration ist die Linearisierung des als zirkuläres Plasmid transfizierten Vektors in der Zelle nötig, die jedoch nicht an bestimmten DNA-Abschnitten, sondern zufällig stattfindet. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass bei der genomischen Integration des Plasmids die HR-Kassette intakt bleibt, wurde daher der vollständige Rekombinationsvektor pGrec verwendet und nicht der um die Sequenzabschnitte OriP und EBNA-1 deletierte pGrec-*integrating*. Die entstandenen Hygromycin-resistenten Kolonien wurden bezüglich der Anwesenheit von GFP^+-Zellen mikroskopisch untersucht.

Es wird angenommen, dass HR hauptsächlich in der S-Phase des Zellzyklus effizient durchgeführt wird (Takata *et al.*, 1998; Johnson und Jasin, 2001). Da rekombinante GFP^+-Zellen weiter vital und proliferationsfähig bleiben, sollte die Wahrscheinlichkeit der Detektion von HR-Ereignissen mit der Anzahl der Generationen nach Transfektion des HR-Vektors steigen. Aus diesem Grunde wurde bei der Ermittlung der CRF die Anzahl der durchlaufenen Generationen als Parameter berücksichtigt. Die Analyse des Zellpärchens erfolgte in den jeweiligen vergleichenden Experimenten nach annähernd gleicher Anzahl der durchlaufenen Generationen. Die Ermittlung der Generationszeit durch Zellzählung logarithmisch replizierender Kulturen ergab eine Verdoppelungszeit von 11 h für die Wildtyp Zelllinie V79B und 15 h für die daraus hervorgegangene Mutante CL-V4B.

Der Vergleich der chromosomalen Rekombinationsfrequenzen in V79B- vs. CL-V4B-Zellen erfolgte in drei vergleichenden, unabhängigen Experimenten, mit gleichzeitiger Transfektion des Zellpärchens unter identischen Bedingungen.

Die Zelllinie V79B wurde in vergleichenden Experimenten, 20 - 31 Generationen nach stabiler pGrec-Aufnahme untersucht (Tabelle 1). Dabei wurden in Experiment 1 nach 20, 28 und 31 Generationen insgesamt 110 Rekombinationsereignisse in 715 untersuchten Kolonien detektiert. Das führt zu einer CRF von 15,4 %. Die Untersuchung von 212 Kolonien nach 26 Generationen (Experiment 2) ergab 55 Rekombinationsereignisse und somit eine RF von 25,9 %. Nach 22 Generationen (Experiment 3) konnten in der Wildtyp-Zelllinie in 379 Kolonien 83 HR-Ereignisse gefunden werden, woraus sich eine CRF von 21,9 % ergibt. Die mittlere CRF dieser drei Experimente beträgt 21,9 % ± 5,3 (siehe Tabelle 2).

Die *Rad51C* mutierte Zelllinie CL-V4B wurde in den vergleichenden Experimenten 24 - 34 Generationen nach stabiler pGrec-Transfektion analysiert (siehe Tabelle 1). Dabei konnten in einem Experiment (Experiment 1) mit 968 Kolonien 2 HR-Ereignisse gefunden werden, somit ergibt sich für diesen Versuch eine CRF von 0,207 %. Bei der Untersuchung der Zellen nach 32 Generationen (Experiment 2) konnten 13 Rekombinationsereignisse in 223 Kolonien detektiert werden, die zu einer CRF von 5,8 % führen. In Experiment drei wurden in 395 untersuchten Kolonien 4 HR-Ereignisse gefunden, woraus sich eine CRF von 1,012 % ergibt. Die durchschnittliche CRF der drei Experimente beträgt 3,51 % ± 3,02 (siehe Tabelle 2).

Experiment 1:

Zelllinie	Anzahl Kolonien	GFP^+ Einzel-zelle	GFP^+-Sektor [a]	GFP^+-Kolonie [b]	GFP^+-Ereignisse Gesamt	Rekombina-tions-frequenz	Genera-tionen
V79B	213	14	19	3	36	16,9 %	20
V79B	302	29	21	4	54	17,9 %	28
V79B	200	11	9	0	20	10,0 %	31
V79B Gesamt	**715**	**54**	**49**	**7**	**110**	**15,4 %**	
CL-V4B	297	0	0	0	0	≤ 0,336 %	24
CL-V4B	226	0	0	0	0	≤ 0,441 %	30
CL-V4B	158	0	2	0	2	0,885 %	32
CL-V4B	211	0	0	0	0	≤ 0,472 %	34
CL-V4B Gesamt	**968**	**0**	**2**	**0**	**2**	**0,207 %**	

Experiment 2:

Zelllinie	Anzahl Kolonien	GFP$^+$ Einzel-zelle[a]	GFP$^+$ - Sektor[a]	GFP$^+$-Kolonie[b]	GFP$^+$-Ereignisse Gesamt	Rekombina-tions-frequenz	Genera-tionen
V79B	212	24	27	4	55	25,9 %	26
CL-V4B	223	7	6	0	13	5,8 %	32

Experiment 3:

Zelllinie	Anzahl Kolonien	GFP$^+$ Einzel-zelle	GFP$^+$ - Sektor[a]	GFP$^+$-Kolonie[b]	GFP$^+$-Ereignisse Gesamt	Rekombina-tions-frequenz	Genera-tionen
V79B	379	42	40	1	83	21,9 %	22
CL-V4B	395	4	0	0	0	1,012 %	22

Tabelle 1: Die in drei unabhängigen Experimenten erhaltenen Daten zum Vergleich der chromosomalen Rekombinationsfrequenzen der isogenen Zelllinien V79B und CL-V4B nach pGrec Transfektion

Bei Analyse der Kolonien einer Zelllinie nach verschiedenen Generationszeiten innerhalb eines Experiments sind die Ergebnisse separat angegeben. Kleingedruckte CRF Werte geben die theoretisch maximal mögliche CRF an, für die Annahme, dass in der nächsten analysierten Kolonie 1 GFP$^+$-Ereignis detektiert worden wäre. Fettdruck kennzeichnet das Gesamtergebnis des Experiments. Zur Ermittlung des Gesamtergebnisses eines Experiments wurde die Summe der untersuchten Kolonien und die Summe der detektierten GFP$^+$-Ereignisse verwendet.
[a] ein GFP-Sektor ist definiert als Bereich einer Kolonie mit mindestens 2 GFP-exprimierenden Zellen.
[b] als GFP-Kolonie wurden Kolonien gewertet, die mind. 50 % GFP-exprimierende Zellen, verteilt über die gesamte Fläche der Kolonie, besitzen.

Die extrem geringe Anzahl an GFP$^+$-Kolonien, mit einem sehr hohem Anteil (≥ 50 %) an GFP$^+$-Zellen (insgesamt 12 GFP$^+$-Kolonien in 248 GFP$^+$-Ereignissen bei V79B; keine GFP$^+$-Kolonie in 19 GFP$^+$-Ereignissen bei CL-V4B) im Vergleich zu GFP$^+$-Einzelzellen und GFP$^+$-Sektoren verdeutlicht, dass in nur weniger als 5 % der Fälle sich das HR-Ereignis in den Ausgangszellen ereignete. Die Mehrheit der detektierten HR-Ereignisse hat tatsächlich nach der genomischen Integration der HR-Kassette stattgefunden. Für die seltenen GFP$^+$-Kolonien kann nicht endgültig bestimmt werden, ob das HR-Ereigniss in pGrec vor der Integration der HR-Kassette in das Genom stattgefunden hat, oder danach. Die in Tabelle 1 dargestellten Daten beruhen also auf CRF innerhalb des Chromosoms, die mittels pGrec in Kolonie-Test-Experimenten ermittelt werden konnten. Eine erwartete Abhängigkeit der CRF von der

Anzahl der Generationen konnte in Experiment 1 nicht eindeutig beobachtet werden, wahrscheinlich aufgrund der statistisch geringen Anzahl an HR-Ereignissen.

Die in drei unabhängigen Experimenten durchgeführte vergleichende Analyse der CRF zeigt, dass die Mutanten-Zelllinie CL-V4B im Vergleich zu der isogenen Wildtyp-Zelllinie V79B eine deutlich verringerte chromosomale Rekombinationsfrequenz aufweist (Tabelle 2). Zusätzlich zu den vergleichen Experimenten wurden für die V79B-Zelllinie zwei separate und für die CL-V4B Zelllinie vier separate Experimente ohne direkten Vergleich durchgeführt, bei denen die Transfektion nicht gleichzeitig und nicht unter identischen Bedingungen erfolgte. Die erniedrigte CRF der mutierten Zelllinie CL-V4B kann auch in den separaten Experimenten ohne direkten Vergleich des Zellpärchens gesehen werden, allerdings nicht so klar wie bei vergleichenden Analysen. So weist die V79B-Zelllinie in zwei separaten Experimenten in Generation 33 eine durchschnittlich CRF von 14,9 % (26,9 % in 628 Kolonien und 2,9 % in 512 Kolonien) auf. Die mutierte Zelllinie weist in vier separaten Experimenten mit insgesamt 808 analysierten Kolonien eine durchschnittliche CRF von 2,96 % auf (3,2 % in 94 Kolonien, 0,95 % in 105 Kolonien, 6,7 % in 403 Kolonien und 0,97 % in 206 Kolonien).

Zelllinie	Anzahl Kolonien insgesamt, vergleichende Experimente	durchschnittliche CRF aus drei vergleichenden Experimenten	Anzahl Kolonien ingesamt, separate Experimente	durchschnittliche CRF aus separaten Experimenten (Anzahl der Experimente)
V79B	1306	21,1 % ± 5,3	1140	14,9 % (2)
CL-V4B	1586	3,51 % ± 3,02	808	2,96 % (4)

Tabelle 2: Die aus drei vergleichenden Experimenten, sowie die aus separaten Experimenten ermittelte durchschnittliche chromosomale Rekombinationsfrequenz der isogenen Zelllinien V79B (Wildtyp) und CL-V4B (*Rad51C*-Mutante)

Die durchschnittliche CRF wurde aus den in den Einzelexperimenten ermittelten CRF-Werten errechnet.

Die erhobenen Daten verdeutlichen, dass die CRF-Werte innerhalb verschiedener Transfektions- und Kolonie-Test-Experimente einer großen Streuung unterliegen können, so dass das zu vergleichende Zellpärchen idealerweise parallel transfiziert und analysiert werden sollte (siehe Abbildung 21 B, separate Experimente).

Die Bewertung aller Kolonie-Test-Experimente aus vergleichenden und separaten Ansätzen, sei es in Abhängigkeit von der Generationszeit, oder nicht (Abbildung 21), unterstreicht die

deutlich verringerte chromosomale Rekombinationsfrequenz der CL-V4B-Zellen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Zellen V79B. Dieser *hypo*-rekombinate Phänotyp passt zu der beobachteten MMC-Sensitivität der Mutante, da HR als der wichtigste Reparaturprozess für *inter-strand-crosslinks*, das heißt DNA-Schäden durch (chemische) Quervernetzung der Stränge gilt (Übersicht bei Dronkert und Kanaar, 2001). Durch die reduzierte Kapazität der *Rad51C*-Mutante können weniger MMC-verursachte *crosslinks* aus der DNA entfernt werden, was die Überlebensfähigkeit der Mutante nach MMC-Behandlung um den Faktor 32 (Godthelp *et al.*, 2002) stark reduziert.

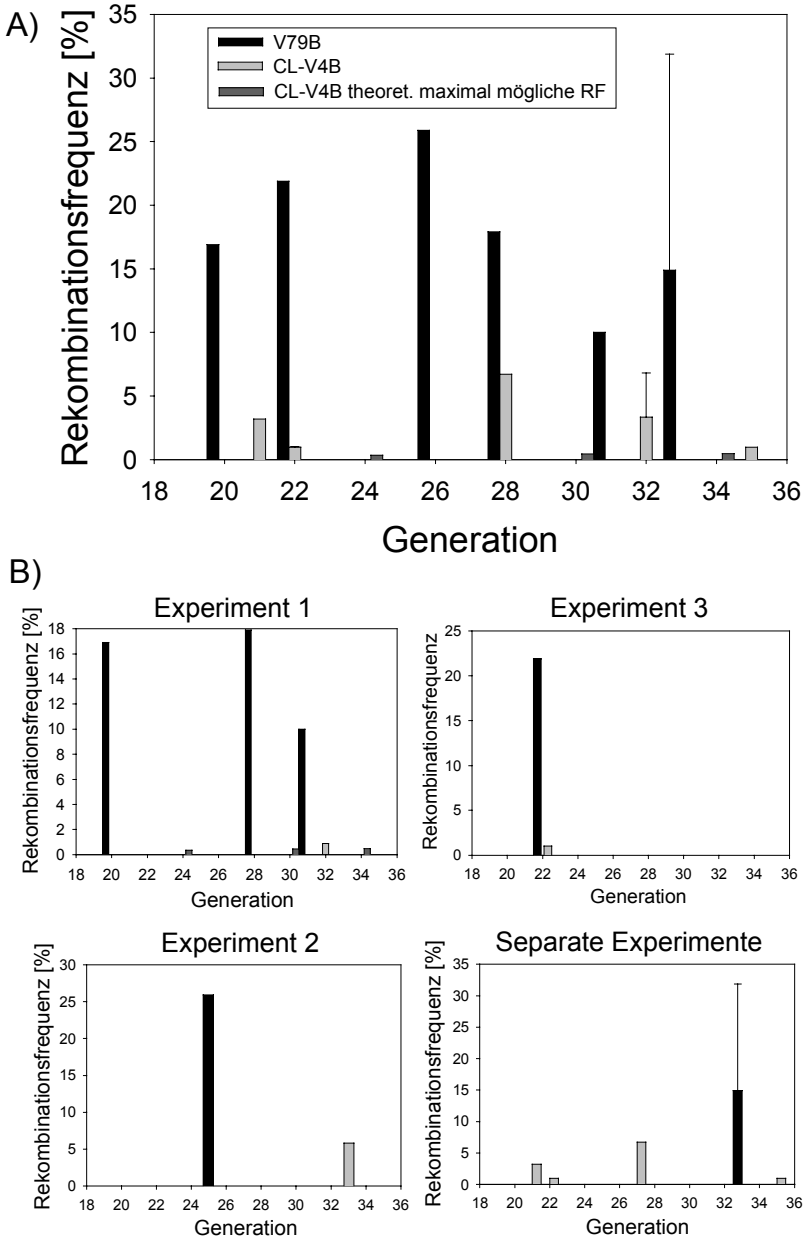


Abbildung 21: Chromosomale Rekombinationsfrequenzen des isogenen Zellpärchens V79B und CL-V4B

Die Zellen wurden mit dem Rekombinationsvektor pGrec transfiziert. Nach Selektion der Zellen auf die Aufnahme des Vektors durch Hygromycin wurden die inzwischen gewachsenen Kolonien fluoreszenzmikroskopisch auf GFP^+-Zellen untersucht. Aus der Gesamtanzahl der untersuchten Kolonien und der Anzahl der Kolonien mit detektierten GFP^+-rekonstituierenden Ereignissen (HR-Ereignissen) wurde die spontane chromosomale Rekombinationsfrequenz ermittelt. Die Rekombinationsfrequenzen der beiden Zelllinien wurden in Abhängigkeit von der Generationszeit zum Zeitpunkt der Fluoreszenzanalyse aufgetragen.
Das Diagramm unter A enthält die Daten aus separaten Transfektionen für V79B und CL-V4B, sowie aus den vergleichenden Experimenten mit paralleler Transfektion und Analyse des Zellpärchens (siehe Tabellen 1 und 2). Für CL-V4B wurde die CRF für Generation 22 und 32 und für V79B für die Generation 33 aus zwei verschiedenen Experimenten gemittelt. Für die Generationen 24, 30 und 34 wurde für die Zelllinie CL-V4B die theoretische RF angegeben. Insgesamt wurden 2446 Kolonien von der Zelllinie V79B und 2394 Kolonien von der Zelllinie CL-V4B analysiert. Die verringerte chromosomale Rekombinationsfrequenz (*hypo-rec* Phänotyp) der mutierten Hamster-Zelllinie ist deutlich zu erkennen. Unter B sind die Daten der einzelnen vergleichenden Experimente, sowie die Daten der der separaten Experimente gesondert gezeigt. Das Diagramm für die separaten Experimente (B, rechts unten) im Vergleich zu den Diagrammen der vergleichenden Experimenten (B, Experiment 1 - 3) verdeutlicht, dass die Transfektion des Zellpärchens parallel unter identischen Bedingungen durchgeführt werden müssen, da die inter-experimentellen Daten ansonsten so stark schwanken, dass keine eindeutige Aussage zu treffen ist.

4.2.3 Ermittlung der chromosomalen Rekombinationsrate in *Rad51C*-Mutanten durch Fluktuationsanalysen

Zur Ermittlung der chromosomalen Rekombinationsrate (CRR) in *Rad51C*-Mutanten wurden Fluktuationsexperimente (analog zu Meyn 1993 (Meyn, 1993) durchgeführt, in denen nach Optimierung des Durchflusszytometers und seiner Einstellungen seltene GFP^+-Zellen detektiert wurden. Es wurden dazu stabil pGrec-transfizierte Einzelklone der Zelllinien V79B und CL-V4B verwendet, die bezüglich der intakten genomisch integrierten HR-Kassetten durch *Southern*-Analysen zuvor charakterisiert wurden.

4.2.3.1 Optimierung der Auflösungsgrenze des Durchflusszytometers für seltene GFP^+-Ereignisse innerhalb einer großen GFP-negativen Zellpopulation

Das Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers beruht auf der Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen in einzelnen Zellen durch einen Laserstrahl, den die Zellen in einem Wasserstrahl passieren (Abbildung 22). Durch das fokussierte Licht werden die Zellen bzw. die in ihnen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission von Licht mit einer größeren Wellenlänge als der des Lasers angeregt. Zusätzlich zu dieser Fluoreszenz streut die Zelle das Licht des Lasers in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Zellstruktur und der Zellgröße. Es entsteht also „Streulicht“ mit derselben Wellenlänge wie das zur Anregung verwendete Licht. Zur getrennten Erfassung der Intensitäten der Fluoreszenz und des Streulichtes sind in geeigneter

Anordnung Detektoren angebracht, die die erfassten Lichtsignale in elektrische Impulse umwandeln. Die Impulse werden an einen Computer weitergeleitet, der die Daten speichert und die graphische Darstellung der gemessenen Parameter ermöglicht.

Das Streulicht der Zelle wird von zwei Detektoren erfasst. Ein Detektor in Richtung des Laserstrahls (sog. *forward scatter*) misst das Kleinwinkelstreulicht. Um zu verhindern, dass das direkte Laserlicht auf den Detektor trifft, wird der Laserstrahl vor dem Detektor durch das *obstruation-bar* abgeblockt und das Kleinwinkle-Streulicht nach dem *obstruation-bar* durch eine Linse auf den Detektor gebündelt. Der sog. *side scatter* misst das Streulicht in einem Winkel von 90° relativ zum Laserstrahl. Aus den beiden gegeneinander aufgetragenen Streulicht-Parametern (*forward scatter* vs. *side scatter*) jeder Zelle ergibt sich für Zellpopulationen eine wolkenförmige Darstellung mit konstanter Position im Koordinatensystem. Partikel oder Zellen, die eine andere Größe oder Struktur besitzen, liegen außerhalb der Hauptpopulation. Die emittierten Fluoreszenzen werden ebenfalls in 90°-Richtung zum Laserstrahl gemessen. Durch ausgewählte optische Filter kann der Wellenlängenbereich, den ein Detektor misst, eingeschränkt werden.

