

# **Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf**

Aus dem Labor

für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie

Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Ekkehard Dikomey

der

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Leitung: Prof. Dr. Cordula Petersen

des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

## **Einfluss von Mre11 auf die Regulation der Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Arne Christian Behlau

geboren am 05.02.1982 in Salzgitter

Hamburg, 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 18.10.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. Jochen Dahm-Daphi

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter/in:

Prof. Dr. Ekkehard Dikomey

Prüfungsausschuss, 3 Gutachter/in:

PD Dr. Kerstin Kutsche

## Inhaltsverzeichnis

1. Ziel der Arbeit .....	3
2. Einleitung .....	4
3. Material und Methoden .....	13
3.1. Zelllinie und Zellkultur .....	13
3.1.1. Zelllinie, Zellkultur und Passagierung .....	13
3.1.2. Das Reparaturkonstrukt 10.1 pGC .....	14
3.1.3. Das Reparaturkonstrukt 10.1 pEJ.....	15
3.1.4. RNasefreie Zellkultur.....	17
3.2. siRNA Transfektion .....	17
3.2.1. Verwendete siRNA's.....	18
3.2.2. Aufnahme der siRNA.....	19
3.2.3. Transfektion der MRE11 siRNA und der Kontroll siRNA.....	19
3.3. Western Blot.....	20
3.3.1. Proteinextraktion und Bestimmung.....	20
3.3.2. Gelelektrophorese und Blot.....	21
3.3.3. Immunodetektion und Proteinquantifizierung .....	22
3.4. Transfektion des pCMV3xNLS-I-SceI Plasmids .....	23
3.4.1. Kontrolle der Aufnahme der Plasmide.....	23
3.4.2. Transfektion des pCMV3xNLS-I-SceI Plasmids.....	23
3.5. Plasmidpräparation und Restriktionsverdau.....	24
3.6. Durchflusszytometrie .....	26
4. Ergebnisse .....	27
4.1. Zellwachstum und siRNA Transfektion.....	27
4.2. Knock-down von Mre11 .....	28
4.3 Plasmidtransfektion .....	31
4.4 Einfluss von Mre11 auf die Regulation der Reparatur von Doppelstrangbrüchen .....	32
4.4.1 Einfluss von Mre11 auf die Homologe Rekombination.....	32
4.4.2 Einfluss von Mre11 auf das Nichthomologe Endjoining .....	34
4.5 Einfluss des Knock-downs von Mre11 auf das Zellüberleben.....	35
5. Diskussion .....	36
5.1. Knock-down von Mre11 .....	36
5.2. Einfluss von Mre11 auf die Reparatur von enzymatisch erzeugten Dsb .....	37

5.3. Einfluss von Mre11 auf die Reparatur von strahleninduzierten Dsb .....	38
5.4. Funktion von Mre11 innerhalb der Dsb-Reparatur .....	40
6. Zusammenfassung .....	42
7. Literaturverzeichnis.....	44
8. Danksagung .....	58
9. Lebenslauf .....	59
10. Eidesstattliche Versicherung .....	60

## 1. Ziel der Arbeit

In dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob Mre11 in Säugetierzellen einen Einfluss auf die Wahl eines spezifischen Mechanismus für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen hat.

Die zelluläre DNA ist ständig Schädigungen ausgesetzt. Einer der schwerwiegendsten DNA Schäden ist ein DNA-Doppelstrangbruch. Solche Brüche führen zu einem Verlust der genetischen Information und müssen repariert werden. Für die Reparatur stehen unterschiedliche Reparaturmechanismen zur Verfügung. Welcher DNA-Doppelstrangbruch mit welchem Mechanismus repariert wird, ist bisher jedoch nicht ausreichend verstanden.

Eine Schlüsselposition zwischen den einzelnen Reparaturwegen nimmt der Mre11/Rad50/Nbs1-Proteinkomplex ein, wobei seine Funktion innerhalb der einzelnen Reparaturwege weiterhin nicht vollständig geklärt ist. Mutation in diesen Proteinen führen zu schweren Erkrankungen, deren Gemeinsamkeit eine deutliche Erhöhung der Strahlensensitivität als Zeichen eines DNA-Reparaturdefektes ist.

Wir wollten in dieser Arbeit untersuchen, welchen Einfluss das Fehlen von Mre11 als zentraler Bestandteil des Mre11/Rad50/Nbs1-Komplexes auf die einzelnen Reparaturwege hat. Hierzu wurde Mre11 durch RNA-Interferenz stark herunterreguliert und der Knock-Down im Western-Blot quantifiziert. Im Anschluss wurden zunächst durch eine Endonuklease Doppelstrangbrüche in speziellen auf dem Grünfluoreszierenden-Protein basierenden Reporterkonstrukten erzeugt und die Effektivität der einzelnen Reparaturmechanismen bestimmt.

Als nächster Schritt wurden nach Knock-down von Mre11 DNA-Doppelstrangbrüche durch ionisierende Strahlung erzeugt und das Zellüberleben als Zeichen der Reparatureffektivität bestimmt.

Durch die Messung der Reparatureffizienz der einzelnen Reparaturwege nach Induktion eines Dsb durch eine Endonuklease sollte untersucht werden, ob Mre11 quantitativ eine Rolle innerhalb der einzelnen Reparaturwege spielt. Durch die Messung des Zellüberlebens nach Bestrahlung sollte geprüft werden, ob Me11 speziell für die Antwort nach ionisierender Schädigung von Bedeutung ist.

## 2. Einleitung

Die Integrität ihrer DNA ist eine Grundvoraussetzung für das Überleben einer jeden Zelle. Die DNA ist ständig Schädigungen ausgesetzt. Sie entstehen zum einen durch exogene Ursachen, wie beispielsweise ionisierende Strahlung oder DNA-schädigende Chemotherapeutika, aber es entstehen auch ohne äußeren Einfluss vielfach spontan DNA-Schäden. Beispielsweise während der Replikation der DNA oder durch die Aktivität der Topoisomerasen I und II. Eine häufige Ursache sind auch Sauerstoffradikale, die während des oxidativen Zellmetabolismus entstehen. Etwa 20.000 DNA-Läsionen entstehen so in jeder Zelle pro Tag (Pfeiffer et al. 2000). Nicht reparierte DNA-Schäden können zum Zelltod oder eine fehlerhafte Reparatur zu Mutationen in der DNA und damit zur Entartung der Zellen führen. Die Reparatur dieser Schäden ist somit notwendig für das Überleben der Zelle und des Organismus. Es existieren abhängig vom Typ des Schadens (Basenschaden, Zuckerschaden, Strangbrüche oder Vernetzung, etc.) verschiedene spezifische Reparaturmechanismen.

Diese Arbeit befasst sich mit der Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen (Dsb). Dieser Art von DNA-Schaden kommt besondere Bedeutung zu, da beide Stränge unterbrochen sind und kein komplementärer Strang zum einfachen Kopieren der genetischen Information zu Verfügung steht. Daher sind in diesem Fall effektive und präzise Reparaturmechanismen besonders wichtig.

Für die Reparatur von Dsb können zwei unterschiedliche Gruppen von Reparaturwegen unterschieden werden. Die homologie-vermittelten Mechanismen, die wegen ihrer Verwandtschaft zur homologen Rekombination während der Meiose auch Homologe Rekombinations Reparatur (HRR) genannt werden, und der nicht-homologie-vermittelte Reparaturmechanismus, der auch als Nicht-Homologes Endjoining (NHEJ) bezeichnet wird. Die zuerst genannten benötigen zur Reparatur eines Dsb eine in ihrer Basenabfolge vollständig identische (homologe) Sequenz an einem anderen Ort des Genoms von der beschrieben werden kann. Diese homologe Sequenz kann zum einen auf dem Schwesterchromatid liegen, aber auch homologe Sequenzen an anderen Genorten, wie dem homologen Chromosom oder eine repetitive Sequenz auf dem selben Chromosom können verwendet werden. Man kann die homologie-vermittelten Reparaturmechanismen noch weiter in konservative und nicht-konservative Mechanismen unterteilen.

Für den Ablauf der konservativen HRR wurden 3 Modelle entwickelt. Das „double-strand break repair“ Modell (DSBR), das „synthesis-dependent strand annealing“ (SDSA) und die „break-induced replication“ (BIR) (Pfeiffer et al. 2000).

Beim DSBR-Modell (Abb. 2.1) werden im ersten Schritt die freien Bruchenden bearbeitet. Hierbei werden die Stränge in 5'–3' Richtung durch eine Exonuklease abgebaut, so dass lange 3' Überhänge entstehen. Der homologe Genabschnitt wird zu einem sogenannten D-loop entwunden und die freien 3' Überhänge werden an die homologen komplementären Sequenzabschnitte angelagert. Die fehlenden Basen werden nun komplementär zur homologen Sequenz neu synthetisiert. Durch die einwandernden 3' Überhänge entsteht eine sogenannte Heteroduplex, die durch die „Holliday junctions“, die sich überkreuzenden DNA-Einzelstränge, begrenzt ist. Diese Holliday junctions werden später durch spezifische Endonukleasen (sog. Resolvasen) aufgelöst. Abhängig von den Schnittrichtungen und der Religation der dann freien Enden, kann es zu einem Crossing-over kommen, das in der Meiose häufig, in der Reparatur von Dsb während des mitotischen Zyklus jedoch selten vorkommt.

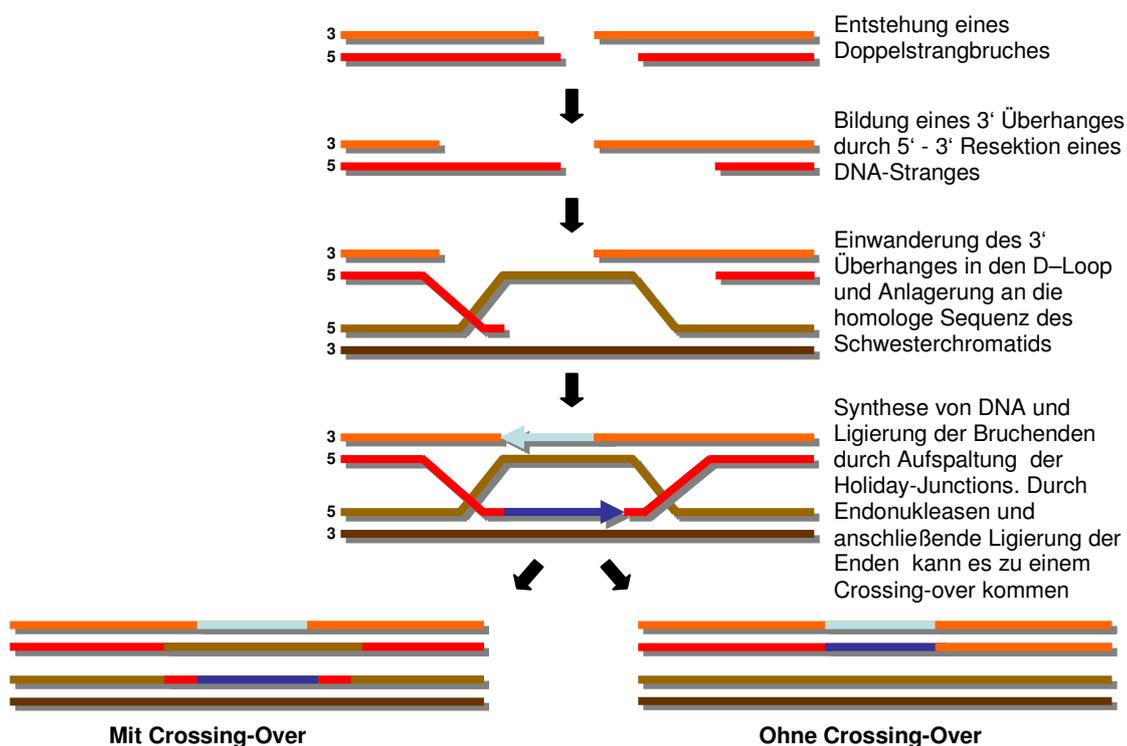


Abb. 2.1 Double-strand-break-repair Modell nach Szostak et al. 1983

Auch beim SDSA-Modell (Abb. 2.2) beginnt die Reparatur mit Bildung von 3' Überhängen. Diese werden auch an die homologe Gensequenz angelagert und komplementäre DNA synthetisiert. Im Gegensatz zum DSBR Modell jedoch werden die neu synthetisierten DNA-Stränge vollständig von der homologen „donor“ Sequenz gelöst

und dann neu miteinander gepaart. Die verbliebenen Lücken werden mit zum Gegenstrang komplementärer DNA aufgefüllt und anschließend ligiert, so dass sämtliche neu synthetisierte DNA auf einem Chromatid liegt und kein Crossing-over stattfindet (Paques und Haber 1999).

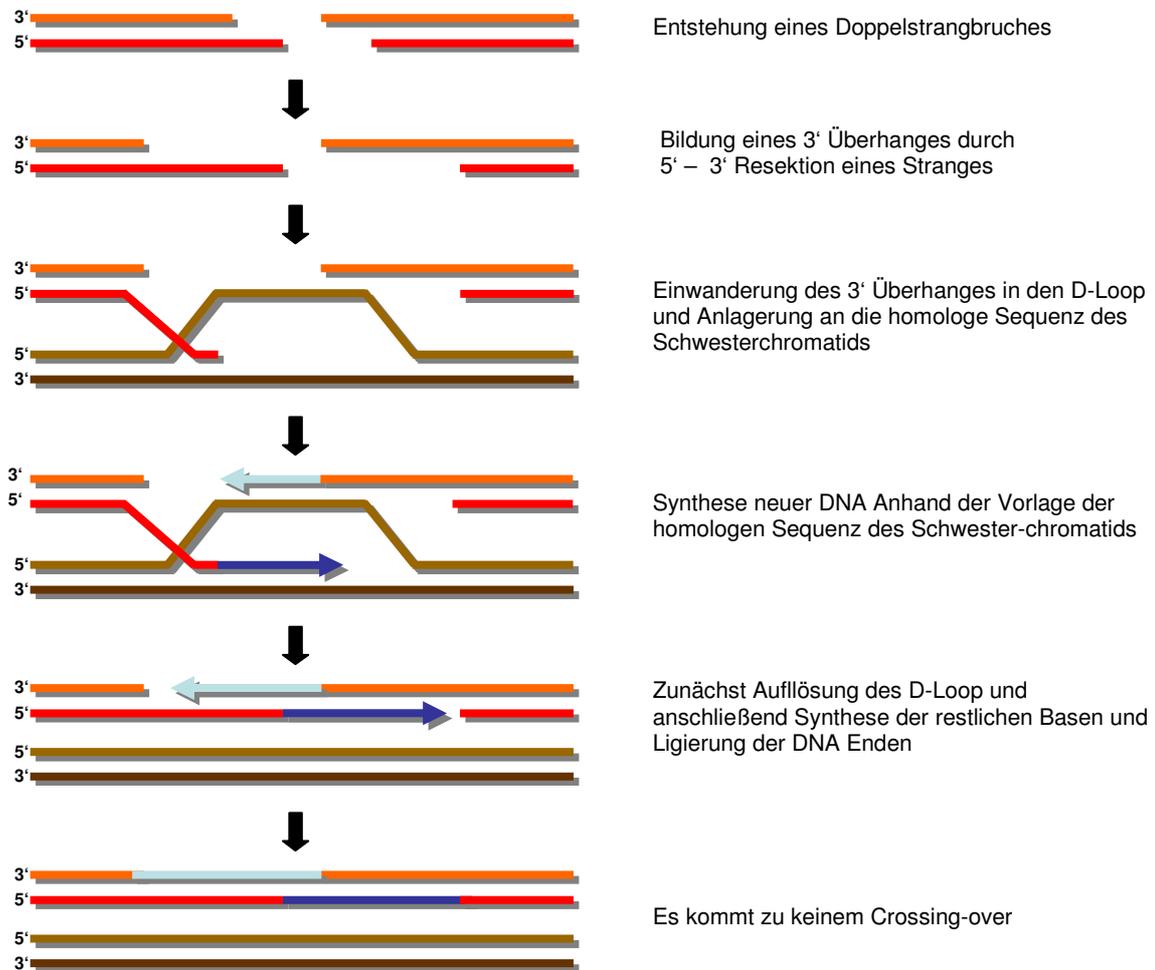


Abb. 2.2 Synthesis-depend strand annealing Modell nach Paques und Haber 1999

Der dritte Mechanismus, das BIR-Modell (Abb. 2.3), geht davon aus, dass nur ein Bruchende prozessiert und nur ein 3' Überhang an die komplementäre DNA-Sequenz angelagert wird. Anschließend werden die fehlenden Enden beider DNA-Stränge anhand der homologen Sequenz vollständig neu synthetisiert. Es wird angenommen, dass dieser Weg besonders wichtig für die Reparatur von Dsb ist, wenn eines der beiden Dsb-Enden verloren gegangen ist (Kraus et al. 2001).

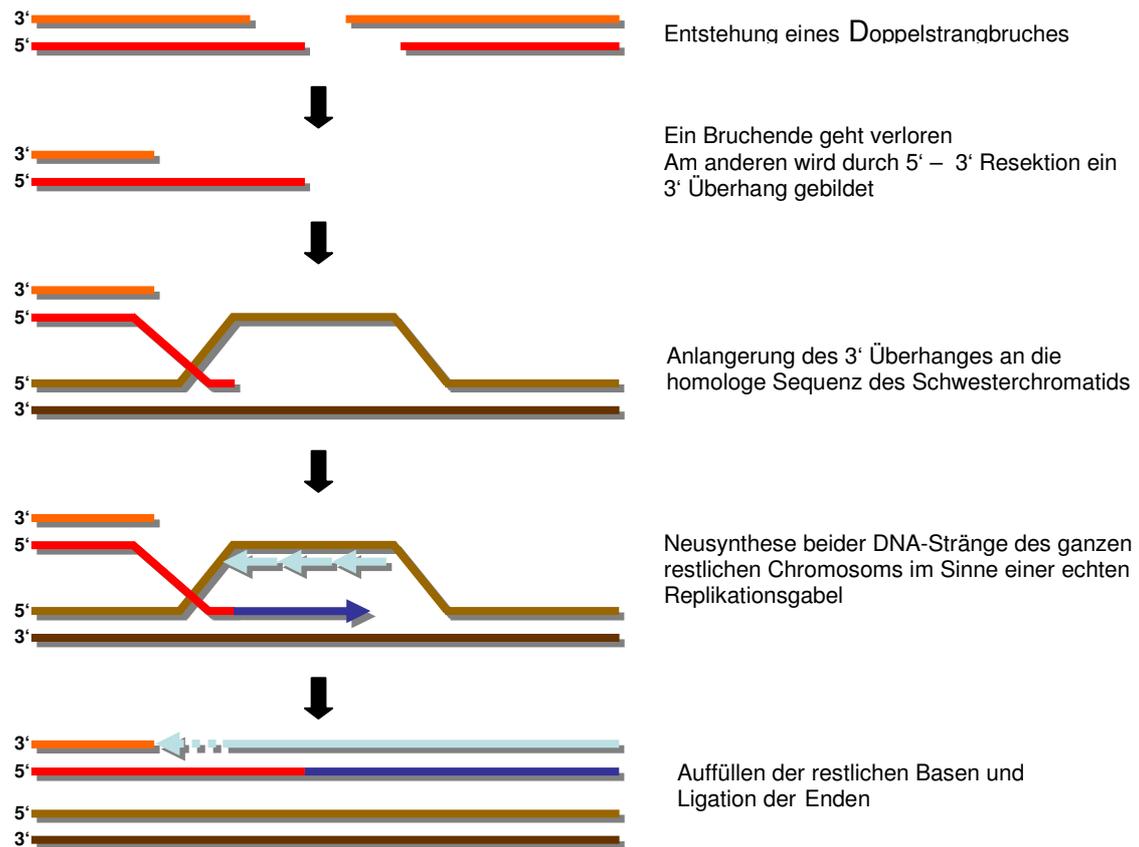


Abb 2.3 Break-induced Replication Modell nach Kraus et al. 2001

Die drei konservativen Mechanismen kopieren die homologe Sequenz fehlerfrei, so dass keine Information verloren geht. Der nicht-konservative Mechanismus, das single-strand annealing (SSA) (Abb.2.4), kann nur stattfinden, wenn der Dsb zwischen zwei relativ großen (~400bp) flankierenden homologen Sequenzen liegt. Auch hier findet zunächst eine Resektion in 5' – 3' Richtung statt. Anschließend werden die komplementären Sequenzen der 3' Überhänge an den flankierenden Homologien aneinander gelagert. Die nicht komplementären DNA-Abschnitte des Bereiches zwischen den flankierenden Homologien werden durch eine Endonuklease entfernt. Dadurch wird der Dsb zwar korrekt repariert, jedoch geht ein relativ großer Teil an DNA verloren (Lin et al. 1984).

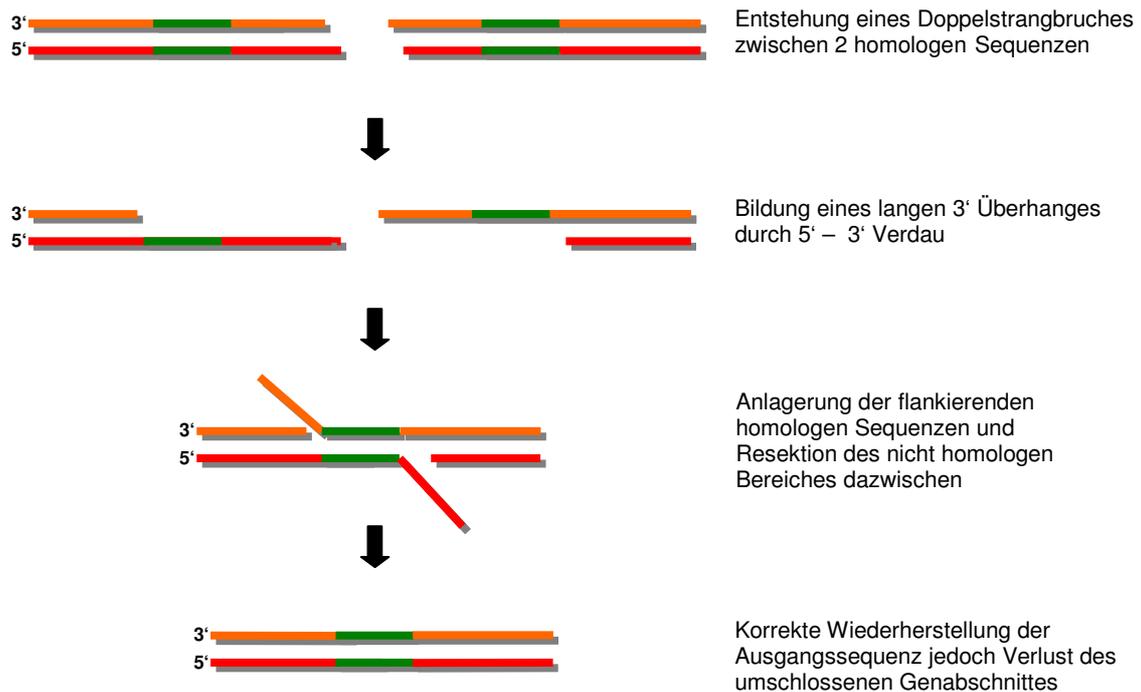


Abb. 2.4 Modell des Single-strand-annealing nach Lin et al. 1984

Während die HRR-Mechanismen durch die großen Homologien die exakte Gensequenz unabhängig von der Art des Doppelstrangbruches wieder herstellen können und somit „fehlerfrei“ arbeiten, werden beim NHEJ (Abb. 2.5) keine oder nur ganz kurze homologe Sequenzen (sog. Mikrohomologien bis zu 20bp) verwendet und es kann zu einer fehlerhaften Reparatur kommen. Abhängig von der Struktur des Doppelstrangbruches (passende Überhänge, unpassende Sequenzen, stumpfe Enden etc.) und weiteren DNA-Schäden in der Nähe des Dsb (Zuckerschäden, Basenschäden etc.) spricht man von einfachen („simple“ oder „clean breaks“) oder schwierigen („difficult“ oder „dirty breaks“) Brüchen. Während die einfachen Brüche direkt ligiert werden können und so ebenfalls die ursprüngliche Sequenz wieder fehlerfrei hergestellt werden kann, wird bei den schwierigen Brüchen zuvor eine Prozessierung der Bruchenden benötigt. Hierbei kann es zu kleinen Deletionen oder Insertionen kommen (Shrivastav et al. 2008). Da ein Großteil der DNA nicht für Gene codiert, sind entstehende Fehler durch NHEJ meist nicht von Bedeutung (Pfeiffer et al. 2000).

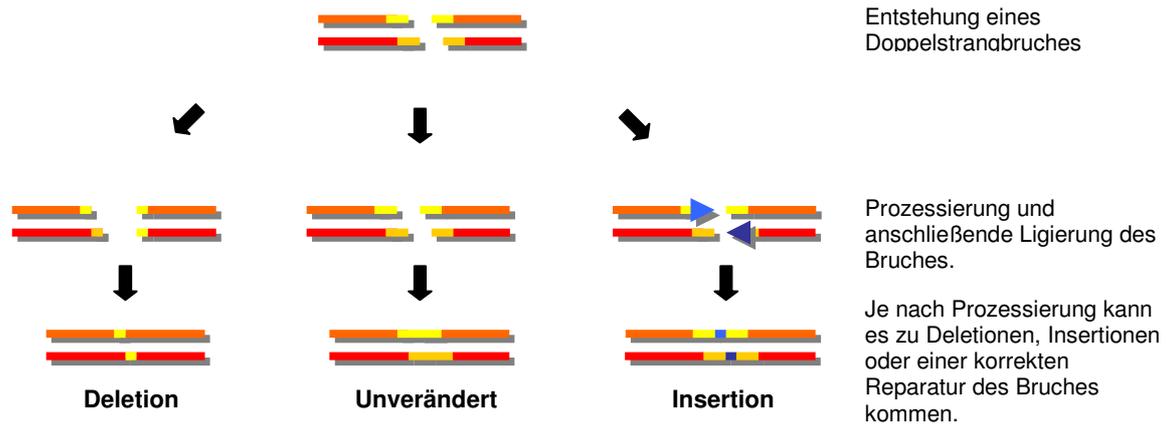


Abb. 2.4 Reparaturergebnisse durch Nicht homologes End-joining

Für alle Reparaturmechanismen konnten Proteine identifiziert werden, die spezifische Aufgaben in nur einzelnen Reparaturwegen wahrnehmen. Zentrale Proteine der HRR sind beispielsweise Proteine der Rad52-Gruppe, die in Hefe für Invasion des 3' Überhanges in die homologe Sequenz des Schwesterchromatids zuständig sind. Für das NHEJ von besonderer Bedeutung sind vor allem die Ku-Proteine Ku70 und Ku80, die DNA-PK sowie die DNA LigaseIV, die mit ihrem Co-Faktor XRR direkt, an der Wiederverknüpfung der Bruchenden beteiligt ist (Pfeiffer et al. 2000).

Neben diesen für einzelne Reparaturmechanismen spezifischen Proteinen konnten noch weitere Proteine identifiziert werden, die sowohl für das NHEJ als auch für die HRR von Bedeutung sind. Hierzu gehört unter anderem der MRN-Komplex bestehend aus Mre11, RAD50 und Nbs1 (Xrs2 in Hefe).

Die Bedeutung der einzelnen Reparaturwege und der beteiligten Proteine zeigt sich besonders anhand der Chromosomalen Instabilitätsyndrome Ataxia-Teleangiectasia (AT), Nijmegen-breakage-Syndrom (NBS, defekt im Gen für das Nbs1 Protein) und Ataxia-Teleangiectasia-like disorder (ATLD). AT ist eine sehr seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die sich neben der namensgebenden cerebellären Ataxie und der Teleangiectasien vor allem im Bereich des Gesichtes der Bindehaut des Auges auch durch erhöhte Strahlensensitivität, Immundefizienz, Mikrocephalie und ein stark erhöhtes Risiko auszeichnet, an malignen Tumoren, vor allem Lymphomen, zu erkranken. Verursacht wird AT durch eine Mutation im ATM-Gen auf Chromosom 11q23. (Chun und Gattí 2004, Jackson 1995). Das hier kodierte Protein ATM spielt eine zentrale Rolle in der Erkennung von Dsb und der anschließenden Zellzyklusregulation (Iijima et al 2008).

Auch NBS-Patienten leiden unter erhöhter Strahlensensitivität, Immundefizienz, Mikrocephalie und einem erhöhten Risiko an malignen Tumoren zu erkranken. Als

Ursache von NBS konnten Mutationen im NBS1-Gen auf Chromosom 8q21 gefunden werden (Varon et al. 1998). Das codierte Protein Nbs1 ist ein Teil des MRN-Komplexes (Carney et al. 1998).

Ein einzelner Patient mit einem Defekt in Rad50, einem weiteren Protein des MRN-Komplexes, wurde bislang beschrieben. Der Phänotyp war mit Mikrocephalie und erhöhter Strahlensensitivität dem Phänotyp der NBS-Patienten ähnlich, jedoch konnte bei diesem einen Patienten keine Immundefizienz festgestellt werden. (Waltes et al. 2009)

Bei einigen wenigen Personen, die klinisch unter ähnlichen Symptomen wie AT-Patienten leiden, konnte eine Mutation im Mre11-Gen, dem letzten Mitglied des MRN-Komplexes, nachgewiesen werden (Stewart et al. 1999, Delia et al. 2004, Fernet et al. 2005). Die Symptome ähnelten mit Ataxie, erhöhter Strahlensensitivität denen der AT-Patienten, begannen jedoch später und waren schwächer ausgeprägt und es konnte bislang kein erhöhtes Risiko für maligne Tumore im Menschen und auch in entsprechend mutierten Mäusen beobachtet werden (Theunissen et al. 2003).

Die Gene für Mre11 und Rad50 sind sehr hoch konserviert und Homologe können in nahezu allen eukaryoten Organismen nachgewiesen werden. Selbst in E.coli konnten funktionell und strukturell ähnliche Proteine identifiziert werden (Sharples und Leach 1995, Conelly und Leach 2002). Nbs1 ist weniger gut konserviert, jedoch wurde in Hefe mit Xrs2 ein funktionell ähnliches Protein gefunden (Faatherstone und Jackson 1998). Ein Knock-out dieser drei Gene führt in Hefe zu einer stark erhöhten Strahlensensitivität. Knock-out Mutationen dieser Gene in Mäusen sind für die Embryonen letal (Xiao and Weaver 1997, Luo et al. 1999, Zhu et al. 2001).

Obwohl man hieran deutlich sehen kann, wie wichtig dieser MRN-Komplex und Mre11 als eines der zentralen Proteine dieses Komplexes für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und somit das Überleben der Zellen sind, ist die genaue Funktion der Proteine innerhalb der Reparaturvorgänge noch relativ unklar.

Einzelne Funktionen des Mre11 Proteins konnten jedoch bereits beschrieben werden (Haber 1998). So gehört Mre11 zu den ersten Proteinen, die nach Induktion von Dsb als sogenannte Foci an den Schadensstellen nachweisbar sind. (Lisby et al. 2004a). Als eine zentrale Aufgabe von Mre11 wird die Regulation und damit Aktivierung und Rekrutierung von Atm, das Protein dessen Gen in AT-Patienten mutiert ist, gesehen. Aktiviertes Atm wiederum phosphoryliert eine Reihe weiterer Proteine, unter anderem Chk2 und p53, die direkten Einfluss auf die Zellzykluskontrolle haben und den Zellzyklus anhalten können bis der Dsb wieder repariert worden ist (Carson et al. 2003, Uziel et al. 2003, Lee und

Paull 2004, Lee und Paull 2005). Durch dieses frühe Auftreten von Mre11 an Dsb und die Interaktion des MRN Komplexes mit der Regulation des Zellzyklus vermittelt durch Atm wird Mre11 als zentraler Sensor von DNA Schäden gesehen. Durch diese Interaktion von Mre11 und Atm erklärt sich auch der ähnliche Phänotyp von ATLD-Patienten und AT-Patienten.

Neben dieser sensorischen und zellzyklusregulatorischen Funktion interagiert Mre11 auch direkt mit der DNA an einem Dsb. So wird als erster Schritt der HRR-Mechanismen ein 3' Überhang durch einen 5' - 3' Verdau der Bruchenden durch eine Exonuklease hergestellt. Für Mre11 wurde in-vitro eine Exonukleasefunktion in 3' - 5' Richtung für Einzelstrang- als auch für Doppelstrang-DNA beobachtet (Paull und Gellert 1998). Dieser 3' - 5' Verdau würde jedoch einen 5' Überhang produzieren und keinen 3' Überhang. Mutationen in Hefe, die die Exonukleasefunktion von Mre11 in vitro ausschalten, reduzieren jedoch auch den 5' -3' Verdau in vivo deutlich (Furuse et al. 1998) und beeinflussen die Reparatur von Dsb (Bressan et al. 1998, Haber 1998). Dieser Widerspruch deutet darauf hin, dass evtl. eine weitere bis jetzt unbekannte Exonuklease in Verbindung mit Mre11 Exonukleasefunktion für diese 5' - 3' Resektion verantwortlich ist (Williams et al. 2007). Diese Nuklease könnte in *Saccharomyces cerevisiae* Sae und in Säugetierzellen CtIP sein. Für diese Proteine konnte gezeigt werden, dass sie zum einen eine enge Bindung zu Mre11 haben und zum anderen für die Bildung von Einzelsträngen in der S und G2 Phase notwendig sind (Sartori et al. 2007). Neben einer Exonukleasefunktion besitzt Mre11 auch eine Endonukleasefunktion für doppel- und einzelsträngige DNA. Diese Endonukleasefunktion wurde zunächst besonders für die Funktion von Mre11 in der Meiotischen Rekombination für wichtig erachtet. Neuere Untersuchungen in *Pyrococcus furiosus* konnten zeigen, dass der 3' Überhang nicht nur durch den Abbau einzelner Basen vom Bruchende durch die Exonuklease entsteht, sondern dass etwa 15 - 55 bp vom Bruchende entfernt ein Schnitt in den intakten DNA-Strang durch die Endonuklease eingefügt werden kann. Das so entstehende freie Einzelstrang-DNA-Fragment wird dann erst im zweiten Schritt abgebaut. (Hopkins und Paull 2008).

Eine weitere Funktion von Mre11, die zunächst in vitro beschrieben wurde, ist die Fähigkeit DNA direkt zu binden. Eine besondere Affinität besteht hierbei zu freien Doppelstrang-DNA-Enden. Dies führte zu der Hypothese, dass der MRN-Komplex die beiden Bruchenden bindet und so in direkter Nähe zueinander hält und somit eine Reparatur der beiden Enden miteinander möglich macht. Außerdem könnte er auch das

Schwesterchromatid binden und für die HRR zugänglich machen (de Jager et al. 2001a, Conelly und Leach 2002).

Diese Funktionen führten zu der Hypothese, dass der MRN-Komplex der zentrale Sensor für DNA Doppelstrangbrüche ist. Er soll den DNA Schaden erkennen, durch Aktivierung von Atm den Zellzyklus regulieren, die Bruchenden beieinander halten und letztlich die Reparatur des Bruches durch Rekrutierung weiterer Reparaturproteine der einzelnen Mechanismen und durch Prozessierung der Bruchenden einleiten.

Welcher Reparaturmechanismus jedoch zur Reparatur eines Bruches ausgewählt wird bleibt noch weitgehend unverstanden. Bislang existieren vier verschiedene Erklärungsmodelle über die Auswahl des geeigneten Reparaturmechanismus.

Zum einen ist bereits bekannt, dass wenn ein Mechanismus ausfällt, beispielsweise durch ein funktionsloses Protein, kann der zweite Mechanismus hier einspringen und den Bruch reparieren. In Hefe ist die HRR der dominante Reparaturweg und nahezu alle Dsb werden durch diesen Mechanismus repariert (Haber 1999).

Die erste Erklärungsmöglichkeit ist, wenn mehrere Reparaturmechanismen zur Verfügung stehen, diese um die Reparatur konkurrieren und keinerlei Kontrolle ausgeübt wird.

Ein zweites Erklärungsmodell berücksichtigt die Tatsache, dass nicht alle Reparaturmechanismen während allen Zellzyklusphasen zur Verfügung stehen. Die HRR-Mechanismen bevorzugen die homologe Sequenz des Schwesterchromatids. Daher können sie nur während der S und G2 Phase des Zellzyklus eingesetzt werden, wenn eben dieses Schwesterchromatid vorhanden ist. Während der M, G1 und G0 Phase des Zellzyklus kann nur der NHEJ Reparaturmechanismus genutzt werden, für den kein Schwesterchromatid benötigt wird (Lisby et al. 2004a, Czornak et al. 2008). Letztlich bleibt jedoch hier bisher ungeklärt, wie die Reparaturmechanismen abhängig von der Zellzyklusphase an- bzw. abgeschaltet werden.

Die dritte Möglichkeit besteht darin, dass die Reparatur einzelner Dsb von deren Struktur abhängt. So könnten einfache Brüche mit komplementären Überhängen das ideale Substrat für das NHEJ sein und bevorzugt durch diesen Mechanismus repariert werden. Dsb mit nur einem Ende, die zum Beispiel durch das Auftreffen von einer Replikationsgabel auf einen Einzelstrangbruch entstehen können, müssen durch den HRR-Mechanismus nach dem SDSA/BIR Modell repariert werden. Sollte die Reparatur eines solchen Endes über NHEJ durch Verknüpfung mit einem fremden DNA-Abschnitt erfolgen, würde das zu einer Translokation führen (Helleday et al. 2007).

Ein viertes Erklärungsmodell wäre die aktive Regulation der Reparaturmechanismen durch spezifische Proteine. So konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Ku80 die homologie vermittelten Reparaturmechanismen unterdrückt (Mansour et al. 2008). Da Mre11 als eines der ersten Proteine am Ort eines Doppelstrangbruches ist und es in Hefe sowohl für die HRR- als auch für den NHEJ Reparaturmechanismus von essentieller Bedeutung ist, geht man zur Zeit davon aus, dass Mre11 neben der Sensorfunktion auch eine regulatorische Funktion für die Entscheidung zwischen den Dsb Reparaturmechanismen hat.

Diese Arbeit soll untersuchen, ob Mre11 in Säugetierzellen einen direkten Einfluss auf die Regulation der einzelnen Reparaturmechanismen ausübt. Dazu wird in Mauszellen mit spezifischer small interference RNA der Gehalt an Mre11 herunterreguliert (sog. Knock-Down) und die Effekte des Verlustes dieses Proteins funktionell untersucht.