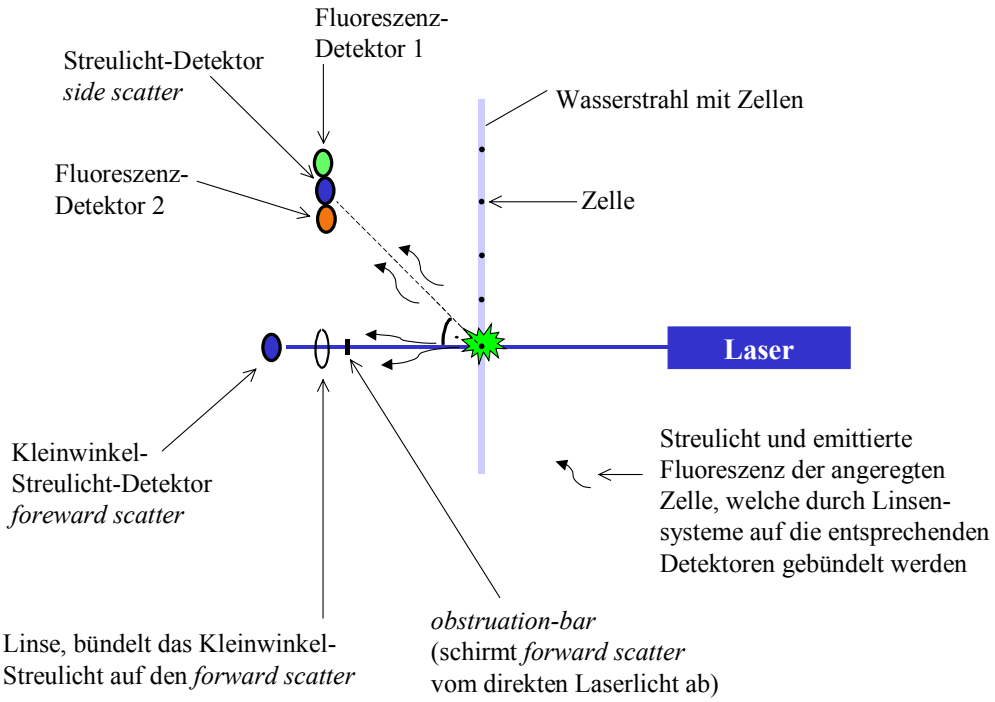


Abbildung 22: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines Durchflusszytometers

Zur Zell-Analyse in einem Durchflusszytometer kreuzen die im Wasserstrahl enthaltenen Zellen einen Laserstrahl. Durch die Zelle wird das Licht des Lasers gestreut und durch Linsensysteme (zur Vereinfachung ist dies

nur für das Kleinwinkel-Streulicht dargestellt) auf die Streulicht-Detektoren (*forward scatter* und *side scatter*) geleitet. Der Laser wiederum regt in der Zelle gebundene Fluoreszenzfarbstoffe zu Fluoreszenz an und das emittierte Licht wird durch weitere Linsensysteme (nicht dargestellt) auf die Fluoreszenz-Detektoren geleitet. Die Detektoren können durch vorgeschaltete optische Filter an Licht bestimmter Wellenlängenbereiche angepasst werden (hier durch die Farbgebung der Detektoren dargestellt). Die Intensität des Lichts wird in elektrische Impulse umgewandelt, die wiederum mit Hilfe eines Computers die graphische Darstellung der Signale einer Zelle erlauben.

Im Laufe dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass es für die Detektion einer konstitutiv GFP-exprimierenden Zellpopulation ausreichend ist, nur einen Fluoreszenzdetektor im Wellenlängenbereich der grünen Fluoreszenz zu verwenden, da sich der Mittelwert der Fluoreszenzintensität dieser Population im Vergleich zu einer GFP-negativen Population signifikant verschiebt (siehe Abbildung 14, S 60). Sollen allerdings einzelne GFP^+-Zellen in einer sehr großen GFP-negativen Population (10^6 - 10^7 Zellen) detektiert werden, gehen diese, auch wenn die optimale Exitationswellenlänge des angewandten GFP (λ = 476 nm) verwendet wird, im „Rauschen“ der unspezifischen Fluoreszenz (Autofluoreszenz) der vielen Zellen verloren. Erschwerend kommt noch hinzu, dass die routinemäßig verwendeten Einstellpartikel für das Durchflusszytometer starke Fluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich aufweisen und das Gerät regelrecht damit „kontaminiert“ ist. Da sie deutlich kleiner sind als die verwendeten Zellen, können sie in der Regel durch die Streulicht-Parameter erkannt werden. Zur Detektion der GFP-exprimierenden Zellen unter den durch starke Autofluoreszenz und partikelbehafteten falsch-positiven Zellen, sowie von Einstellpartikeln, musste also zuerst die Auflösungsgrenze des verwendeten Durchflusszytometers (hier ein FACStar plus von Becton Dickinson) gesteigert werden.

Da das Emissionsmaximum des zu messenden GFP bei λ = 509 nm liegt, wurde zunächst der Fluoreszenz-Detektor mit einem 510 nm Bandpass-Filter versehen. Der verwendete Bandpass-Filter besitzt eine Bandbreite von 10 nm mit einer gewissen Flankensteilheit, lässt also fast nur Licht der Wellenlänge 505 nm bis 515 nm passieren. Selbst in diesem geringen Wellenlängenbereich war die Trennung der unspezifischen Fluoreszenz von seltenen GFP^+-Zellen nicht befriedigend (Daten nicht gezeigt). Dafür existieren zwei Gründe. Erstens liegt bei dem zu messenden GFP das Exitationsmaximum (λ = 476 nm) sehr nahe am Emissionsmaximum. Dadurch kann sich das durch die Zellen verursachte Streulicht störend auf den Fluoreszenz-Detektor auswirken. Zweitens kann einer einzelnen gemessenen Fluoreszenz kein „Farbton“ zugeordnet werden. Dadurch kann unspezifische Fluoreszenz nicht eindeutig von der GFP-Fluoreszenz unterschieden werden, da z. B. intensive gelbe Fluoreszenz

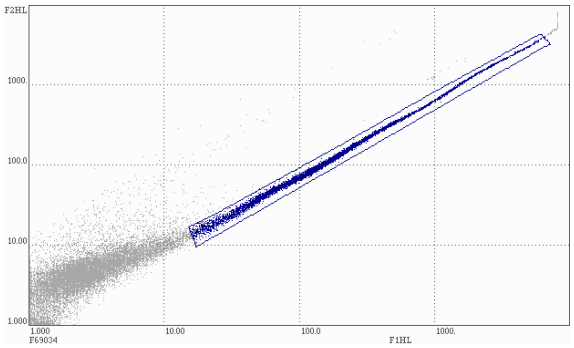
(λ = 50 nm – 610 nm) auch noch starke Lichtanteile mit der Wellenlänge λ = 504 – 514 nm (den Bereich, den der verwendete Band-Pass Filter nicht extinktiert) enthalten kann. Die Zuordnung eines „Farbtons“ wird erst bei der Messung der Fluoreszenzintensität in einem weiteren Wellenlängenbereich mit einem zweiten Fluoreszenz-Detektor und der graphischen Darstellung der Intensitäten gegeneinander möglich (hier grüne Fluoreszenz vs. rote Fluoreszenz). Als zweiter gemessener Wellenlängenbereich wurde daher orange bis rot (λ > 560 nm) gewählt. Erst durch die Kombination der zwei detektierten Fluoreszenz-Wellenlängenbereiche (Tabelle 3) wurde eine verlässliche Trennung der GFP-exprimierenden Zellen von Zellen mit unspezifischer Autofluoreszenz erreicht, da bei GFP-spezifischer Fluoreszenz die Intensität der grünen Fluoreszenz deutlich stärker zunimmt als die der roten. Für unspezifische Fluoreszenz verhält es sich genau umgekehrt, die Intensität nimmt im grünen Wellenlängenbereich weniger zu als im roten. Dadurch erscheint die GFP-negative Population graphisch deutlich abgesetzt von den wenigen GFP^+-Zellen.

Wellenlänge des zur Anregung der Zellen verwendeten Lasers	verwendeter optischer Filter für grüne Fluoreszenz	verwendeter optischer Filter für rote Fluoreszenz
λ = 476 nm	510 Band-Pass	Transmission bei λ > 560 nm

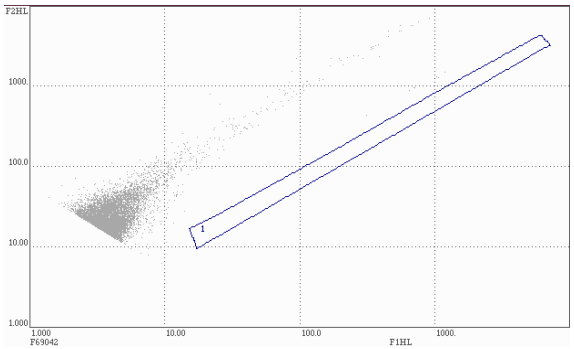
Tabelle 3: Wichtige durchflusszytometrische Parameter zur sensiblen Detektion weniger GFP-exprimierender Zellen innerhalb einer großen pGrec-transfizierten GFP-negativen Population

Mit dem so optimierten Durchflusszytometer war es möglich, eine GFP^+-Zelle in 2,3 x 10^6 GFP-negativen Zellen zu detektieren (siehe Abb. 23). Auch bei der Analyse von 10,3 x 10^6 Zellen war die Auflösungsgrenze nicht erreicht (Daten nicht gezeigt). Die Optimierung der Auflösungsgrenze der durchflusszytometrischen Analyse ist also in sehr guter Weise gelungen.

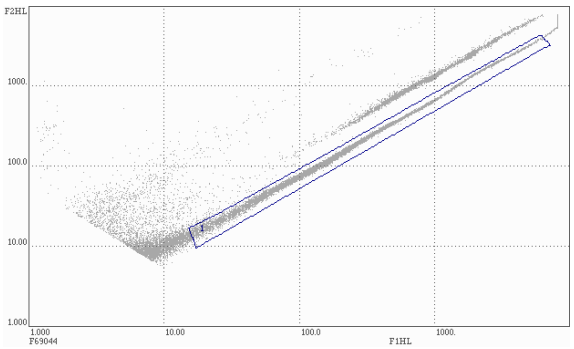
A)



B)



C)



D)

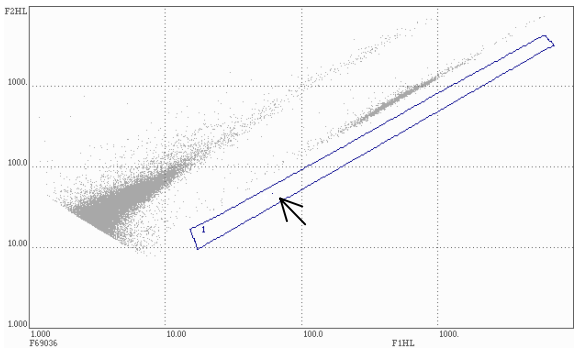


Abbildung 23: Durchflusszytometer-Histogramme bei Verwendung der optimierten Parameter

Durch die Verwendung der in Tabelle 3 dargestellten Parameter für das Durchflusszytometer wurde das Auflösungsvermögen außerordentlich verbessert. In den Histogrammen ist rote Fluoreszenz (Ordinate) gegen grüne Fluoreszenz (Abszisse) aufgetragen. Abbildung A zeigt alle Zellen eines konstitutiv GFP-exprimierenden V79B-Klons transfiziert mit dem Vektor pRep5-*GFP*. Die blau markierten Zellen innerhalb der Markierung zeigen deutliche GFP-Fluoreszenz. Die blaue Markierung, der Bereich in dem sich die GFP^+-Zellen befinden, ist in allen vier Abbildungen identisch. Abbildung B zeigt 2,3 x 10^6 Zellen eines nicht-GFP-exprimierenden V79B-Klons, transfiziert mit dem leeren Vektor pRep5. Die falsch-positiven Zellen mit hoher Autofluoreszenz sind deutlich von den GFP^+-Zellen durch einen größeren Anteil an roter Fluoreszenz getrennt. Es befindet sich keine Zelle in der blauen Markierung. Abbildung C zeigt den selben GFP-exprimierenden Klon wie Abbildung A. Die Probe wurde mit den für das Durchflusszytometer verwendeten Einstellpartikeln versetzt. Diese falsch positiven Signale befinden sich deutlich abgesetzt oberhalb der GFP-exprimierenden Zellen. Abbildung D zeigt einen Ausschnitt von 2,3 x 10^6 Zellen des Klons V79B-Grec1. Im Fenster der GFP-exprimierenden Zellen befindet sich eine GFP^+-Zelle (Pfeil). Der untere Anteil der Zellen, in dem keine GFP^+-Zellen vorhanden sein können, muss bei diesen Zellzahlen aus Datenverarbeitungstechnischen Gründen aus der Darstellung durch sog. *Gates* entfernt werden.

4.2.3.2 Chromosomaler pGrec HR-Kassetten Status der verwendeten Klone

Nach der stabilen Transfektion der Hamster-Wildtyp und *Rad51C*-mutierten Zellen mit dem pGrec-Vektor wurden Einzelzellklone isoliert. Von diesen wurde eine Präparation der genomischen DNA durchgeführt. Zur Identifikation von Klonen, die die HR-Kassette möglichst vollständig enthalten, wurde die isolierte DNA einem *EcoR*V-Restriktionsverdau unterzogen, um den Großteil der integrierten HR-Kassette aus dem Genom herauszuschneiden. Das pGrec-Plasmid enthält eine *EcoR*V-Restriktionsschnittstelle kurz vor dem Promotor und eine weitere zwischen dem *GFPΔ*-Allel und dem SV40-polyA-Schwanz. Das Restriktionsenzym *Sal*I, das die HR-Kassette in vollständiger Form aus dem Plasmid entfernt (siehe Abbildun 12, S 56), kann hier nicht verwendet werden, da es in Säugerzellen methylierte DNA-Sequenzen nicht schneidet. Die nach dem Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Die Größe der HR-Kassette wurde durch Hybridisierung mit einer *GFP*-spezifischen, radioaktiv markierten Sonde und Autoradiographie ermittelt (siehe Abbildung 24). Von jeder Zelllinie wurden jeweils drei Klone ausgewählt, deren *EcoR*V-verdaute genomische DNA ein einziges Signal in der Größe von 4 kb zeigte (Pfeile Abbildung 24). Für die Zelllinie V79B waren dies die Klone #1, #20 und #23 (in weiteren als V79B-Grec1, V79B-Grec20 und V79B-Grec23 bezeichnet). Für die Zelllinie CL-V4B wurden die Klone #6, #11 und #12 ausgewählt (im weiteren als V4B-Grec6, V4B-Grec11 und V4B-Grec12 bezeichnet).

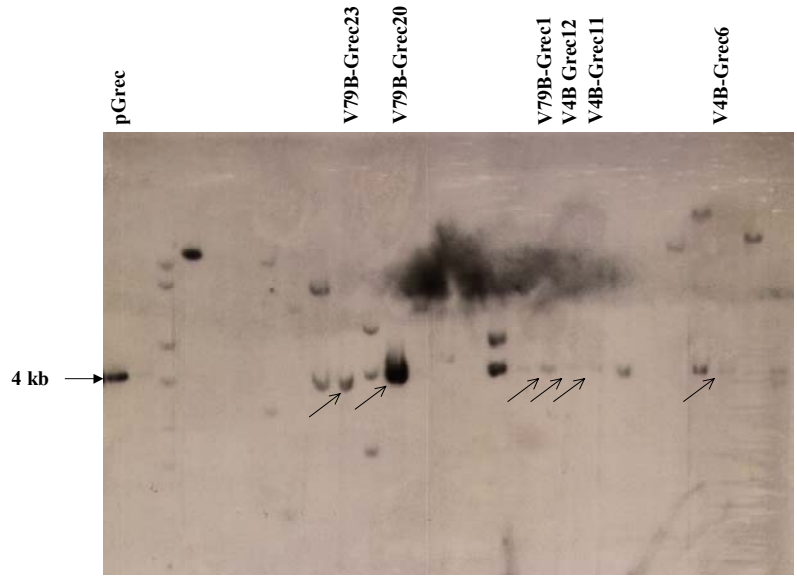


Abbildung 24: Autoradiographie des *Southern*-Blots zur Ermittlung geeigneter Kandidaten Klone mit genomisch integrierter, mutmaßlich vollständiger pGrec HR-Kassette.

Von pGrec-transfizierten Einzelklonen der Nager-Zelllinien V79B und CL-V4B wurde die genomische DNA präpariert und einem *EcoR*V-Restriktionsverdau unterzogen. Das Enzym schneidet die fast vollständige HR-Kassette aus dem Genom aus. Die verdaute DNA wurde durch Elektrophorese aufgetrennt und anschließend mit der *Southern-Blot*-Technik auf eine Nylonmembran transferiert. Die in den Klonen vorliegende HR-Kassette wurde durch Hybridisierung der DNA mit einer radioaktiv markierten *GFP*-spezifischen Sonde detektiert und ihre molekulare Größe ermittelt.
Die linke Spur zeigt das Signal des *EcoR*V-verdauten pGrec-Vektors. Nach Hybridisierung mit der *GFP*-spezifischen Sonde ist ein einzelnes Signal mit der molekularen Größe von 4 kb zu erkennen. Jeweils drei Einzelklone einer Zelllinie (V79B-Grec1, V79B-Grec20 und V79B-Grec23, sowie V4B-Grec6, V4B-Grec11 und V4B-Grec12) die ebenfalls ein einzelnes Signal in der selben Größe von 4 kb (Pfeile) aufwiesen, wurden zur Durchführung von Fluktuationsexperimenten ausgewählt.

4.2.3.3 Fluktuationsanalysen

Zur Bestimmung der chromosomalen Rekombinationsrate (CRR) der charakterisierten Einzelklone der isogenen Zelllinien V79B (V79B-Grec1, V79B-Grec20 und V79B-Grec23) und CL-V4B (V4B-Grec6, V4B-Grec11 und V4B-Grec12) wurden für jeden Klon zwei unabhängige Fluktuationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden ca. 250 Zellen der Klone ausplattiert und zu Kolonien expandiert. Nach ca. zweiwöchiger Kultivierung, während der die Zellen passagiert wurden, erfolgte die Analyse auf GFP-spezifische Fluoreszenz der Zellen mit Hilfe eines Durchflusszytometers. Zur Kontrolle wurde in den Experimenten

dieselbe Anzahl an pRep5-transfizierten Zellen der verwendeten Zelllinie untersucht und als GFP-negativ bestätigt. Aus der Anzahl der analysierten Zellen und den darin enthaltenen GFP-exprimierenden Zellen wurde die Rekombinationsrate nach Luria und Delbrück (Luria und Delbrück, 1943) mit Hilfe von Fluktuationstabellen von Capizzi und Jameson (Capizzi und Jameson, 1973) berechnet (siehe Kapitel 3.2.6, S 36). Sie bezieht sich auf die Zahl der Rekombinationsereignisse an dem Lokus / Zelle / Generation.