## **3. Material und Methoden**

### ***3.1. Zelllinie und Zellkultur***

#### **3.1.1. Zelllinie, Zellkultur und Passagierung**

Alle Experimente wurden mit primären embryonalen Mausfibroblasten der Linie 10.1 durchgeführt. Diese wurden BALB/c Mäusen entnommen und mittels des 3T3 Schemas immortalisiert (Harvey and Levine 1991). Im Zuge dessen verlor die Zelllinie beide p53 Allele. Die Zellen wachsen als Monolayer exponentiell bis zur Konfluenz. Sie wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)<sup>1</sup> mit 10% fetalem Kälberserum (FCS)<sup>2</sup>, 2% L-Glutamin<sup>3</sup>, 1% Penicillin/Streptomycin<sup>4</sup> und 0,5% Puromycin<sup>5</sup> bei 37° C, 100% Luftfeuchtigkeit und 10% CO<sub>2</sub> im Brutschrank in T-75 Gewebekulturflaschen<sup>6</sup> kultiviert. Vor Erreichen der Konfluenz, ca. alle 2-3 Tage, wurden die Zellen in 10ml PBS<sup>7</sup> gewaschen. Anschließend mit 2 ml Trypsin<sup>8</sup> für 2 Minuten gelöst und dann mit 8 ml DMEM aufgenommen und erneut ausgesät. Zur Lagerung wurden 1x10<sup>6</sup> Zellen mit

---

<sup>1</sup> DMEM 1x, Gibco

<sup>2</sup> FBS Superior, Biochrom AG

<sup>3</sup> L-Glutamin 200nM, Gibco

<sup>4</sup> Penicillin Streptomycin, Gibco

<sup>5</sup> Puromycin, Sigma

<sup>6</sup> Tissue Culture Flask 75 cm<sup>2</sup>

<sup>7</sup> 137 mM NaCl + 2,7 mM KCl + 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

<sup>8</sup> 5 % Trypsin-EDTA, Gibco

Trypsin gelöst und anschließend in der Labofuge Zentrifuge<sup>9</sup> bei 1200 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,5 ml DMEM mit 10% DMSO<sup>10</sup> resuspendiert und in ein 2ml Cryoröhrchen<sup>11</sup> überführt. Das Cryoröhrchen wurde anschließend erst für 2 Stunden bei -20°C, dann über Nacht in -80°C und zuletzt dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Etwa alle 30 Passagen wurden die Zellen verworfen und neue aus der Lagerung entnommen. Die Zellzahl wurde mithilfe eines CASY-Zellcoulters<sup>12</sup> bestimmt. Dazu wurden 200µl der Zellsuspension in 9,8ml CASYton<sup>13</sup> gelöst. Diese Lösung wird durch eine dünne Kapillare an einer Elektrode vorbei gesogen. Gemessen wird die Zellzahl über die Änderung des elektrischen Widerstandes durch die vorbeiströmenden Zellen.

#### 3.1.2. Das Reparaturkonstrukt 10.1 pGC

Die Zelllinie 10.1 pGC (pGFSP3 in Schmidt-Petersen 2003) enthält ein chromosomal stabil integriertes Reporterkonstrukt zur Messung der Reparatur von Dsbs mittels HRR. Die erfolgreiche Reparatur kann durch Bildung des green-flourescent-proteins (GFP) nachgewiesen werden. Das GFP ist ein aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliertes Protein, das nach Anregung mit blauem Licht grün fluoresziert. In diesem Konstrukt wurde in das GFP-Gen die 18 Basenpaare lange Erkennungssequenz der I-SceI Endonuklease integriert, wodurch dieses funktionslos wurde. Außerdem wurde ein ebenfalls funktionsloses am 3'-Terminus verkürztes Gen für GFP ( $\Delta$ gfp3) als homologe Sequenz integriert. Die Endonuklease I-SceI schneidet die DNA an der in das GFP-Gen eingebrachten Sequenz und es entsteht ein Doppelstrangbruch. Erfolgt die Reparatur dieses Doppelstrangbruches mittels HRR mit der 3'verkürzten homologen Sequenz wird ein funktionsfähiges GFP-Gen hergestellt. Die Expression dieses Gens führt zur Grünfluoreszenz der Zellen, welche im Flusszytometer messbar ist.

---

<sup>9</sup> Labofuge 400R, Heraeus Instruments

<sup>10</sup> Dimethyl sulphoxide, Sigma

<sup>11</sup> Cryogenic vial, Corning Incorporated

<sup>12</sup> Casy 1 Cell Counter, Schärfe System

<sup>13</sup> Casyton, Schärfe Systems

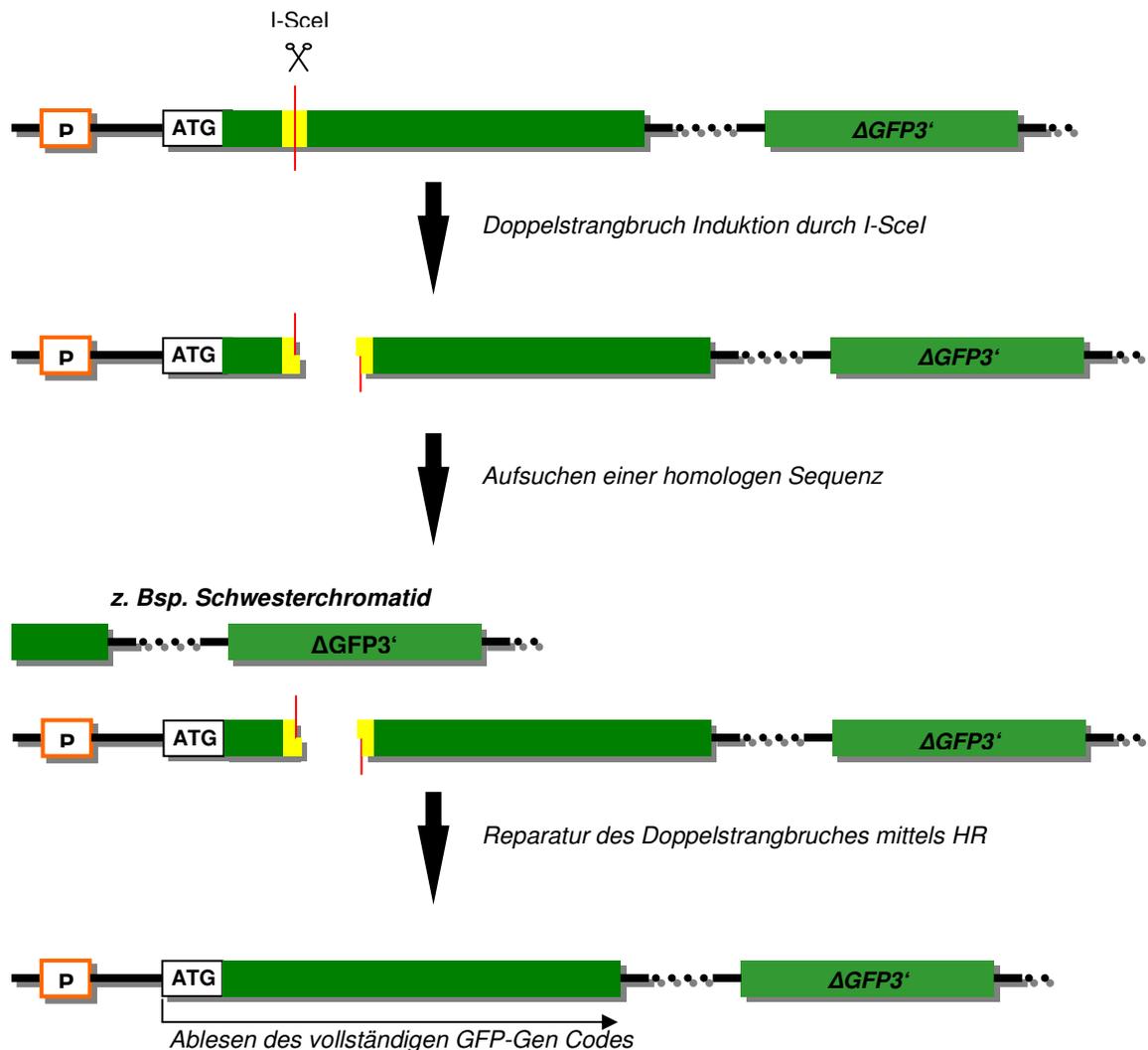


Abb. 3.1 Das Reparaturkonstrukt pGC. In die ursprüngliche Gensequenz des GFP-Gens wurde die Erkennungssequenz der I-SceI Endonuklease integriert. Zusätzlich wurde eine verkürzte Version des GFP Gens ( $GFP3'$ ) an die Gensequenz angehängt. Nach Induktion des DSB kann die Originalgensequenz unter Verwendung des verkürzten Abschnittes durch HRR wieder hergestellt werden und ein funktionstüchtiges GFP exprimiert werden.

### 3.1.3. Das Reparaturkonstrukt 10.1 pEJ

Die Zelllinie 10.1 pEJ (pGFSP6 in Schmidt Petersen 2003) enthält ein stabil integriertes Reporterkonstrukt zur Messung der Reparatur von Dsbs mittels NHEJ. Diesem Konstrukt wurde dem Startcodon des GFP-Gens ein zweites Startcodon vorgeschaltet, welches zum Ablezen eines unspezifischen Genprodukts führt. Der Leserahmen des neu integrierten Startcodons ist gegenüber dem Originalstartcodon verschoben, daher kommt es zu einer

nahezu vollständigen Unterdrückung der Transkription des GFP Gens. Dieses falsche Startcodon ist von zwei Schnittstellen für die Endonuklease I-SceI flankiert. Die Endonuklease I-SceI schneidet an den Schnittstellen und das falsche Startcodon wird entfernt. Nach Reparatur des verbleibenden Doppelstrangbruches durch NHEJ verbleibt nur das richtige Startcodon und ein funktionierendes GFP wird exprimiert. Die Grünfluoreszenz ist im Flusszytometer messbar.

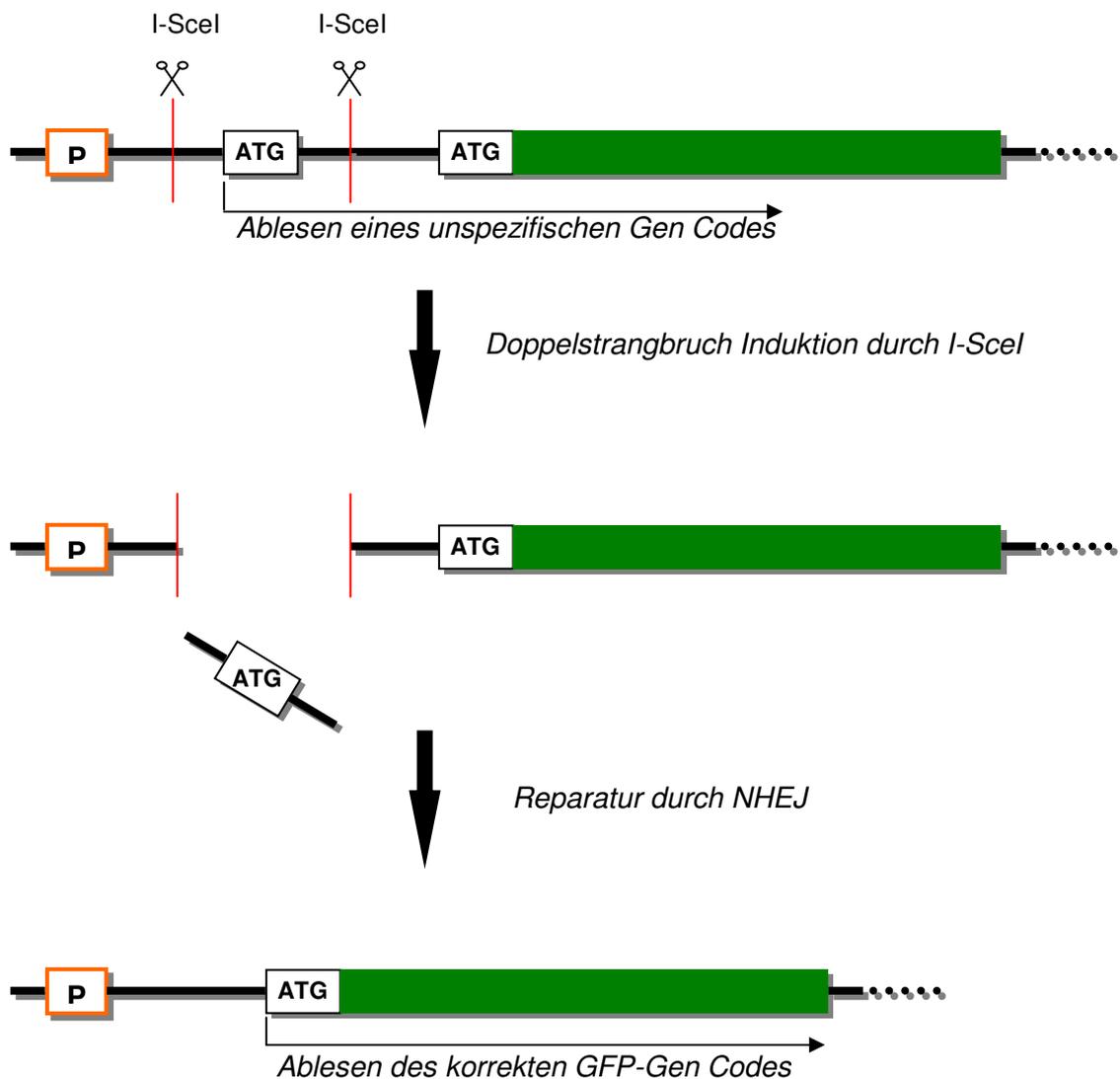


Abb. 3.2 Das Reparaturkonstrukt pEJ. Vor das ursprüngliche Startcodon wurde ein weiteres von zwei I-SceI Schnittstellen flankierten Startcodon integriert. Durch Expression der I-SceI Endonuklease wird das artifizielle Startcodon entfernt. Nach direkter Ligierung des entstandenen Bruches durch NHEJ kann wieder ein funktionsfähiges GFP exprimiert werden.

### 3.1.4. RNasefreie Zellkultur

Zellkulturmedium enthält normalerweise nicht-toxische Spuren von RNase, die jedoch synthetische siRNA schnell abbauen kann...Um negative Effekte auf die siRNA durch evtl. vorhandene RNase im Medium zu verhindern, wurden die Zellen vor jedem Experiment mit siRNA für mindestens drei Passagen in RNase-freiem DMEM<sup>14</sup> mit 10% FCS ohne Antibiotika kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin für 2 Minuten gelöst und dann mit 8ml RNasefreiem DMEM mit 10%FCS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden verdünnt ausgesät und im Brutschrank bei 37° C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5 %CO<sub>2</sub> kultiviert. In Experimenten mit siRNA wurden außerdem ausschließlich RNasefreie Pipettenspitzen<sup>15</sup>, sowie RNasefreie Reaktionsgefäße<sup>16</sup> verwendet. Die Arbeitsfläche wurde vor Experimentbeginn mit RNaseAway<sup>17</sup> gründlich gereinigt.

### 3.2. siRNA Transfektion

RNA-Interferenz ist ein natürlich vorkommender zellulärer Mechanismus zur Regulierung der Proteinexpression. Zunächst konnte dieser Mechanismus im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen werden (Fire et al. 1999). Eine in die Zelle eingebrachte doppelsträngige DNA (dsRNA) führt zu einer gezielten Ausschaltung der korrespondierenden mRNA. Ein ähnlicher Vorgang ist mit der posttranskriptionalen Gensuppression in Pflanzen und dem Quelling in Pilzen bekannt (Tuschl 2001). In Säugetierzellen konnte diese Technik erstmals 2001 durchgeführt werden, nachdem herausgefunden wurde, dass die dsRNA zunächst in kleine 21 – 22 bp lange Stücke, die so genannte small-interfering RNA (siRNA), geschnitten wurde (Elbashir 2001a, Elbashir 2001b). Die dsRNA bindet in der Zelle an bestimmte Proteine und bildet den RNA-induced silencer Komplex. Dieser Komplex baut die für die dsRNA komplementäre mRNA ab (Hammond et al. 2000). Dadurch sinkt die Menge der zur Translation zur Verfügung stehenden mRNA und damit verringert sich auch vorübergehend die Menge an Mre11-Protein in den Zellen.

---

<sup>14</sup> 13,8g DMEM, Gibco + 2g NaHCO<sub>3</sub> in 1 l ultraPURE distilled water, Gibco

<sup>15</sup> Safeseal-Tips® professional 1000µl, 200µl, 100µl, 20µl, Biozym

<sup>16</sup> Safe-Lock Tues 1,5 ml PCR Clean, Eppendorf

<sup>17</sup> RNase AWAY, Molecular BioProducts

Die RNA-Interferenz bietet sich für diese Arbeit an, da sie eine sehr spezifische Methode zum Knock-down ausgewählter Proteine ist und demgegenüber die Knock-out Technik im Fall von Mre11 nicht möglich ist.

Die siRNA Moleküle wurden mit dem kationischen Lipofektionsagens Lipofektamin2000<sup>18</sup> in die Zellen eingeschleust. Die kationischen Lipide bilden mit der siRNA lipophile Komplexe, die die Zellmembran durchwandern können.

### 3.2.1. Verwendete siRNA's

Für die Versuche wurden drei verschiedene siRNA's verwendet. Zum Knockdown von MRE11 wurde eine 19bp lange dsRNA benutzt. Die Sequenz ist homolog zu den Basen 741 -759 auf dem Maus MRE11-Gen. Die Sequenz wurde gemäß der zur Verfügung stehenden Literatur gewählt (Reynolds et. al. 2004, Pei und Tuschl 2006). Als Kontrolle wurde eine 21 bp lange dsRNA verwendet, die keinerlei Homologie auf dem Mausgenom besitzt. Zur Kontrolle der Aufnahme der siRNAs in die Zellen wurde eine siRNA gewählt an deren 5'Ende Fluorescein, ein grün fluoreszierender Farbstoff, gebunden wurde. Alle Sequenzen wurden auf evtl. Homologien in anderen Genen des Mausgenoms mit Blast search der NCBI Datenbank untersucht. Die Kontroll siRNAs hatten keine Homologien im Mre11 Gen. Für alle 3 siRNAs fand sich keine Homologie in anderen Genen im Mausgenom.

<i>siRNA MRE11</i> <sup>19</sup>	5' GGAAGAUGAGAACUCAUGG TT 3' TT CCUUCUACUCUUGAGUACC
<i>Kontroll siRNA</i> <sup>20</sup>	5' AAGUCUGCAUACUAGACUAGC TT 3' 3' TT UUCAGACGUAUGAUCUGAUCG
<i>Fluorescein markierte siRNA</i> <sup>21</sup>	5' FI CGUACGCGGAAUACUUCGA TT 3' TT GCAUGC GCCUUAUGAAGCU

Tab 2.1 Sequenzen der verwendeten siRNA

<sup>18</sup> Lipofektamin<sup>TM</sup>2000, Invitrogen

<sup>19</sup> siMRE11, MWG Biotech AG

<sup>20</sup> Scr siRNA, MWG Biotech AG

<sup>21</sup> FI-LuciferaseGL2 Duplex, Dharmacon

### 3.2.2. Aufnahme der siRNA

Die siRNA wurde mittels kationischer Lipofektion in die Zellen gebracht. Dazu wurden die RNA Moleküle mit den kationischen Lipiden des Lipofektamin2000 zusammengebracht und bildeten lipophile Komplexe, die über die Zellmembran aufgenommen werden konnten. Die Aufnahme der Lipofektamin2000-siRNA-Komplexe sollte während der exponentiellen Wachstumsphase erfolgen. Zur Überprüfung der Aufnahme der siRNA in die Zellen wurde eine Fluorescein-markierte siRNA verwendet. Die Aufnahme wurde im Flusszytometer<sup>22</sup> bestimmt. Es wurden  $1,5 \times 10^5$  und  $3 \times 10^5$  Zellen in  $75 \text{ cm}^2$  sowie  $3 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  und  $10 \times 10^5$  Zellen in  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen ausgesät. Als Kontrolle diente eine Flasche mit  $3 \times 10^5$  Zellen. Nach 48 h Wachstum wurde die Lipofektamin-siRNA-Lösung anhand der Empfehlung der Firma Invitrogen vorbereitet. Es wurden  $230 \mu\text{l}$  Fluorescein-markierte siRNA ( $20 \mu\text{M}$ ) zu  $670 \mu\text{l}$  Opti-Mem Medium und  $126 \mu\text{l}$  Lipofektamin 2000 wurden zu  $674 \mu\text{l}$  Optim-Mem Medium gegeben. Nach 5 min Inkubation wurden beide Lösungen gemischt, und weitere 20 min im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden je  $445 \mu\text{l}$  der Lösung mit 4 ml RNasefreiem DMEM mit 2% FCS in die  $75 \text{ cm}^2$  und  $148 \mu\text{l}$  mit 1,35 ml RNasefreiem DMEM mit 2% FCS in die  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen gegeben. Als Kontrolle wurden entsprechend  $20 \mu\text{l}$  siRNA scrambled ( $20 \mu\text{M}$ ) in  $230 \mu\text{l}$  OptiMem und  $11 \mu\text{l}$  Lipofektamin in  $239 \mu\text{l}$  OptiMem inkubiert und dann mit 1 ml RNasefreiem DMEM mit 2% FCS in die Zellkulturflasche gegeben. Nach 4 Stunden wurde das siRNA Medium abgesaugt und die Zellen für die Flusszytometrie vorbereitet.

### 3.2.3. Transfektion der MRE11 siRNA und der Kontroll siRNA

In T75 Gewebekulturflaschen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Als Kontrollen wurden je einmal  $2 \times 10^5$  und  $1,2 \times 10^5$  in T75 Gewebekulturflaschen ausgesät. Nach 24h Wachstum wurde die siRNA-Lipofektionslösung in Anlehnung an das Invitrogen Lipofektamin-Protokoll vorbereitet, das mit geringen Unterschieden dem zuvor beschriebenen Protokoll entspricht. Dazu wurden zuerst  $13 \mu\text{l}$  siRNA Mre11 ( $80 \mu\text{M}$ ) in  $487 \mu\text{l}$  Opti-MEM und  $52 \mu\text{l}$  Kontroll siRNA ( $20 \mu\text{M}$ ) in  $448 \mu\text{l}$  Opti-MEM gelöst. Dann wurden  $30 \mu\text{l}$  Lipofektamin2000

---

<sup>22</sup> FACScan, Beckton Dickinson

in 470µl Opti-Mem Medium gelöst. Nach 5 Minuten Inkubation wurden die siRNA Lösungen zur Lipofektaminlösung hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation für 20 Minuten im Dunkeln. 4ml RNasefreies DMEM mit 2% FCS wurden zusammen mit der siRNA-Lipofektaminlösung in die Zellkulturflaschen mit  $5 \times 10^5$  Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde die Lösung wieder abgesaugt und gegen 15ml RNasefreies DMEM mit 10% FCS ersetzt. Die Zellen wurden weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

### **3.3. Western Blot**

Um den erfolgreichen Knockdown von Mre11 durch die siRNA zu testen, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Dabei wurde zunächst das Protein aus den Zellen extrahiert. Die Proteine werden dann durch eine Gelelektrophorese getrennt und anschließend auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) überführt. Bestimmte Proteine konnten dann mit spezifischen primären Antikörpern nachgewiesen werden und durch eine an einen sekundären Antikörper gebundene Peroxidase kann ein Lichtsignal erzeugt werden. Das Lichtsignal wird zur quantitativen Analyse mit einer hochsensitiven CCD-Video Kamera aufgenommen und danach auf einem Röntgenfilm festgehalten.

#### **3.3.1. Proteinextraktion und Bestimmung**

Die zu extrahierenden Zellen wurden 2x mit 10ml PBS gewaschen, bei 1200 rpm 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellett wurde mit 1 ml PBS gelöst und anschließend in Eppendorftubes<sup>23</sup> überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1500 rpm und 4°C in der Microfuge<sup>24</sup> für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellett 1:1 in Lysis-Puffer<sup>25</sup> aufgenommen. Die Lösung wurde 4-mal für einige Sekunden in flüssigen Stickstoff gefroren und anschließend im Heizblock<sup>26</sup> bei 30°C getaut. Die Suspension wurde anschließend für 10 Minuten bei 11000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorftube überführt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Überstandes wurde nach der Biuret-Methode durchgeführt. 2 µl des Überstandes wurden zur Konzentrationsbestimmung mit

---

<sup>23</sup> Eppendorf Tubes, Sarstedt

<sup>24</sup> Microfuge® R, Beckman

<sup>25</sup> Protease Inhibitor Cocktail, Sigma

<sup>26</sup> Thermomixer comfort, Eppendorf

48µl destilliertem Wasser verdünnt. 2µl des Lysis-Puffers wurden ebenfalls mit 48µl destilliertem Wasser zur Null-Kontrolle verdünnt. Die BCA Lösungen A<sup>27</sup> und B<sup>28</sup> wurden im Verhältnis 1:50 zusammengefügt. 1 ml dieser Lösung wurde zur Proteinelösung hinzugegeben und nach 30 Minuten Inkubation im Wasserbad<sup>29</sup> wurde die Lösung in eine Photometerküvette<sup>30</sup> überführt und die Proteinkonzentration bei 545 nm im Photometer<sup>31</sup> bestimmt.

### 3.3.2. Gelelektrophorese und Blot

30 µg Protein wurden mit 10µl Auftragspuffer<sup>32</sup> und H<sub>2</sub>O zu insgesamt 20 µl zusammengegeben. Zur Denaturierung der Proteine wurde die Lösung für 8 Minuten in kochendem Wasser und dann weitere 8 Minuten auf Eis inkubiert. Ein 10% Polyacrylamidgel<sup>33</sup> wurde für 5 Minuten in Tris-Glycin-Puffer<sup>34</sup> (TG-Puffer) equilibriert. Das Gel wurde in eine Gelelektrophoresekammer<sup>35</sup> eingespannt und diese mit TG-Puffer gefüllt. Die gekochte Proteinelösung wurde in die Kammern pipetiert. Zur Überprüfung des Gellaufs und des Blots wurde 10µl des direkt im Gel und auf der Membran sichtbaren Benchmark<sup>36</sup> Markers, sowie als Größenstandard 5 µl des erst nach Detektion mit ECL sichtbaren MagicMarkers<sup>37</sup> in mindestens eine Tasche des Gels pipetiert. Anschließend wurde ein Sammlungslauf mit 100V für 10 Minuten durchgeführt und dann eine Trennungsphase bei 200V für 90 Minuten auf Eis.

Danach wurde zum Blot eine 7x9 cm große PVDF-Membran<sup>38</sup> ausgeschnitten, 30 Sekunden in Methanol<sup>39</sup> aktiviert, 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und zusammen mit 2 Schwämmen und 4 Whatmanfilterpapieren<sup>40</sup> für weitere 5 Minuten in Transferpuffer<sup>41</sup> equilibriert. Das Elektrophoresegel wurde ebenfalls für 5 Minuten in

---

<sup>27</sup> Bicinchoninic Acid solution, Sigma

<sup>28</sup> Copper(II) sulfate solution, Sigma

<sup>29</sup> Thermostat, Lauda

<sup>30</sup> Küvetten halb-mikro, Greiner bio-one

<sup>31</sup> BioPhotometer, Eppendorf

<sup>32</sup> Ref. Solutions

<sup>33</sup> Pager<sup>®</sup> Gold Precast Gels, Lonza

<sup>34</sup> 14,4g Glycin, Roth 3,03g Trizma base, Sigma ad 1 L ddH<sub>2</sub>O + 10ml 10% sodium dodecyl sulfate, Sigma

<sup>35</sup> Ready Gel Cell, Bio-Rad

<sup>36</sup> BenchMark<sup>™</sup> prestained Protein Ladder, Invitrogen

<sup>37</sup> MagicMarktm XP Western Stanard, Invitrogen

<sup>38</sup> Immun-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad

<sup>39</sup> Methanol, J.T. Baker

<sup>40</sup> Gel-Blotting-Papier, Schleicher und Schuell

<sup>41</sup> 28.8g Glycin, 6,06 g Trizma base, 300 ml Methanol ad 1,5l ddH<sub>2</sub>O

Transferpuffer equilibriert. Ein Schwamm, 2 Whatmanpapiere, das Elektropheresegel, die PVDF-Membran, erneut 2 Whatmanpapiere und der letzte Schwamm wurden in dieser Reihenfolge in die Blotkammer<sup>42</sup> gelegt. Die Blotkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und die Proteine wurden für 55 Minuten bei 100V auf Eis in die Membran überführt.

### 3.3.3. Immunodetektion und Proteinquantifizierung

Die Membran wurde vorsichtig herausgenommen und für wenige Minuten in PBS gewaschen. Für die nächsten 2 Stunden folgte die Blockierung in 20 ml PBS mit 10% Magermilch<sup>43</sup> und 120µl Tween<sup>44</sup>. Im Anschluss danach folgte eine Inkubation mit 5µl anti-MRE11-Kaninchen-Antikörper<sup>45</sup> in 10ml PBS mit 5% Magermilch und 60µl TWEEN über Nacht bei 4° C. Am folgenden Tag wurde die Membran zunächst 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden 3 Waschschrte in PBST<sup>46</sup> durchgeführt. Es folgte eine einstündige Inkubation mit 2µl Anti-Kaninchen-Antikörper<sup>47</sup> in 10 ml PBS mit 5% Magermilch und 60µl TWEEN. Die bereits beschriebene Waschprozedur wurde wiederholt. Die Membran wurde dann 1 Minute mit 3 ml ECL-Lösung<sup>48</sup> inkubiert. Zur quantitativen Bestimmung des Mre11 Signals wurde das Lichtsignal zunächst mit einer hochsensitiven CCD-Kamera<sup>49</sup> gemessen. Die Auswertung der gemessenen Lichtsignale erfolgte mit der Software WinLight<sup>50</sup>. Anschließend wurde für 2-4 Minuten ein Röntgenfilm<sup>51</sup> unter Ausschluss anderer Lichtquellen auf die Membran gelegt. Der Film wurde für 2 Minuten in den Entwickler<sup>52</sup> und dann kurz in Fixierlösung<sup>53</sup> gelegt. Als Vergleichsstandard wurde außerdem immer das Protein  $\beta$ -Actin bestimmt. Die Membran wurde hierfür erneut für eine Stunde blockiert und dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 1µl  $\beta$ -Actin-Antikörper<sup>54</sup> in 20ml PBS mit 5% Magermilchpulver, 120 µl TWEEN inkubiert. Nach 3 Waschschrten in PBST für 10 Minuten wurde die Membran

---

<sup>42</sup> Mini Trans-Blot® Cell, Bio-Rad

<sup>43</sup> Naturaflo Magermilchpulver, Töpfer

<sup>44</sup> TWEEN®, Sigma

<sup>45</sup> pAB Anti hMRE11, Novus Biologicals

<sup>46</sup> 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,72 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,2g KCl, 8gNaCl ad 1L ddH<sub>2</sub>O + 3ml TWEEN

<sup>47</sup> ECLtm Anti-rabbit IgG, Horseradish peroxidase linked whole antibody (from donkey), GE Healthcare

<sup>48</sup> ECL™ Western Blotting Detections Reagents, Amersham Bioscience

<sup>49</sup> NightOwl, Berthold Technologies

<sup>50</sup> Winlight, Berthold Technologies

<sup>51</sup> CL-Xposure Film. Pierce

<sup>52</sup> Eukobrom B/W paper developer, Tetenal, 40 ml ad 400 ml H<sub>2</sub>O

<sup>53</sup> Superfix Plus, Tetenal, 200ml ad 600ml H<sub>2</sub>O

<sup>54</sup> Monoclonal anti- $\beta$ -actin clone ac-15, Sigma

für eine Stunde in 10µl Anti-Mouse-Antikörper<sup>55</sup> in 10ml PBS mit 5% Magermilchpulver und 60 µl TWEEN inkubiert. Die Membran wurde mit wenig PBST eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

### **3.4. Transfektion des pCMV3xNLS-I-SceI Plasmids**

Doppelstrangbrüche wurden durch die Endonuklease I-SceI induziert. Die c-DNA der I-SceI Endonuklease wurde aus *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen und in ein Expressionsplasmid kloniert. Sie schneidet innerhalb einer 18 bp Erkennungssequenz, die in die hier verwendeten Reporterkonstrukten integriert wurde. Die Expression dieser Endonuklease ist für Mauszellen nicht toxisch, da die Erkennungssequenz aufgrund ihrer Länge und Spezifität im Säuger genom natürlicherweise nicht vorkommen sollte, und die Endonuklease somit keine weiteren Dsb erzeugt (Rouet et al. 1994).

#### **3.4.1. Kontrolle der Aufnahme der Plasmide**

Zur Überprüfung der Aufnahme der Plasmide in die Zellen wurde ein Plasmid transfiziert, das ein funktionstüchtiges GFP Gen trägt. Zunächst wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in T25 Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 24 h wurden 8µg dieses pEGFP-N1<sup>56</sup> Plasmides in 500 µl Opti-MEM Medium gelöst. 20 µl Lipofektamin wurden dann in 480 µl Opti-MEM gelöst und beide Lösungen nach 5 Minuten vermischt. Nach weiteren 20 Minuten Inkubationszeit wurde die Lösung zusammen mit 4 ml RNasefreiem-DMEM mit 10% FCS zu den Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für die Flusszytometrie vorbereitet und der Anteil der grün-fluoreszierenden Zellen bestimmt.

#### **3.4.2. Transfektion des pCMV3xNLS-I-SceI Plasmids**

Versuche das Plasmid pCMV3xNLS-I-SceI im Anschluss an eine siRNA Transfektion mit Lipofektamin durch Elektroporation in die Zellen zu transferieren, führten zu einem

---

<sup>55</sup> ECLtm Anti-mouse IgGHorseradish peroxidase linked F(ab)2 fragment from sheep, GE Healthcare

<sup>56</sup> pEGFP-N1, Clontech

starken Absterben der Zellen. Es konnten nicht ausreichend Zellen zur Messung im Flusszytometer gewonnen werden, so dass diese Methode verworfen werden musste. Das Plasmid pCMV3xNLS-I-SceI wurde daher ebenfalls mit Lipofektamin transient in die Zellen transfiziert.

Die Plasmidtransfektion wurde modifiziert nach dem Invitrogen Lipofektamin 2000-Protokoll durchgeführt. Das Plasmid wurde in 500 µl Opti-MEM Medium gelöst. 20µl Lipofektamin 2000 wurden anschließend zu 480µl Opti-MEM gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurden beide Lösungen zusammengegeben. Nach weiteren 20 Minuten Inkubation wurde bei den zu transfizierenden Zellen das Medium entfernt und durch 4 ml RNasefreies DMEM mit 2% FCS ersetzt. Das Plasmid-Lipofektamingemisch wurde hinzugegeben. Um den toxischen Effekt des kationischen Lipofektationsagens zu minimieren, wurde die Lösung nach 6 Stunden abgesaugt und durch 15 ml RNasefreies DMEM ausgetauscht. Nach 24 Stunden für NHEJ bzw. 48 Stunden für HRR wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie vorbereitet.

#### ***3.5. Plasmidpräparation und Restriktionsverdau***

Das pCMV3xNLS-I-SceI Plasmid wurde in *E. coli* transformiert durch diese vermehrt und anschließend wieder durch Präparation an Anionenaustauscher-Säulen zurückgewonnen.

Zunächst wurde das Plasmid durch Elektroporation in Bakterien transformiert. Dabei kommt es durch einen kurzen elektrischen Puls zur Öffnung von Poren in den Bakterienzellen durch welche das Plasmid aufgenommen wird. 10 µl *E. coli*<sup>57</sup> Suspension wurden zusammen mit 0,1 µg I-SceI Plasmid in 20µl Wasser in die Elektroporationsküvette gegeben. Im Elektroporator<sup>58</sup> wurde ein Impuls von 1800 V und 950 µF gegeben. Anschließend wurden die Bakterien für 1 Stunde bei 37° C in 800 µl LB-Medium<sup>59</sup> kultiviert. Die Bakterien wurden dann über Nacht auf LB-Agarplatten<sup>60</sup> zu Kolonien gezüchtet.

Für die Präparation der Plasmide aus den transformierten Bakterien wurde das NucleoBond-Kit<sup>61</sup> der Firma Macherey-Nagel verwendet.

---

<sup>57</sup> DH 10 B, Gibco

<sup>58</sup> *E. coli* Pulser, Biorad

<sup>59</sup> 10g Bactotrypton, 5g Bactoyeast Extract 10g NaCl, 1ml NaOH ad 1l ddH<sub>2</sub>O

<sup>60</sup> 400ml LB-Medium mit 6 g Agar

<sup>61</sup> NucleoBond PC 500, Macherey-Nagel

Eine Kolonie der transformierten Bakterien wurde gepickt und erneut in LB-Medium angezchtet. 150 ml dieser Suspension wurden bei 4000 rpm für 15 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 12 ml in Puffer S1 + RNaseA<sup>62</sup> resuspendiert. Anschließend wurden 12 ml des Puffers S2<sup>63</sup> hinzugefügt und die Suspension durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Dann wurde der auf 4° C gekühlte Puffer S3<sup>64</sup> hinzugegeben und die Suspension erneut durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Die Austauschersäule wurde mit dem Puffer N2<sup>65</sup> equilibriert. Die Bakteriensuspension wurde dann für 40 Minuten bei 4 ° C bei 11000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurden vorsichtig auf die Austauschersäule gegeben. Im Anschluss wurde die Säule mit 32 ml des Puffer N3<sup>66</sup> gewaschen. Mit 15 ml Puffer N5<sup>67</sup> wurde die Plasmid DNA dann aus der Säule eluiert. Die im Eluat gelöste DNA wurde mit 11ml Isopropanol precipitiert und bei 11000 rpm für 30 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet kurz in 75% Ethanol gewaschen und erneut bei 11000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem das Ethanol vorsichtig entfernt wurde, wurde das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in etwas destilliertem Wasser gelöst.

Die DNA-Konzentration wurde bei 260 nm im Photometer bestimmt, wobei eine OD von 1 der Menge von 50µg DNA/ml entsprechen.

Zur Kontrolle des Plasmid und evtl. Verunreinigungen wurde ein Restriktionsverdau und anschließende Gelelektrophorese durchgeführt. Bei einem Restriktionsverdau wird die eingesetzte ringförmige Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen in kleinere lineare DNA-Stücke geschnitten. Diese können in der Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Anhand der Größe der einzelnen Bruchstücke kann das Plasmid identifiziert werden. Die DNA wurde durch Zugabe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das Ethidiumbromid interkaliert die DNA und lässt sie unter UV-Licht orange fluoreszieren.