Dabei konnten für den Klon V79B-Grec1 in 2,6 x 10^6 Zellen 2 HR-Ereignisse gefunden werden, die zu einer errechneten CRR von 0,90 x 10^{-6} führen (Tabelle 4). Bei der Untersuchung von 2,9 x 10^6 Zellen des selben Klons wurde 1 GFP^+-Zelle detektiert, woraus sich eine CRR von 0,61 x 10^{-6} errechnen lässt. Die aus den beiden Experimenten ermittelte durchschnittliche CRR beträgt 0,75 x 10^{-6} ± 0,21 x 10^{-6}. Bei der Untersuchung des Klons V79B-Grec20 wurden nur in einem Experiment 4 GFP^+-Zellen in 2,6 x 10^6 Zellen detektiert. Daraus errechnet sich eine CRR von 1,27 x 10^{-6}. Für das weitere Experiment mit diesem Klon kann für die Untersuchung von 3,6 x 10^6 Zellen nur eine theoretisch maximal mögliche CRR von ≤ 0,49 x 10^{-6} angegeben werden, da kein HR-Ereignis detektiert wurde. In den Experimenten mit dem Klon V79B-Grec23 konnte beide Male kein HR-Ereignis in 2,0 x 10^6 bzw. 3,6 x 10^6 untersuchten Zellen detektiert werden. Daraus errechnen sich theoretisch maximal mögliche CRR von ≤ 0,88 x 10^{-6} bzw. ≤ 0,49 x 10^{-6}. Die durchschnittliche CRR der untersuchten Klone der Zelllinie V79B beträgt ohne Berücksichtigung der theoretisch maximal möglichen CRR-Werte 0,93 x 10^{-6} ± 0,31 x 10^{-6}. Da in einem weiteren Hybridisierungsexperiment in den Zellen des Subklons V79B-Grec20 mit hoher Wahrscheinlichkeit mehrere pGrec-Kopien gefunden wurden, soll der entsprechende CRR-Wert hier nicht berücksichtigt werden. Es ergibt sich somit eine durchschnittliche CRR (für den Klon V79B-Grec1) von 0,75 x 10^{-6} ± 0,20 x 10^{-6}.

Die Analyse von 10,4 x 10^6 Zellen des Klons V4B-Grec6 erbachte 1 GFP^+-Zelle, die zu einer errechneten CRR von 0,17 x 10^{-6} führt. Bei der Untersuchung von 6,0 x 10^6 Zellen des Klons wurden zwei HR-Ereignisse detektiert, woraus sich eine CRR von 0,39 x 10^{-6} kalkulieren lässt. Die durchschnittliche CRR dieser beiden Experimente beträgt 0,28 x 10^{-6} ± 0,16 x 10^{-6}. In den Experimenten mit dem Klon V4B-Grec11 konnte bei der Analyse von 13,2 x 10^6 Zellen keine rekombinate Zelle detektiert werden. Die daraus berechnete theoretisch maximal mögliche CRR beträgt ≤ 0,13 x 10^{-6}. Die Untersuchung von 6,0 x 10^6 Zellen im zweiten Experiment erbrachte 1 GFP-exprimierende Zelle. Daraus kann eine CRR von 0,29 x 10^{-6} errechnet werden. Die Untersuchung von 3,8 x 10^6 Zellen des Klons V4B-Grec12 ergab keine

GFP^+-Zelle. Die errechnete maximal mögliche CRR beträgt $\leq 0{,}46 \times 10^{-6}$. In der zweiten Analyse von $6{,}8 \times 10^6$ Zellen des Klons konnten 171 GFP-exprimierende Zellen detektiert werden, die zu einer errechneten CRR von $6{,}60 \times 10^{-6}$ führen. Die durchschnittliche CRR der experimentell ermittelten CRR-Werte beträgt $1{,}86 \times 10^{-6} \pm 3{,}10 \times 10^{-6}$. Wird der deutlich abweichende CRR-Wert des Klons V4B-Grec12 (Abbildung 25) außer acht gelassen, ergibt sich eine bereinigte durchschnittliche CRR von $0{,}28\ 10^{-6} \times \pm 0{,}11 \times 10^{-6}$ für die Zelllinie CL-V4B.

Zellen (Subklon)	Zellzahl ($\times 10^6$)	Anzahl GFP^+	Rekombinationsrate ($\times 10^{-6}$) an dem Lokus / Zelle / Generation
V79B-Grec1	2,6	2	0,90
V79B-Grec1	2,9	1	0,61
V79B-Grec20	2,6	4	1,27
V79B-Grec20	3,6	0	$\leq$ 0,49
V79B-Grec23	2,0	0	$\leq$ 0,88
V79B-Grec23	3,6	0	$\leq$ 0,49
CL-V4B-Grec6	10,4	1	0,17
CL-V4B-Grec6	6,0	2	0,39
CL-V4B-Grec11	13,2	0	$\leq$ 0,13
CL-V4B-Grec11	6,0	1	0,29
CL-V4B-Grec12	3,8	0	$\leq$ 0,46
CL-V4B-Grec12	6,8	171	6,60

Tabelle 4: Rekombinationsraten von jeweils pGrec-transfizierten Einzelklonen des isogenen Zellpärchens V79B und CL-V4B.

Die CRR wurde für jeden Klon in zwei unabhängigen Versuchen bestimmt. Die theoretisch maximal mögliche CRR für Experimente, in denen keine GFP+-Zelle detektiert wurden, sind durch kleindruck und das Zeichen $\leq$ gekennzeichnet.

Die erstaunlich hohe CRR des Klons V4B-Grec12 von $6{,}6 \times 10^{-6}$ stellt für die Zelllinie CL-V4B kein repräsentatives Ergebnis dar; die in Abbildung 25 A dargestellte Standard-abweichung des Mittelwertes, der den CRR-Wert des Klons V4B-Grec12 (Mittel CL-V4B) enthält, verdeutlicht dies. Der Wert des Klons ist um den Faktor 23,6 größer als der bereinigte Mittelwert der Zelllinie CL-V4B (Abbildung 25 A, Mittel 2 CL-V4B) und übersteigt den

Mittelwert der Wildtyp-Zelllinie V79B um den Faktor 7,1. Es ist anzunehmen, dass dieser hohe Wert durch die klonale Expansion einer Zelle verursacht wurde, die in der Anfangsphase des Experiments HR in dem Rekombinationssubstrat des pGrec-Vektors durchgeführt hat.

Die in unabhängigen Experimenten ermittelten CRR-Werte für Einzelklone der Zelllinien V79B und der daraus hervorgegangenen Mutante CL-V4B bestätigt den in Kolonie-Tests gefundenen erniedrigten rekombinanten Phänotyp (*hypo-rec* Phänotyp) der Mutante (siehe. Abbildung 25, B). In den hier gezeigten Daten ist der Unterschied des Zellpärchens in der CRR mit dem Faktor 2,7 allerdings deutlich kleiner als der in Kolonie-Test-Experimenten ermittelte Unterschied der Rekombinationsfrequenz (Faktor 6,0). Ob dies die wahrscheinlich größere Anzahl der genomisch integrierten HR-Kassetten bei Kolonie-Test-Experimenten widerspiegelt, oder ob der Effekt in den Fluktuationsexperimenten aufgrund der extrem geringen Anzahl der detektierten HR-Ereignisse reduziert ist, kann zur Zeit nicht beantwortet werden.

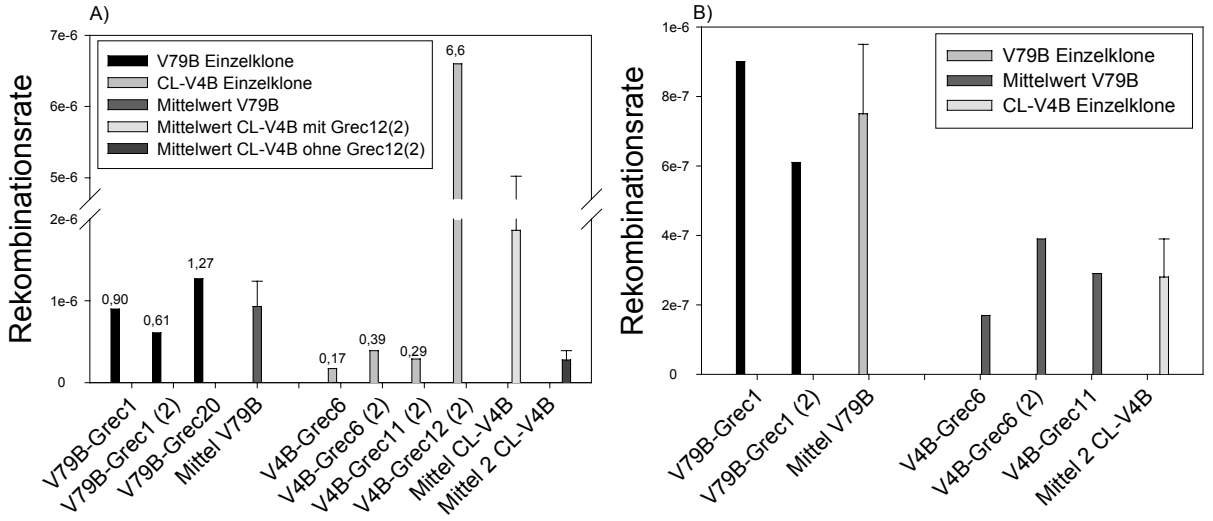


Abbildung 25: Graphische Darstellung der chromosomalen Rekombinationsrate von Einzelklonen der Zelllinien V79B und CL-V4B

Zur Ermittlung der chromosomalen Rekombinationsrate (CRR) der jeweils drei Einzelklone des isogenen Nager-Zellpärchens V79B (V79B-Grec1, V79B-Grec20 und V79B-Grec23) und CL-V4B (V4B-Grec6, V4B-Grec11 und V4B-Grec12) die bezüglich der Anzahl der genomisch integrierten pGrec-HR-Kassetten charakterisiert sind, wurden Fluktuationsexperimente nach Meyn (Meyn, 1993) durchgeführt. Aus den daraus erhaltenen Daten wurde die CRR nach Luria und Delbrück (Luria und Delbrück, 1943) mit Hilfe von Capizzi und Jameson kalkulierten Fluktuationstabellen (Capizzi und Jameson, 1973) berechnet. Abbildung A zeigt die aus den Daten der Einzelexperimente mit real gemessenen HR-Ereignissen errechneten CRR-Werte und die Mittelwerte (ohne die theoretisch maximal möglichen CRR-Werte) für die Zelllinien. Für die Zelllinie CL-V4B sind zwei Mittelwerte angegeben. Einmal ist der deutlich Abweichende CRR-Wert des Klons V4B einbezogen (Mittel CL-V4B), einmal ist er außer acht gelassen worden (Mittel 2 CL-V4B). Diagramm B zeigt die CRR-Werte, ohne den durch ein wahrscheinlich sehr früh in der Kultivierungsphase erfolgtes Rekombinationsereignis, überhöhten CRR-Wert des

Klons V4B-Grec12, sowie ohne den Wert des Klons V79B-Grec20, da dieser Klon mit hoher Wahrscheinlichkeit mehrere Kopien der HR-Kassette enthält. Die Skalierung der Ordinate ist gegenüber Abbildung A verändert. Die Grafik zeigt, dass der erniedrigte Rekombinations-Phänotyp (*hypo-rec* Phänotyp) der *Rad51C*-Mutante auch in Fluktuationsexperimenten mit Einzelklonen gesehen werden kann. Allerdings ist der hier beobachtete Effekt der um den Faktor 2,7 erniedrigten Rekombinationsrate nicht so ausgeprägt, wie es bei den vergleichenden Kolonie-Test-Experimenten gesehen werden kann.

4.2.4 Ermittlung der extrachromosomalen Rekombinationsfrequenz in *Atm*-Mutanten durch Kolonie-Test-Experimente

Die dargestellten Ergebnisse an Hamster-Zelllinien zeigen, dass pGrec chromosomal integriert, zur Messung von Rekombinationsfrequenzen und -raten geeignet ist. Es sollte darauf aufbauend untersucht werden, ob pGrec als episomales Plasmid geeignet ist, Unterschiede in der Rekombinationsfähigkeit bei verschiedenen Zellpopulationen mit pGrec nachzuweisen. Es wurde hierfür das humane Ataxia-telangiectasia (A-T)-Zellsystem verwendet, da in früheren Arbeiten für chromosomal integrierte Reportergene (*LacZ* und *Neomycin*^{r}) eine deutliche erhöhte Rekombinationsrate in ATM-defizienten Zellen gezeigt worden war (Meyn, 1993; Luo *et al.*, 1996). Der episomale pGrec-Vektor wird in menschlichen Zellen als extrachromosomales, episomales Plasmid weitervererbt, kann also extrachromosomale HR-Ereignisse in diesen Zellen detektieren.

Für die Kolonie-Test-Experimente wurde das Zellpärchen AT-pEBS (A-T-Zellen transfiziert mit leerem Kontroll-Vektor) und AT-YZ (A-T-Zellen komplementiert durch stabile, ektopische ATM-Expression) (Ziv *et al.*, 1997) in einem parallelen Ansatz mit dem pGrec-Vektor transfiziert, und die Zellen wurden mit Puromycin auf die Vektoraufnahme selektioniert. Die aus den transfizierten Zellen hervorgegangenen Kolonien wurden 28 - 36 Tage nach der Transfektion (Verdoppelungszeit von 30 h für beide Zelllinien) fluoreszenzmikroskopisch auf GFP-exprimierende Zellen analysiert. Durchgeführt wurden zwei unabhängige Experimente (Tabelle 5).

Die Zelllinie AT-YZ wurde 22 bzw. 27 und 28 Generationen nach pGrec-Transfektion untersucht (Tabelle 5). In Experiment 1 konnten nach 22 Generationen in 441 analysierten Kolonien insgesamt 9 Rekombinationsereignisse gefunden werden. Daraus ergibt sich eine extrachromosomale Rekombinationsfrequenz (ERF) von 2,04 %. In Experiment 2 wurden nach 27 Generationen 3 Rekombinationsereignisse in 83 Kolonien und nach 28 Generationen 2 rekombinante Zellen in 44 Kolonien detektiert. Aus diesen 5 Rekombinationsereignissen in

insgesamt 127 Kolonien resultiert eine ERF von 3,94 %. Die gemittelte ERF der beiden Experimente beträgt 2,99 % ± 0,354 (siehe Tabelle 6).

Die Zelllinie AT-pEBS wurde 22 bzw. 27 und 29 Generationen nach pGrec-Transfektion untersucht (siehe Tabelle 5). Nach 22 Generationen (Experiment 1) konnte in 503 Kolonien kein Rekombinationsereignis festgestellt werden. Das führt zu einer theoretischen ERF von ≤ 0,198 %. In Experiment 2 konnte nach 27 Generationen in 123 Kolonien kein HR-Ereignis entdeckt werden. Erst nach 29 Generationen wurden 3 Rekombinationsereignisse in 197 Kolonien detektiert. Die 3 HR-Ereignisse in insgesamt 320 analysierten Kolonien ergeben für diesen Versuch eine ERF von 0,938 %. Aus den beiden Experimenten (ohne Beachtung der theoretischen ERF in Experiment 1) kann eine durchschnittliche ERF von 0,469 % ± 0,663 ermittelt werden (siehe Tabelle 6).

Experiment 1:

Zelllinie	Anzahl Kolonien	GFP^+ Einzel-zelle	GFP^+ - Sektor[a]	GFP^+-Kolonie[b]	GFP^+-Ereignisse Gesamt	Rekombina-tions-frequenz	Genera-tionen
AT-YZ	441	4	2	3	9	2,04 %	22
AT-pEBS	503	0	0	0	0	≤ 0,198 %	22

Experiment 2:

Zelllinie	Anzahl Kolonien	GFP^+ Einzel-zelle	GFP^+ - Sektor[a]	GFP^+-Kolonie[b]	GFP^+-Ereignisse Gesamt	Rekombina-tions-Frequenz	Genera-tionen
AT-YZ	83	2	1	0	3	3,6 %	27
AT-YZ	44	2	0	0	2	4,5 %	28
AT-YZ Gesamt	**127**	**4**	**1**	**0**	**5**	**3,94 %**	
AT-pEBS	123	0	0	0	0	≤ 0,806 %	27
AT-pEBS	197	2	1	0	3	1,5 %	29
AT-pEBS Gesamt	**320**	**2**	**1**	**0**	**3**	**0,938 %**	

Tabelle 5: Die in 2 unabhängigen Konversionsexperimenten erhaltenen Daten zur Ermittlung der extrachromosomalen Rekombinationsfrequenz des pGrec-transfizierten Zellpärchens AT-pEBS und AT-YZ.

Bei Analyse der Kolonien einer Zelllinie zu verschiedenen Zeitpunkten sind die Ergebnisse separat angegeben. Fettdruck kennzeichnet das Gesamtergebnis des Experiments. Theoretische ERF-Werte sind durch kleindruck und das Zeichen ≤ gekennzeichnet. Zur Ermittlung des Gesamtergebnisses eines Experiments wurde die Anzahl der Kolonien und die Anzahl der HR-Ereignisse der zwei Messungen addiert und aus diesen Werten die ERF bestimmt.
[a] ein GFP^+-Sektor ist definiert als Bereich einer Kolonie mit mindestens 2 GFP-exprimierenden Zellen.
[b] als GFP^+-Kolonie wurden Kolonien gewertet, die über die ganze Ausbreitung der Kolonie und augenscheinlich mind. 50 % GFP-exprimierende Zellen, verteilt über die gesamte Fläche der Kolonie aufwiesen.

Es ergibt sich für die ATM-defiziente Zelllinie im Vergleich zu den AT-YZ-Zellen überraschender Weise eine um den Faktor 6,4 erniedrigte durchschnittliche ERF (Tabelle 6).

Zelllinie	Anzahl Kolonien insgesamt	durchschnittliche ERF
AT-YZ	568	2,99 % ± 0,354
AT-pEBS	820	0,469 % ± 0,663

Tabelle 6: Die aus zwei Kolonie-Test-Experimenten ermittelte extrachromosomale Rekombinationsfrequenz der isogenen Zelllinien AT-pEBS und YZ.

Die durchschnittliche ERF wurde aus den in den Einzelexperimenten ermittelten ERF-Werten errechnet. Die in Tabelle 5 angegebene theoretische RF für AT-pEBS in Experiment 1 wurde zur Ermittlung der durchschnittlichen ERF für diese Zelllinie nicht verwendet. Stattdessen wurde die ERF für AT-pEBS in diesem Experiment als 0 % gewertet.

Um die Möglichkeiten auszuschließen, dass Identitäten vertauscht worden waren, oder dass die Zelllinie AT-YZ die Fähigkeit verloren hat, funktionelles ATM-Protein zu exprimieren, wurde das Überleben beider Zelllinien nach γ-Bestrahlung in Kolonie-Überlebenstests verglichen (Abbildung 26). Dabei zeigt die Zelllinie AT-YZ deutliche Komplementation der IR-Sensitivität. Diese Komplementation bestätigt, dass AT-YZ-Zellen durch ektopische ATM-Expression weiterhin phänotypisch komplementiert sind, zumindest im charakteristischen Phänotyp der Strahlensensitivität (Ziv *et al.*, 1997).