Für den Restriktionsverdau wurden 0,5 µg DNA in 20µl H<sub>2</sub>O mit 5 Einheiten (IU) AflIII Endonuklease<sup>68</sup> zusammengegeben und für eine Stunde bei 36° C inkubiert. Nach Hinzugabe eines Auftragspuffers<sup>69</sup> wurden 10 µl der Lösung in eine Tasche eines 1%

---

<sup>62</sup> 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100µg RNaseA, pH 8,0

<sup>63</sup> 200 mM NaOH, 1% SDS

<sup>64</sup> 2,8 M KAc , pH 5,1

<sup>65</sup> 100 mM Tris, 15% Ethanol, 900 mM KCl, 0,15% Triton X-100, durch H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 6,3 justiert

<sup>66</sup> 100 mM Tris, 15% Ethanol, 1,15 M KCl, durch H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 6,3 justiert

<sup>67</sup> 100 mM Tris, 15% Ethanol , 1 M KCl, durch H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 8,5 justiert

<sup>68</sup> AflIII, NEB

<sup>69</sup> 0,5% SDS; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 31% Glycerol (w/v), 25mM EDTA in ddH<sub>2</sub>O

Agarosegels<sup>70</sup> gegeben, das in 0,5x TBE<sup>71</sup>-Puffer in der Gelkammer vorbereitet war. In eine weitere Tasche des Gels wurde 0,5 µg unverdaute DNA mit Auftragspuffer und zusätzlich in eine weitere ein Größenstandard<sup>72</sup> gegeben. Nach einem etwa einstündigen Lauf bei 100V wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet.

### ***3.6. Durchflusszytometrie***

Sowohl die Fluorescein markierte siRNA als auch die GFP-exprimierenden Zellen fluoreszieren grün, wenn sie mit blauem Licht angeregt werden. Diese Fluoreszenz kann mit einem Flusszytometer gemessen werden. Im FACScan Flusszytometer werden Zellen einzeln durch eine feine Kapillare gesogen und passieren dort einen Laser mit 488 nm Wellenlänge. Zellen die in der Kapillare angestrahlt werden erzeugen Streulicht. Mehrere Photodetektoren messen dieses Streulicht. Durch Beugung des Lichts entstandenes Vorwärtsstreulicht (FSC) gibt Auskunft über die Größe der Zellen. Das durch Brechung entstandene Seitwärtsstreulicht (SSC) über die Granularität der Zellen. Weitere Photodetektoren messen spezifische Wellenlängen und ermitteln somit die Farbfluoreszenz der Zellen. FL1 gibt die Grünfluoreszenz und FL2 die Rotfluoreszenz der Zellen an.

Die Zellen wurden in Vorbereitung auf die Flusszytometrie zunächst mit Trypsin gelöst und in 10ml PBS aufgenommen. Nach 3 Minuten Zentrifugation mit 1200 rpm wurde das PBS abgesaugt und die Zellen erneut in 10ml PBS aufgenommen. Nach weiteren 3 Minuten Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 1 – 1,5 ml PBS vorsichtig resuspendiert. Um Zellverklumpungen zu entfernen, wurde die Suspension durch eine feine Gaze filtriert und in ein FACS Röhrchen überführt.

Es wurden durchschnittlich 500.000 Zellen je Probe gemessen.

Anhand der Partikelgröße und Lichtstreuung (FSC und SSC) wurden evtl. vorhandene Verunreinigungen und Zelltrümmer aus der Wertung ausgeschlossen. Anhand einer unbehandelten Kontrollprobe wurde der FL1 Grenzwert festgelegt, oberhalb dessen eine Zelle als grünfluoreszierend galt. Anschließend wurde das Verhältnis zwischen grünfluoreszierenden und der Gesamtzellzahl bestimmt.

---

<sup>70</sup> 1 g Agarose in 100 ml 0,5 x TBE und 3 µl 1% Ethidiumbromid

<sup>71</sup> 5,4 g Tris-Base; 2,75 g Borsäure; 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1l ddH<sub>2</sub>O

<sup>72</sup> Gibco

## 4. Ergebnisse

### *4.1. Zellwachstum und siRNA Transfektion*

Für die Planung zellbiologischer Experimente mit RNA-Interferenz ist es notwendig das Wachstumsverhalten der Zellen zu kennen, da die Aufnahme der siRNA mit Hilfe einer kationischen Lipofektionsagenz während der exponentiellen Wachstumsphase am höchsten ist. Um die optimalen Transfektionsbedingungen für die Mre11 siRNA zu finden wurde eine Fluorescein markierte siRNA in unterschiedlich dicht ausgesäte Zellen transfiziert. Zellen, die erfolgreich Fluorescein markierte siRNA aufgenommen haben, leuchten nach Anregung mit blauem Licht grün. Diese Grünfluoreszenz kann im Flusszytometer gemessen und die Transfektionseffizienz als Anzahl grünfluoreszierender Zellen bestimmt werden. Um die optimalen Transfektionsbedingungen für die Mre11 siRNA zu finden, wurde eine Fluorescein markierte siRNA in unterschiedlich dicht ausgesäte Zellen 24h nach deren Aussaat in der exponentiellen Wachstumsphase transfiziert und die Grünfluoreszenz der Zellen vier Stunden nach der Transfektion im Flusszytometer bestimmt. Bei einer sehr dünn ausgesäten Anzahl Zellen von  $0,2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> fluoreszierten 92% der Zellen (Abb. 4.2.). Mit zunehmender Zellzahl verschlechterte sich die Transfektionseffizienz. Bei einer Zellzahl von  $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> lag der Anteil der grünfluoreszierenden Zellen nur noch bei 75%.

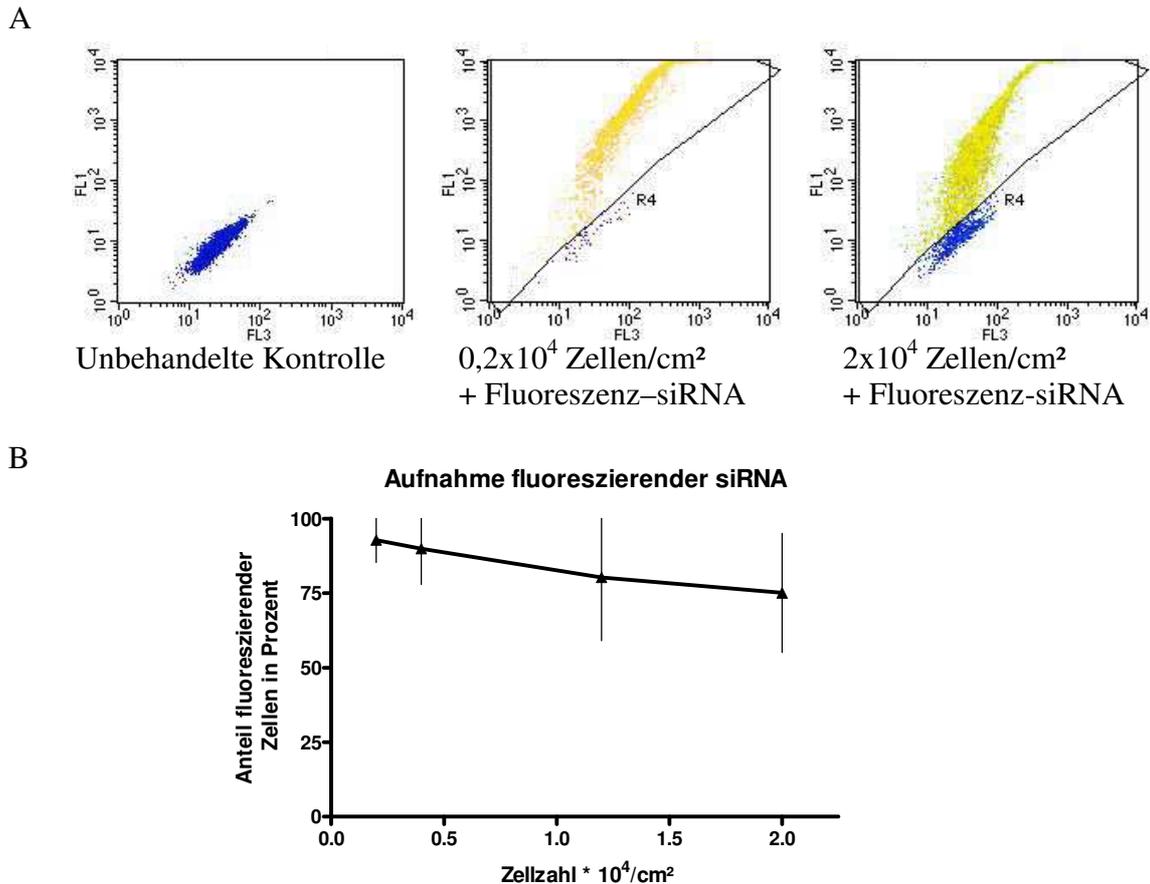


Abb. 4.1. Transfektionseffizienz einer grün fluoreszierenden siRNA

A) Transfektion von Fluoreszeinkonjugierter siRNA in unterschiedlich dicht ausgesäte Mausfibroblasten. FL1 = Grünfluoreszenz FL2 = Rotfluoreszenz. Links eine unbehandelte Kontrolle, Mitte Transfektion von 200nM siRNA 24h nach Aussaat von  $0,2 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup>. Rechts Transfektion von 200nM siRNA 24h nach Aussaat von  $2 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup>. Messung der Grünfluoreszenz am Flusszytometer 4h nach Transfektion

B) Anteil der grün fluoreszierenden Zellen in Prozent

## 4.2. Knock-down von Mre11

Mre11 wurde durch RNA-Interferenz herunterreguliert. Dafür wurden die Zellen mit Mre11 siRNA und als Kontrolle mit einer unspezifischen siRNA transfiziert. 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Transfektion mit 200nM siRNA wurde aus den Zellen Protein isoliert. Dieses wurde in einem Westernblot aufgetrennt auf eine Membran übertragen und Mre11 mit einem Antikörper dargestellt.

Mit dem Antikörper gegen Mre11 konnte eine isolierte Bande bei 80 kDa dargestellt werden. Bereits 24h nach Transfektion mit Mre11 siRNA konnte eine Reduktion in der Intensität der Bande sowohl in der Zelllinie 10.1 pGC (Abb 4.2.A) als auch in der Zelllinie 10.1 pEJ (Abb. 4.3. C) gesehen werden. Im weiteren Verlauf kam es nach 48, 72 und 96 Stunden zu einer weiteren Abnahme der Intensität des Signals in der Zelllinie 10.1 pGC

(Abb. 4.3. A). Auch in der Zelllinie 10.1 pEJ war ein weiterer Rückgang in der Intensität der Bande nach 48 Stunden zu sehen. Jedoch nahm hier die Intensität bereits nach 72 Stunden nach der Transfektion wieder leicht zu (Abb. 4.3. C).

Zur genaueren Quantifizierung des relativen Mre11 Gehaltes in den Zellen wurde zusätzlich  $\beta$ -Actin als Kontrolle für eventuelle Unterschiede in der Proteinkonzentration bestimmt. Der relative Mre11 Gehalt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde durch Bestimmung des Lichtsignals von Mre11 nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz bestimmt. Unregelmäßigkeiten durch Unterschiede in der eingesetzten Proteinkonzentration wurden durch Bestimmung von  $\beta$ -Actin ausgeglichen.

24 Stunden nach Transfektion mit 200nM Mre11 siRNA konnte ein Abfall von Mre11 in der Zelllinie 10.1 pGC auf etwa 80% und 48 Stunden nach Transfektion auf etwa 45% im Vergleich zur mit einer unspezifischen siRNA behandelten Kontrolle beobachtet werden (Abb 4.3. B). In der Zelllinie 10.1 pEJ führte die Transfektion mit Mre11 SiRNA nach 24 Stunden zu einem Abfall von Mre11 auf etwa 56%. Nach 48 Stunden kam es zu einem weiteren Abfall auf 35%. Nach 72 Stunden kam es in der Zelllinie 10.1 pEJ bereits zu einem erneuten Anstieg des Mre11 Signals (Abb. 4.3. D).

Eine Erhöhung der siRNA Konzentration, brachte keine weitere Reduktion des Mre11 Gehaltes in den Zellen. Sowohl eine Transfektion von 200nM als auch 400nM siRNA senkte das Mre11 Signal 48 Stunden nach der Transfektion auf etwa 45% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zu mit unspezifischer siRNA behandelten Zellen ab (Abb. 4.3. E und F).

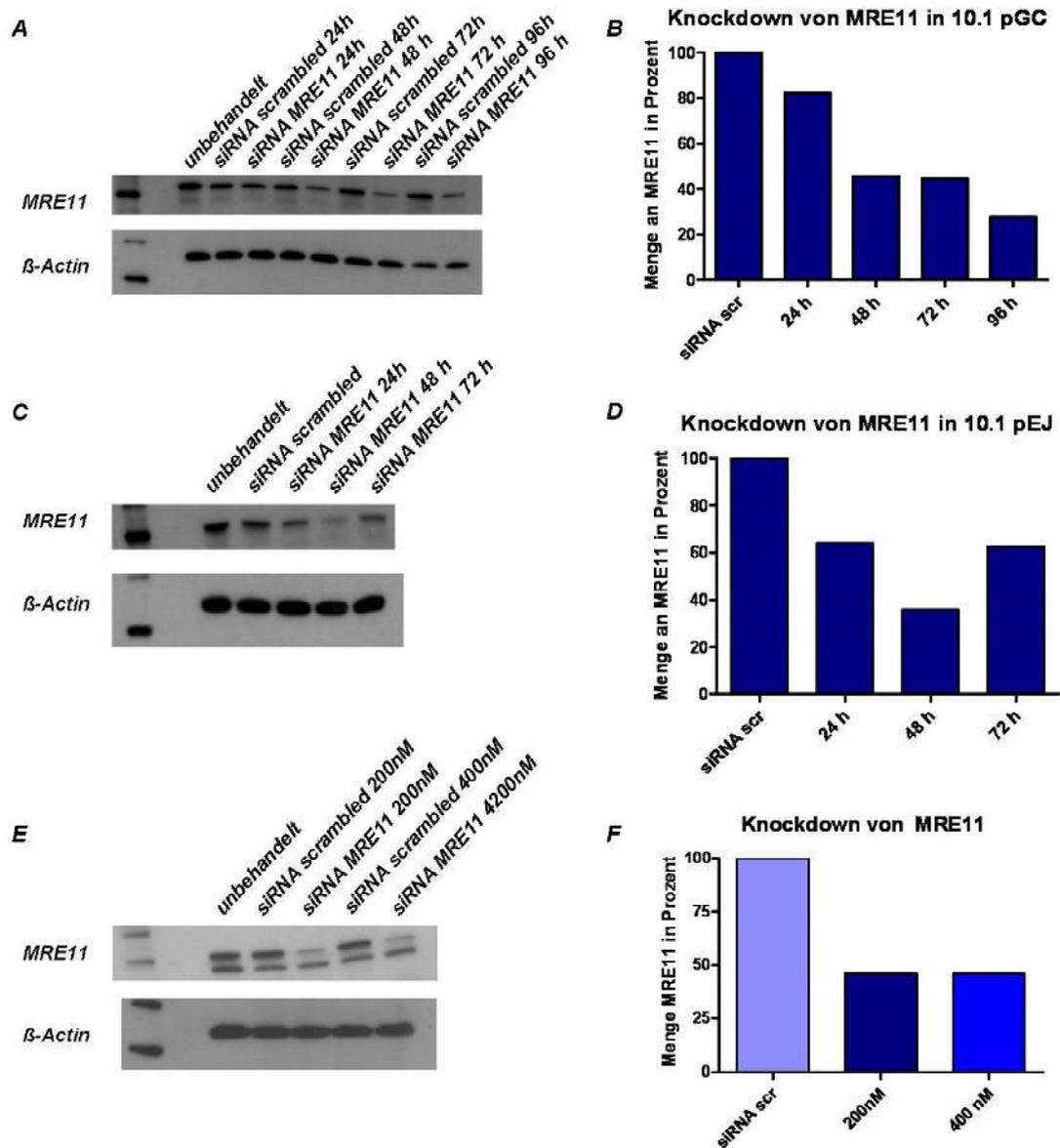


Abb 4.2. Knockdown von Mre11 mittels siRNA

A) Westernblot von Extrakten der Zelllinie 10.1pGC die mit 200nM siRNA gegen Mre11 oder Kontroll-siRNA (siRNA scrambled) behandelt wurden. Extraktion der Proteine erfolgte nach 24, 48, 72 und 96 Stunden. Die Kontrolle besteht aus Extrakt unbehandelter Zellen. B) Relative Menge an Mre11 in den Zellen. C) Westernblot von Extrakten der Zelllinie 10.1 pEJ die mit 200nM siRNA gegen Mre11 oder Kontroll-siRNA (siRNA scrambled) behandelt wurden. Die Kontrolle besteht aus Zellextrakt unbehandelter Zellen. D) Relative Menge an Mre11 in den Zellen. E) Westernblot aus Zellextrakten der Zelllinie 10.1 pEJ die mit 200nM und 400nM siRNA gegen Mre11 oder Kontroll-siRNA (siRNA scrambled) behandelt wurden. F) Relative Menge an Mre11 in Zellen.

### 4.3 Plasmidtransfektion

Zur Induktion eines Doppelstrangbruches in den Reporterkonstrukten sollte das pCMV3xNLS-I-SceI Plasmid transient in die Zellen transfiziert werden. Die bereits in der Arbeitsgruppe etablierte Methode der Elektroporation (Schmidt-Petersen 2003) konnte nicht verwendet werden, da nach Transfektion mit siRNA und anschließender Elektroporation viel zu wenig Zellen in den Zellkulturflaschen anwuchsen, so dass keine ausreichende Zellzahl im Flusszytometer gemessen werden konnte.

Als Alternative kam eine erneute Transfektion mit dem kationischen Lipofektionsagenz Lipofektamin 2000 in Betracht. Zur Überprüfung der Aufnahme des Plasmids in die Zelle wurde das Plasmid pEGFP-N1 in die Zellen transfiziert. In den Zellen wird das Grünfluoreszierende Protein exprimiert, das nach Anregung mit blauem Licht grün fluoresziert. Diese Fluoreszenz wurde im Flusszytometer bestimmt.

Nach Transfektion von 8 µg pEGFP-N1-Plasmid fluoreszierten durchschnittlich 60% der Zellen grün (Abb. 4.3)

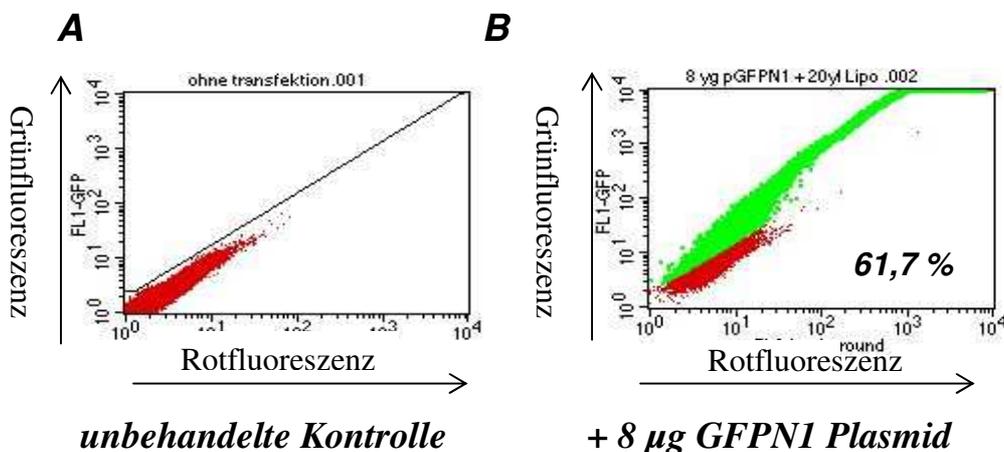


Abb 4.3 Transfektionseffizienz des eEGFP-N1 Plasmides

5x10<sup>5</sup> pEJ Zellen wurden ausgesät. Nach 24h wurden 8 µg pEGFP-N1 Plasmid mit 20 µl Lipofektamin 2000 transfiziert. Nach weiteren 24h wurde im Flusszytometer der Anteil grünfluoreszierender Zellen bestimmt. Links eine unbehandelte Kontrolle. Rechts nach Transfektion mit 8 µg pEGFP-N1 Plasmid

Nachdem wir die erfolgreiche Transfektion des pEGFP-N1-Plasmides mit Lipofektamin2000 durch Expression des GFP zeigen konnten, sollte als nächster Schritt die erfolgreiche Induktion eines Dsb durch die Endonuklease I-SceI nach Transfektion des

pCMV3xNLS-I-SceI Plasmids kontrolliert werden. Dazu transfizierten wir das pCMV3xNLS-I-SceI Plasmid in verschiedenen Konzentrationen. Nach Transfektion von 20  $\mu\text{g}$  Plasmid fluoreszierten 3,94% der Zellen grün (Abb 4.4).

Eine weitere Steigerung der Plasmidkonzentration führte zu keiner deutlichen Steigerung des Anteils an grün fluoreszierenden Zellen. Nach Transfektion von 30  $\mu\text{g}$  Plasmid fluoreszierten 4,14 % der Zellen grün. Neben dieser leichten Steigerung kam es jedoch zunehmend zu einem Absterben der Zellen nach der Transfektion, so dass nur wenige Zellen im Flusszytometer ausgewertet werden konnten. Wir transfizierten daher nach dem knock-down von Mre11 20  $\mu\text{g}$  pCMV3xNLS-I-SceI Plasmid zur Induktion von Dsb.

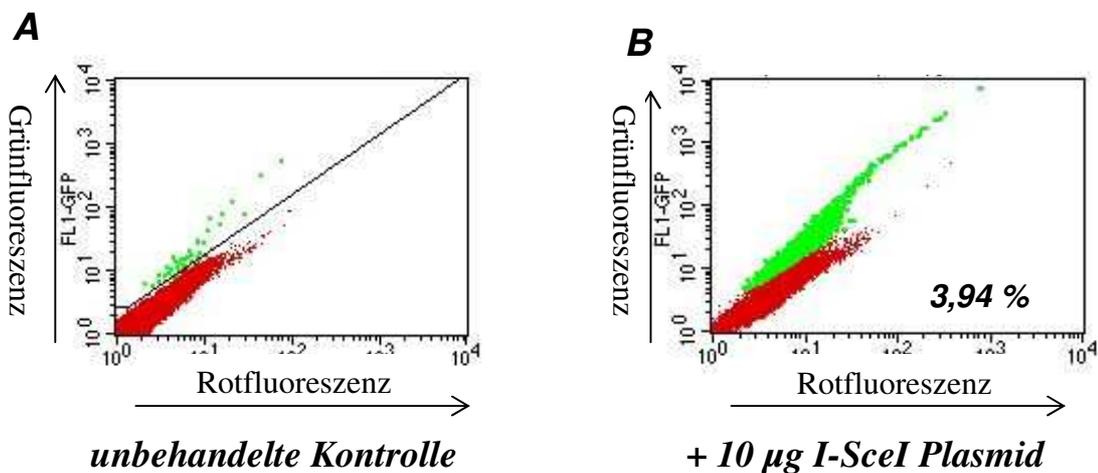


Abb. 4.4 Transfektion des pCMVxnl3-I-SceI Plasmids

$5 \times 10^5$  pEJ Zellen wurden ausgesät. Nach 24h wurden verschiedenen Konzentrationen I-SceI-Plasmid mit 20 mit Lipofektamin in die Zellen transfiziert. Nach weiteren 24h wurde der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen bestimmt. Links eine unbehandelte Kontrolle. Rechts Transfektion von 10  $\mu\text{g}$  I-SceI Plasmid.

#### 4.4 Einfluss von Mre11 auf die Regulation der Reparatur von Doppelstrangbrüchen

##### 4.4.1 Einfluss von Mre11 auf die Homologe Rekombination

Zur Überprüfung des Einflusses von Mre11 auf die HRR wurden zunächst 10.1 pGC Zellen mit siRNA gegen Mre11 oder der Kontroll siRNA behandelt. 48 Stunden später wurde das pCMV3xNLS-I-SceI Plasmid transfiziert. Zu jedem Experiment wurden zeitgleich unbehandelte Zellen ausschließlich mit pCMV3xNLS-I-SceI transfiziert, um

Fehler bei der Transfektion des Plasmids auszuschließen. Nach weiteren 48 Stunden wurde die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen im Flusszytometer bestimmt. Eine erfolgreiche Reparatur des Dsb durch HRR führt zur Wiederherstellung des funktionsfähigen GFP-Gencodes. Das Grünfluoreszierende Protein kann in diesen Zellen exprimiert werden und führt zur im Flusszytometer messbaren Grünfluoreszenz der Zellen.

Nach Transfektion von pCMV3xNLS-I-SceI fluoreszierten  $0,26\% \pm 0,1\%$  der unbehandelten Zellen grün. Bei den mit einer unspezifischen siRNA behandelten Zellen sank der Anteil der grünfluoreszierenden Zellen auf  $0,156\% \pm 0,063\%$  ab. Bei den mit siRNA gegen Mre11 behandelten Zellen war ebenfalls ein geringerer Anteil grünfluoreszierenden Zellen messbar. Hier fluoreszierten nur  $0,153\% \pm 0,076$  der Zellen grün. (Abb. 4.5 A). Im Vergleich zwischen siRNA gegen Mre11 und Kontroll siRNA konnte so kein Unterschied in der Effizienz der Reparatur von Dsb durch HRR gesehen werden (Abb. 4.5 B).

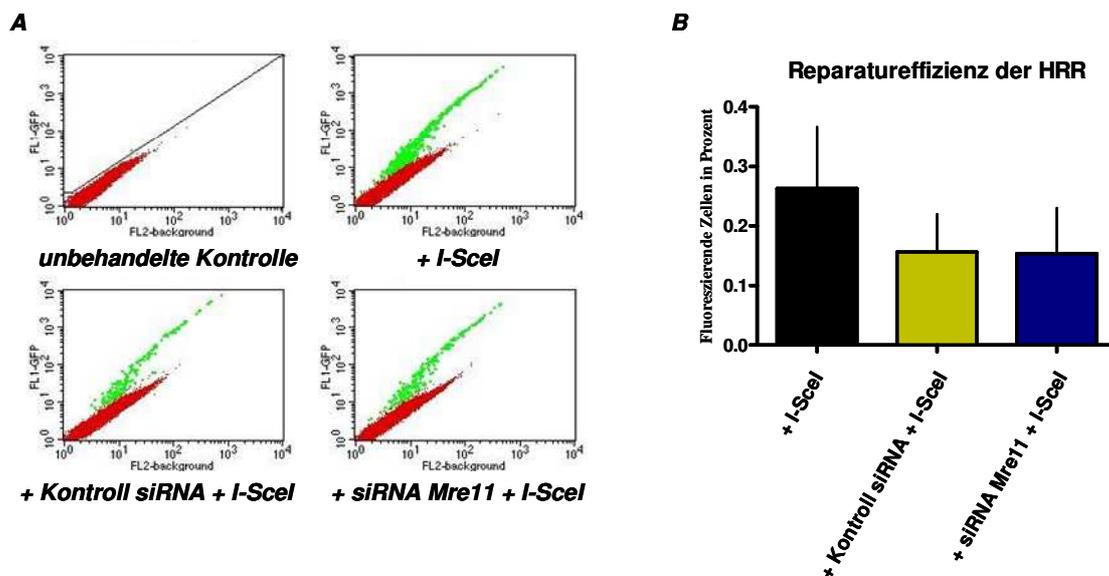


Abb 4.5 Einfluss von Mre11 auf die HRR

A) Beispielsmessung am Flusszytometer. 10.1 pGC Mausfibroblasten wurden mit siRNA gegen Mre11 und Kontroll siRNA behandelt. Nach 48 h wurde in diese Zellen und unbehandelten Zellen I-SceI Plasmid transfiziert. Die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen wurden nach weiteren 48 h im Flusszytometer bestimmt. Links oben eine unbehandelte Kontrolle zur Bestimmung der Grundfluoreszenzeigenschaften. Zellen ohne siRNA mit I-SceI Plasmid transfiziert. Unten links Zellen die mit Kontroll siRNA und I-SceI Plasmid behandelt wurden. Rechts unten Zellen die mit Mre11 siRNA und I-SceI Plasmid behandelt wurden. B) Anteil der grünfluoreszierenden Zellen als Zeichen der Reparatureffizienz der HRR

#### **4.4.2 Einfluss von Mre11 auf das Nichthomologe Endjoining**

Zur Überprüfung des Einflusses von Mre11 auf das NHEJ wurden 10.1 pEJ Zellen zunächst mit siRNA gegen Mre11 oder der Kontroll siRNA behandelt. Wie in Abb 4.5 wurden die pEJ Zellen zunächst mit siRNA und anschließend mit pCMV3xNLS-I-SceI transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Grünfluoreszenz der Zellen am Flusszytometer bestimmt. Durch erfolgreiche Reparatur des Dsb durch NHEJ wird das artifizielle Startcodon entfernt und das GFP kann exprimiert werden, was zur Grünfluoreszenz der Zellen führt. Auch hier wurden zu jedem Experiment unbehandelte Zellen als Transfektionskontrolle ausschließlich mit I-SceI Plasmid behandelt.

Bei den unbehandelten Zellen fluoreszierten  $4,46\% \pm 1,08\%$  der Zellen grün. Nach Transfektion der Kontroll siRNA sank der Anteil der grünfluoreszierenden Zellen auf  $3,8\% \pm 0,74\%$  ab. Nach Transfektion mit siRNA gegen Mre11 hingegen zeigte sich dieser Rückgang nicht, sondern es konnte eine Steigerung des Anteils der grün fluoreszierenden Zellen auf  $6,39\% \pm 0,8\%$  gesehen werden (Abb. 4.6 A). Im Vergleich beider mit siRNA transfizierten Zellen ergab sich eine signifikante Steigerung um den Faktor 1,7. Der Knock-down von Mre11 erhöht demnach die Effizienz des NHEJ (Abb 4.7 B).

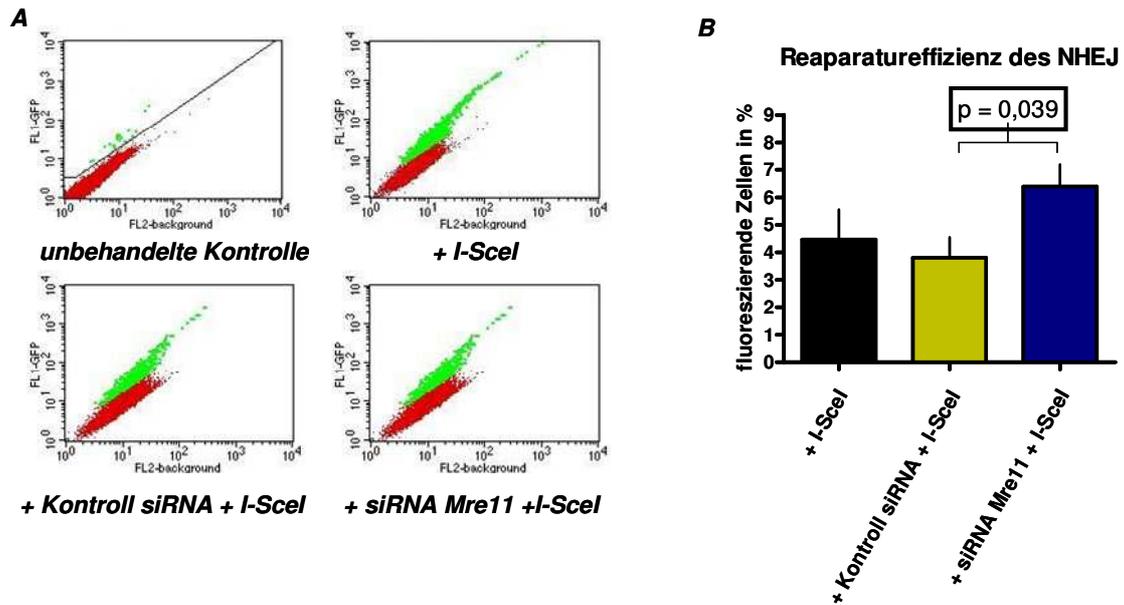


Abb. 4.6 Einfluss von Mre11 auf NHEJ

A) Beispielmessung am Flusszytometer. 10.1 pEJ Mausfibroblasten wurden mit siRNA gegen Mre11 und Kontroll siRNA behandelt. Nach 48 h wurde in diese Zellen und unbehandelten Zellen I-SceI Plasmid transfiziert. Die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen wurden nach weiteren 24 h im Flusszytometer bestimmt. Links oben eine unbehandelte Kontrolle zur Bestimmung der Grundfluoreszenzeigenschaften. Zellen ohne siRNA mit I-SceI Plasmid transfiziert. Unten links Zellen die mit Kontroll siRNA und I-SceI Plasmid behandelt wurden. Rechts unten Zellen die mit Mre11 siRNA und I-SceI Plasmid behandelt wurden. B) Anteil der grünfluoreszierenden Zellen als Zeichen der Reparatureffizienz des NHEJ

#### 4.5 Einfluss des Knock-downs von Mre11 auf das Zellüberleben

Durch Röntgenbestrahlung werden in diploiden Säugerzellen ca. 30 Dsb/Gy erzeugt (Dahm-Daphi und Dikomey, El-Awady et al.). Notwendige Bedingung für das Überleben der Zellen nach Bestrahlung ist die Reparatur dieser Dsb. Daher ist das Überleben der Zellen nach Bestrahlung ein guter Anhaltspunkt für die Fähigkeit der Zellen Dsb zu reparieren. Der Knock-down von Mre11 führte zu einer Erhöhung der Effizienz des NHEJ, während die Effizienz der HRR unbeeinflusst blieb. Da das NHEJ der wichtigste Mechanismus zur Reparatur von Dsb in Säugetierzellen ist, sollte nun untersucht werden, ob die gezeigte Verbesserung der Effizienz in diesem Mechanismus zu einer Erhöhung der Strahlenresistenz in den Zellen führt. Um dies zu überprüfen, wurden zunächst Zellen mit siRNA gegen Mre11 und der Kontroll siRNA behandelt. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen ausgesät und weitere 24h später bestrahlt. Die überlebenden Kolonien wurden ausgezählt und die Überlebensrate bestimmt. Nach Bestrahlung von unbehandelten Zellen mit 2 Gy sank die Anzahl der gebildeten Kolonie im Verhältnis zu unbestrahlten

Zellen auf 64% ab. Nach einer Dosis von 4 Gy sank der Anteil auf 30%, nach 6 Gy auf 7,6% und nach 8 Gy auf 3,5% ab. Nach Transfektion von Kontroll siRNA und anschließender Bestrahlung mit 2 Gy sank die Anzahl der gebildeten Kolonien auf 65%, nach 4 Gy auf 27,6%, nach 6 Gy auf 10,3% und nach 8 Gy auf 4,4% ab. Im Anschluss an die Transfektion mit siRNA gegen Mre11 und Bestrahlung mit 2 Gy reduzierte sich die Anzahl der gebildeten Kolonien im Vergleich zu unbestrahlten Zellen auf 77%, nach 4 Gy auf 27%, nach 6 Gy auf 11,6% und nach 8 Gy auf 4,1%. Durch Transfektion mit siRNA gegen Mre11 konnte kein Unterschied im Zellüberleben nach Bestrahlung festgestellt werden.

### Kolonibildungstest nach Bestrahlung

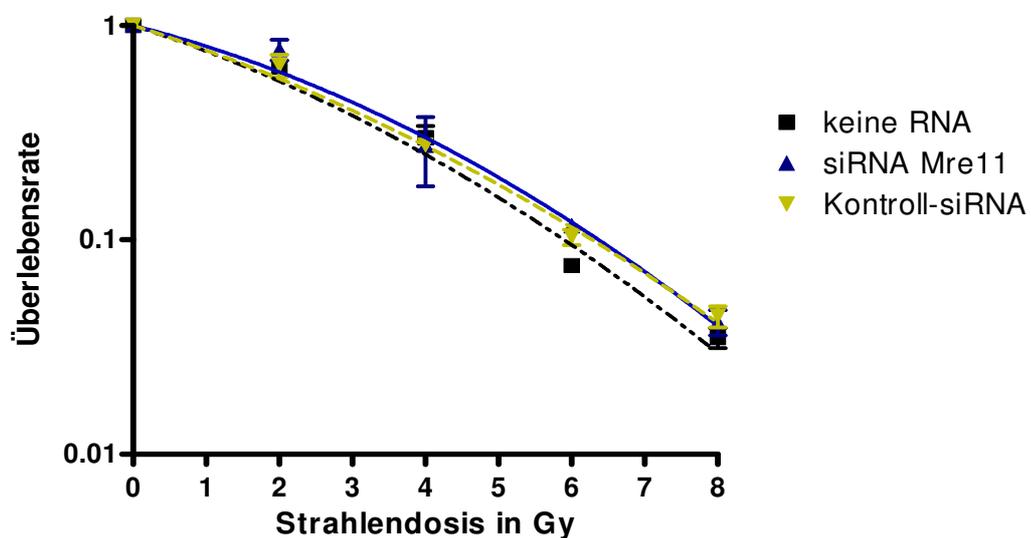


Abb 4.7 Zellüberleben nach Bestrahlung

Zellen wurden mit siRNA behandelt und nach 48h mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt. Die Zellen wurden dann für weitere 7 Tage im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt.

## 5. Diskussion

### 5.1. Knock-down von Mre11

Wir konnten zeigen, dass ein deutlicher Knock-down von Mre11 in unseren embryonalen Mausfibroblasten durch den Einsatz von siRNA möglich ist. Die Effektivität des Knock-down hängt vom zu regulierenden Protein, der verwendeten Zelllinie und der verwendeten siRNA ab. Ein vollständiger Knock-out konnte jedoch bisher von keiner Arbeitsgruppe

erreicht werden. Ein Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen die siRNA verwendet haben ist jedoch nur bedingt möglich, da entweder ausschließlich eine qualitative Überprüfung des Knock-downs durch den Western-Blot erfolgte (Zhang et al. 2005, Hanlon Newell et al. 2008) oder mit Bestimmung der vorhandenen Mre11 mRNA in den Zellen eine alternative Methode zur Quantifizierung gewählt wurde (Zhong et al. 2007). In den Versuchen mit dem NHEJ Reporterkonstrukt im Anschluss an den Knock-down von Mre11 konnten wir einen signifikanten Unterschied zu den mit der Kontroll siRNA behandelten Zellen sehen, so dass von einem wirksamen Knock-down von Mre11 in den Versuchen ausgegangen werden kann.