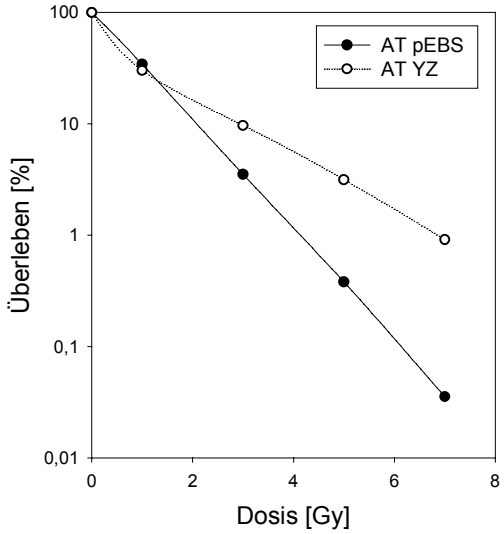


Abbildung 26: Überleben der isogenen Zelllinien AT-YZ und AT-pEBS nach γ-Bestrahlung.

Zur Ermittlung der IR-Sensitivität der beiden Zelllinien wurde eine der Dosis angepasste Zellzahl in Zellkulturschalen ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen am Boden der Kulturschalen erfolgte die Bestrahlung der Zellen mit den Dosen 1 Gy, 3 Gy, 5 Gy bzw. 7 Gy. Als Referenz dienten unbestrahlte Kontrollen. Nach 14 Tagen Wachstum wurde die Anzahl der gewachsenen Kolonien ermittelt. Die Koloniezahl der unbestrahlten Kontrollen wurde als 100 % Überleben gesetzt. Damit wurden die auf den γ-exponierten Zellkulturschalen gewachsene Anzahl an Kolonien unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in Relation gesetzt. Die Zelllinie AT-pEBS zeigt eine deutlich ausgeprägtere IR-Sensitivität als die Zelllinie AT-YZ. Die erhöhte Toleranz der AT-YZ-Zellen gegenüber IR-Exposition ist auf funktionelle ATM-Proteinexpression zurückzuführen (Ziv, *et al.,* 1997).

Generell ist in den hier beschriebenen Rekombinations-Experimenten, in Anbetracht der sehr geringen Anzahl der insgesamt detektierten HR-Ereignisse (14 Ereignisse für AT-YZ, 3 Ereignisse für AT-pEBS) die Aussagekraft der Daten vermindert. Das Ergebnis der Kolonie-Test-Experimente mit dem episomalen Rekombinationsvektor widerspricht den bisher publizierten Daten, die für A-T-Zellen klar eine erhöhte Rekombinationsrate mit in chromosomal integrierten HR-Meßsystemen zeigen (Meyn, 1993; Luo *et al.*, 1996).

4.2.5 Ermittlung von extrachromosomalen Rekombinationsraten in *Atm*-Mutanten durch Fluktuationsanalysen

Zur Ermittlung der extrachromosomalen Rekombinationsrate (ERR) wurden Fluktuationsexperimente mit stabil pGrec-transfizierten Einzelklonen der Zelllinien AT-pEBS und AT-YZ (analog zu Meyn (Meyn, 1993)) durchgeführt. Für jede Zelllinie wurden jeweils zwei zufällig ausgewählte Klone in zwei unabhängigen Experimenten untersucht. Zur Kontrolle wurde in

den Experimenten dieselbe Anzahl an nicht-transfizierten Zellen der verwendeten Zelllinie untersucht und als GFP-negativ bestätigt.

Die Rekombinationsrate wurde aus der Anzahl der GFP^+-Zellen und der Gesamtzahl der analysierten Zellen aus Fluktuationstabellen von Capizzi und Jameson (Capizzi und Jameson, 1973) nach Luria und Delbrück (Luria und Delbrück, 1943) berechnet. Sie bezieht sich auf Rekombinationsereignisse an dem Lokus / Zelle / Generation.

In der Zelllinie AT-pEBS wurde die ERR für die stabil pGrec-transfizierten Einzelklone #9 und #10 (im folgenden AT-pEBS-pGrec9 und AT-pEBS-pGrec10 genannt) ermittelt. Bei der Analyse des Klons pGrec9 wurden in $3{,}45 \times 10^6$ untersuchten Zellen 251 GFP-exprimierende Zellen detektiert, woraus sich eine ERR von $1{,}77 \times 10^{-5}$ errechnet (siehe Tabelle 7). Ein weiteres Fluktuationsexperiment ergab 561 GFP^+-Zellen in $4{,}8 \times 10^6$ analysierten Zellen. Daraus errechnet sich für diesen Versuch eine ERR von $2{,}45 \times 10^{-5}$. Zusammengefasst ergeben die zwei Experimente ein mittlere ERR von $2{,}11 \times 10^{-5} \pm 0{,}48 \times 10^{-5}$.

Bei der Analyse des Klons AT-pEBS-pGrec10 traten beim ersten Versuch (siehe Tabelle 7, Zeile 3) technische Probleme mit den präparierten Zellen in der Durchflusszytometer-Anwendung auf, die sich auch in der geringen Anzahl der untersuchten Zellen widerspiegeln ($1{,}9 \times 10^6$), in denen nur 6 GFP-exprimierende Zellen gefunden wurden. Generell ist dieses Experiment, und die daraus ermittelte ERR von $0{,}22 \times 10^{-5}$, als fragwürdig anzusehen. Im Gegensatz dazu konnten während des zweiten Experiments mit Zellen des selben AT-pEBS-pGrec10-Einzelklons, in $4{,}1 \times 10^6$ analysierten Zellen 225 GFP^+-Zellen ermittelt werden. Daraus kann eine ERR von $1{,}36 \times 10^{-5}$ errechnet werden. Die durchschnittliche ERR der zwei Experimente beträgt $0{,}79 \times 10^{-5} \pm 0{,}81 \times 10^{-5}$.

Für die Atm komplementierte Zelllinie AT-YZ wurden die stabil pGrec-transfizierten Einzelzellklone #6 und #11 (im Folgenden AT-YZ-pGrec6 und AT-YZ-pGrec11 genannt) auf ihre ERR untersucht (siehe Tabelle 7). Für den Klon AT-YZ-pGrec6 wurden in beiden unabhängigen Experimenten je $4{,}1 \times 10^6$ Zellen untersucht. Dabei konnte in einem Experiment 1 GFP^+-Zelle, im anderen Experiment keine GFP-exprimierende Zelle gefunden werden. Daraus errechnet sich eine ERR von $0{,}043 \times 10^{-5}$ für das Experiment mit einem detektierten HR-Ereignis und eine theoretisch maximal mögliche von $\leq 0{,}043 \times 10^{-5}$ für den Versuch mit keinem. Für den Klon AT-YZ-pGrec11 ergibt sich ein ähnliches Bild. Bei diesem Klon wurden in $3{,}8 \times 10^6$ Zellen keine GFP^+-Zelle gefunden (theoretisch maximal mögliche ERR von $\leq 0{,}046 \times 10^{-5}$) und in $4{,}1 \times 10^6$ Zellen 1 HR-Ereignis, woraus sich eine ERR von $0{,}043 \times 10^{-5}$ errechnet.

Zelllinie Klon	analysierte Zellzahl (x 10^6)	Anzahl GFP^+	extrachromosomale Rekombinationsrate (x 10^{-5}) / Lokus / Generation
AT-pEBS-pGrec9	3,45	251	1,77
AT-pEBS-pGrec9	4,80	561	2,45
AT-pEBS-pGrec10	1,90	6	0,22
AT-pEBS-pGrec10	4,10	225	1,36
AT-YZ-pGrec6	4,10	1	0,043
AT-YZ-pGrec 6	4,10	0	≤ 0,043
AT-YZ-pGrec11	3,80	0	≤ 0,046
AT-YZ-pGrec11	4,10	1	0,043

Tabelle 7: Extrachromosomale Rekombinationsraten der stabil pGrec-transfizierten Einzelzellklone der Zelllinien AT-pEBS und AT-YZ.

Die ERR wurde für jeden Klon in zwei unabhängigen Versuchen bestimmt. Die theoretisch maximal mögliche ERR für Experimente in denen keine GFP^+-Zelle detektiert wurde, sind durch kleindruck und das Zeichen ≤ gekennzeichnet.

Bei annähernd gleicher Anzahl der analysierten Zellen in den oben beschriebenen vier Experimenten zeigt sich ein deutlicher Zelllinien-abhängiger Effekt bezüglich des Phänotyps extrachromosomale Rekombination (Abbildung 27, A). Dies kann sowohl im Vergleich der Anzahl der tatsächlich detektierten GFP^+-Zellen gesehen werden (1037 bei den verwendeten AT-pEBS Klonen vs. 2 bei den pGrec-transfizierten AT –YZ Klonen), als auch im Vergleich der ERR. Die Durchschnitte der für die Zelllinien experimentell bestimmten ERR unterscheiden sich deutlich (siehe Abbildung 27, B). Für die pGrec-transfizierten Klone der AT-pEBS Zelllinie beträgt die mittlere ERR 1,45 x 10^{-5} ± 0,9 x 10^{-5} bzw. 1,86 x 10^{-5} ± 0,55 x 10^{-5}, wenn der deutlich abweichende Wert des missglückten Experiments außer acht gelassen wird. Für die Klone der Zelllinie AT-YZ ist der Mittelwert aus den zwei Experimenten mit detektierten HR-Ereignissen 0,043 x 10^{-5} ± 0.

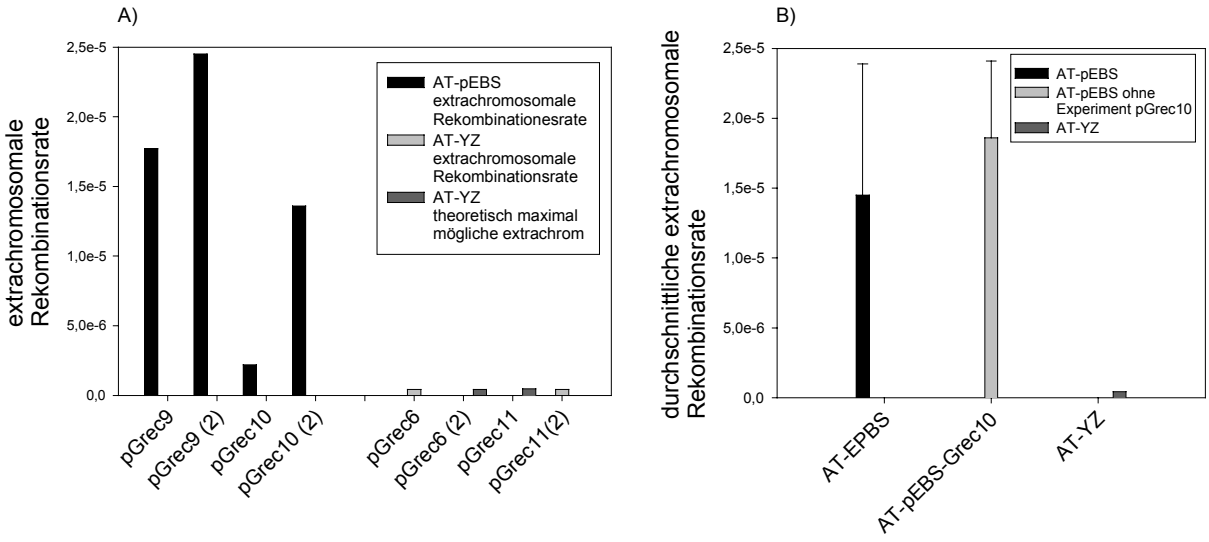


Abbildung 27: Darstellung der experimentell ermittelten extrachromosomalen Rekombinationsraten des isogenen Zellpärchens AT-pEBS und AT-YZ.

Mit jeweils zwei stabil pGrec-transfizierten Einzellklonen der Zelllinien AT-pEBS und AT-YZ wurden Fluktuationsexperimente durchgeführt. Aus der Anzahl der analysierten Zellen und den darin enthaltenen GFP^+-Zellen lässt sich nach Luria und Delbrück (Luria und Delbrück, 1943) anhand von Capizzi und Jameson errechneten Fluktuationstabellen (Capizzi und Jameson, 1973) die Rekombinationsrate, in diesem Fall die extrachromosomale (ERR) kalkulieren.
Abbildung A zeigt die einzelnen Daten der unabhängigen Einzelexperimente. Das zweite Experiment eines Klons ist durch (2) verdeutlicht. Die theoretisch maximal möglichen ERR für Experimente, in denen kein HR-Ereignis detektiert wurde (AT-YZ-pGrec6 (2) und AT-YZ-pGrec11) ist durch eine andere Farbe der Balken gekennzeichnet (siehe Legende innerhalb der Abbildung). Für den Klon AT-pEBS-pGrec9 wurde für Experiment 1 eine ERR von $1{,}77 \times 10^{-5}$, für Experiment 2 eine ERR von $2{,}45 \times 10^{-5}$ errechnet. Im ersten Experiment mit dem Klon AT-pEBS-pGrec10 traten technische Schwierigkeiten auf, die sich auf die Güte der Messung auswirkten. Dies erklärt die deutlich erniedrigte ERR von $0{,}22 \times 10^{-5}$ aus diesem Experiment. Die aus dem zweiten Experiment ermittelte ERR beträgt $1{,}36 \times 10^{-5}$. Für die beiden stabil pGrec-transfizierten Klone der ATM-komplementierten Zelllinie AT-YZ wurde generell eine deutlich niedrigere ERR errechnet. In zwei der vier durchgeführten Experimente (AT-YZ-pGrec6 und AT-YZ-pGrec11 (2)) wurde jeweils ein HR-Ereignis in $4{,}3 \times 10^{6}$ Zellen gefunden. Daraus errechnet sich für beide Experimente eine ERR von $0{,}043 \times 10^{-5}$.
Abbildung B zeigt für die beiden Zelllinien die Mittelwerte aus den Experimenten, ohne die theoretisch maximal mögliche ERR der AT-YZ Klone zu berücksichtigen. Für die Klone der Zelllinie AT-pEBS ist einmal der Durchschnitt aller Einzelexperimente (AT-pEBS, $1{,}45 \times 10^{-5} \pm 0{,}91 \times 10^{-5}$) und einmal der Mittelwert ohne Experiment 1 des Klons AT-pEBS-pGrec10 (AT-pEBS-pGrec10, $1{,}86 \times 10^{-5} \pm 0{,}55 \times 10^{-5}$) angegeben. Für die Klone der Zelllinie AT-YZ ist der Mittelwert der zwei Experimente, in denen ein HR-Ereignis detektiert wurde, $0{,}043 \times 10^{-5} \pm 0$.

Die Zelllinie AT-pEBS weist in den durchgeführten Experimenten eine um den Faktor 34 - 43 erhöhte ERR auf. Um auszuschließen, dass diese Beobachtung durch Zelllinien-spezifische Unterschiede in der Anzahl der episomal vorliegenden HR-Kassette verursacht wird, wurde

durch *Southern*-Analysen die relative Menge der zellulären Plasmide innerhalb der Klone AT-pEBS-pGrec9, AT-pEBS-pGrec10 und AT-YZ-pGrec11 bestimmt. Dazu wurde eine genomische DNA-Präparation durchgeführt, mit der die episomalen Plasmide ebenfalls erhalten wurden. Um die HR-Kassette aus dem Vektorrückgrat auszuschneiden, wurde die isolierte DNA einem *EcoR*V-Restriktionsverdau unterzogen und die fragmentierte DNA durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der *Southern-Blot*-Technik aus dem Gel auf eine Nylonmembran transferiert und die HR-Kassette durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, *GFP*-spezifischen Sonde detektiert (siehe Abbildung 28). Durch Exposition eines Röntgenfilms wurde die Sonde visualisiert. Anhand der Schwärzung des Films und der auf das Gel aufgetragenen DNA-Menge wurde die relative Anzahl der episomalen HR-Kassetten abgeschätzt.

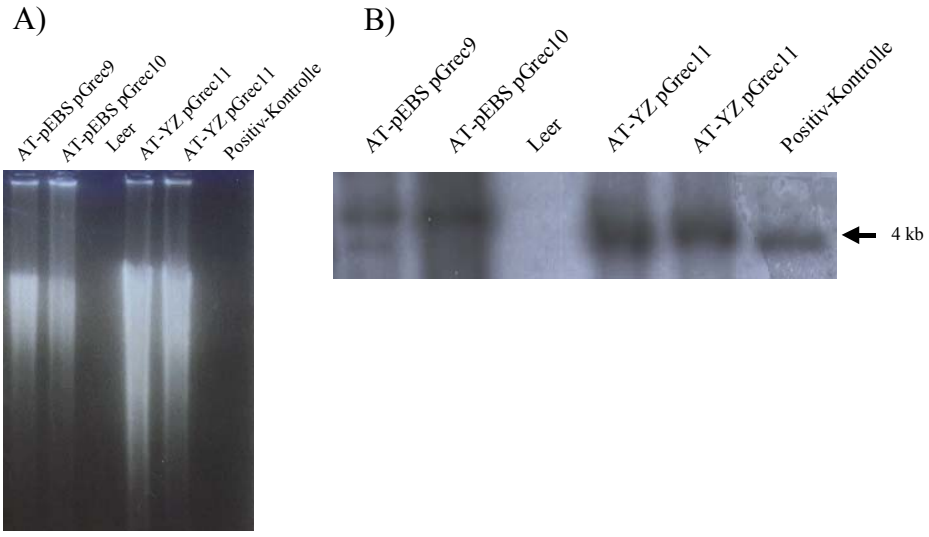


Abbildung 28: Gelphoto und Autoradiographie der *Southern*-Analysen zu relativen Mengen Abschätzung der in den stabil pGrec-transfizierten AT-pEBS und AT-YZ Einzelzell Klonen vorhandenen episomalen HR-Kassetten.

Für *Southern*-Analysen zur Bestimmung der relativen zellulären Anzahl von pGrec HR-Kassetten der Klone AT-pEBS-pGrec9, AT-pEBS-pGrec10 und AT-YZ-pGrec11 wurde eine genomische DNA-Präparation dieser Klone durchgeführt. Nach einem *EcoR*V-Restriktionsverdau der genomischen DNA wurde die fragmentierte DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Die HR-Kassette wurde mit einer radioaktiv markierten *GFP*-spezifischen Sonde hybridisiert und durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Abbildung A zeigt das Photo des Agarosegels, da die aufgetragene DNA-Menge nicht standardisiert war. Spuren 1 und 2 enthalten die DNA der AT-pEBS Klone, Spur 3 ist leer. Die Spuren 4 und 5 enthalten DNA des AT-YZ Klons und Spur 6 das pGrec Plasmid, verdaut mit *EcoR*V als Positiv-Kontrolle. Abbildung B zeigt einen Ausschnitt der Autoradiographie. Alle drei Klone zeigen bei der erwarteten Länge des DNA-Fragments von 4 kb eine Bande, die, wie die Positiv-Kontrolle zeigt, spezifisch für die HR-Kassette ist. Der

Klon AT-pEBS-pGrec9 zeigt ein im Vergleich zu dem Klon AT-YZ-pGrec11 ein schwächeres Signal der radioaktiv markierten Sonde (ca. um den Faktor 2 - 3) auf. Das Verhältnis der aufgetragenen DNA-Menge (AT-pEBS-pGrec9 : AT-YZ-pGrec11) ist in etwa 1 : 2. Daraus wird geschlossen, dass der Klon AT-YZ-pGrec11 etwa gleich viel Kopien der HR-Kassette enthält, wie der Klon AT-pEBS-pGrec9.

Die Southern-Analysen erbrachten erstaunlicherweise, dass der Einzelklon AT-pEBS-pGrec10 etwa 5 mal so viele pGrec-Plasmide enthält wie AT-pEBS-pGrec9. Trotzdem sind die in Fluktuationsanalysen erhobenen HR-Raten nicht wesentlich verschieden und sogar geringer in Klon #10 verglichen mit Klon #9. Die Anzahl episomaler pGrec-Kopien scheint also in den Fluktuationsanalysen keinen wesentlichen Einfluss zu haben. Weiterhin zeigt sich, dass der Klon AT-YZ-pGrec11 etwa gleich viele oder sogar mehr HR-Kassetten enthält, als der Klon AT-pEBS-pGrec9. Im Gegensatz dazu ist die HR-Rate von AT-YZ-pGrec11 etwa 50-fach erniedrigt im Vergleich zu AT-pEBS-pGrec9. Daraus folgt, dass die in AT-YZ reduzierte HR-Rate nicht auf geringerer Kopienzahl von pGrec beruht, sondern tatsächliche einen ATM-abhängigen HR-Phänotyp verdeutlicht. Die Experimente zeigen also, dass die ektopische Expression von ATM-Protein in *Atm*-defizienten Zellen die spontane Rate extra-chromosomaler Rekombination auf klonaler Ebene unterdrückt.

5 Diskussion

5.1 Etablierung des Systems

Die Rolle der homologen Rekombination (HR) in DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturprozessen, und damit einhergehend in der genomischen Stabilität, gewinnt auch in Säugerzellen wachsende Bedeutung. Zur zellulären und weiterführenden molekularbiologischen Analyse von HR sollten HR-Ereignisse in Testzellen meßbar sein, sowie rekombinante Zellen isoliert und als Subklone etabliert werden können. Die wenigen dafür beschriebenen und verwendeten experimentellen Meßsysteme sind zwar in der Detektion von HR-Ereignissen sehr sensitiv, in ihrer Anwendbarkeit zur effizienten Messung von HR-Ereignissen und/oder der Etablierung von rekombinanten Subklonen aber nur begrenzt einsetzbar.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte diese Lücke geschlossen werden durch Etablieren eines verbesserten HR-Meßsystems, welches auf einem *GFP*-Gen als Reporter beruht.

5.1.1 Expression der funktionellen und mutierten *GFP*-Allele

Zunächst mußte das GFP-Gen als möglicher Reporter in den zu verwendeten Zellinien getestet werden. Es konnte nach stabiler Transfektion des pRep5-*GFP*-Vektors in A-T-Zellen sowie in die verwendeten Nager-Zellinien gezeigt werden, dass eine konstitutive Expression des *eGFP*-Gens auftritt, die als zelluläre Fluoreszenz fluoreszenzmikroskopisch und in durchflusszytometrischen Analysen sowie als biochemisch nachweisbares GFP-Protein in *Western*-Analysen messbar ist.

Weiterhin wurde getestet, ob die in dieser Arbeit generierten, spezifisch mutierten GFP-Allele tatsächlich funktionell inaktiviert worden waren. Bei stabiler Expression der mutierten *GFP*-Allele alleine, sowie auch als Bestandteil der Rekombinationskassette von pGrec, war keine erhöhte Fluoreszenz der Gesamtpopulation im Bereich des GFP-Emissionsmaximums detektierbar. Damit übereinstimmend war in diesen Populationen biochemisch mit Hilfe eines anti-GFP-Antikörpers kein Protein detektierbar. Somit konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Inaktivierung der spezifisch mutierten *GFP*-Allele erfolgreich war.

Darüber hinaus konnten in den Populationen, die mit mutierten *GFP*-Expressionsvektoren stabil transfiziert waren, keine durch spontane Mutation enstandenen, selten auftretenden GFP^+-Zellen gefunden werden. Es kann auch aus theoretischen Gründen ausgeschlossen werden, dass eine spontane Reversionsmutagenese der inaktiven *GFP*-Allele stattfinden kann, die zur Expression eines funktionellen GFPs führt. So wäre z.B. die Möglichkeit denkbar, dass eine (Punkt-) Mutation im *GFP-FS*-Allel die Expression von funktionellem GFP bewirken kann; diese müsste dann aber sowohl das Stop-Kodon als auch die Leseraster-verschiebung eliminieren. Auf DNA-Sequenzebene könnte eine solche Mutation aber nicht das Auftreten der Restriktionsstelle *Bst11071* des Wildtyp-Allels erklären, die nur durch Rekombinantionsereignisse rekonstituiert werden kann. In PCR-und RFLP-Analysen war das Auftreten der Wildtyp-Restriktionsschnittstelle jedoch in dem exemplarisch gezeigten Subklon sowie weiteren Subklonen experimentell nachweisbar.

Weiterhin wäre es theoretisch möglich, dass im 5´-Bereich des *GFPΔ*-Allels potentielle Start-Kodons durch Mutation (Insertionen oder Deletionen von Nukleotiden) ins richtige Leseraster gelangen und so die Translation eines Proteins mit verkürzter, aber eventuell funktioneller GFP-Chromophordomäne initiieren. Die Erkennung eines solchen verkürzten Proteins ist aufgrund der ähnlichen Größe wie das GFPwt-Protein mit Hilfe der *Western-Blot*-Technik nicht möglich. Allerdings kann, wiederum aufgrund der PCR-Daten, diese Möglichkeit ausgeschlossen werden, da sich sonst in den PCR-amplifizierten *GFP*-Allelen keine *GFP-Wildtyp*-spezifische Restriktionsschnittstelle nachweisen lassen würde.

Ferner ist eine spontane Deletion im *GFP-FS*-Allel denkbar, die sich exakt über den Bereich des eingebrachten Oligonukleotids erstreckt und dadurch sowohl die *GFPwt*-spezifische Restriktionsschnittstelle, als auch den *GFPwt*-ORF rekonstituiert. Diese Situation könnte molekularbiologisch nicht erkannt werden. Insgesamt gilt aber für alle möglichen Fälle einer spontanen Reversionsmutagenese, dass sie statistisch extrem unwahrscheinlich sind. Experimentell konnten sie in $2{,}5 \times 10^7$ Zellen, die mit den mutierten *GFP*-Expressions-vektoren transfiziert worden waren, tatsächlich nicht gefunden werden.

Daraus folgt, dass die in dieser Arbeit generierten, spezifisch mutierten GFP-Allele zur Konstruktion einer Rekombinations-Kassette geeignet waren.

5.1.2 Funktionalität der HR-Kassette

Nach der Klonierung der Rekombinationskassette und des endgültigen Rekombinationsvektors wurde dieser nach Transfektion in A-T-Zellen funktionell getestet: In Fluktuationsanalysen eines stabil pGrec-transfizierten Einzelklons konnten wenige GFP^+-Zellen aus der GFP-negativen Zellpopulation mittels Durchflusszytometer isoliert werden. Nach Etablierung und Expansion der isolierten Zellen zu stabilen Subklonen war die GFP-Expression in den Zellen fluoreszenzmikroskopisch und biochemisch mit einem anti-GFP-Antikörper nachweisbar. Die weitere Analyse der Klone auf DNA-Ebene durch PCR und RFLP-Analysen zeigte, dass die *GFPwt*-Allel-spezifische Restriktionsstelle in der Gesamtheit der zellulären pGrec-Plasmide nachweisbar war, dass also mindestens ein *GFPwt*-Allel rekonstituiert worden war. Diese molekularen Befunde belegen zusammen mit den Ergebnissen der als Negativ-Kontrollen exprimierten mutierten *GFP*-Allele, dass die detektierten Zellen mit rekonstituiertem Wildtyp-*GFP* tatsächlich auf HR-Ereignissen in der pGrec-HR-Kassette beruhen.

5.1.3 Sensitivität und Vorteile des pGrec-Systems

Zur Detektion seltener GFP-fluoreszierender Zellen in einer sehr großen GFP-negativen Zellpopulation musste zunächst einmal das Auflösungsvermögen des Durchflusszytometers optimiert werden. Die in Kapitel 4.2.3.1 exemplarisch gezeigten Durchflusszytometer-Histogramme belegen, dass die Trennung GFP-exprimierender von falsch-positiven Zellen in sehr guter Weise gelungen ist, da die Detektion von nur einer GFP^+-Zelle in einer Anzahl von $2{,}3 \times 10^6$ negativen Zellen möglich war. Das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis ist so gut eingestellt, dass dies auch bei der Analyse von 1×10^7 Zellen kein Problem darstellt. Dies sollte es ermöglichen, die Anzahl der untersuchten Zellen um eine Zehnerpotenz zu steigern. Das in dieser Arbeit vorgestellte HR-Meßsystem erlaubt es also, eine sehr große Anzahl von Zellen zu analysieren, ohne an Sensitivität einzubüßen. Damit ist das pGrec-System bezüglich der Sensitivität anderen Meßsystemen ebenbürtig.

Die bereits beschriebenen HR-Meßsysteme (Übersicht bei Lambert *et al.*, 1999), die auf der Expression Resistenz-vermittelnder Gene (z.B. neo) oder Farbstoff-umsetzender Enzyme (z.B. β-Galaktosidase) basieren (Meyn, 1993; Luo *et al.*, 1996) sind in ihrer Sensitivität kaum von Expressionsstärken und/oder Detektionsmethode abhängig. Im Fall der Expression

von Resistenzgenen reicht eine geringe Proteinmenge zur Diskriminierung resistenter vs. nicht- resistenter Zellen. Im Falle der β-Galaktosidase (β-Gal) wird schon eine geringe Expression des Proteins durch dessen enzymatische Aktivität bei der Umsetzung des Farbstoffes amplifiziert. Hier treten allerdings Probleme mit der Seneszenz-assoziierten β-Gal auf, die in alternden Zellen unter spezifischen pH-Bedingungen auftreten und falsch-positive Ergebnisse erzeugen kann (Kurz *et al.*, 2000; Coates, 2002).

Die Anwendbarkeit der bereits etablierten HR-Meßsysteme ist jedoch aus unterschiedlichen Gründen eingeschränkt: Mit Systemen, die die Expression Resistenz-vermittelnder Gene messen, kann theoretisch eine unbeschränkte Anzahl an Zellen untersucht werden. Da diese Systeme aber die uneingeschränkte Replikationsfähigkeit der rekombinanten Zellen voraussetzen, besitzen sie jedoch eine begrenzte Anwendbarkeit. So wurde z.B. beschrieben, dass in Werner Syndrom Zellen, die einen vermuteten Defekt in der HR besitzen, zwar ähnliche HR-Raten in Fluktuationsanalysen mit dem pLrec-Rekombinationsvektor auftreten wie in Kontrollzellen unauffälliger Spender. Solche Werner Zellen, die rekombiniert haben, verlieren jedoch meist ihre Proliferationsfähigkeit (Prince *et al.*, 2001) und sind daher mit Resistenz-vermittelnden Systemen nicht meßbar. Bei diesen Systemen wird außerdem eine zweite Selektionsphase der Zellen benötigt, die einen erheblichen zeitlichen Aufwand und Kosten verursacht. Systeme, die enzymatische Farbstoff-Umwandlung messen (β-Gal), sind in der möglichen Höchstzahl der analysierten Zellen stark eingeschränkt, da die Auswertung in aller Regel mikroskopisch erfolgt und deshalb extrem zeitaufwendig ist. Zwar existieren erste Ansätze, β-Gal-exprimierende, lebende Zellen durch Zugabe eines sehr teuren Substrates (FDG) zu messen, welches durch β-Gal zu einem fluoreszierenden Farbstoff umgesetzt wird. Diese enzymatische Substratumsetzung ist jedoch sehr stark temperatur-abhängig und fehler-anfällig (Dr. M. Nüsse, Dr. E. Fritz, persönliche Mitteilung, unveröffentlicht) und daher für durchflusszytometrische Experimente ungeeignet. Beim pGrec-System treten die genannten Probleme in der Anwendbarkeit nicht auf.

Auch bezüglich der Möglichkeit, rekombinante vitale Zellen klonal zu isolieren, ist pGrec den bisherigen Systemen überlegen: Bei den resistenz-vermittelnden Systemen wachsen zwar klonale, rekombinante Subklone zur Kolonie aus. Die Isolierung rekombinanter Einzel-Zellen, die möglicherweise nicht mehr proliferationsfähig sind, ist damit aber nicht möglich. Mit dem pGrec-System können solche Zellen detektiert und prinzipiell isoliert werden, sie sind aber, aufgrund ihres Replikationsstops, mit dem heutigem Stand der molekular-biologischen Techniken auf Einzelzell-Ebene nur äußerst begrenzt analysierbar (z. B.

Fluoreszenz-*in-sito*-Hybridisierung (FISH), oder Comet-Assay). Mit dem β-Gal-System können nur durch Färbung mit FDG vitale, rekombinante Zellen detektiert werden, die aber aus oben genannten Gründen mit dem Durchflusszytometer nicht klonal isolierbar sind.

Ein Nachteil des pGrec-Systems liegt in der relativ kurzen DNA-Sequenz von 383 bp, die die beiden mutierten *GFP*-Allele als gemeinsame Homologiestrecke besitzen und innerhalb derer die HR-Ereignisse stattfinden müssen, um detektierbar zu sein. Diese Länge rangiert am unteren Ende des Bereichs, für den eine direkte Proportionalität zwischen HR-Ereignissen und Länge des Homologiebereichs beschrieben wurde (295 bp – 1,8 kb) (Übersicht bei Lambert *et al.*, 1999). Aus diesem Grund sind im pGrec-System weniger HR-Ereignisse zu erwarten, als bei der Verwendung von Systemen, die längere Homologiebereiche enthalten. Aufgrund der kürzeren Homologiestrecke, die pGrec im Vergleich zu den früher beschriebenen Systemen verwendet, ist es daher auch nicht möglich, die gemessenen Rekombinationshäufigkeiten direkt zu vergleichen. Die während dieser Arbeit ermittelten HR-Raten liegen aber im Rahmen der bisher veröffentlichten (0,0023 – 121 x 10^{-5} Rekombinationsereignisse an dem gemessenen Lokus / Zelle / Generation) (Meyn, 1993; (Luo *et al.*, 1996; Übersicht bei Bollag *et al.*, 1989).

Während diese Arbeit entstand, wurde von Pierce und Ko-Autoren das erste GFP-basierende HR-Meßsystem vorgestellt (Pierce *et al.*, 1999). Eine der beiden in gleicher Orientierung (*head-to-tail*) zueinander angeordneten Kopien der inaktivierten Allele des *GFP*-Gens enthält eine I-*Sce*I-Restriktionsschnittstelle. Dieses Restriktionsenzym besitzt sehr wahrscheinlich keine weitere Erkennungssequenz im Säugergenom. Durch ektopische Expression der I-*Sce*I-Endonuklease wird also direkt im HR-Substrat ein DSB induziert, der durch HR oder andere Mechanismen repariert werden kann. Auf diese sehr elegante Weise kann die Restriktionsenzym-induzierte Rekombination direkt an dem Lokus des DNA-Schadens gemessen werden, wodurch auch die gemessenen Rekombinationsfrequenzen, im Vergleich zum pGrec-System, deutlich erhöht werden. Es werden damit allerdings, wie in der Einleitung bereits erklärt, ausschliesslich HR-Ereignisse an nicht physiologisch auftretenden DSBs gemessen.

Das pGrec-System ist zur Messung von spontanen HR-Ereignissen konzipiert und optimiert, die an physiologisch auftretenden DSBs im Zuge des DNA-Metabolismus auftreten, bzw. durch Behandlung mit DNA-schädigenden Agentien induziert werden können. Das hier etablierte und beschriebene System stellt also eine verbesserte Variante des von Herzing und Meyn (Herzing und Meyn; 1993) publizierten Rekombinationssystems dar.

5.2 Anwendung des Systems

5.2.1 Suppression chromosomaler HR-Ereignisse in *Rad51C*-defekten Zellen

Das pGrec-System wurde zur vergleichenden Messung der HR in *Rad51C*-defekten Nager-Zellen und deren isogenen Wildtypzellen verwendet. Kürzlich wurde durch Komplementationsstudien, Sequenzierung und biochemischen Analysen gezeigt, dass die Zelllinie CL-V4B eine Mutation im *Rad51C*-Gen trägt. Diese Mutation führt zum Verlust des Exon 5, wodurch das Rad51C-Protein in der Zelle instabil und leicht degradierbar wird. Das Fehlen des Rad51C-Proteins führt in CL-V4B Zellen zu hoher MMC-Sensitivität, verminderter Formierung lokaler RAD51-Proteinaggregationen (‚Foci') nach DNA-Schadens-Induktion, erhöhter spontaner und MMC-induzierter genomischer Instabilität, erniedrigter MMC-induzierter Rate von Schwesterchromatid-Austauschen und zu reduzierter Schwester-chromatid-Kohäsion (Godthelp *et al.*, 2002). Einen fast identischen Phänotyp konnte French für die IRS3 Zelllinie zeigen, deren durch Sequenzierung bestätigte Mutation im *Rad51C*–Gen zu einer Deletion des Exon 6 im Genprodukt führt, woraufhin Rad51Cp in der Zelle nicht mehr nachweisbar ist (French *et al.*, 2002). Eine Rad51C-mutierte DT-40 Hühner-Zelllinie weist eine erniedrigte Häufigkeit an gerichteter Integration von Disruptionskassetten an drei verschieden Loci und eine reduzierte Rate an Schwesterchromatid-Austauschen auf (Takata *et al.*, 2001).

Die zellulären Befunde dieser *Rad51C*-Mutanten werden von allen Autoren als Auswirkungen defekter HR gedeutet. Aus diesem Grunde war ein Vergleich *Rad51C*-defekter Zellen mit ihren isogenen parentalen Kontrollen hinsichtlich der Fähigkeit zur homologen Rekombination wissenschaftlich von großem Interesse. pGrec wurde daher angewendet zur Bestimmung der chromosomalen Rekombinationsfrequenz (CRF) (Fritz *et al.*, 2000) und der chromosomalen Rekombinationsrate (CRR) (Luria und Delbrück, 1943; Capizzi und Jamesson, 1973; Meyn, 1993) des isogenen Nager-Zellpärchens V79B und CL-V4B.

Die Bestimmung der CRF genomisch integrierter HR-Kassetten erfolgte mit Hilfe von Kolonie-Tests, in welchen primäre Transfektantenkolonien, die nach pGrec-Transfektion gewachsen waren, auf GFP-exprimierende Zellen getestet wurden. Anfangs wurden für die Zelllinien separate Experimente ohne direkten Vergleich der isogenen Zelllinien (Mutante vs.

Wildtyp) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die für eine Zelllinie erhobenen Daten stark innerhalb einzelner Experimente schwanken können, z. B. wurden für die Zelllinie V79B in zwei separaten Experimenten in Generation 33 CRF-Werte von 26,9 % in 628 Kolonien und 2,9 % in 512 Kolonien ermittelt. Dies ist möglicherweise ein Effekt unterschiedlicher inter-experimenteller Transfektionseffizienzen und der Qualität der DNA (z. B. durchlaufene Auftau-Einfrier-Zyklen der Plasmid-DNA). Aus diesem Grunde wurden weiterhin die CRF-Werte der beiden Zelllinien in direkt zu vergleichenden Experimenten parallel untersucht. In drei unabhängigen Experimenten ergab die Analyse von insgesamt 1306 Kolonien der Zelllinie V79B 248 HR-Ereignisse. Dem gegenüber stehen 19 HR-Ereignisse in insgesamt 1586 Kolonien der Zelllinie CL-V4B. Die aus den Experimenten erhaltene gemittelte CRF beträgt für V79B 21,1 % und für CL-V4B 3,51 %. Damit zeigt die Zelllinie CL-V4B eine um den Faktor 6,0 hoch signifikant erniedrigte CRF (Fischer's exakter Test; $P << 0{,}001$).