### ***5.2. Einfluss von Mre11 auf die Reparatur von enzymatisch erzeugten Dsb***

Wir konnten in unserem Modell zeigen, dass ein Knock-down von Mre11 zu einer signifikanten Erhöhung der Reparaturrate durch NHEJ bei enzymatisch erzeugten DNA-Dsb führt. Die genaue Funktion von Mre11 in diesem Reparaturmechanismus ist in Säugetierzellen weitestgehend unklar. Unseren Ergebnissen nach scheint Mre11 bei der Reparatur von durch eine Endonuklease induzierten Dsb nicht notwendig, sondern im Gegenteil eher hinderlich zu sein. Das Fehlen von Mre11 führt daher zu einer Verbesserung der Effizienz des NHEJ. Ähnliches konnte vor kurzem auch für Ku80 gezeigt werden. Die Anwesenheit von Ku80 führte zu einer Unterdrückung der Rad51 abhängigen HRR und des SSA (Mansour et al. 2008), ohne dass Ku80 eine Funktion in diesem Reparaturweg hat. Wie diese Regulation durch Mre11 genau abläuft, bleibt jedoch weiterhin unbekannt. Mre11 könnte durch seine Exonukleasefunktion oder durch Rekrutierung einer anderen Exonuklease (z.Bsp. CtIP) mit dem Bilden des 3' ss-Überhangs beginnen. Im Anschluss an diesen Initiationsschritt kann eine Reparatur des Bruches nur durch HRR durchgeführt werden. Das Fehlen dieses Startprozesses der HRR ließe nur noch eine Reparatur durch NHEJ zu. Mre11 ist als eines der ersten Proteine an einem Dsbs zu finden. Jedoch ist bislang unklar, ob es eine zentrale Rolle innerhalb der Reparaturmechanismen spielt. Sicher ist jedoch, dass es als zentraler Sensor durch die Aktivierung von ATM in die Regulation des Zellzyklus eingreift. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Inaktivierung von ATM zu einer Blockierung der HRR führt (Shirastav et al. 2009). Auch Mutationen in Mre11, wie in Patienten mit ATLD, führen zu einer verminderten Aktivierung von ATM (Delia et al. 2004), so dass hier der knock-down

von Mre11 durch eine verminderte Aktivierung von ATM zu einer Blockade der HRR führen könnte. Dies würde eine Steigerung des NHEJ nach sich ziehen.

Überraschenderweise hatte der Knock-down von Mre11 in Säugetierzellen jedoch keinen Einfluss auf die Reparatur der enzymatisch erzeugten Dsbs durch HRR. In Hefe ist die HRR der Hauptmechanismus zur Reparatur von Dsbs. Ein Knockout von Mre11 oder ein funktioneller knock-out durch Inaktivierung der Exonukleasefunktion von Mre11 führte in Hefe zu einer deutlichen Erhöhung der Strahlensensitivität (Steward et al. 1999). Es wurde daraus geschlossen, dass Mre11 essentiell für die Reparatur durch HRR in Hefe ist (D'Amours und Jackson 2002). In Säugetierzellen ist die Rolle von Mre11 in der HRR nicht ausreichend verstanden. Jedoch führten in Säugetierzellen ein funktioneller Knock-out durch Mutationen in Mre11, wie bei ATLD-Patienten, ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung der Strahlensensitivität, so dass auch hier von einer wichtigen Rolle in der Reparatur von Dsbs ausgegangen wurde (Steward et al. 1999, Buis et al. 2008). In unserem Versuch konnten wir nun zeigen, dass Mre11 für die Reparatur von enzymatisch erzeugten Dsbs nicht essentiell ist. In einem ähnlichen Modell wurden in Hefe Dsbs durch die Endonuklease HO erzeugt. In diesen Versuchen zeigte sich eine Verzögerung der Reparatur durch HRR, jedoch konnte eine effiziente Reparatur nachgewiesen werden (Tsubouchi und Ogawa 1998, Moreau et al. 2000). In dem von uns durchgeführten Experiment beobachteten wir die Anzahl der erfolgreich durchgeführten Reparaturen nach 48 Stunden. Der Messzeitpunkt von 48 Stunden nach Transfektion des I-SceI-Plasmids wurde entsprechend der von Filip Schmidt Petersen etablierten Methode gewählt. Die beschriebene Verzögerung in der Reparatur von Dsbs ist hier durch den langen Zeitraum zwischen Dsb und Messpunkt möglicherweise nicht erfasst worden.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Mre11 für die Reparatur von enzymatisch erzeugten Dsb nicht notwendig ist und dass der knock-down von Mre11 sogar zu einer Verbesserung der Effizienz des NHEJ bei enzymatisch erzeugten Dsb führt.

### ***5.3. Einfluss von Mre11 auf die Reparatur von strahleninduzierten Dsb***

Wir konnten zeigen, dass der knock-down von Mre11 bei Endonuklease-induzierten Dsb keinen Einfluss auf die Effektivität von HRR hat und zu einer signifikanten Verbesserung der Effektivität des NHEJ führt. Das Überleben der Zellen nach Bestrahlung ist ein direktes Zeichen der Effektivität der Reparatur von Dsb. In Säugetierzellen werden

strahleninduzierte Dsb überwiegend durch NHEJ repariert. Die von uns beobachtete Verbesserung im NHEJ sollte zu einem deutlich verbesserten Zellüberleben führen.

Der Hauptunterschied zwischen beiden Experimenten liegt in der Art, wie Dsb erzeugt werden. Während Endonukleasen genau definierte glatte Schnitte an spezifischen Erkennungssequenzen in der DNA erzeugen („clean breaks“), sind die Brüche die durch ionisierende Strahlung entstehen weitaus komplexer. Es kann zu den unterschiedlichsten chemischen Änderungen im Bereich der terminalen Nukleotide (z.B. 3'Phosphate oder Phosphoglycolate) oder auch zu Proteinaddukten kommen („dirty breaks“) (Krogh und Symington 2004). Möglicherweise ist Mre11 verantwortlich für die Prozessierung dieser schwierigen Brüche, jedoch für die Reparatur „sauberer“ Brüche nicht notwendig sondern eher hinderlich. So konnte gezeigt werden, dass ein Knock-out von Mre11 in Hefe zu einem drastischen Anstieg der Strahlensensitivität führt. Auch eine Funktionsminderung durch Mutation wie in ATLD-Patienten führt zu einer Erhöhung der Strahlensensitivität. (Stewart et al. 1999).

In unseren Versuchen konnten wir jedoch keinen Unterschied im Zellüberleben nach Bestrahlung als Zeichen der Reparatur von Dsb feststellen.

Der von uns erreichte Knock-down von Mre11 (auf 40% Restaktivität) könnte nicht ausreichend für eine Strahlensensibilisierung sein. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Diskrepanz wäre, dass der durch siRNA erzeugte knock-down von Mre11 nur zeitlich begrenzt wirksam ist. Zur Zeit der Bestrahlung (48h nach Transfektion von siRNA) ist die Menge an Mre11 in den Zellen zwar reduziert und wir konnten zeigen, dass auch noch nach 96 Stunden die Menge von Mre11 reduziert ist, jedoch ist davon auszugehen, dass es im weiteren Verlauf der Inkubationszeit zu einer Erholung von Mre11 kommt. Nach Erzeugung eines Dsb kommt es zu einem Zellzyklusarrest (Falck et al. 2002). Die bestrahlten Mre11-depletierten Zellen werden so lange angehalten bis wieder ausreichend Mre11 vorhanden ist und eine effektive Reparatur durchgeführt werden kann. So kommt es zwar zu einer Verlangsamung des Zellwachstums aber zu keiner Verschlechterung des Zellüberlebens.

#### **5.4. Funktion von Mre11 innerhalb der Dsb-Reparatur**

Wir konnten zum einen zeigen, dass Mre11 für die Reparatur von „einfachen“ Dsb nicht zwingend notwendig sondern im Fall des NHEJ sogar eher hinderlich ist. Diese Verbesserung der Reparatureffizienz des NHEJ sollte zu einer Verbesserung der Strahlenresistenz führen. Jedoch konnten wir keinen Effekt durch Knock-down von Mre11 auf die Reparatureffizienz nach Bestrahlung finden. Im Gegensatz dazu konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass der Knock-out von Mre11 zu einer erhöhten Strahlensensitivität als Zeichen einer ineffektiven Reparatur führt.

Mre11 hat eine Vielzahl an enzymatischen Funktionen (Haber 1998). Es ist zudem als eines der ersten Enzyme am Ort eines Dsb nachweisbar (Lisby et al. 2004). Passend zu unseren Ergebnissen bei den enzymatisch erzeugten Brüchen und der deutlich erhöhten Strahlensensitivität stellen B. Krogh und S. Symington bereits 2004 die Hypothese auf, dass Mre11 insbesondere in den ersten Schritten in der Reparatur von strahleninduzierten „schwierigen“ Dsb notwendig ist. Mre11 ist als einziges Enzym in der Lage mit diesen verschiedenen DNA Enden nach ionisierenden Strahlen umzugehen (Paull und Gellert 1998). Wir konnten jedoch im Gegensatz zu der Hypothese von Krogh und Symington keinen Einfluss von Mre11 auf die Strahlensensitivität und damit die Reparatur von komplexen Brüchen finden.

Außer der isolierten Verbesserung des NHEJ durch Knock-down von Mre11 in enzymatisch induzierten Dsb konnten wir keinen negativen Einfluss von Mre11 auf die Reparatur von Dsb finden, insbesondere keine spezifische Rolle in der Regulation zwischen beiden Reparaturwegen.

Insgesamt spielen Mutationen von Mre11 in Individuen eine eher untergeordnete Rolle. Knock-out Mutationen führen zu einem frühen embryonalen Zelltod und nur sehr wenige ATLD-Patienten mit einer Mutation in Mre11 konnten bisher identifiziert werden (Stewart et al. 1999, Delia et al. 2004, Fernet et al. 2005). Eine wichtigere Rolle könnte Mre11 jedoch in der Entwicklung von Tumoren spielen. In einigen Karzinomzelllinien konnte ein deutlich verminderter Mre11 Gehalt oder Mutationen in Mre11 nachgewiesen werden. Gianni et al. zeigten damit, dass Mutationen im MRN-Komplex entweder durch verminderte Aktivierung des Zellzyklusarrestes oder durch fehlerhafte Reparatur die maligne Entartung einzelner Zellen könnten (Gianni et al. 2001).

Die genaue Bedeutung von Mre11 für die Reparatur von DSB und insbesondere für die Entwicklung von Tumoren bleibt jedoch weiter nicht vollständig geklärt. Es Bedarf weiterer Untersuchungen, um insbesondere die Rolle von Mre11 innerhalb der einzelnen Reparaturmechanismen zu klären.

## 6. Zusammenfassung

Die DNA eines jeden Organismus ist ständigen Schädigungen ausgesetzt. Sowohl durch exogene Noxen, wie ionisierende Strahlung, aber auch durch endogene Substanzen, wie z.B. Sauerstoffradikale und zelleigene Nukleasen. Die schwerwiegendste Schädigung ist ein DNA-Doppelstrangbruch (Dsb). Werden solche Dsbs nicht repariert, können sie zum Zelltod führen oder zu Mutationen und damit möglicherweise maligne Entartung auslösen. Zwei Hauptwege der Dsb-Reparatur konnten identifiziert werden. Zum einen die nicht homologe Endverknüpfung (Nichthomologes End-joining, NHEJ), welches zwei freie DNA-Enden zusammenfügt und ligiert, ohne dabei die exakte Ursprungssequenz wiederherstellen zu müssen. Zum anderen die homologe Rekombination (HR), welche die Originalsequenz unter Zuhilfenahme des Schwesterchromatids exakt wiederherstellen kann und damit im Gegensatz zum NHEJ einen fehlerfreien Reparaturweg darstellt. Für beide Wege wurden eine Reihe unterschiedlicher aber jeweils spezifischer Reparaturproteine charakterisiert. Demgegenüber stehen zu Beginn der zellulären Schadensantwort einige Proteine, wie ATM, die frühzeitig an die DNA binden und Reparaturvorgänge und Zellzyklusregulation miteinander koordinieren. Ein weiterer „früher“ Proteinkomplex mit Signalfunktion bestehend aus Mre11/Nbs1/Rad50 ist vermutlich direkt in beide Reparaturwege, NHEJ und HR involviert. Daher wird diesem Komplex eine zentrale Rolle in der Regulation der Reparatur der Doppelstrangbrüche zugeschrieben. Mutationen in Mre11 und Nbs1 führen zu schweren genetischen Erkrankungen der Ataxia-Teleangiectasia-like-disorder und dem Nijmegen breakage Syndrom, die sich unter anderem durch erhöhte Strahlensensitivität auszeichnen. Ein Knockout vom Mre11 führt in Mäusen zum frühen embryonalen Tod, so dass auch keine k.o. Zelllinien etabliert werden konnten. Wir konnten Mre11 durch RNA Interferenz erfolgreich herunterregulieren. Im Anschluss erzeugten wir durch die Endonuklease I-SceI einen Dsb in auf dem Grünfluoreszierenden-Protein basierenden Reporterkonstrukten.

Wir konnten zeigen, dass der Knock-down von Mre11 im Vergleich zu einer unspezifischen siRNA zu keiner Zu- oder Abnahme der Effizienz der HRR führt. Im Gegensatz führte der Knock-down von Mre11 zu einer signifikanten Zunahme der Effizienz des NHEJ bei der Reparatur des Reporterkonstruktes. Dieser Unterschied könnte sich durch die Exonukleasefunktion von Mre11 erklären. Mre11 lagert sich an die Brüche an und beginnt mit einem Abbau der DNA Enden bevor eine Ligation stattfinden kann.

Fehlt Mre11 findet kein Verdau statt und die Enden können direkt wieder miteinander verbunden werden, so dass Mre11 für die Reparatur von enzymatisch erzeugten Brüchen eher hinderlich ist. Da NHEJ der wichtigste Dsb Reparaturweg für Säugerzellen ist, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die verbesserte Reparatur einen Einfluss auf das Zellüberleben nach Röntgenbestrahlung hat. Wir haben daher mit siRNA behandelte Zellen mit 0 bis 8 Gy bestrahlt und nach ca. 7 Tagen die Koloniebildungsrate bestimmt. Es fand sich jedoch kein Einfluss der siRNA-Behandlung auf das Zellüberleben, weder mit der spezifischen Mre11-siRNA noch mit der Kontroll-siRNA. Generell sollte eine Verbesserung der Reparatureffizienz, wie von uns gefunden aber zu einer erhöhten Strahlenresistenz führen.

Wir konnten zeigen, dass ein Knock-down von Mre11 mit siRNA zu einem verbesserten end-joining von enzymatisch erzeugten Dsbs führt. Die homologe Rekombination blieb dagegen durch Mre11-Suppression unbeeinflusst wie auch die zelluläre Strahlenempfindlichkeit. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass Mre11 insbesondere in der Reparatur von enzymatisch induzierten „einfachen Brüchen“ keine wesentliche Rolle spielt. Der MRN-Komplex und insbesondere Mre11 ist mit seiner Vielzahl an enzymatischen Funktionen in der Lage unsaubere DNA Enden, wie sie beispielsweise durch ionisierende Strahlung entstehen, zu prozessieren und so für die Reparaturenzyme zugänglich zu machen. In den enzymatisch erzeugten Brüchen ist eine vorherige Prozessierung durch Mre11 eher hinderlich für die Reparatur.

## 7. Literaturverzeichnis

Adams K. E., Medhurst A. L., Dart D. A. and Lakin N. D. (2006)

Requirement of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex *Oncogene* 25: 3894 – 3904

Bass B. L. (2000)

Double-stranded RNA as a Template for Gene Silencing *Cell* 101: 235 – 238

Bressan D. A., Olivares H. A., Nelms B. E. und Petrini J. H. (1998)

Alteration of N-terminal phosphoesterase signature motifs inactivates *Saccharomyces cerevisiae* Mre11 *Genetics* 150: 591 – 600

Budd M. E. and Campbell J. L. (2009)

Interplay of Mre11 Nuclease with Dna2 plus Sgs1 in Rad51-Dependent Recombinational Repair *PLOS one* 4: e4267

Buis J., Wu Y., Deng Y., Leddon J., Westfield G., Eckersdorff M., Sekiguchi J.M., Chang S. and Ferguson D. O. (2008)

Mre11 Nuclease Activity Has Essential Roles in DNA Repair and Genomic Stability Distinct from ATM Activation *Cell* 135: 85 – 96

Carney J. P., Maser R. S., Olivares H., Davies E. M., LeBeau M., Yates III J. R., Hays L., Morgan W. F. und Petrini J. H. J. (1998)

The hMre11/hRad50 Protein Complex and Nijmegen Breakage Syndrome: Linkage of Double-Strand Break Repair to the Cellular DNA Damage Response *Cell* 93: 477 - 486

Carney J. P. (1999)

Chromosomal breakage syndromes *Curr Opin Immunol* 11: 443 – 447

Carson C. T., Schwartz R. A., Stracker T. H., Lilley C. E., Lee D. V. and Weitzmann M. D. (2003)

The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint  
*EMBO J* 22: 6610 – 6620

Chun H.H. und Gatti R. A. (2004)

Ataxia telangiectasia, an evolving Phenotype *DNA Repair* 3: 1187 – 1196

Connelly J. C. und Leach D. R. F. (2002)

Tethering on the brink: the evolutionarily conserved Mre11-Rad50 complex  
*Trends Biochem Sci* 27: 410 – 418

Czornak K., Chughtai S. and Chrzanowska (2008)

Mystery of DNA repair: the role of MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair *J Appl Genet* 49: 383 – 396

Dahm-Daphi J., Hubbe P., Horvath F., El-Awady R. A, Bouffard K. E., Powell S. N. und Willers H. (2005)

Nonhomologous end-joining of site-specific but not radiation induced DNA double-strand breaks is reduced in the presence of wild type p53  
*Oncogene* 24: 1663 - 1672

D'Amours D. and Jackson S. P. (2002)

The Mre11 Complex: At the Crossroads of DNA Repair and Checkpoint Signalling  
*Molecular Cell Biology* 3: 317 – 327

Delia D., Piane M., Buscemi G., Savio C., Palmeri S., Lulli P., Carlessi L., Fontanella E. and Chessa L. (2004)

MRE11 mutations and impaired ATM dependent responses in an Italian family with ataxia-teleangiectasia-like disorder *Hum Mol Genet* 13: 2155 – 2163

Digweed M. (1993)

Human genetic instability syndromes: Single gene defects with increased risk of cancer *Toxicology* 67: 259 – 281

- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalchin A., Weber K. and Tuschl T. (2001a)  
Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells *Nature* 411: 494 – 498
- Elbashir S.M., Lendeckel W. and Tuschl T. (2001b)  
RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs  
*Genes Dev* 15: 188 - 200
- Eleni P. and Symington P. (2008)  
Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing  
*Nature* 455: 770 – 775
- Falck J., Petrini H. J. H., Williams B. R., Lukas J. und Batek J. (2002)  
The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways *Nature Genetics* 30: 290 - 294
- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver A. E. and Mello C. C. (1998)  
Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* *Nature* 399: 808 - 811
- Featherstone C. and Jackson S. P. (1998)  
DNA repair: The Nijmegen breakage syndrome protein *Curr Biol* 8: 622 – 625
- Fernet M., Gribaa M., Salih M. A. M., Seidahmed M. Z., Hall J. and Koenig M. (2005)  
Identification and functional consequences of a novel *MRE11* mutation affecting 10 Saudi Arabian patients with the ataxia telangiectasia-like disorder  
*Hum Mol Genet* 14 307 - 318
- Finnie N. J., Gottlieb T. M., Blunt T., Jeggo P. A. and Jackson S. P. (1995)  
DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: Implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair  
*Proc Natl Acad Sci USA* 92: 320 – 324

Furuse M., Nagase Y., Tsubouchi H., Murakami-Murofushi K., Shibata T. and Ohta K. (1998)

Distinct roles of two separable activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination *EMBO J* 17: 6412 – 6425

Gennery A. R. (2006)

Primary immunodeficiency syndromes associated with defective DNA double-strand break repair *Br Med Bull* 77: 71 – 85

Gianni G., Ristori E., Cerignoli F., Rinaldi C., Zani M., Viel A., Ottini L., Crescenzi M., Martionetti S., Bignami M., Frati L., Screpanti I., and Guilino A. (2002)

Human MRE11 is inactivated in mismatch repair deficient cancers  
*EMBO Rep.* 3: 248 – 254

Goedecke W., Eijpe M., Offenbergh H. H., van Aalderen Mirjam and Heyting C. (1999)

Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but differentially expressed in early meiosis *Nat Genet* 23: 194 – 198

Grenon M., Magill C. P., Lowndes und Jackson S. P. (2006)

Double-strand breaks trigger MRX- and Mec1-dependent, but Tel1-independent, checkpoint-activation *Yeast Res* 6: 836 – 847

Haber J. E. (1998)

The many Interfaces of Mre 11 *Cell* 95: 583 – 586

Haber J.E. (1999)

DNA recombination: the replication connection *Trends Biochem Sci* 24: 271-275

Hammond S. M., Bernstein E., Beach D. and Hannon G. J. (2000)

An RNA-directed nucleic acid deaminase mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells *Nature* 404: 293 – 296

- Hammond S. M., Caudy A. A. and Hannon G. J. (2001)  
Post-Transcriptional Gene Silencing by Double-Stranded RNA  
*Nat Rev Genetics* 2: 110 – 119
- Hanlon Newell A. E., Hemphill A., Akkari Y. M., Hejna J., Moses R. E. und Olson S. B. (2008)  
Loss of homologous recombination or non-homologous end-joining leads to radial formation following DNA interstrand crosslink damage  
*Cytogenet Genome Res.*121: 174-180
- Harvey D. M. and Levine A. J. (1991)  
P53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts *Gen Dev* 5: 2375 – 2385
- Helleday T., Lo J., van Gent D. C. and Engelward B. P. (2007)  
DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment *DNA Repair* 6: 923 – 935
- Hopkins B. B. an Paull T. T. (2008)  
The P. furiosus Mre11/Rad50 Complex Promotes 5' Strand Resection at a DNA Double-Strand Break *Cell* 135: 250 – 260
- Huang J. and Dynan W. S. (2002)  
Reconstitution of the mammalian DNA double strand break end-joining reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction  
*Nucleic Acid Res* 30: 667 – 674
- Iijima K., Ohara M., Seki R. und Tauchi H. (2008)  
Dancing on Damaged Chromatin: Functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 Complex in Cellular Responses to DNA Damage *J Radiat Res* 49: 451 – 464

Jackson S. P. (1995)

Cancer predisposition. Ataxia-telangiectasia at the crossroads.

*Curr Biol* 1: 1210 - 1212

de Jager M., Dronkert M., Modesti M., Beerens C. Kanaar R. und van Gent D. C. (2001a)

DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways

*Nucleic Acids Res.* 29: 1317 – 1325

de Jager M. van Noort J., van Gent D. C., Dekker C., Kanaar R. and Wyman C., (2001b)

Human Rad50/Mre11 Is a Flexible Complex that Can Tether DNA Ends

*Molecular Cell* 8: 1129 - 1135

Johnson R. D., Liu N. and Jasin M. (1999)

Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination *Nature* 401: 397 – 399

Kraus E., Leung W-Y. and Haber J- E. (2001)

Break-induced replication: A review and an example in budding yeast

*Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8255 -. 8262

Krishna S., Wagener B., Liu H. P., Lo Y-C., Sterk R., Petrini H. J. H. und Nickloff J. A. (2007)

Mre11 and Ku regulation of double-strand break repair by gene conversion and break- induced replication *DNA repair* 6: 797 – 808

Krogh B. O. and Symington L. S. (2004)

Recombination proteins in yeast *Annu Rev Genet* 38: 233 – 271

Lavin M. F. (1999)

ATM: the product of gene mutated in ataxia-telangiectasia

*Int J Biochem Cell Biol* 31: 735 – 740

- Lee J-H. und Paull T. T. (2004)  
Direct Activation of the ATM Protein Kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 Complex  
*Science* 304: 93 – 96
- Lee J-H. an Paull T. T. (2005)  
ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1  
Complex *Science* 308: 551 – 554
- Li X. and Heyer W-D. (2008)  
Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance  
*Cell Res* 18: 99 – 113
- Limbo O., Chahwan C., Yamada Y., de Bruin R. A. M., Wittenberg C. und Russel P.  
(2007)  
Ctp1 Is a Cell-Cycle-Regulated Protein that Functions with Mre11 Complex to  
Control Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination  
*Mol Cell.* 28: 124 – 146
- Lin F. L., Sperle K., Sternberg N. (1984)  
Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells:  
role for DNA ends in the recombination process *Mol Cell Biol.* 4: 1020 – 34
- Lisby M., Barlow J., Burgess R. and Rothstein R. (2004a)  
Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among  
checkpoint and repair proteins *Cell* 118 : 699 – 713
- Lisby M. and Rothstein R. (2004b)  
DNA Repair: Keeping it together *Curr Biol* 14: 994 996
- Luo G., Yao M. S., Bender C. F., Mills M., Bladl A. R., Bradley A., Petrini J. H. (1999)  
Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic  
development, and sensitivity to ionizing radiation.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 96:7376 -7381

Ma J-L., Kim E. M., Haber J. E. and Lee S. E. (2003)

Yeast Mre11 and Rad1 Proteins Define a Ku-Independent Mechanism To Repair Double-Strand Breaks Lacking Overlapping End Sequences  
*Mol Cell Biol* 23: 8820 - 8828

Mansour W. Y., Schumacher S., Roskopf R., Rhein Tim., Schmidt-Petersen F., Gatzemeier F., Haag F., Borgmann K., Willers H. und Dahm-Daphi J. (2008)

Hierarchy of nonhomologous end-joining single strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double strand breaks  
*Nucleic Acids Res.* 36: 4088 – 4098

Mimitou E. P. and Symington L. S. (2008)

Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing  
*Nature* 455: 770 – 774

Moreau S., Ferguson J. R. and Symington L. S. (2000)

The Nuclease Activity of Mre11 IS Required for Meiosis but not for Mating Type Switching, End Joining, or Telomere Maintenance *Mol Cell Biol* 19: 556 – 566

Morrison C., Sonoda E., Takao N., Shinohara A., Yamamoto K-I and Takeda (2000)

The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage *EMBO J* 19: 463 – 471

Páques F. and Haber J. E. (1999)

Muliple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae* *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 349 – 404

Paull T. T. and Gellert M. (1998)

The 3' to 5' Exonuclease Activity of Mre11 Faciliates Repair of DNA Double-Strand Breaks *Molecular Cell* 1: 969 – 979

Paull T. T. and Gellert M. (1999)

Nbs1 potentiates ATP-driven DMA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex *Genes Dev* 13: 1276 - 1288

Pei Y. and Tuschl T. (2006)

On the art of identifying effective and specific siRNAs *Nat Methods* 3: 670 – 676

Pfeiffer P., Goedecke W. and Obe G. (2000)

Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations *Mutagenesis* 15: 289 – 302

Pfeiffer P., Goedecke W., Kuhfittig-Kulle S. and Obe G. (2004)

Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations *Cytogenet Genome Res* 104: 7 - 13

Pierce A. J., Hu P., Han M., Ellis N. and Jasin M. (2008)

Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells *Genes Dev* 15: 3237 – 3242

Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marschall W. S. and Khvorova A. (2004)

Rational siRNA design for RNA interference *Nat Biotechnol* 22: 326 – 330

Riballo E., Kühne M., Rief N., Doherty A., Smith G. C. M., Recio M.J., Reis C., Dahm K., Fricke A., Krempler A., Parker A. R., Jackson S. P., Gennery A., Jeggo P. A. and Löbrich M. (2004)

A pathway of double-strand breaks rejoining dependent upon ATM, Artemis and proteins locating to  $\gamma$ -H2AX *Molecular Cell* 16: 715 – 724

Robinson J. G., Elliott J., Dixon K. and Oakley G. G. (2004)

Replication Protein A and the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex Co-localize and Interact at Sites of Stalled Replication Forks *J Biol Chem* 279: 34082 – 34810

Rouet P., Smih F. and Jasin M. (1994)

Introduction of Double-Strand Breaks into the Genome of Mouse Cells by Expression of a Rare-Cutting Endonuclease *Mol Cell Biol* 14: 8096 - 8106

Sartori A. A., Lukas C., Coates J., Mistrik M., Fu S., Bartek J., Baer R., Lukas J. and Jackson S. P. (2007)

Human CtIP promotes DNA end resection *Nature* 450: 509 – 515

Savitzky K., Bar-Shira A., Gilad S., Rotman G., Ziv Y., Vanagaite L., Tagle D. A., Smith S., Uziel T., Sfez S., Ashkenazi M., Pecker I., Frydman M., Harnik R., Patajali S. R., Simmons A., Clines G. A., Sartiel A., Chessa L., Sanal O., Lavin M. F., Jaspers N. G., Taylor A. M., Arlett C. F., Miki T., Weissmann S. M., Lovett M., Collins F. S. and Shiloh Y. (1995)

A single teleangiectasia gene with a product similar to PI-3 Kinase  
*Science* 268: 1749 – 1753

Schmidt-Petersen F. and Dahm-Daphi (2006)

Homologe und Nicht-homologe Rekombination: Klonierungssubstrate auf Basis des Grünfluoreszierenden Proteins

*Experimentelle Strahlentherapie und klinische Strahlenbiologie* 11: 140 - 143

Schmidt-Petersen F. (2003)

Verwendung des Grün-Fluoreszenz-Protein Gens zur Messung von homologer und nicht homologer Rekombination in chromosomal integrierten Plasmiden *Medizinische Dissertation Universität Hamburg*

Shirastav M., de Haro L. P. and Nickoloff J. A. (2008)

Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice

*Cell Res* 18: 134 – 147

Shirastav M., Miller C. A., de Haro L. P., Durant S. T., Chen B. J. C., Chen D. J. and Nickloff J. A. (2009)

DNA-PKcs and ATM co-regulate DNA double-strand break repair

*DNA repair* 8: 920 – 929

Schulte-Uentrop L., El-Awady R. A., Schliecker L., Willers H. and Dahm-Daphi J. (2008)  
Distinct roles of XRCC4 and Ku80 in non-homologous end-joining of  
endonuclease- and ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks  
*Nucleic Acids Res* 36: 2561 – 2569

Sharples G.J., Leach D. R. (1995)  
Structural and functional similarities between the SbcCD proteins of Escherichia  
coli and the RAD50 and MRE11 (RAD32) recombination and repair proteins of  
yeast. *Mol Microbiol.* 17: 1215 – 1217

Signon L., Malkova A., Naylor M. L., Klein H and Haber J. E., (2001)  
Genetic Requirements for RAD51- and RAD54-Independent Break-Induced  
Replication Repair of a Chromosomal Double-Strand Break  
*Mol Cell Biol* 6: 2048 – 2056

Stewart G. S., Maser R. S., Stankovic T., Bressan D. A., Kaplan M. I., Jaspers N. G. J.,  
Raams A., Byrd P. J., Petrini J. H. J. and Taylor A. M. R. ( 1999)  
The DNA Double-Strand Break Repair Gene hMRE11 Is Mutated in Individuals  
with an Ataxia-Telangiectasia-like Disorder *Cell* 99: 577 – 587

Szostak J.W., Pringle J. E., Rothstein R. J., Stahl F. W. (1983)  
The double-strand-break repair model for recombination *Cell* 33: 25 – 35

Takemura H., Rao V. A., Sordet O., Furuta T., Miao Z-H., Meng LH., Zhang H. and  
Pommier Y. (2006)  
Defective Mre11-dependent Activation of Chk2 by Ataxia Telangiectasia Mutated  
in Colorectal Carcinoma Cells in Response to Replication dependent DNA Double  
Strand Breaks *J Biol Chem* 281: 30814 – 30823

Taylor A. M. (2001)  
Chromosome instability syndromes *Best Pract Res Clin Haematol* 14: 631 – 644

Taylor A.M., Groom A. and Byrd P. J. (2004)

Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD) – its clinical presentation and molecular basis *DNA repair* 3: 1219 - 1225

Theunissen J-W. F., Kaplan M. I., Hunt P. A., Williams B. R., Ferguson D., Alt F. W. and Petrini J. H. J. (2003)

Checkpoint Failure and Chromosomal Instability without Lymphomagenesis in  $Mre11^{ATLD1/ATLD1}$  Mice *Molecular Cell* 12: 1511 - 1523

Tsubouchi H. and Ogawa H (1998)

A Novel *mre11* Mutation Impairs Processing of Double-Strand Breaks of DNA during Both Mitosis and Meiosis *Mol. Cell. Biol.* 18: 260 – 268

Tuschl T. (2001)

RNA Interference and Small Interfering RNAs *ChemBiochem* 2:239 – 245

Uziel T., Lerenthal Y., Moyal L., Andegeko Y., Mittelman L. and Shiloh Y. (2003)

Requirements of the MRN complex for ATM activation by DNA damage *EMBO J* 20: 5612 – 5621

Varon R., Vissinga C. Platzer M., Cerosaletti K. M., Chrzanowska K. H., Saar K., Beckmann G., Seemanova E., Cooper P. R., Nowak N. J., Stumm M., Weemaes C. M. R., Gatti R. A., Wilson R. K., Digweed M., Rosenthal A., Sperling K., Concannon P. and Reis A. (1998)

Nibrin, a Novel DNA Double-Strand Break Repair Protein, Is Mutated in Nijmegen Breakage Syndrome *Cell* 93: 467 – 476

di Virgilio M. and Gautier J. (2008)

Repair of double strand breaks by nonhomologous end joining in the absence of *Mre11* *J Cell Biol* 5: 765 – 771

Waltes R., Kalb R., Gatei M., Kijas A. W., Stumm M., Sobeck A., Wieland B., Varon R., Lerenthal Y., Lavin M. F., Schindler D. and Dörk T. (2009)

Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder  
*Am J Hum Genet* 84: 605 – 616

Willers H., Dahm-Daphi J. and Powell S. N. (2004)

Repair of radiation damage to DNA *Br J Cancer* 90: 1297 - 1301

Willers H., Husson J., Lee L. W., Hubbe P., Gatzemeier F., Powell S. N. und Dahm-Daphi J. (2006)

Distinct Mechanisms of Nonhomologous End Joining in the Repair of Site-Directed Chromosomal Breaks with Noncomplementary Ends *Radiat Res* 166: 567 - 574

Williams R. S., Williams J. S. and Tainer J. A. ( 2007)

Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signalling, and the chromatin template *Biochem Cell Biol* 85: 509 – 520

Williams R. S., Moncalian G., Williams J. S., Yamada Y., Limbo O., Shin D. S., Grocock L. M., Cahill D., Hitomi C., Guenther G., Moiani D., Carney J. P., Russel P. and Tainer J. A. (2008)

Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair *Cell* 135: 97 - 109

Wyman C. and Kanaar R. (2006)

DNA Double-Strand Break Repair: All's Well that Ends Well  
*Annu Rev Genet* 40: 363 – 383

Xiao Y. und Weaver D. T. (1997)

Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 25: 2985 – 2991

Yamaguchi-Iwai Y., Sonoda E., Sasaki M. S., Morrison C., Haraguchi T., Hiraoka Y., Yamashita Y. M., Yagi T., Takata M., Price C., Kakazu and Takeda S. (1999)

Mre11 ist essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells  
*EMBO J* 23: 6619 – 6629

Zhang Y., Lim C. U. K., Williams E. S., Zhou J., Zhang Q., Fox M. H., Bailey S. M. and Liber H. L. (2005)

Nbs1 Knockdown by Small Interfering RNA Increases Ionizing Radiation  
Mutagenesis and Telomere Association in Human Cells  
*Cancer Res* 65: 5544 – 5553

Zhong Z-H., Jiag W-Q., Cesare A. J., Neumann A. A., Wadhwa R. and Reddel R. R (2007)

Disruption of Telomere Maintenance by Depletion of the MRE11/RA50/NBS1  
Complex in Cells That Use Alternative Lengthening of Telomeres  
*J Bio Chem* 282: 29314 – 29322

Zhu J., Petersen S., Tessarollo L und Nussenzweig A. (2001)

Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early  
embryonic lethality in mice *Curr Biol.* 11: 105 – 109

Zhu Z. Chung W-H., Shim E. Y., Lee S. E. and Grzegorz I. (2008)

Sgs1 and Exo1 Resect DNA Double-Strand Breaks Ends *Cell* 134: 981 – 994

## **8. Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ekkehard Dikomey für die Möglichkeit, meine Dissertation im Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie anfertigen zu können.

Ich möchte mich bei Frau Fruszina Gatzemeier und Frau Lena Nitsch für eine hervorragende Einarbeitung und stetige Hilfe bei Problemen während der Experimente bedanken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Jochen Dahm-Daphi für die ausgezeichnete Betreuung während der ganzen Dissertation. Besonders danke ich auch für fortwährende Unterstützung bei allen aufgetretenen Schwierigkeiten und seine Hilfe während des Schreibens dieser Dissertation.

Danken möchte ich auch der gesamten Arbeitsgruppe für „experimentelle Radioonkologie“ für die freundliche Aufnahme in eure Gemeinschaft.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Arne Behlau  
Geburtstag: 05.02.1982  
Geburtsort: Salzgitter  
Anschrift: Planckstr. 16  
37073 Göttingen  
Familienstand: ledig

### Schulischer Werdegang

1988 – 1992 Besuch der Grundschule am Fredenberg in Salzgitter  
1992 – 1994 Schüler an der Orientierungsstufe am Fredenberg in Salzgitter  
1994 – 2001 Besuch des Gymnasiums am Fredenberg  
2001 – 2002 Wehrdienstleistender in der LwSanStff/ 17.  
Flugabwehrraketenstaffel in Ahlhorn

### Studium

2002 Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität Hamburg  
08/2004 Abschluss des vorklinischen Abschnittes der medizinischen  
Ausbildung durch das Physikum  
11/2008 Abschluss des Medizinstudiums durch die zweite Ärztliche Prüfung

### Praktisches Jahr

08/2007 – 12/2007 Hals-Nasen-Ohren Heilkunde am Kantonsspital Liestal (Schweiz)  
12/2007 – 04/2008 Innere Medizin an der Asklepios Klinik Barmbek  
04/2008 – 07/2008 Chirurgie am Diakoniekrankenhaus Alten Eichen

### Beruflicher Werdegang

Seit 03/09 Assistenzarzt in der Abtl. Nephrologie und Rheumatologie der  
Universitätsmedizin Göttingen

## **10. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

---

Arne Behlau

Hamburg, den 25.05.10