Zur Bestimmung der CRR wurden Fluktuationsexperimente mit je drei stabil pGrec-transfizierten Einzelklonen für jede Zelllinie durchgeführt. Die genomische Integration der intakten HR-Kassetten war zuvor durch *Southern*-Analysen ermittelt worden. Die im Zuge des Fluktuationsexperiments herangewachsene Zellpopulation eines Einzelklons wurde auf GFP^+-exprimierende Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. Aus den erhaltenen Daten erfolgte die Berechnung der CRR (Luria und Delbrück, 1943) mit Fluktuationstabellen (Capizzi und Jameson, 1973). Für jeden Einzelklon wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, die allerdings nicht immer zu HR-Ereignissen führten. Die Ursache dafür ist nicht in mangelnder Sensitivität der Analysen zu suchen (siehe oben), sondern in dem extrem seltenen Auftreten von HR-Ereignissen in den untersuchten Klonen. Aus den erhaltenen Daten wurde eine mittlere CRR von $0{,}75 \times 10^{-6}$ für die V79B-Zelllinie berechnet. Die CRR der mutierten Zelllinie CL-V4B ist mit $0{,}28 \times 10^{-6}$ um den Faktor 2,7 reduziert.

Die Ergebnisse der beiden unterschiedlichen experimentellen Ansätze sind also in sich konsistent. Sie zeigen beide einen *hypo-rec* Phänotyp der untersuchten mutierten Zelllinie CL-V4B, der allerdings in Kolonie-Tests deutlicher sichtbar wird. Es besteht die Möglichkeit, dass die in den Fluktuationsexperimenten bestimmten CRR-Werte aufgrund der äußerst geringen Anzahl an HR-Ereignissen noch nicht genügend gesichert sind. Zur endgültigen Bestimmung der CRR dieser beiden Zelllinien mit dem Grec-System sollte daher in weiterführenden Arbeiten eine größere Zellzahl sowie weitere Einzelklone untersucht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit durch Kolonie-Tests eindeutig nachgewiesene HR-Defizienz der CL-V4B Zelllinie kann den bisher bekannten Phänotyp der mutierten Zellen (Godthelp *et al.*, 2002) gut begründen. Eine erniedrigte Anzahl von MMC-induzierten Schwesterchromatid-Austauschen deutet auf Defizienz in HR hin, die in der vorliegenden Arbeit experimentell gezeigt werden konnte. Die Zelllinie CL-V4B weist außerdem Störungen in der Schwesterchromatid-Kohäsion auf (Godthelp *et al.*, 2002). In vielen Zellen liegen die Schwesterchromatiden nicht am Zentromer miteinander verbunden und dadurch räumlich getrennt vor. Möglicherweise vermindert der vergrößerte Abstand der Schwesterchromatiden die Effizienz von HR, indem die Findung des homologen Bereichs auf dem Schwesterchromatid erschwert ist.

Die von French vorgestellte Arbeit an einer *Rad51C*-Mutante (IRS3) zeigt, dass zwei Proteinkomplexe der RAD51-paralogen Proteine, die zuerst in humanen Zellen entdeckt wurden (Masson *et al.*, 2001) (ein Komplex bestehend RAD51C und XRCC3 und ein Komplex bestehend aus Rad51B, RAD51C, RAD51D und XRCC2 im weiteren kurz BCDX2 genannt) (Masson *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2002; Wiese *et al.*, 2002) in Hamster-Zellen in ähnlicher Form vorkommen und in der Rad51C-Mutante nicht mehr detektierbar sind (French *et al.*, 2002). Diese Komplexe binden in vitro an ssDNA, der BCDX2-Komplex zusätzlich an Einzelstrangbrüche und -lücken in dsDNA (Masson *et al.*, 2001). Die Autoren der beiden Artikel (Masson *et al.*, 2001; French *et al.*, 2002) deuten dies als eine mögliche Rolle dieser Komplexe in der Rekrutierung von RAD51-Protein an die durch MMC verursachten DNA-Schäden. Dem zufolge würden die RAD51-paralogen Proteine also eine Rolle in den frühen Schritten der HR, bei dem Aufbau der Nukleoproteinfilamente spielen, also vor der Stranginvasion.

Da HR-Ereignisse in den Zellen der Mutante gefunden werden (diese Arbeit), sollte eine solche frühe Rolle von RAD51Cp für homologe Rekombinationsprozesse nicht existentiell sein, sondern offensichtlich unterstützend (French *et al.*, 2002; Godthelp *et al.*, 2002) diese Arbeit). Möglicherweise wird ein Teil der noch zu beobachtenden HR-Ereignisse durch die *in vitro* gezeigte ssDNA-Bindung von RAD51p ohne RAD51C-Proteine, bzw. mit anderen akzessorischen Faktoren wie RP-A bewerkstelligt (Baumann *et al.*, 1996). So kann auch in der IRS3 Mutante, ebenso wie in CL-V4B und in der *Rad51C*-Hühner-DT-40 *knock-out*-Mutante (Takata *et al.*, 2001), RAD51-Foci-Formierung nach DNA-Schadens-Induktion noch beobachtet werden, wenn auch stark vermindert. Es ist nicht auszuschließen, dass ein Großteil der detektierten HR-Ereignisse der *Rad51C*-Mutante auf RAD51-unabhängigem *single strand annealing* (SSA) beruhen kann. Mit dem hier vorgestellten pGrec-System sollte

es in weiterführenden Analysen möglich sein, die molekularen Ereignisse in den rekombinanten Zellen zu bestimmen, da Genkonversions- vs. SSA-Ereignisse molekularbiologisch differenzierbar sind.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse klar, dass ein Defekt im *Rad51C*-Gen einen deutlich messbaren HR-Defekt der Zellen bewirkt. Die in *Rad51C*-defekten Zellen reduzierte HR korreliert mit der von anderen Gruppen gezeigten genomischen Instabilität (French *et al.*, 2002; Godthelp *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse liefern also einen weiteren experimentellen Hinweis auf die Bedeutung der HR für die Erhaltung der genomischen Integrität (siehe Kapitel 1.5).

5.2.2 Erhöhte extrachromosomale Rekombinationsraten in *Atm*-defekten Zellen

Kultivierte Zellen von Ataxia-telangiectasia (A-T)-Patienten sind charakterisiert durch zelluläre und chromosomale Strahlenüberempfindlichkeit. Auch unbestrahlte A-T-Zellen zeigen eine erhöhte Anzahl an Chromosomen-Aberrationen, die mit erhöhten spontanen Rekombinationsraten von chromosomal integrierten HR-Vektoren (Meyn, 1993; Luo *et al.*, 1996) korreliert. Ob in A-T-Zellen tatsächlich DNA-Reparaturdefekte vorliegen, oder ob eine bereits früher postulierte veränderte Chromatinstruktur in A-T-Zellen die spontane und strahlen-induzierte chromosomale Instabilität bedingen, ist weiterhin ungeklärt. Das in A-T-Zellen defekte Gen, *Atm*, kodiert für eine putative Proteinkinase, die unter anderem auch RAD51- und c-ABL-Proteine phosphorylieren und regulieren kann (Chen *et al.*, 1999). Es stellt sich daher die Frage, ob eine durch eine homozygot vorliegende *Atm*-Mutation bedingte De-Regulation von Rekombinationsproteinen für die spontane Hyperrekombination und nachfolgende spontane sowie strahlen-induzierte Anhäufung chromosomaler Aberrationen verantwortlich sein könnte.

Um einen möglichen generellen HR-Defekt in A-T-Zellen, unabhängig von der Chromatinstruktur und vom spezifischen Integrationsort des HR-Vektors, zu testen, wurde daher das isogene Zellpärchen AT-YZ (komplementierter Phänotyp) und AT-pEBS (A-T-Phänotyp) mit Hilfe des in humanen Zellen episomal vorliegenden pGrec-Vektors hinsichtlich ihrer HR-Häufigkeiten verglichen. Weitere Wildtyp-Kontrollen erschienen nicht sinnvoll, da die Streuung der HR-Raten und -Frequenzen in ‚normalen' Wildtyp-Zellen nicht bekannt ist.

Daher wurden ausschließlich isogene Zellen verglichen, die sich lediglich in der ektopischen ATM-Expression unterscheiden.

Die Ermittlung der extrachromosomalen Rekombinationsfrequenz (ERF) in Kolonie-Tests erbrachte erstaunlicherweise, dass die ektopisch *ATM*-komplementierten AT-YZ-Zellen einen um den Faktor 6,4-fach erhöhten rekombinanten Phänotyp im Vergleich zu AT-pEBS-Zellen aufweisen (P = 0,007). Dem gegenüber steht das statistisch hochsignifikante Ergebnis der Fluktuationsexperimente, das eine ca. 40-fach erhöhte extrachromosomale Rekombinationsrate (ERR) für die nicht-komplementierten, *Atm*-defizienten Zellen zeigt. Das überraschende Ergebnis der Kolonie-Tests kann nicht mit Unterschieden in der Anzahl der pGrec-Plasmide in den untersuchten Populationen erklärt werden. Da beide Zelllinien aus einer gemeinsamen Ursprungszelllinie hervorgegangen sind, ist anzunehmen, dass die Anzahl der aufgenommenen und stabil weitervererbten pGrec-Plasmide in etwa gleich ist, sofern die *ATM*-Expression keinen Einfluß auf diesen Parameter hat. Auch konnte bei den für Fluktuationsanalysen verwendeten AT-pEBS-pGrec-Subklonen mit deutlich unterschiedlicher pGrec-Plasmidanzahl kein Einfluss der pGrec-Kopienzahl auf die ERR erkannt werden. Zusätzlich dazu zeigt der durch *Southern*-Analysen charakterisierte Subklon AT-YZ-pGrec11 bei einer mindestens gleich hohen pGrec-Anzahl wie der Klon AT-pEBS-pGrec9 eine hochsignifikant erniedrigte HR-Rate.

Bei Betrachtung des Ergebnisse der Kolonie-Test-Experimente muss betont werden, dass die Zahlen auf der Detektion von insgesamt nur 17 HR-Ereignissen in 1391 untersuchten Kolonien beruhen, die allerdings statistisch deutliche Signifikanz bzgl. des Unterschieds der Zellinien aufweisen (Fischer's exakter Test, P = 0,007). Da in diesem Experiment keine ‚echte' Wildtyp-Kontrolle mitgeführt werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass z. B. die AT-pEBS-Zellen einen A-T-typischen, erhöhten ERF-Wert zeigen, der aufgrund eines dominant-negativen Effekts durch konstitutiv erhöhte, nicht-physiologische ATM-Expression in wenigen Einzelklonen der AT-YZ-Population weiter angehoben wurde.

Sollten dominant-negative Effekte die Kolonie-Tests verfälscht haben, so kommen diese mit einiger Wahrscheinlichkeit in den Fluktuationsanalysen nicht zum Tragen: Das Ergebnis der Kolonie-Tests basiert auf sehr wenigen HR-Ereignissen innerhalb einer großen Anzahl von Kolonien. Es wäre also nur ein geringer Anteil der Einzelklone von der dominant-negativen ATM-Expression betroffen. Somit ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die für Fluktuationsexperimente zufällig ausgewählten Einzelklone bzgl. HR eine tolerierbare ATM-Expression aufweisen. Darüberhinaus sind bei den Fluktuationsexperimenten sehr viel längere

Kultivierungszeiten erforderlich, innerhalb derer sich eine ‚physiologische' ATM-Konzentration (durch Wachstumsvorteile) in den Zellen einpendeln kann. Die Bestimmung von ATM-Proteinmengen in den isolierten Einzelklonen der AT-YZ Zelllinie konnte aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden.

Eine weitere Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse könnte darin liegen, dass die nicht-komplementierten AT-pEBS-Zellen nach der pGrec-Vektoraufnahme einige Zeit benötigen, um den *hyper*-rekombinanten Phänotyp auszubilden, der deshalb in den durchgeführten Kolonie-Test-Experimenten erst verspätet erkannt werden konnte. In den AT-pEBS-Zellen konnten erst in der 29. Generation HR-Ereignisse detektiert wurden, in AT-YZ-Zellen schon nach 22 Generationen. Gestützt würde diese Hypothese durch die Beobachtung, dass A-T-Zellen bei längerer Kultivierung zu Veränderungen neigen, zum Beispiel zu erhöhter Verkürzung der Telomere (Pandita *et al.*, 1995; Metcalfe *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1996; Vaziri *et al.*, 1997; Fritz *et al.*, 2000). Der möglicherweise spätere, aber dann schnellere Anstieg von HR in A-T-Zellen wäre ein neuer Aspekt, der die komplexen Themengebiete DNA-Reparatur, genomische Instabilität und Alterung direkt miteinander verknüpfen würde.

In den Fluktuationsexperimenten mit dem episomalen pGrec-Rekombinationssubstrat kann eine deutliche ATM-abhängige Reduktion der extrachromosomalen HR-Rate gesehen werden. Dieses Ergebnis widerspricht früheren Arbeiten, in denen keine erhöhte ERR in AT-Zellen gefunden wurde (Meyn, 1993; Luo *et al.*, 1996). Da aber in den genannten Arbeiten linearisierte DNA als Rekombinationssubstrat verwendet wurde, die genomisch integrieren musste, sind die experimentellen Ansätze nicht vergleichbar. Außerdem konnten in den genannten Arbeiten keine isogenen Zellpärchen verglichen werden. Allerdings kann bei den hier gezeigten Ergebnissen auch nicht ausgeschlossen werden, dass eine genomische Integration der HR-Kassette stattgefunden hatte, da eine Isolation von GFP^+-Zellen zur weiteren genomischen Anyalyse aus zeitlichen Gründen nicht durchführbar war.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die HR-Messung mit einem episomalen HR-Substrat in einer ektopisch komplementierten Mutanten-Zelllinie mehrere Variablen vereint, die das Resultat in seiner Aussagekraft vermindern können. Eine solche Variable ist möglicherweise die in den Zellen vorliegende unterschiedliche Kopienanzahlen des pGrec-Plasmids, was allerdings in dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte. Auch besteht die Möglichkeit der genomischen Integration der HR-Kassette. Ein wichtiger Parameter scheint der zelluläre Zustand des zu untersuchenden Genproduktes zu sein, also ob z.B. heterogene Populationen durch unterschiedlich stark ektopisch exprimierte Gene vorliegen, oder

homogenere Populationen, in welchen durch einen chromosomal fixierten ‚*knock-out*' keine unterschiedliche Expressionsstärken des zu untersuchenden Gens möglich sind. Der Vergleich parentaler Zellen mit chromosomal mutierten Abkömmlingen sollte zuverlässigere Daten zu den sehr seltenen HR-Ereignissen erzeugen, als der Vergleich mit Zellen, welche durch konstitutive, ektopische Expression eines Gens entstanden sind.

In weiterführenden Arbeiten soll versucht werden, die Reduktion extrachromosomaler Rekombination durch ATM zu bestätigen. Sollte dies der Fall sein, so wird eine regulierende oder auch direkte Rolle von ATM in Rekombinationsprozessen, unabhängig von bestimmten Chromatinstrukturen und -bereichen, wahrscheinlich: Ein mögliches Beispiel hierfür hierfür liefert auch die ektopische Überexpression einer dominant-negativ wirkenden Topoisomerase III-alpha (Top3α), die einige Aspekte des $Atm^{(-/-)}$-Phänotyps, darunter auch die erhöhte mitotische Rekombination, unterdrückt (Meyn *et al.*, 1993; Fritz *et al.*, 1997) . Das Top3α-Protein interagiert funktionell mit der Bloom's Syndrom-Helikase BLM (Wu *et al.*, 2000), deren Expression durch ATM reguliert wird (Ababou *et al.*, 2000). Der Ausfall von BLM korreliert ebenfalls mit erhöhter Rekombination, wie anhand der erhöhten Rate an SCEs in BS-Zellen ersichtlich ist (Übersicht in Enomoto, 2001). Offensichtlich sind funktionelle TOP3α/BLM -Komplexe direkt an HR beteiligt und durch ATM reguliert.

Sowohl A-T als auch BS sind klinisch durch ausgeprägte Immundefizienzen charakterisiert. Neueste Arbeiten konnten nun erstmalig zeigen, dass ATM und NBS wahrscheinlich an immunologischen Rekombinationsprozessen, der *switch*-Rekombination und der V(D)J-Rekombination beteiligt sind (Pan *et al.*, 2002; Perkins *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse bieten erste molekulare Erklärungsmöglichkeiten für die klinisch auftretende Immundefizienz der Patienten. Die klinische beobachtete Infertilität von A-T-Patienten korreliert mit der Lokalisierung des ATM-Proteins an synaptonemale Komplexe homologer Chromosomen im Pachytän meiotischer Hodenzellen (Keegan *et al.*, 1996). Auch hier wird eine Rolle von ATM in Rekombinationsprozessen, und zwar im Zuge der Meiose diskutiert.

Zusammenfassend unterstützen die Daten, dass ATM direkt oder/und über die Regulation von anderen Rekombinationsproteinen an mehreren Mechanismen der homologen Rekombination beteiligt sein sollte. Defekte in der HR durch fehlendes ATM-Protein führen dann in Immunzellen zu Immundefizienz, in meiotischen Zellen zu Infertilität. In mitotischen nicht-Immunzellen äußert sich dieser Defekt in genomischer Instabilität und Strahlen-empfindlichkeit, wie anhand der zellulären und klinischen Phänotypen von A-T deutlich wird.

Die weitere Analyse von HR mit verbesserten Testsystemen sollte, nicht nur für A-T, den Beitrag von HR zur Reparatur und Stabilität des Genoms mitotischer Säugerzellen bestätigen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Vektor (pGrec) zur Messung der homologen Rekombination (HR) in mitotischen Säugerzellen kloniert und etabliert. pGrec enthält eine HR-Kassette mit zwei Allelen des *GFP (green fluorescent protein)*-Gens, die durch differentielle Mutagenese inaktiviert wurden. Diese Allele können nur durch HR zu einem Wildtyp-Allel rekonstituiert werden, dessen zelluläre Expression mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und Durchflusszytometrie nachweisbar ist. Die Detektion mittels Durchfluss-zytometer erlaubt es, seltene GFP^+-Zellen zu isolieren und als rekombinante Subklone zur weiteren molekularbiologischen, biochemischen und zellulären Analyse zu etablieren.

Das pGrec-HR-Meßsystem wurde an zwei isogenen Zellpärchen angewendet. Nach chromosomaler Integration in die Nager-Zelllinien V79B und deren mutierte Variante CL-V4B (*Rad51C*$^{(-/-)}$ (Godthelp *et al.*, 2002)) konnte die vermutete Störung der HR in den *Rad51C*-defizienten CL-V4B-Zellen (Masson *et al.*, 2001; Takata *et al.*, 2001; French *et al.*, 2002; Godthelp *et al.*, 2002) eindeutig nachgewiesen werden: Im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie V79B ist die intrachromosomale Rekombinationsfrequenz der HR-Kassette in der *Rad51C*-Mutante statistisch signifikant erniedrigt (6-fach). Ebenso scheint die Rate der homologen Rekombination in Fluktuations-Analysen reduziert zu sein (2,7-fach). Somit konnte erstmalig direkt eine Beteiligung von *Rad51C* an HR gezeigt werden, deren Störung mit der Mutagenüberempfindlichkeit (MMS) und chromosomalen Instabilität von CL-V4B-Zellen korreliert.

Kultivierte Zellen von A-T-Patienten sind charakterisiert durch chromosomale Hyper-Rekombination (Meyn, 1993; Luo *et al.*, 1996). Das pGrec-System wurde in AT-Zellen auf seine Anwendbarkeit zur Messung extrachromosomaler Rekombination getestet, um ungleiche Einflüsse der Chromatinstruktur an einem spezifischen Integrationsort zu umgehen. Das Zellpärchen AT-pEBS (*Atm*$^{(-/-)}$, transfiziert mit leerem Kontroll-Vektor) und AT-YZ (Atm$^{(-/-)}$, ATM ektopisch komplementiert (Ziv *et al.*, 1997)) wurde mit der für humane Zellen episomalen Version des pGrec-Vektors transfiziert. Die Rekombinationsrate in zwei untersuchten Subklonen der AT-pEBS-Zelllinie war im Vergleich zu zwei AT-YZ-Subklonen statistisch signifikant erhöht (34 - 43-fach). Somit wäre erstmals eine Hyperrekombination von AT-Zellen auch in episomalen Loci gezeigt. Die Bestimmung der Rekombinationsfrequenz ergab jedoch, dass diese in der Gesamtpopulation ATM-komplementierter AT-Zellen erhöht zu sein scheint (6-fach). Mögliche Gründe für die

unterschiedlichen Ergebnisse, die mit verschiedenen experimentellen Ansätzen in den AT-Zelllinien erhalten wurden, werden diskutiert.

Das pGrec-System ist als leicht modifizierbarer Vektor konzipiert und somit prinzipiell in allen Säugerzellen anwendbar. Insgesamt stellt pGrec also ein sehr sensitives und nützliches Werkzeug zur Charakterisierung von HR auf molekular-biologischer, biochemischer und zellulärer Ebene dar.

7 Literaturverzeichnis

Ababou, M., Dutertre, S., Lecluse, Y., Onclercq, R., Chatton, B. und Amor-Gueret, M. (2000). ATM-dependent phosporylation and accumulation of endogenous BLM protein in response to ionizing radiation. *Oncogene* **19**(52): 5955-63.

Albala, J. S., Thelen, M. P., Prange, C., Fan, W., Christensen, M., Thompson, L. H. und Lennon, G. G. (1997). Identification of a novel human RAD51 homolog, RAD51B. *Genomics* **46**(3): 476-9.

Bai, Y. und Symington, L. S. (1996). A Rad52 homolog is required for RAD51-independent mitotic recombination in Saccharomyces cerevisiae. *Genes and Development* **10**(16): 2025-37.

Baumann, P., Benson, F. E. und West, S. C. (1996). Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* **87**(4): 757-66.

Baumann, P. und West, S. C. (1998). Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends in Biochemical Sciences* **23**(7): 247-51.

Benson, F. E., Baumann, P. und West, S. C. (1998). Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature* **391**(6665): 401-4.

Bishop, D. K., Ear, U., Bhattacharyya, A., Calderone, C., Beckett, M., Weichselbaum, R. R. und Shinohara, A. (1998). Xrcc3 is required for assembly of Rad51 complexes in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **273**(34): 21482-8.

Blander, G., Kipnis, J., Leal, J. F., Yu, C. E., Schellenberg, G. D. und Oren, M. (1999). Physical and functional interaction between p53 and the Werner's syndrome protein. *Journal of Biological Chemistry* **274**(41): 29463-9.

Bollag, R. J., Waldman, A. S. und Liskay, R. M. (1989). Homologous recombination in mammalian cells. *Annual Reviews of Genetics* **23**: 199-225.

Brosh, R. M., Li, J. L., Kenny, M. K., Karow, J. K., Cooper, M. P., Kureekattil, R. P., Hickson, I. D. und Bohr, V. A. (2000). Replication protein A physically interacts with the Bloom's syndrome protein and stimulates its helicase activity. *The Journal of Biological Chemistry* **275**(31): 23500-8.

Brosh, R. M., Orren, D. K., Nehlin, J. O., Ravn, P. H., Kenny, M. K., Machwe, A. und Bohr, V. A. (1999). Functional and physical interaction between WRN helicase and human replication protein A. *Journal of Biological Chemistry* **274**(26): 18341-50.

Buchhop, S., Gibson, M. K., Wang, X. W., Wagner, P., Sturzbecher, H. W. und Harris, C. C. (1997). Interaction of p53 with the human Rad51 protein. *Nucleic Acids Research* **25**(19): 3868-74.

Capizzi, R. L. und Jameson, J. W. (1973). A table for the estimation of the spontaneous mutation rate of cells in culture. *Mutation Research* **17**(1): 147-8.

Cartwright, R., Tambini, C. E., Simpson, P. J. und Thacker, J. (1998). The XRCC2 DNA repair gene from human and mouse encodes a novel member of the recA/RAD51 family. *Nucleic Acids Research* **26**(13): 3084-9.

Chen, G., Yuan, S. S., Liu, W., Xu, Y., Trujillo, K., Song, B., Cong, F., Goff, S. P., Wu, Y., Arlinghaus, R., Baltimore, D., Gasser, P. J., Park, M. S., Sung, P. und Lee, E. Y. (1999). Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *Journal of Biological Chemistry* **274**(18): 12748-52.

Coates, P. J. (2002). Markers of senescence? *The Journal of Pathology* **196**(4): 371-3.

Critchlow, S. E., Bowater, R. P. und Jackson, S. P. (1997). Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Current Biology* **7**(8): 588-98.

Critchlow, S. E. und Jackson, S. P. (1998). DNA end-joining: from yeast to man. *Trends in Biochemical Sciences* **23**(10): 394-8.

Davies, A. A., Masson, J. Y., McIlwraith, M. J., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A. R. und West, S. C. (2001). Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. **7**(2): 273-82.

Dosanjh, M. K., Collins, D. W., Fan, W., Lennon, G. G., Albala, J. S., Shen, Z. und Schild, D. (1998). Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes. *Nucleic Acids Research* **26**(5): 1179-84.

Dronkert, M. L. G. und Kanaar, R. (2001). Repair of interstrand cross-links. *Mutation Research* **486**: 217-247.

Ellis, N. A., Proytcheva, M., Sanz, M. M., Ye, T. Z. und German, J. (1999). Transfection of BLM into cultured bloom syndrome cells reduces the sister-chromatid exchange rate toward normal. *American Journal of Human Genetics* **65**(5): 1368-74.

Enomoto, T. (2001). Functions of RecQ Family Helicases: Possible Involvement of Bloom's and Werner's Syndrome Gene Products in Guarding Genome Integrity during DNA Replication. *J. Biochem.* **129**: 501-507.

Fishman-Lobell, J., Rudin, N. und Haber, J. E. (1992). Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Molecular and Cellular Biology* **12**(3): 1292-303.

French, C. A., Masson, J.-Y., Griffin, C. S., O'Regan, P., West, S. C. und Thacker, J. (2002). Role of mammalian Rad51L2 (Rad51C) in recombination and genetic stability. *Journal of Biological Chemistry*.

Fritz, E. und Digweed, M. (2002). Nijmegen Breakage Syndrome. Chromosomal Instability and Aging: Basic Science and Clinical Implication. Hisuma, F., Martin, G. und Weissman, F. New York, Dekker. **in Druck**.

Fritz, E., Elsea, S. H., Patel, P. I. und Meyn, M. S. (1997). Overexpression of a truncated human topoisomerase III partially corrects multiple aspects of the ataxia-telangiectasia phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(9): 4538-42.

Fritz, E., Friedl, A. A., Zwacka, R. M., Eckardt-Schupp, F. und Meyn, M. S. (2000). The yeast TEL1 gene partially substitutes for human ATM in suppressing hyperrecombination, radiation-induced apoptosis and telomere shortening in A-T cells. *Molecular Biology of the Cell* **11**(8): 2605-16.

Furuichi, Y. (2001). Premature aging and predisposition to cancers caused by mutations in RecQ family helicases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **928**: 121-31.

Game, J. C. und Mortimer, R. K. (1974). A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. *Mutation Research* **24**(3): 281-92.

Godthelp, B. C., Wiegant, W. W., van Duijn-Goedhart, A., Schärer, O. D., van Buul, P. P. W., Kanaar, R. und Zdzienicka, M. Z. (2002). Mammalian Rad51C contributes to DNA cross-link resistance, sister chromatid cohesio and genomic stability. *Nucleic Acids Research* **30**(10): in Druck.

Golub, E. I., Gupta, R. C., Haaf, T., Wold, M. S. und Radding, C. M. (1998). Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Research* **26**(23): 5388-93.

Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M. und Lieber, M. R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* **388**(6641): 492-5.

Groger, R. K., Morrow, D. M. und Tykocinski, M. L. (1989). Directional antisense and sense cDNA cloning using Epstein-Barr virus episomal expression vectors. *Gene* **81**(2): 285-94.

Gupta, R. C., Bazemore, L. R., Golub, E. I. und Radding, C. M. (1997). Activities of human recombination protein Rad51. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(2): 463-8.

Haaf, T., Golub, E. I., Reddy, G., Radding, C. M. und Ward, D. C. (1995). Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(6): 2298-302.

Haber, J. E. (1999). DNA recombination: the replication connection. *Trends in Biochemical Sciences* **24**(7): 271-5.

Herzing, L. B. und Meyn, M. S. (1993). Novel lacZ-based recombination vectors for mammalian cells. *Gene* **137**(2): 163-9.

Hiom, K. (1999). Dna repair: Rad52 - the means to an end. *Current Biology* **9**(12): R446-8.

Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**(6835): 366-74.

Ivanov, E. L. und Haber, J. E. (1995). RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology* **15**(4): 2245-51.

Ivanov, E. L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J. und Haber, J. E. (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **142**(3): 693-704.

Jasin, M. (1996). Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends in Genetics* **12**(6): 224-8.

Jeggo, P. A., Carr, A. M. und Lehmann, A. R. (1998). Splitting the ATM: distinct repair and checkpoint defects in ataxia-telangiectasia. *Trends in Genetics* **14**(8): 312-6.

Jeong Yu, S. J. und Carroll, D. (1992). Test of the double-strand-break repair model of recombination in Xenopus laevis oocytes. *Molecular and Cellular Biology* **12**(1): 112-9.

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

Johnson, R. D., Liu, N. und Jasin, M. (1999). Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature* **401**(6751): 397-9.

Kanaar, R., Hoeijmakers, J. H. und van Gent, D. C. (1998). Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. **8**(12): 483-9.

Karran, P. (2000). DNA double strand break repair in mammalian cells. *Current Opinion in Genetics and Development* **10**(2): 144-50.

Keegan, K. S., Holtzman, D. A., Plug, A. W., Christenson, E. R., Brainerd, E. E., Flaggs, G., Bentley, N. J., Taylor, E. M., Meyn, M. S., Moss, S. B., Carr, A. M., Ashley, T. und Hoekstra, M. F. (1996). The Atr and Atm protein kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes. *Genes and Development* **10**(19): 2423-37.

Khyse-Anderson, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203-207.

Kupiec, M. (2000). Damage-induced recombination in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mutation Research* **451**(1-2): 91-105.

Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y. und Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science* **113 (Pt 20)**: 3613-22.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259): 680-5.

Lambert, S., Saintigny, Y., Delacote, F., Amiot, F., Chaput, B., Lecomte, M., Huck, S., Bertrand, P. und Lopez, B. S. (1999). Analysis of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cell, using tandem repeat sequences. *Mutation Research* **433**(3): 159-68.

Lederberg, E. und Cohen, S. (1974). Transformation of Salmonella typhimurium by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **119**: 1072-1074.

Li, B. und Comai, L. (2000). Functional interaction between Ku and the werner syndrome protein in DNA end processing. *The Journal of Biological Chemistry* **275**(37): 28349-52.

Liang, F., Han, M., Romanienko, P. J. und Jasin, M. (1998). Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(9): 5172-7.

Liang, F., Romanienko, P. J., Weaver, D. T., Jeggo, P. A. und Jasin, M. (1996). Chromosomal double-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(17): 8929-33.

Lim, D. S. und Hasty, P. (1996). A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Molecular and Cellular Biology* **16**(12): 7133-43.

Lin, F. L., Sperle, K. und Sternberg, N. (1984). Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Molecular and Cellular Biology* **4**(6): 1020-34.

Lin, F. L., Sperle, K. und Sternberg, N. (1990). Repair of double-stranded DNA breaks by homologous DNA fragments during transfer of DNA into mouse L cells. *Molecular and Cellular Biology* **10**(1): 113-9.

Liu, N., Lamerdin, J. E., Tebbs, R. S., Schild, D., Tucker, J. D., Shen, M. R., Brookman, K. W., Siciliano, M. J., Walter, C. A., Fan, W., Narayana, L. S., Zhou, Z. Q., Adamson, A. W., Sorensen, K. J., Chen, D. J., Jones, N. J. und Thompson, L. H. (1998). XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. **1**(6): 783-93.

Liu, N., Schild, D., Thelen, M. P. und Thompson, L. H. (2002). Involvement of Rad51C in two distinct protein complexes of Rad51 paralogs in human cells. *Nucleic Acids Research (Online)* **30**(4): 1009-15.

Liu, Y. und Maizels, N. (2000). Coordinated response of mammalian Rad51 and Rad52 to DNA damage. **1**(1): 85-90.

Luo, C. M., Tang, W., Mekeel, K. L., DeFrank, J. S., Anne, P. R. und Powell, S. N. (1996). High frequency and error-prone DNA recombination in ataxia telangiectasia cell lines. *Journal of Biological Chemistry* **271**(8): 4497-503.

Luria, S. E. und Delbrück, M. (1943). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resitance. *Genetics* **28**: 491-511.

Marians, K. J. (2000). Replication and recombination intersect. *Current Opinion in Genetics and Development* **10**(2): 151-6.

Maryon, E. und Carroll, D. (1991). Characterization of recombination intermediates from DNA injected into Xenopus laevis oocytes: evidence for a nonconservative mechanism of homologous recombination. *Molecular and Cellular Biology* **11**(6): 3278-87.

Masson, J.-Y., Tarsounas, M. C., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Shah, R., McIlwraith, Benson, F. E. und West, S. C. (2001). Identification and purifivation of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes and Development* **15**: 3296-3307.

Mazin, A. V., Bornarth, C. J., Solinger, J. A., Heyer, W. D. und Kowalczykowski, S. C. (2000). Rad54 protein is targeted to pairing loci by the Rad51 nucleoprotein filament. **6**(3): 583-92.

Metcalfe, J. A., Parkhill, J., Campbell, L., Stacey, M., Biggs, P., Byrd, P. J. und Taylor, A. M. (1996). Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia. *Nature Genetics* **13**(3): 350-3.

Meyn, M. S. (1993). High spontaneous intrachromosomal recombination rates in ataxia-telangiectasia. *Science* **260**(5112): 1327-30.

Meyn, M. S., Lu Kuo, J. M. und Herzing, L. B. (1993). Expression cloning of multiple human cDNAs that complement the phenotypic defects of ataxia-telangiectasia group D fibroblasts. *American Journal of Human Genetics* **53**(6): 1206-16.

Miller, K. A., Yoshikawa, D. M., McConnell, I. R., Clark, R., Schild, D. und Albala, J. S. (2002). RAD51C interacts with RAD51B and is central to a larger protein complex in vivo exclusive of RAD51. *The Journal of Biological Chemistry* **277**(10): 8406-11.

Mohaghegh, P. und Hickson, I. D. (2001). DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature aging disorders. *Human Molecular Genetics* **10**(7): 741-746.

Moore, J. K. und Haber, J. E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology* **16**(5): 2164-73.

Morgenstern, J. P. und Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Research (Online)* **18**(12): 3587-96.

Mortensen, U. H., Bendixen, C., Sunjevaric, I. und Rothstein, R. (1996). DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(20): 10729-34.

Moynahan, M. E., Chiu, J. W., Koller, B. H. und Jasin, M. (1999). Brca1 controls homology-directed DNA repair. **4**(4): 511-8.

Moynahan, M. E., Pierce, A. J. und Jasin, M. (2001). BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. **7**(2): 263-72.

Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W. R. und Gloor, G. B. (1994). Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Molecular and Cellular Biology* **14**(3): 1613-25.

McElhinny N., S. A., Snowden, C. M., McCarville, J. und Ramsden, D. A. (2000). Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Molecular and Cellular Biology* **20**(9): 2996-3003.

O'Regan, P., Wilson, C., Townsend, S. und Thacker, J. (2001). XRCC2 is a nuclear RAD51-like protein required for damage-dependent RAD51 focus formation without the need for ATP binding. *Journal of Biological Chemistry* **276**(25): 22148-53.

Ogawa, T., Yu, X., Shinohara, A. und Egelman, E. H. (1993). Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science* **259**(5103): 1896-9.

Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W. und Rothstein, R. J. (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**(10): 6354-8.

Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W. und Rothstein, R. J. (1983). Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids. *Methods in Enzymology* **101**: 228-45.

Pan, Q., Petit-Frere, C., Lahdesmaki, A., Gregorek, H., Chrzanowska, K. H. und Hammarstrom, L. (2002). Alternative end joining during switch recombination in patients with Ataxia-Telangiectasia. *European Journal of Immunology* **35**(5): 1300-1308.

Pandita, T. K., Pathak, S. und Geard, C. R. (1995). Chromosome end associations, telomeres and telomerase activity in ataxia telangiectasia cells. *Cytogenetics and Cell Genetics* **71**(1): 86-93.

Paques, F., Leung, W. Y. und Haber, J. E. (1998). Expansions and contractions in a tandem repeat induced by double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology* **18**(4): 2045-54.

Pastink, A., Eeken, J. C. und Lohman, P. H. (2001). Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mutation Research* **480-481**: 37-50.

Perkins, E. J., Nair, A., Cowley, D. O., Van_Dyke, T., Chang, Y. und Ramsden, D. A. (2002). Sensing of intermediates in V(D)J recombination by ATM. *Genes & Development* **16**(2): 159-64.

Petukhova, G., Stratton, S. und Sung, P. (1998). Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature* **393**(6680): 91-4.

Petukhova, G., Stratton, S. A. und Sung, P. (1999). Single strand DNA binding and annealing activities in the yeast recombination factor Rad59. *Journal of Biological Chemistry* **274**(48): 33839-42.

Pfeiffer, P., Thode, S., Hancke, J. und Vielmetter, W. (1994). Mechanisms of overlap formation in nonhomologous DNA end joining. *Molecular and Cellular Biology* **14**(2): 888-95.

Phillips, J. W. und Morgan, W. F. (1994). Illegitimate recombination induced by DNA double-strand breaks in a mammalian chromosome. *Molecular and Cellular Biology* **14**(9): 5794-803.

Pierce, A. J., Johnson, R. D., Thompson, L. H. und Jasin, M. (1999). XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes and Development* **13**(20): 2633-8.

Pittman, D. L., Weinberg, L. R. und Schimenti, J. C. (1998). Identification, characterization, and genetic mapping of Rad51d, a new mouse and human RAD51/RecA-related gene. *Genomics* **49**(1): 103-11.

Potter, H., Weir, L. und Leder, P. (1984). Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**(22): 7161-5.

Prince, P. R., Emond, M. J. und Monnat, R. J. (2001). Loss of Werner syndrome protein function promotes aberrant mitotic recombination. *Genes and Development* **15**: 933-938.

Raderschall, E., Bazarov, A., Cao, J., Lurz, R., Smith, A., Mann, W., Ropers, H.-H., Sedivy, J. M., Golub, E. I., Fritz, E. und Haaf, T. (2002). Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. *Journal of Cell Science* **115**(1): 153-164.

Raderschall, E., Golub, E. I. und Haaf, T. (1999). Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(5): 1921-6.

Ramsden, D. A. und Gellert, M. (1998). Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *Embo Journal* **17**(2): 609-14.

Ristic, D., Wyman, C., Paulusma, C. und Kanaar, R. (2001). The architecture of the human Rad54-DNA complex provides evidence for protein translocation along DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(15): 8454-60.

Roth (1998). Illegitimate Recombination in mammalian cells. Genetic recombination. Kucherlapti, R. und Smith, G., R. Washington, D.C., American Society for Microbiology**:** 621-653.

Rudin, N. und Haber, J. E. (1988). Efficient repair of HO-induced chromosomal breaks in Saccharomyces cerevisiae by recombination between flanking homologous sequences. *Molecular and Cellular Biology* **8**(9): 3918-28.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saparbaev, M., Prakash, L. und Prakash, S. (1996). Requirement of mismatch repair genes MSH2 and MSH3 in the RAD1-RAD10 pathway of mitotic recombination in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **142**(3): 727-36.

Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T. und Livingston, D. M. (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* **88**(2): 265-75.

Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D. S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P. und Bradley, A. (1997). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* **386**(6627): 804-10.

Shinohara, A., Ogawa, H. und Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in S. cerevisiae is a RecA-like protein. *Cell* **69**(3): 457-70.

Shinohara, A., Shinohara, M., Ohta, T., Matsuda, S. und Ogawa, T. (1998). Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes to Cells* **3**(3): 145-56.

Southern, E. M. (1974). An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Analytical Biochemistry* **62**(1): 317-8.

Stauber, R. H., Horie, K., Carney, P., Hudson, E. A., Tarasova, N. I., Gaitanaris, G. A. und Pavlakis, G. N. (1998). Development and applications of enhanced green fluorescent protein mutants. *Biotechniques* **24**(3): 462-6, 468-71.

Sturzbecher, H. W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U. und Buchhop, S. (1996). p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *Embo Journal* **15**(8): 1992-2002.

Sugawara, N. und Haber, J. E. (1992). Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Molecular and Cellular Biology* **12**(2): 563-75.

Sugawara, N., Ira, G. und Haber, J. E. (2000). DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of Saccharomyces cerevisiae RAD59 in double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology* **20**(14): 5300-9.

Sugawara, N., Ivanov, E. L., Fishman-Lobell, J., Ray, B. L., Wu, X. und Haber, J. E. (1995). DNA structure-dependent requirements for yeast RAD genes in gene conversion. *Nature* **373**(6509): 84-6.

Sugawara, N., Paques, F., Colaiacovo, M. und Haber, J. E. (1997). Role of Saccharomyces cerevisiae Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(17): 9214-9.

Sugiyama, T., Zaitseva, E. M. und Kowalczykowski, S. C. (1997). A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the Saccharomyces cerevisiae Rad51 protein. *Journal of Biological Chemistry* **272**(12): 7940-5.

Sung, P. (1994). Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science* **265**(5176): 1241-3.

Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J. und Stahl, F. W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**(1): 25-35.

Szostak, J. W. und Wu, R. (1979). Insertion of a genetic marker into the ribosomal DNA of yeast. *Plasmid* **2**(4): 536-54.

Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Fukushima, T., Morrison, C., Albala, J. S., Swagemakers, S. M., Kanaar, R., Thompson, L. H. und Takeda, S. (2000). The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Molecular and Cellular Biology* **20**(17): 6476-82.

Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi Iwai, Y., Shinohara, A. und Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo Journal* **17**(18): 5497-508.

Takata, M., Sasaki, M. S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L. H. und Takeda, S. (2001). Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Molecular and Cellular Biology* **21**(8): 2858-66.

Tan, T. L., Essers, J., Citterio, E., Swagemakers, S. M., de_Wit, J., Benson, F. E., Hoeijmakers, J. H. und Kanaar, R. (1999). Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Current Biology* **9**(6): 325-8.

Tashiro, S., Walter, J., Shinohara, A., Kamada, N. und Cremer, T. (2000). Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin. *The Journal of Cell Biology* **150**(2): 283-91.

Tebbs, R. S., Zhao, Y., Tucker, J. D., Scheerer, J. B., Siciliano, M. J., Hwang, M., Liu, N., Legerski, R. J. und Thompson, L. H. (1995). Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(14): 6354-8.

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**(9): 4350-4.

Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y. und MoritaT. (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(13): 6236-40.

Tutt, A., Bertwistle, D., Valentine, J., Gabriel, A., Swift, S., Ross, G., Griffin, C., Thacker, J. und Ashworth, A. (2001). Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *Embo Journal* **20**(17): 4704-16.

Van Dyck, E., Hajibagheri, N. M., Stasiak, A. und West, S. C. (1998). Visualisation of human rad52 protein and its complexes with hRad51 and DNA. *Journal of Molecular Biology* **284**(4): 1027-38.

Van Dyck, E., Stasiak, A. Z., Stasiak, A. und West, S. C. (1999). Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* **398**(6729): 728-31.

van Heemst, D. und Heyting, C. (2000). Sister chromatid cohesion and recombination in meiosis. *Chromosoma* **109**(1-2): 10-26.

Vaziri, H., West, M. D., Allsopp, R. C., Davison, T. S., Wu, Y. S., Arrowsmith, C. H., Poirier, G. G. und Benchimol, S. (1997). ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *Embo Journal* **16**(19): 6018-33.

Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**(2): 171-82.

Verkaik, N. S., Esveldt van Lange, R. E., van Heemst, D., Bruggenwirth, H. T., Hoeijmakers, J. H., Zdzienicka, M. Z. und van Gent, D. C. (2002). Different types of

V(D)J recombination and end-joining defects in DNA double-strand break repair mutant mammalian cells. *European Journal of Immunology* **32**(3): 701-9.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J. und Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes & Development* **14**(8): 927-39.

Weaver, D. T. (1995). What to do at an end: DNA double-strand-break repair. *Trends in Genetics* **11**(10): 388-92.

Wiese, C., Collins, D. W., Albala, J. S., Thompson, L. H., Kronenberg, A. und Schild, D. (2002). Interactions involving the Rad51 paralogs Rad51C and XRCC3 in human cells. *Nucleic Acids Research (Online)* **30**(4): 1001-8.

Wong, A. K., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V. und Bartel, P. L. (1997). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *Journal of Biological Chemistry* **272**(51): 31941-4.

Wu, L., Davies, S. L., Levitt, N. C. und Hickson, I. D. (2001). Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51. *Journal of Biological Chemistry* **276**(22): 19375-81.

Wu, L., Davies, S. L., North, P. S., Goulaouic, H., Riou, J. F., Turley, H., Gatter, K. C. und Hickson, I. D. (2000). The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. *The Journal of Biological Chemistry* **275**(13): 9636-44.

Xia, S. J., Shammas, M. A. und Shmookler Reis, R. J. (1996). Reduced telomere length in ataxia-telangiectasia fibroblasts. *Mutation Research* **364**(1): 1-11.

Yates, J. L., Warren, N. und Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* **313**(6005): 812-5.

Yuan, Z. M., Huang, Y., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Kharbanda, S., Wang, R., Sung, P., Shinohara, A., Weichselbaum, R. und Kufe, D. (1998). Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *Journal of Biological Chemistry* **273**(7): 3799-802.

Ziv, Y., Bar-Shira, A., Pecker, I., Russell, P., Jorgensen, T. J., Tsarfati, I. und Shiloh, Y. (1997). Recombinant ATM protein complements the cellular A-T phenotype. *Oncogene* **15**(2): 159-67.

Anhang

7.1 Sequenz der HR-Kassette des pGrec Plasmids

```
   0  CTCATGTTTG ACAGCTTATC ATCGCAGATC CTGAGCTTGT ATGGTGCACT
  50  CTCAGTACAA TCTGCTCTGC TGCCGCATAG TTAAGCCAGT ATCTGCTCCC
 100  TGCTTGTGTG TTGGAGGTCG CTGAGTAGTG CGCGAGCAAA ATTTAAGCTA
 150  CAACAAGGCA AGGCTTGACC GACAATTGCA TGAAGAATCT GCTTAGGGTT
 200  AGGCGTTTTG CGCTGCTTCG CGATGTACGG GCCAGATATA CGCGTATCTG
 250  AGGGGACTAG GGTGTGTTTA GGCGCCCAGC GGGGCTTCGG TTGTACGCGG
 300  TTAGGAGTCC CCTCAGGATA TAGTAGTTTC GCTTTTGCAT AGGGAGGGGG
 350  AAATGTAGTC TTATGCAATA CACTTGTAGT CTTGCAACAT GGTAACGATG
 400  AGTTAGCAAC ATGCCTTACA AGGAGAGAAA AAGCACCGTG CATGCCGATT
 450  GGTGGAAGTA AGGTGGTACG ATCGTGCCTT ATTAGGAAGG CAACAGACAG
 500  GTCTGACATG GATTGGACGA ACCACTGAAT TCCGCATTGC AGAGATAATT
 550  GTATTTAAGT GCCTAGCTCG ATACAATAAA CGCCATTTGA CCATTCACCA
 600  CATTGGTGTG CACCTCCAAG CTGGGTACGG ATCCACTAGT AACGGCCGCC
 650  AGTGTGCTGG AATTCTGCAG ATCTCGTTTA GTGAACCGTC AGATCGCCTG
 700  GAGACGCCAT CCACGCTGTT TTGACCTCCA TAGAAGACAC CGGGACCGAT
 750  CCAGCCTCCG CGGGCGCGCA AGAAATGGCT AGCAAAGGAG AAGAACTCTT
 800  CACTGGAGTT GTCCCAATTC TTGTTGAATT AGATGGTGAT GTTAACGGCC
 850  ACAAGTTCTC TGTCAGTGGA GAGGGTGAAG GTGATGCAAC ATACGGAAAA
 900  CTTACCCTGA AGTTCATCTG CACTACTGGC AAACTGCCTG TTCCATGGCC
 950  AACACTAGTC ACTACTCTGT GCTATGGTGT TCAATGCTTT TCAAGATACC
```

```
1000  CGGATCATAT GAAACGGCAT GACTTTTTCA AGAGTGCCAT GCCCGAAGGT
1050  TATGTACAGG AAAGGACCAT CTTCTTCAAA GATGACGGCA ACTACAAGAC
1100  ACGTGCTGAA GTCAAGTTTG AAGGTGATAC CCTTGTTAAT AGAATCGAGT
1150  TAAAAGGTAT TGACTTCAAG GAAGATGGCA ACATTCTGGG ACACAAATTG
1200  GAATACAACT ATAACTCACA CAATGTATGA GAGATCTTCA TACATCATGG
1250  CAGACAAACA AAAGAATGGA ATCAAAGTGA ACTTCAAGAC CCGCCACAAC
1300  ATTGAAGATG GAAGCGTTCA ACTAGCAGAC CATTATCAAC AAAATACTCC
1350  AATTGGCGAT GGCCCTGTCC TTTTACCAGA CAACCATTAC CTGTCCACAC
1400  AATCTGCCCT TTCGAAAGAT CCCAACGAAA AGAGAGACCA CATGGTCCTT
1450  CTTGAGTTTG TAACAGCTGC TGGGATTACA CATGGCATGG ATGAACTGTA
1500  CAACTGAGGA TCCGGCCTTG CCGGCCTCGA CCCTGTGGAA TGTGTGTCAG
1550  TTAGGGTGTG GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAAG
1600  CATGCATCTC AATTAGTCAG CAACCAGGTG TGGAAAGTCC CCAGGCTCCC
1650  CAGCAGGCAG AAGTATGCAA AGCATGCATC TCAATTAGTC AGCAACCATA
1700  GTCCCGCCCC TAACTCCGCC CATCCCGCCC CTAACTCCGC CCAGTTCCGC
1750  CCATTCTCCG CCCCATGGCT GACTAATTTT TTTTATTTAT GCAGAGGCCG
1800  AGGCCGCCTC GGCCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAGG AGGCTTTTTT
1850  GGAGGCCTAG GCTTTTGCAA AAAGCTTACC ATGACCGAGT ACAAGCCCAC
1900  GGTGCGCCTC GCCACCCGCG ACGCAGTCCC CAGGGCCGTA CGCACCCTCG
1950  CCGCCGCGTT CGCCGACTAC CCCGCCACGC GCCACACCGT CGATCCGGAC
2000  CGCCACATCG AGCGGGTCAC CGAGCTGCAA GAACTCTTCC TCACGCGCGT
2050  CGGGCTCGAC ATCGGCAAGG TGTGGGTCGC GGACGACGGC GCCGCGGTGG
2100  CGGTCTGGAC CACGCCGGAG AGCGTCGAAG CGGGGGCGGT GTTCGCCGAG
2150  ATCGGCCCGC GCATGGCCGA GTTGAGCGGT TCCCGGCTGG CCGCGCAGCA
2200  ACAGATGGAA GGCCTCCTGG CGCCGCACCG GCCCAAGGAG CCCGCGTGGT
2250  TCCTGGCCAC CGTCGGCGTC TCGCCCGACC ACCAGGGCAA GGGTCTGGGC
```

2300 AGCGCCGTCG TGCTCCCCGG AGTGGAGGCG GCCGAGCGCG CCGGGGTGCC

2350 CGCCTTCCTG GAGACCTCCG CGCCCCGCAA CCTCCCCTTC TACGAGCGGC

2400 TCGGCTTCAC CGTCACCGCC GACGTCGAGG TGCCCGAAGG ACCGCGCACC

2450 TGGTGCATGA CCCGCAAGCC CGGTGCCTGA CGCCCGCCCC ACGACCCGCA

2500 GCGCCCGACC GAAAGGAGCG CACGACCCCA TGCATCGATA AAATAAAAGA

2550 TTTTATTTAG TCTCCAGAAA AAGGGGGGAA TGAAAGACCC CACCTGTAGG

2600 TTTGGCAAGC TAGCAAGCTT CAG**AACGGCC ACAAGTTCTC TGTCAGTGGA**

2650 **GAGGGTGAAG GTGATGCAAC ATACGGAAAA CTTACCCTGA AGTTCATCTG**

2700 **CACTACTGGC AAACTGCCTG TTCCATGGCC AACACTAGTC ACTACTCTGT**

2750 **GCTATGGTGT TCAATGCTTT TCAAGATACC CGGATCATAT GAAACGGCAT**

2800 **GACTTTTTCA AGAGTGCCAT GCCCGAAGGT TATGTACAGG AAAGGACCAT**

2850 **CTTCTTCAAA GATGACGGCA ACTACAAGAC ACGTGCTGAA GTCAAGTTTG**

2900 **AAGGTGATAC CCTTGTTAAT AGAATCGAGT TAAAAGGTAT TGACTTCAAG**

2950 **GAAGATGGCA ACATTCTGGG ACACAAATTG GAATACAACT ATAACTCACA**

3000 **CAATGTATAC ATCATGGCAG ACAAACAAAA GAATGGAATC AAAGTGAACT**

3050 **TCAAGACCCG CCACAACATT GAAGATGGAA GCGTTCAACT AGCAGACCAT**

3100 **TATCAACAAA ATACTCCAAT TGGCGATGGC CCTGTCCTTT TACCAGACAA**

3150 **CCATTACCTG TCCACACAAT CTGCCCTTTC GAAAGATCCC AACGAAAAGA**

3200 **GAGACCACAT GGTCCTTCTT GAGTTTGTAA CAGCTGCTGG GATTACACAT**

3250 **GGCATGGATG AACTGTACAA CTGA**GGATCC ACTAGTAACG GCCGCCAGTG

3300 TGCTGGAATT CTGCAGATAT CTGCAGAATC TCGGCTTAGC CGAATTCCAG

3350 CACACTGGCG GCCGTTACTA GTGGATCCGA GCTCGGTACC GATCC*AGACA*

3400 *TGATAAGATA CATTGATGAG TTTGGACAAA CCACAACTAG AATGCAGTGA*

3450 *AAAAAATGCT TTATTTGTGA AATTTGTGAT GCTATTGCTT TATTTGTAAC*

3500 *CATTATAAGC TGCAATAAAC AAGTTAACAA CAACAATTGC ATTCATTTTA*

3550 *TGTTTCAGGT TCAGGGGGAG GTGGGGAGGT TTTTTAAAGC AAGTAAAACC*

```
3600  TCTACAAATG TGGTATGGCT GATTATGATC CGGCTGCCTC GCGCGTTTCG
3650  GTGATGACGG TGAAAACCTC TGACACATGC AGCTCCCGGA GACGGTCACA
3700  GCTTGTCTGT AAGCGGATGC CGGGAGCAGA CAAGCCCGTC AGGGCGCGTC
3750  AGCGGGTGTT GGCGGGTGTC GGGGCGCAGC CATGACCGGT CGAC
```

Sequenziert wurde der Bereich von nt 637 bis nt 3654.

Fett kursiv: ***RSV-LTR***

grün: GFP-FS

grün unterstrichen: Leseraster-verschiebendes Oligonukleotid LRV-*Bgl*II

blau: Puromycin^{r}-Kassette

grün Fett: **GFP-delta**

kursiv: *SV40-polyA*

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumpersulat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
Bis	N,N´-Methylenbisacrylamid
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
c/ml	Zellen pro ml (cells per ml)
d	Tag(e) (day(s))
Da	Dalton
dATP	2´-Desoxy-Adenosin-5´-Triphosphat
dCTP	2´-Desoxy-Cytidin-5´-Triphosphat
dest.	destilliert

deion.	deionisiert
dGTP	2´-Desoxy-Guanosin-5´-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DOC	Desoxycholsäure (deoxycholic acid)
dNTP	2´-Desoxy-Nukleosid-5´-Triphosphat
ds	doppelsträngig (double stranded)
DSB	Doppelstrangbruch bzw. Doppelstrangbrüche (double Strand breaks)
dTTP	2´-Desoxy-Thymidin-5´-Triphosphat
EB	Ethidiumbromid
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
f	femto
FCS	fötales Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde(n) (hour(s))
HR	homologe Rekombination
k	kilo-
kb	Kilobasenpaar(e)
l	Liter
λ	Wellenlänge
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Mol
m	milli-
MCS	multible Klonierungsstelle (mutiple cloning site)
min	Minute(n) (minute(s))
n	nano-
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol [25:24:1]
PCR	Polymerase Kettenrektion (polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)

sec	Sekunde(n) (second(s))
ss	einzelsträngig (single stranded)
SSC	Standard-Natrium-Citrat (standard sodium citrat)
T	Thymin
T_A	Anlagerungstemperatur (annealing temperature)
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
T_M	Schmelztemperatur (melting temperature)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100®	Oktylphenylpoly-(ethylenglykolether)$_n$
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
U	Enzymeinheit (unit)
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
x g	-fache Erdbeschleunigung
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)

Lebenslauf

Name	Guido Drexler
Geburtsdatum	10.12.1969
Geburtsort	München
Schulausbildung	
1977-1981	Grundschule Oberschleißheim, Parksiedlung
1981-1990	Carl-Orff-Gymnasium Unterschleißheim Abschluß mit allgemeiner Hochschulreife
Hochschulausbildung	
1990-1998	Studium Biologie Diplom
August 1998	Abschluss mit Diplom
Oktober 1998-Mai 2002	Promotion bei Frau Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp Institut für molekulare Strahlenbiologie GSF-Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt