

Aus dem Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Leitung Prof. Dr. Ekkehard Dikomey

Bedeutung der homologen Rekombination für die Reparatur eines DNA-Doppelstrangbruchs in Zellen mit einem Defekt im „nicht-homologen Endjoining“

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

**Raphael Roßkopf**

aus Karlsruhe

Hamburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 23.02.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. E. Dikomey

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. J. Dahm-Daphi

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. B. Fehse

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Arbeitshypothese und Fragestellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>2</b>
2.1	DNA-Schäden und ihre Reparatur.....	3
2.2	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	4
2.2.1	Nicht-homologes Endjoining.....	5
2.2.2	Homologe Rekombination.....	7
2.2.3	Single Strand Annealing.....	12
2.3	Plasmid Rekonstruktions Assay .....	13
2.4	Kooperation gleichzeitig verfügbarer Reparaturwege.....	15
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
3.1	Plasmid Rekonstitutions Assay .....	17
3.1.1	Das Rekombinationssubstrat pGC .....	18
3.1.2	Der I-Sce 1 Expressionsvektor pSceMJ .....	19
3.2	Amplifikation der Plasmide pGC und pSceMJ .....	19
3.2.1	Elektrotransformation .....	19
3.2.2	Präparation der Plasmide.....	20
3.2.3	Qualitätsbestimmung der amplifizierten Plasmide .....	21
3.2.4	Linearisieren des Plasmids pGC .....	22
3.3	Transfektion .....	22
3.3.1	Elektroporation.....	23
3.3.2	Lipofektion .....	23
3.4	Integration des Rekombinationssubstrats pGC .....	24
3.4.1	Zellkulturtechniken .....	24
3.4.2	Ermittlung der zellulären Toleranz gegen Puromycin .....	25
3.4.3	Klonale Aufzucht.....	25
3.4.4	Kryokonservierung .....	25
3.5	Nachweis der stabilen Integration .....	26
3.5.1	Extraktion von genomischer DNA.....	26
3.5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	27
3.6	Durchflusszytometrie.....	28
3.7	RNAi zum Knockdown von RAD51 .....	28
3.8	Nachweis des enzymatisch induzierten DSB durch $\gamma$ H2AX-Focibildung.....	29
3.9	Metaphasen-Technik zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit.....	31
3.10	Bestrahlung und Dosimetrie .....	34
3.11	Material .....	35
3.11.1	Geräte und Software .....	35

3.11.2	Reagenzien und Medien .....	36
3.11.3	Lösungen und Puffer.....	37
3.11.4	Chemikalien und Fertiglösungen.....	38
3.11.5	DNA-Extraktionskits .....	39
3.11.6	Restriktionsenzyme+Puffer .....	40
3.11.7	PCR- Primer und -Fertigreagenz.....	40
3.11.8	Antikörper: .....	40
3.11.9	RNA-Interferenz .....	41
3.11.10	DNA-Längenstandard.....	41
3.11.11	Verbrauchsmaterial .....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
4.1	Methodische Vorarbeiten .....	43
4.1.1	Ermittlung der zellulären Puromycintoleranz .....	43
4.1.2	Präparation der Plasmide pGC und pSceMJ.....	44
4.1.3	Nachweis der induzierten DSB mittels $\gamma$ H2AX–Fokusbildung .....	47
4.1.4	Nachweis der erhöhten Strahlenempfindlichkeit der xrs5 Zellen.....	48
4.2	Stabile Integration des Rekombinationssubstrats.....	50
4.3	Transfektionseffizienz .....	51
4.4	GC-Frequenz .....	53
4.5	GC-Frequenz nach RNAi zur Inhibition von RAD51 .....	56
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>58</b>
5.1	Bedingungen zur Selektion stabil transfizierter Zellen .....	59
5.2	Kinetik der DSB-Induktion .....	60
5.3	Kontrolle des xrs Phänotyps.....	60
5.4	Nachweis der chromosomalen Integration .....	62
5.5	Einfluss der Transfektionseffizienz .....	63
5.6	Abhängigkeit vom NHEJ .....	63
5.7	RAD51-Abhängigkeit der GC-Ereignisse.....	67
5.8	Zusammenfassung der Diskussion .....	69
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>82</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>83</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>84</b>

## 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Der Erhalt der genomischen Stabilität stellt die wichtigste Voraussetzung für den Fortbestand der Zelle dar. Diese Stabilität wird ständig durch exogen und endogen auftretende Noxen gefährdet, die potentiell zu einem vermehrten Auftreten von Mutationen und in der Summe zur malignen Entartung der Zelle führen können. Ihren Fortbestand kann eine Zelle sichern, da sie über ein umfangreiches Netzwerk an Schadenserkennungs- und Entfernungsmaßnahmen verfügt und so in der Lage ist, auf eine Vielzahl von Schadenstypen erfolgreich zu reagieren. Der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) stellt dabei die folgenschwerste Läsion dar, da mit der Kontinuitätsunterbrechung beider Einzelstränge eines DNA-Moleküls keine Matrize für eine unmittelbare Reparatursynthese zur Verfügung steht. Zur Reparatur dieser Läsionen existieren mehrere Mechanismen in Zellen höherer Eukaryoten: Die beiden vorrangigen Mechanismen sind dabei das nicht-homologe Endjoining (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR). NHEJ kann die sequenzunabhängige Ligation der Bruchenden vermitteln und gewährleistet so die strukturelle Integrität der DNA. HR ermöglicht durch Reparatursynthese die Rekonstruktion der zerstörten Sequenz. Es ist bekannt, dass die Wahl des Reparaturwegs u.a. von der Zellzyklusphase und der Konfiguration des DSB beeinflusst wird; unklar ist, ob die Ursache für diese Präferenzen genereller Natur ist oder ob beide Mechanismen um einen DSB konkurrieren können, also HR verwendet werden kann, wenn das NHEJ in seiner Funktion beeinträchtigt ist. Zur Klärung dieser Frage wurde in dieser Arbeit mittels eines chromosomal integrierten Rekombinationssubstrats zur Detektion von GC-Ereignissen der Anteil der HR zur Reparatur eines DSB in einer Zelllinie mit intaktem NHEJ und einer Zelllinie mit einem Defekt im NHEJ verglichen. Zur Verifizierung des Ergebnisses wurden Experimente mit einer durch RNA-Interferenz unterdrückten HR durchgeführt. Die zentralen Fragestellungen dieser Arbeit waren damit:

Gibt es einen Unterschied im Anteil der durch HR vermittelten Genkonversion in Zellen mit intaktem im Vergleich zu defektem NHEJ?

Ist die mittels des Plasmid-Rekonstruktions-Assays beobachtete Genkonversion abhängig von RAD51?

## 2 Einleitung

Die Behandlung maligner Tumoren beruht auf den drei Säulen der chirurgischen Entfernung, der Strahlentherapie und der Behandlung mit Chemotherapeutika, die in Abhängigkeit von der Entität und vom Stadium der Erkrankung mit dem Ziel zum Einsatz kommen, Tumorzellen möglichst selektiv zu schädigen und so die Tumorlast zu verringern. Sie stellt auch für die moderne Medizin immer noch eine große Herausforderung dar, weshalb nur etwa 50% der Patienten mit einem malignen Tumor geheilt werden können (RKI und GeKiD 2008). Dies ist neben anderen Faktoren auch darauf zurückzuführen, dass die Empfindlichkeit der Tumoren gegenüber den eingesetzten Agenzien sehr deutlich variiert. Die Ursachen dieser Variation sind Gegenstand aktueller Forschung, wobei eine unterschiedliche Reparaturkapazität der Tumorzellen, sowie eine variable Toleranz für die entstandenen Schäden als Einflussfaktoren diskutiert werden. Bei der Strahlentherapie und bei einigen Chemotherapeutika ist die DNA das Ziel der Schädigung, und die detaillierte Charakterisierung der zur Verfügung stehenden DNA-Reparaturmechanismen könnte die Möglichkeit eröffnen, die Therapie an die Empfindlichkeit des jeweiligen Tumors und des mitbetroffenen Normalgewebes anzupassen.

Ein Verständnis von DNA-Reparaturmechanismen verspricht aber auch Einblicke in die Entstehung von malignen Erkrankungen: Man nimmt heute an, dass diese durch eine Akkumulation von Mutationen hervorgerufen werden, die durch Aktivierung oder Inaktivierung kritischer Gene zu einem Selektionsvorteil führen (Lengauer et al. 1998). Die beteiligten Gene lassen sich zwei funktionellen Gruppen zuordnen: Gatekeeper-Gene verhindern die Tumorentstehung, indem sie Zellproliferation und Zelltod kontrollieren. Caretaker-Gene sind an Reparatur und Erhaltung des Genoms beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei erblicher Prädisposition für Tumoren (Burma et al. 2006, Kinzler und Vogelstein 1997).

Genetische Veränderungen, die mit der Tumorigenese assoziiert sind, können auf verschiedenen Ebenen auftreten: Auf Ebene der Basensequenz können einzelne oder wenige Nukleotide betroffen sein, wohingegen Veränderungen auf chromosomaler Ebene zum Verlust oder zur Vervielfältigung von großen Abschnitten bis hin zu ganzen Chromosomen führen können (Lengauer et al. 1998). Chromosomenaberrationen, als wichtiger Vertreter der Veränderungen auf dieser Ebene, sind nach Burma et al. (2006) direkte Folge fehlerhafter Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Zusätzliche Bedeutung für die Verhinderung der malignen Transformation gewinnt die DSB-Reparatur dadurch, dass durch die Koordination von Zellzyklus-Kontrollpunkten und Apoptose ein Selektionsdruck zur

Umgehung dieser Schutzmechanismen entsteht (Burma et al. 2006). Dieser Selektionsdruck nimmt bei genotoxischem Stress zu und lastet auf den DNA-Reparaturmechanismen, indem Mutationen, die durch fehlerbehaftete Reparatur eingeführt wurden, eher zur Ausprägung gelangen.

## 2.1 DNA-Schäden und ihre Reparatur

Der Erhalt und die korrekte Weitergabe des genetischen Materials ist für alle lebenden Organismen von essentieller Bedeutung. Die Integrität des Genoms ist jedoch durch Schädigung der DNA kontinuierlich gefährdet. DNA-Schäden werden durch endogene wie exogene Prozesse verursacht. Endogene DNA-Schäden, beispielsweise durch freie Sauerstoffradikale (ROS) oder fehlerhaft arbeitende Topoisomerasen erzeugt, entstehen im Laufe des normalen Zellstoffwechsels und können zu einem Kollaps der Replikation führen. Weitere endogen erzeugte Schäden werden durch inkorrekte mitotische oder meiotische Rekombinationsereignisse oder durch thermische Fluktuation erzeugt.

Zu den exogenen genotoxischen Substanzen gehören Chemikalien und Strahlung. So erzeugt ein Gray Röntgenstrahlung 3000 bis 4000 Basenschäden pro Zelle, 1000 Einzelstrangbrüche und 40 Doppelstrangbrüche (DSB). Darüber hinaus treten gehäufte Läsionen, bestehend aus mehreren Basenschäden bzw. Einzelstrangbrüchen mit 200 bis 400/Zelle/Gy sowie Vernetzungen (crosslinks) zwischen den DNA-Strängen untereinander oder mit Proteinen mit 150 bis 200/Zelle/Gy auf (Dikomey et al. 2001).

Je nach Schadenstyp stehen unterschiedliche Mechanismen für die DNA-Reparatur zur Verfügung:

Basenschäden und Einzelstrangbrüche können mittels Basenexzisionsreparatur erkannt und repariert werden, indem bis zu drei schadhafte Nukleotide abgespalten werden. Anhand des komplementären Strangs findet dann die Reparatursynthese statt. Zum Schluss verschließt eine Ligase die Lücke in der Phosphodiesterkette. In ähnlicher Weise können durch die Nukleotidexzisionsreparatur bis zu 30 Nukleotide eines Strangs herausgeschnitten und neu synthetisiert werden. Gehäufte Läsionen können ebenfalls durch die Basenexzisionsreparatur repariert werden; dabei kann es sekundär zur Bildung eines DSB im Verlauf der Reparatur kommen.

Doppelstrangbrüche (DSB) benötigen aufwendigere Mechanismen zur Wiederherstellung der Sequenz, da sie beide Stränge eines DNA-Moleküls betreffen und somit keine direkte Vorlage für die Reparatur zur Verfügung steht. Die korrekte Reparatur dieser potentiell mutagenen Läsionen ist jedoch für die Zelle von großer Bedeutung, da nicht oder fehlerhaft reparierte DSB mehrere hundert Ba-

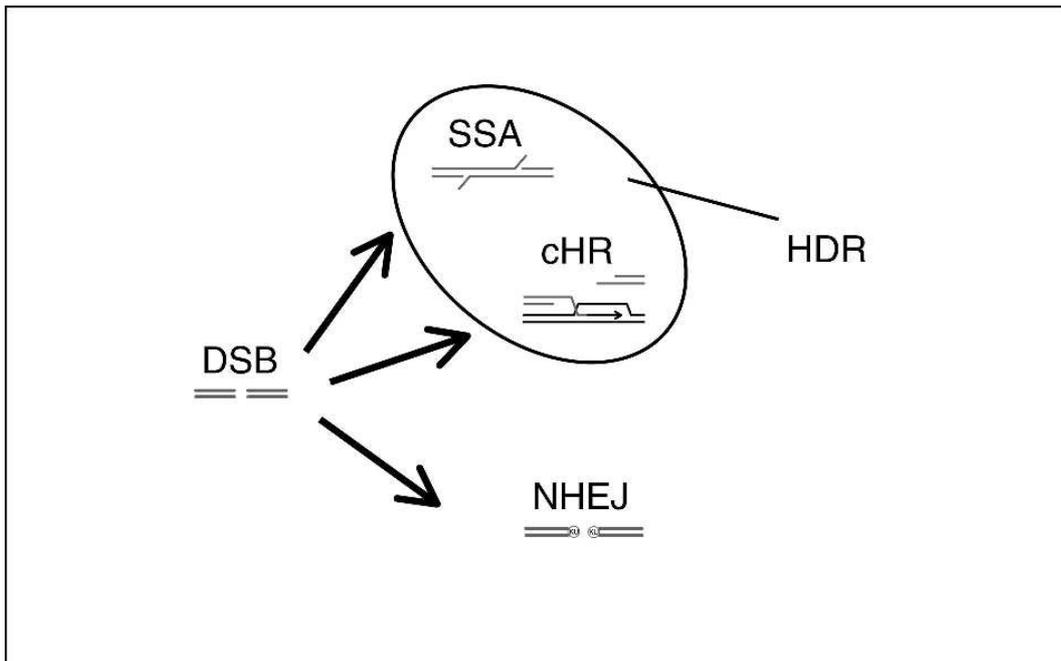
senpaare umfassende Sequenzumordnungen zur Folge haben können und so eine erhebliche Bedrohung für die Integrität der genetischen Information darstellen. Je nach Entstehungsmechanismus einer Schädigung kommt es zu unterschiedlichen Arten von DSB, die sich insbesondere durch ihre Konfiguration mit einem oder zwei freien DNA-Enden unterscheiden lassen (Helleday et al. 2007).

## **2.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen**

DSB entstehen durch eine Kontinuitätsunterbrechung eines vorbestehenden DNA-Moleküls, z.B. in der Folge ionisierender Bestrahlung oder experimentell erzeugt durch Einsatz von Restriktionsendonukleasen. Der Bruch beider Stränge eines DNA-Moleküls an gegenüberliegenden Stellen (DSB) stellt eine der bedrohlichsten DNA-Läsionen dar, da es bei fehlerhafter Reparatur z.B. zur Bildung von Chromosomenaberrationen und damit zu einem Verlust von Millionen von Basenpaaren an genetischer Information kommen kann (Burma et al. 2006, Helleday et al. 2007). In eukaryoten Zellen stehen mehrere Mechanismen für die Reparatur dieser Schäden zur Verfügung, die jeweils charakteristische Reparaturprodukte erzeugen (Abb.1).

Nicht-homologes Endjoining (NHEJ) vermittelt die sequenzunabhängige Ligation der Bruchenden und stellt in unsynchronisierten Zellen höherer Eukaryoten den häufigsten DSB-Reparaturweg dar (Sonoda et al. 2006).

Daneben existieren homologieabhängige Reparaturwege, die als konservative homologe Rekombination (HR) zu einer vollständigen Wiederherstellung der an der Bruchstelle zerstörten Sequenz führen, bzw. in Form des Single Strand Annealing (SSA) mit einer Deletion einhergehen und somit zu einem nicht-konservativen Reparaturprodukt führen können. Im Folgenden soll der gegenwärtige Kenntnisstand über diese drei Hauptmechanismen zusammengefasst werden.



**Abb.1:** Mögliche Reparaturwege eines DSB. Nicht-homologes End Joining (NHEJ) kann zur Ligation der Bruchenden und Wiederherstellung der strukturellen Integrität des DNA-Moleküls führen. Homologieabhängige Mechanismen (HDR) können zu einer Wiederherstellung der Sequenz führen (cHR) oder mit Deletionen einhergehen (SSA).

### 2.2.1 Nicht-homologes Endjoining

Das nicht-homologe Endjoining (NHEJ) ist ein Mechanismus zur sequenzunabhängigen Ligation der Bruchenden eines DSB. Nach Lieber (2008) stellt es in Zellen höherer Eukaryoten den Hauptweg zur Reparatur von DSB dar, weil es während des gesamten Zellzyklus aktiv ist und ohne eine homologe Vorlage für die Reparatur auskommt. Das NHEJ kann verschiedenste Formen von Bruchenden verarbeiten, wie sie z.B. als Folge ionisierender Bestrahlung und durch Sauerstoffradikale entstehen; solche Brüche können durch irreguläre Enden mit 3' oder 5' Überhängen und variablen Verlust von Basen an der Bruchstelle gekennzeichnet sein. Durch die Wiederherstellung der Kontinuität des Phosphodiester-Rückgrats gewährleistet NHEJ die strukturelle Integrität der DNA, wobei es auf Ebene der Basensequenz durch Deletionen oder Insertionen unterschiedlichen Ausmaßes zu einer großen Zahl unterschiedlicher Reparaturprodukte führen kann. Diese Flexibilität, unterschiedlich konfigurierte Substrate verarbeiten zu können, und dabei die Basensequenz unpräzise zu rekonstruieren, beruht auf einer flexiblen Kombination dreier Enzymaktivitäten, die nicht auf eine feste Reihenfolge bei der Bearbeitung der Bruchenden festgelegt sind (Lieber 2008). Das KU Heterodimer, das diese Komponenten für die Reparatur rekrutiert, bildet als

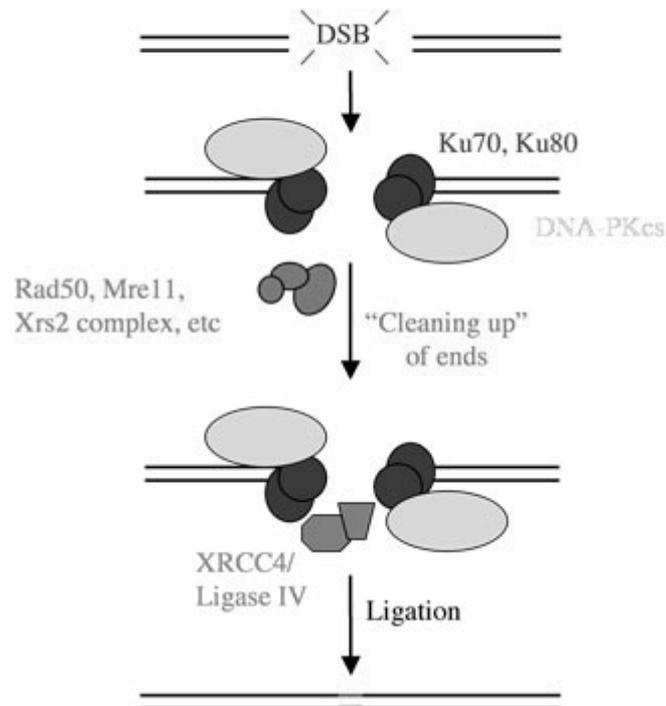
DNA-bindende Komponente die Basis des NHEJ. Es besteht aus den beiden Untereinheiten KU70 und KU80 und bildet mit diesen eine stabile Ringstruktur, die in der Lage ist, freie DNA-Enden eines DSB zu binden (Walker et al. 2001). Infolge der Bindung von KU an die Bruchenden können weitere Aktivitäten an der Bruchstelle stabilisiert werden. Diese Komponenten der NHEJ-Reaktion sind im Einzelnen:

- eine Nukleaseaktivität zur Resektion von nicht direkt ligierbaren DNA-Enden, sie wird von Artemis in Verbindung mit DNA-PK<sub>cs</sub> zur Verfügung gestellt
- eine Polymeraseaktivität in Gestalt der Polymerasen  $\mu$  oder  $\lambda$  zum Auffüllen von Lücken in der Basensequenz
- eine Ligaseaktivität, die von einem Komplex aus Ligase IV, XRCC4 und XLF ausgeht und die Kontinuität wiederherstellt

An DNA gebundenes KU kann die übrigen für die Reparatur erforderlichen Aktivitäten an der Bruchstelle stabilisieren, indem es die Gleichgewichtslage ihrer Substratbindung beeinflusst; z.B. ist die Affinität der DNA-PK<sub>cs</sub> für einen KU-DNA Komplex zwei Größenordnungen höher als für das DNA-Ende alleine (West et al 1998).

Die charakteristische Flexibilität des NHEJ, selbst ausgehend von einem genau definierten Reparatursubstrat zu einer Vielzahl unterschiedlicher Produkte führen zu können, entsteht dabei durch die Bereitstellung alternativer Enzyme für eine bestimmte Aktivität oder durch die alternative Reihenfolge ihrer Anwendung (Lieber 2008). Allen Produkten des NHEJ ist ein mehr oder weniger starker Verlust von Sequenzinformation an der Bruchstelle gemeinsam.

## Non-homologous end-joining



**Abb. 2:** Nicht-homologes Endjoining (NHEJ). NHEJ kann durch eine flexible Kombination mehrerer Enzymaktivitäten zur Wiederherstellung der Kontinuität des Phosphodiester-Rückgrats führen und gewährleistet so die strukturelle Integrität der DNA. Zum Einsatz kommen Nuklease (DNA-PK<sub>cs</sub>), pol X Polymerasen und Ligase IV/XRCC4. Entnommen aus <http://www.gurdon.cam.ac.uk/~jacksonlab/Images/nhej.jpg> am 16.11.2008

### 2.2.2 Homologe Rekombination

Konservative Homologe Rekombination (HR) ermöglicht die fehlerfreie Reparatur von DSB. Dieser Vorgang ist in Bezug auf die Qualität des Reparaturprodukts dem NHEJ überlegen ('konservativ'), da es nicht zum Verlust von Basen im Bereich der Bruchstelle kommt, erfordert aber eine aufwendigere Prozessierung der Bruchenden, um die umgebende Basensequenz freizulegen und eine homologe Sequenz aufzusuchen. Als Matrize für die Reparatursynthese wird eine mehrere hundert Basenpaare lange, homologe Sequenz aus dem Genom der Zelle rekrutiert (Rubnitz et al. 1984); insbesondere kann hierzu das in der späten S und G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus bereits replizierte Schwesterchromatid verwendet werden.

Die Reparatursynthese führt zur Genkonversion, einem experimentell nachweisbaren Transfer von Sequenzinformation von der Matrize an die Bruchstelle.

Allen Unterformen der HR ist gemeinsam, dass sie mit einer exonukleolytischen Resektion der Bruchenden in 5'-3' Richtung beginnen; dieser Schritt wird durch die Aktivität des Mre11-Rad50-Nbs1 Komplexes ermöglicht (Yang et al. 2006). Das entstehende, einzelsträngige 3' Ende muss dann in die homologe Duplex eindringen und mit dem gegenläufigen Strang der Vorlage hybridisieren, um die Reparatursynthese über die Bruchlücke zu ermöglichen. Für diese Prozesse der Invasion eines homologen DNA-Abschnitts und der Ausbildung von Heteroduplex-DNA ist das Protein RAD51 von großer Bedeutung. Zusammen mit seinen Paralogen Rad51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 bildet es das zentrale Element der Homologie-abhängigen DNA-Reparatur (Helleday et al. 2007, West 2003, Thacker 2005). Die wichtige Rolle des RAD51 Proteins wurde bereits in Studien mit dem RAD51 Orthologen aus *S. cerevisiae* etabliert, in denen gezeigt werden konnte, dass *yRAD51* in der Lage ist, *in vitro* den Strangaustausch zwischen einer einzelsträngigen DNA (ssDNA) und einem homologen Doppelstrang zu katalysieren (Sung 1994). Diese Funktion beruht biochemisch auf der Eigenschaft des Proteins, ssDNA zu binden und so ein Nukleoproteinfilament auszubilden, das den Strangaustausch vermittelt (Sung und Robberson 1995). Die durch den Strangaustausch gebildete Heteroduplex-DNA, die durch Hybridisierung eines Rad51 ummantelten Einzelstrangs mit einem homologen Doppelstrang entsteht, ist das zentrale Intermediärprodukt der HR (Pethukova et al. 1998).

Diese Funktion des RAD51 Proteins wurde auch in biochemischen Studien mit humanem hRAD51 bestätigt, von dem gezeigt werden konnte, dass es in der Lage ist, ssDNA zu binden und ein Nukleoproteinfilament auszubilden (Benson et al. 1994) und dadurch die Koaggregation von ssDNA und dsDNA und den Strangaustausch zwischen den Molekülen zur Bildung von Heteroduplex-DNA zu begünstigen (Baumann et al. 1996). Dabei ist RAD51 auf das koordinierte Zusammenspiel mit weiteren Proteinen angewiesen, darunter RPA, RAD52 und RAD54 (Sugiyama et al. 2002, Solinger et al. 2001).

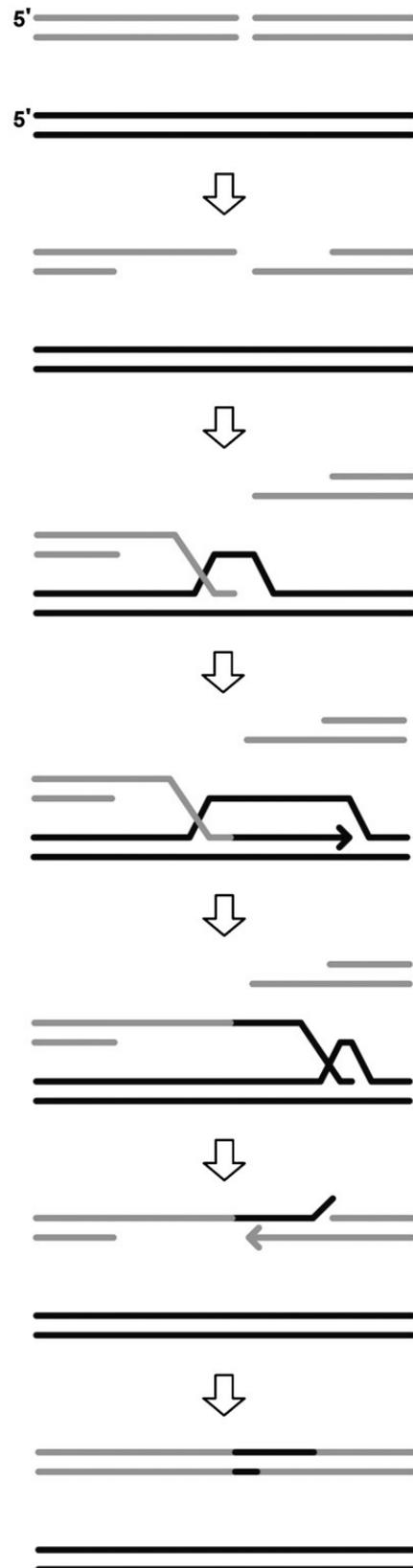
Es wurden mehrere mechanistische Modelle der HR vorgeschlagen, deren gemeinsames Merkmal die Ausbildung einer solchen Heteroduplex ist. Sie führen zu unterscheidbaren Reparaturprodukten und können z.T. von verschiedenen Arten von DSB ausgehen:

Das ‚double-strand break repair‘ -Modell von Szostak et al. (1983) ist das klassische Modell für die HR vermittelte Reparatur von DSB. Durch die Invasion

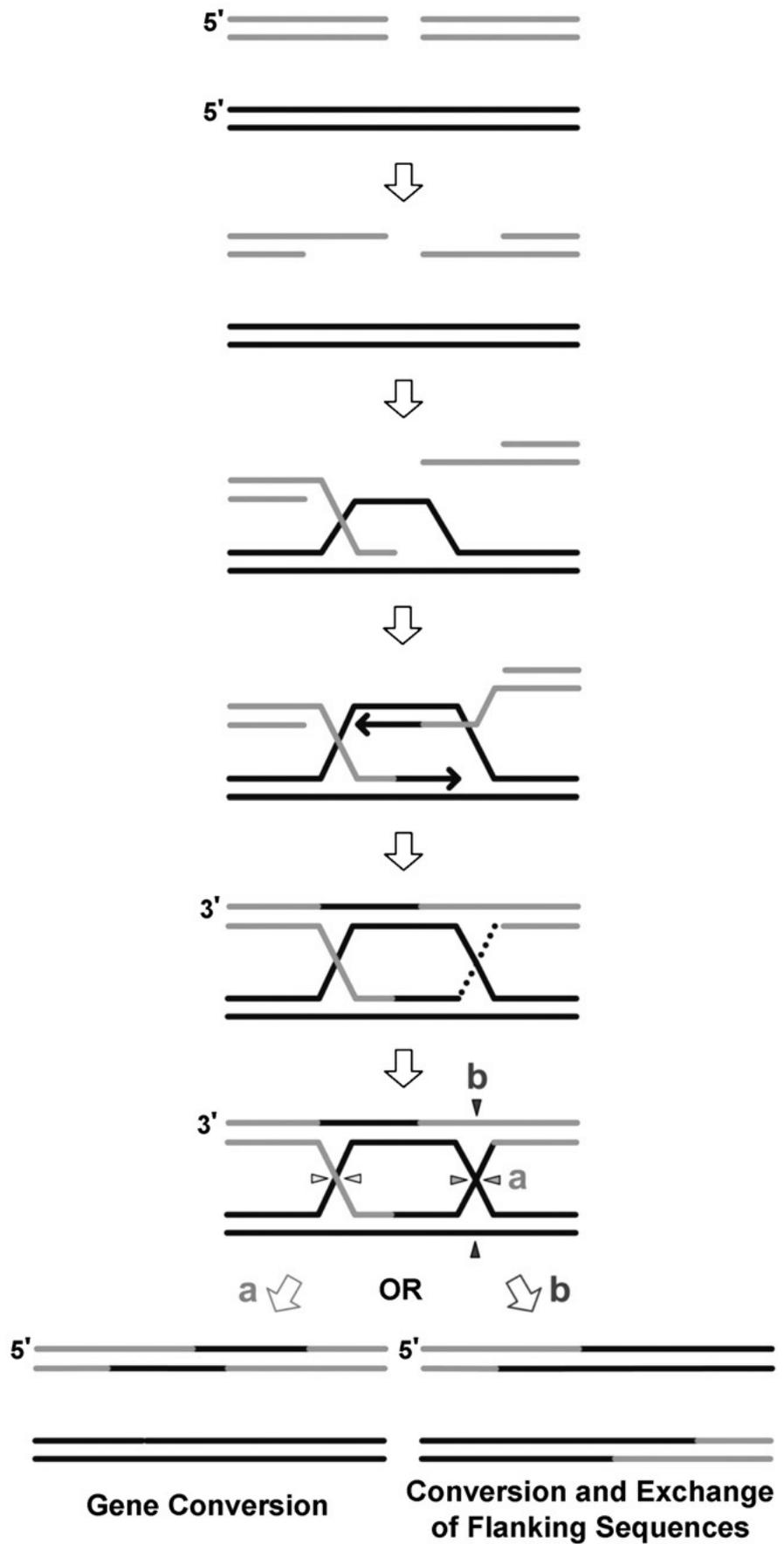
beider einzelsträngiger 3'-Enden des Bruchs in die Duplex des Donorstrangs entsteht eine schlaufenförmige Öffnung dieses Doppelstrangs, ein D-Loop. Die Kreuzungsstellen zwischen dem eindringenden Strang und dem verdrängten Strang der Vorlage bilden zwei Holliday-Junctions, die aufgelöst werden müssen, um nach der Reparatursynthese den verlängerten Einzelstrang des Akzeptormoleküls freizugeben. Infolge der Reparatursynthese kommt es zu einer Übertragung der Sequenzinformation vom Donorstrang an die Stelle des DSB, was sich experimentell als Genkonversion nachweisen lässt. Zusätzlich kann es zu einem Austausch (crossover) der angrenzenden Stränge zwischen dem Donor- und dem Akzeptormolekül kommen, wenn die beiden HJ in asymmetrischer Weise gespalten werden. Das DSBR Modell der HR kann so das parallele Auftreten von Genkonversion und crossover-Ereignissen bei der HR erklären. Rekombinationsprodukte mit crossover entstehen nach Helleday et al. (2007) insbesondere bei der Meiose und werden in mitotischen Zellen selten beobachtet. Das Auftreten von doppelten Holliday-Junctions im Rahmen der mitotischen DSB Reparatur kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Helleday et al. 2007, Abb.4).

Nach neueren Beobachtungen wird die mitotische HR vorwiegend durch 'synthesis-dependent strand annealing' erreicht. Dabei entsteht ein D-Loop durch die Invasion nur eines der beiden einzelsträngigen 3' Enden in den Donorstrang. Die Kreuzungsstelle zwischen dem eindringenden Strang und dem verdrängten Strang der Vorlage bildet eine einzelne Holliday-Junction, die aufgelöst werden muss, um nach der Reparatursynthese den verlängerten Einzelstrang des Akzeptormoleküls freizugeben. Dies geschieht beim synthesis-dependent strand annealing durch ein Verschieben der Holliday-Junction über das neusynthetisierte Ende des Akzeptorstrangs hinweg. In der Folge kann der verlängerte Akzeptorstrang mit dem einzelsträngigen 3'-Ende des anderen Bruchendes hybridisieren und so die weitere Reparatursynthese ermöglichen (Helleday et al. 2007, s. Abb. 3).

**Abb. 3:** Modell der HR mit einfacher Holliday-Struktur (SDSA). Die Reparatur des DSB erfolgt durch exonukleolytische Resektion der 5' Enden, gefolgt von RAD51 vermittelter Stranginvasion der resultierenden, einzelsträngigen 3' Enden mit Ausbildung eines sogenannten D-Loop. Innerhalb dieser Heteroduplex mit einer Holliday Junction (HJ) findet die Reparatursynthese statt. Die Auflösung erfolgt durch Verschieben der Holliday Junction über das Ende des neusynthetisierten Strangs hinaus; der verlängerte Akzeptorstrang kann mit seinem Gegenstück hybridisieren und nach der Resektion überhängender 3'-Enden kann die Bruchlücke durch eine Ligase verschlossen werden. Abb. entnommen aus Helleday et al. 2007.



**Abb. 4:** Modell der homologen Rekombination mit zwei HJ (DSBR). Die exonukleolytische Resektion wird gefolgt von der RAD51 vermittelten Stranginvasion beider 3' Enden in den Donorstrang. Der so gebildete D-Loop wird von zwei HJ begrenzt, die zu einem Reparaturprodukt mit oder ohne crossover aufgelöst werden können. Abb. entnommen aus Helleday et al. 2007

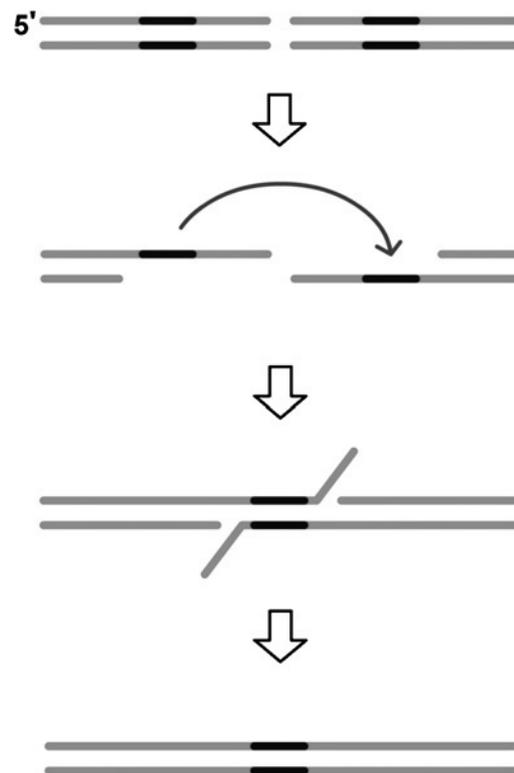


Weitere Modelle der homologen Rekombination existieren, mit denen z.B. die Reparatur von einseitigen DSB und andere Strangaustauschprozesse beschrieben werden können. Gemeinsames Merkmal ist dabei stets die durch Stranginvasion gebildete Heteroduplex.

### **2.2.3 Single Strand Annealing**

Für die Reparatur von zweiseitigen DSB steht mit dem single strand annealing ein weiterer homologieabhängiger Reparaturweg zur Verfügung, der sich von den vorgenannten Mechanismen der konservativen HR unterscheidet, indem er bei der Reparatur zum Verlust der Sequenz in der Umgebung des DSB führt. Tritt ein DSB zwischen zwei sich wiederholenden DNA-Sequenzen (repeats) auf, so können diese homologen Sequenzen bei der initialen exonukleolytischen Resektion auf den beiden komplementären Strängen freigelegt werden. Durch Hybridisierung und anschließende Resektion der überhängenden 3' ssDNA Enden kommt es zum Verlust je eines Strangs der beiden repeats sowie der dazwischen liegenden Sequenz. Dieser Prozess wird RAD51-unabhängig durch die Proteine RPA und RAD52 ermöglicht. (Helleday et al. 2007, s. Abb. 5). Die Frequenz, mit der dieser nicht-konservative Weg homologieabhängiger DSB-Reparatur besprochen wird, hängt von der Länge der Homologie in den repeats ab (Sugawara et al. 2000) sowie vom Abstand zwischen ihnen (Schildkraut et al. 2005). Im Mittel genügen für das SSA erheblich kürzere homologe Abschnitte, als sie für die HR erforderlich sind (Sugawara et al. 2000, Rubnitz et al. 1984).

**Abb. 5:** Modell der nichtkonservativen, homologie-abhängigen DNA-Reparatur (SSA). Werden bei der Resektion der Enden homologe Sequenzen freigelegt, so können diese hybridisieren und der DSB ligiert werden. Dabei kommt es zum Verlust je eines Strangs der homologen Sequenz sowie der zwischen den beiden liegenden Basenfolge. Abb. entnommen aus Helleday et al. 2007



### 2.3 Plasmid Rekonstruktions Assay

Die Untersuchung von DNA-Reparaturvorgängen erfolgte lange anhand von Schäden, die entweder spontan aufgrund endogener Prozesse auftreten, oder durch exogene, unspezifisch toxische Einflüsse in den Zellen induziert wurden: Unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit bei Bestrahlung mit UV oder ionisierender Strahlung führte zur Identifikation von strahlensensiblen Mutanten unterschiedlicher Ursprungszelllinien; mittels Fusionsexperimenten konnten Gruppen von Mutanten mit gleichem Gendefekt ausgemacht werden, was die Grundlage für die molekulare Identifizierung spezifischer Reparaturgene schuf (Thompson und Jeggo 1995).

Auf der anderen Seite führte die Untersuchung meiotischer und mitotischer Rekombination zur Erkenntnis, dass diese Vorgänge jeweils von einem DNA-Schaden ihren Ausgang nehmen, sei es bei der Reparatur eines durch toxische Einwirkung entstandenen DNA-Schadens, oder bei der gezielten Erzeugung von Diversität im Rahmen programmierter Rearrangements wie V(D)J- Rekombination und meiotischer Rekombination (Pâques und Haber 1999, Symington 2002). Experimentell erfasst wurden die Rekombinationsvorgänge genetisch, anhand leicht zu detektierender Heteroallele natürlich auftretender genetischer Marker, sowie physikalisch anhand von Restriktionsfragment-Polymorphismen in der Umgebung bekannter Rekombinationsloci, z.B. beim Wechsel des Paarungs-

typs (mating type switching MAT) in *S. cerevisiae*. Dabei können spontane Rekombinationsereignisse im Verlauf des normalen Zellwachstums von induzierten Rekombinationsereignissen unterschieden werden, die in der Folge einer Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien wie IR auftreten. Die Bestrahlung von Zellen hat dabei den Vorteil, die Rekombinationsfrequenz bis zu 1000fach zu stimulieren. So ermöglicht sie die einfachere Beobachtung der Rekombinationsvorgänge, die spontan nur mit einer geringen Frequenz von  $10^{-6}$ /Zelle/Generation auftreten (Symington 2002). Der Nachteil von IR zur Erzeugung von DSB liegt dabei in der unspezifischen Wirkung, sowohl was den Ort der gesetzten Schäden im Genom der Zellen betrifft, als auch bezüglich der Vielzahl an möglichen Schadenstypen, die in einer Zelle hervorgerufen werden können (vgl. 2.1 bzw. Dikomey et al. 2001).

Die Verwendung von seltenen Restriktionsendonukleasen zur Erzeugung eines definierten DSB erlaubt dagegen die gezielte Spaltung der DNA an der Stelle der Erkennungssequenz und erzeugt dabei genau definierte Bruchenden. Die gezielte Induktion solcher Schäden führt zu einer starken Stimulation der Rekombinationsfrequenz und erlaubt die detailliertere Untersuchung der molekularen Rekombinationswege (Rouet et al. 1994). Für die Untersuchung enzymatisch erzeugter DSB benötigt man einerseits ein Expressionssystem für die verwendete Restriktionsendonuklease, andererseits ein Reparatursubstrat, das die Zielsequenz des Enzyms enthält. Die Expression des Enzyms erzeugt dann einen DSB an der Stelle der Erkennungssequenz innerhalb des Rekombinationssubstrats. Dabei kann das Rekombinationssubstrat extrachromosomal (z.B. Willers et al. 2001, Akyüz et al. 2002) oder chromosomal integriert (z.B. Liang et al. 1996a, Delacôte et al. 2002) vorliegen; darüber hinaus kann es homologe Regionen unterschiedlichen Ausmaßes und unterschiedlicher Anordnung enthalten, um spezifisch bestimmte Reparaturwege zu erfassen. Erfolgreiche Rekombination führt bei den meisten Konstrukten zur Rekonstitution eines einfach detektierbaren Markergens, was zur Bezeichnung ‚Plasmid Rekonstitutions Assay‘ geführt hat. Alternativ oder ergänzend kann auch die Sequenzierung des Substrats nach erfolgter Enzymexpression erfolgen (z.B. Liang et al. 1998, Mansour et al. 2008). Seit der Entwicklung eines Vektors für die Expression der sonst nicht in Säugerzellen vorhandenen I-Sce 1 Restriktionsendonuklease in Zellen höherer Eukaryoten durch M. Jasin et al. (Rouet et al. 1994) wurde diese Technik angewendet, um den differenzierten Einsatz bestimmter Reparaturwege vor dem Hintergrund unterschiedlicher Zelllinien, Mutationen und Zellzyklusphasen zu quantifizieren.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Reparatursubstrat pGC verfügt über eine Erkennungssequenz der I-Sce 1 Restriktionsendonuklease zur Erzeugung eines DSB, flankiert von zwei Fragmenten des Reportergens *EGFP*. Dieses Gen eignet sich in besonderer Weise als Reporter, da das Genprodukt einen optisch anregbaren Biofluorophor darstellt und so die durchflusszytometrische Bestimmung der Rekombinationsfrequenzen erlaubt. Ausschließlich konservative HR führt dabei zur Rekonstitution des Markers (Schmidt-Petersen, 2003) und in der Folge zur Fluoreszenz der Zellen.

## 2.4 Kooperation gleichzeitig verfügbarer Reparaturwege

Die Wahl des Reparaturwegs für einen bestimmten DSB wird in Zellen höherer Eukaryoten von zahlreichen Faktoren beeinflusst. Zu diesen zählen die Zellzyklusphase und die Konfiguration des DSB mit einem oder zwei freien Bruchenden (Helleday et al. 2007).

Es ist allgemein akzeptiert, dass NHEJ während des gesamten Zellzyklus zum Einsatz kommen kann, während HR vorwiegend in der späten S- und G<sub>2</sub>-Phase verwendet wird (Delacôte und Lopez 2008, Rothkamm et al. 2003, Takata et al. 1998). Eine mögliche Erklärung für diese Daten könnte nach Sonoda et al. (2006) in der Kontrolle der Reparaturwege durch zellzyklusspezifische Kinasen (CDK) liegen. Die Art des DSB stellt einen weiteren Einflussfaktor dar, indem akzidentielle DSB, die in hochkondensiertem Chromatin auftreten, mittels NHEJ repariert werden müssen, weil die Suche nach einer homologen Matrize für die HR unter diesen Umständen stark erschwert ist. Im Gegensatz dazu liegen beim Auftreten eines DSB während der Replikation ideale Voraussetzungen für die HR vor, da mit dem Schwesterchromatid eine homologe Vorlage in unmittelbarer räumlicher Nähe gegeben ist (Delacôte und Lopez 2008, Sonoda et al. 2006).

Solche Daten beschreiben komplementäre Funktionen des NHEJ und der HR, der beiden Hauptreparaturwege für DSB in Säugerzellen (Sonoda et al. 2006). Komplementär sind diese Funktionen in dem Sinn, dass in Situationen, in denen der eine Reparaturweg gar nicht regelrecht ablaufen kann, weil die Voraussetzungen für sein Eintreten nicht erfüllt sind, ein anderer zur Verfügung steht und dadurch das Spektrum an Situationen erweitert, auf die erfolgreich reagiert werden kann.

Auch wenn NHEJ somit den Hauptweg zur Reparatur akzidentierlicher DSB darstellt, gibt es Hinweise, dass beide Reparaturwege um einen DSB konkurrieren können: Für das gleichzeitige Agieren mehrerer alternativer Wege spricht z.B., dass nach der Reparatur eines enzymatisch erzeugten DSB in 30-50% der überlebenden Zellpopulation Produkte homologieabhängiger Mechanismen gefunden

werden (Liang et al. 1998). Für eine Kooperation der HR und des NHEJ bei der Reparatur strahleninduzierter DSB spricht auch die synergistische Steigerung der Strahlenempfindlichkeit infolge der parallelen Beeinträchtigung beider Reparaturwege in DT40 Zellen (Takata et al. 1998) sowie die Stimulation der HR nach Bestrahlung in  $G_1$  in Zellen mit defektem  $G_1$ -Checkpoint (Delacôte und Lopez 2008).

Ausgehend von der gleichzeitigen Verfügbarkeit mehrerer potentieller Reparaturwege in Säugerzellen am Ende der S-Phase postulierten Sonoda et al. (2006), dass die Zellen über einen Regulationsmechanismus verfügen müssten, um sich für einen der Wege entscheiden zu können (Sonoda et al. 2006). Details dieser Regulation wurden untersucht, indem der relative Beitrag der verschiedenen Wege an der DSB Reparatur in unterschiedlich mutierten Zellmodellen bestimmt wurde. Mit diesem Ziel wurde entweder das Überleben nach einer Schädigung (z.B. ionisierende Bestrahlung) untersucht, als globaler Wert zur Beschreibung der Reparaturkapazität (Takata et al. 1998, Rothkamm et al. 2003, Essers et al. 2000), oder ein bestimmter Reparaturweg mittels Plasmid Rekonstitution an einem gezielt induzierten DSB direkt quantifiziert. Mit beiden experimentellen Ansätzen lässt sich der Einfluss verschiedener Mutationen (Mansour et al. 2008, Delacôte et al. 2002, Pierce et al. 2001), Zellzyklusphasen (Rothkamm et al. 2003, Takata et al. 1998) oder Entwicklungsstadien (Essers et al. 2000) auf die Wahl des Reparaturwegs darstellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Bedeutung der HR für die Reparatur eines enzymatisch induzierten DSB aufzuzeigen. Ein derartiger, zweiendiger DSB wird in unsynchronisierten Zellen in den meisten Fällen mittels NHEJ prozessiert (Mansour et al. 2008). Ob die beiden Reparaturwege um den DSB konkurrieren können wurde untersucht, indem der Einfluss einer Defektmutation im NHEJ auf die gemessenen Rekombinationsfrequenzen quantifiziert wurde. Nachfolgend wurde der Einfluss einer zusätzlichen Hemmung RAD51 abhängiger HR vor dem Hintergrund des NHEJ Defekts untersucht.

### 3 Material und Methoden

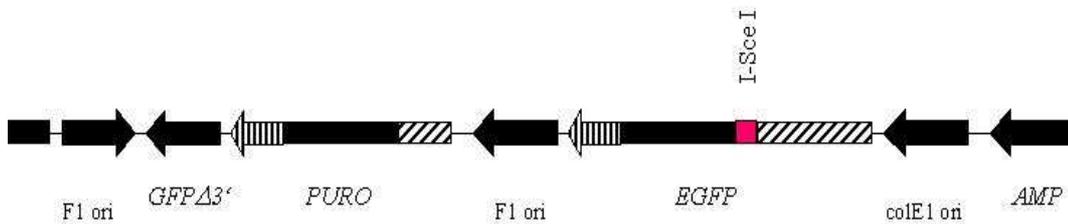
#### 3.1 Plasmid Rekonstitutions Assay

Ein Plasmid-Rekonstitutions-Assay dient der Messung der relativen Häufigkeit eines DNA-Reparaturwegs. Dabei wird ein inaktives Markergen durch die erfolgreiche Reparatur eines induzierbaren DSB in seine aktive Form überführt. In der Folge wird der Marker von der Zelle exprimiert und erlaubt die Quantifizierung dieses Reparaturwegs.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Reparatursubstrat pGC ist eine rekombinante DNA-Sequenz, die als Plasmid in Bakterien vermehrt werden kann: Sie kann in eukaryote Zellen eingebracht werden und erlaubt die Selektion von Klonen, von denen sie chromosomal integriert wurde (s. Abb. 6, Schmidt-Petersen, 2003). Das Reparatursubstrat pGC ermöglicht die Induktion eines DSB, indem es die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease I-Sce 1 umfasst; diese 18 bp lange Sequenz ist als Insertionsmutation in das Markergen *EGFP* ('enhanced green fluoreszent protein' -Gen) eingefügt. Dies verhindert zum einen die Expression des Markers, zum anderen kann das Reparatursubstrat an dieser Stelle durch das Restriktionsenzym geschnitten werden, wodurch ein Doppelstrangbruch erzeugt wird.

Zellen der beiden Zelllinien CHO-K1 und xrs5 wurden mit dem Rekombinationssubstrat transfiziert und Klone identifiziert, die pGC chromosomal integriert haben. In diesen Klonen lässt sich ein Doppelstrangbruch durch Transfektion eines Expressionsvektors für I-Sce 1 erzeugen. Die Rekonstitution des Markers *EGFP* erfolgt *in vivo* durch die Reparatur des enzymatisch induzierten Doppelstrangbruchs mittels konservativer homologer Rekombination; dabei dient ein Fragment des Markergens, bei dem keine Insertion eingefügt wurde, als Matrice. Durch Genkonversion wird die ursprüngliche Sequenz des Markers wiederhergestellt; in der Folge kann EGFP exprimiert werden. Die Verwendung des grün fluoreszierenden Proteins als Marker erlaubt es, erfolgreiche HR-Reparaturereignisse auf einfache Weise am Durchflusszytometer zu quantifizieren.

### 3.1.1 Das Rekombinationssubstrat pGC



**Abb. 6:** Das Rekombinationssubstrat pGC. *PURO*: Puromycin-Resistenzgen, *EGFP*: enhanced green fluorescent protein-Gen, I-Sce 1 : Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease I-Sce 1 , *GFP Δ3'*: Fragment des *EGFP*-Gens, *AMP*: Ampicillin-Resistenzgen, ori: Origin of Replication.

Das Plasmid pGC wurde aus Abschnitten anderer Plasmide hergestellt und ist 6621 bp lang (Schmidt-Petersen, 2003). Es enthält ein Gen, das eukaryoten Zellen Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin verleiht. Dies ermöglicht es, selektiv Klone von Säugerzellen zu kultivieren, die das Plasmid in ihr Genom integriert haben.

Dieses Puromycinresistenzgen (*PURO*) wird flankiert von zwei Fragmenten des *EGFP* - Gens. Dieses Gen stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea coerulea* und kodiert ein Protein, das bei optischer Anregung Licht im grünen Bereich des Spektrums emittiert. Die kommerziell erhältliche Variante *EGFP* wurde im Hinblick auf eine stärkere Fluoreszenz und Expression in Säugerzellen optimiert; ihr Emissionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 507 nm, das Absorptionsmaximum bei 488 nm. Beide Kopien des *EGFP* -Gens auf dem Vektor sind jedoch inaktiv:

Das Fragment *GFP Δ3'* ist am 3' Ende deletiert, und die ansonsten intakte Sequenz des *EGFP* wird durch eine Insertion der Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease I-Sce 1 im ersten Drittel unterbrochen. Daher exprimieren Zellen, die mit dem Vektor pGC transfiziert wurden zunächst kein *EGFP*; erst nach erfolgter Reparatur eines an der Insertion induzierten Doppelstrangbruchs durch konservative homologe Rekombination kommt es durch Genkonversion zu einer Elimination der I-Sce 1 Insertion: Ein funktionelles *EGFP* wird wiederhergestellt und führt zur Grünfluoreszenz der Zelle.

Außerdem kodiert das Plasmid ein bakterielles Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin (*AMP*) zur Selektion in Bakterien und die Replikationsursprünge, die es transformierten Bakterien erlauben, das Plasmid extrachromosomal zu vervielfältigen (Schmidt-Petersen, 2003, s. Abb. 6).

### 3.1.2 Der I-Sce 1 Expressionsvektor pSceMJ

Das Plasmid pSceMJ ist 5452 bp lang. Es dient als Expressionsvektor für die Restriktionsendonuklease I-Sce 1, d.h. mit diesem Vektor transfizierte Zellen exprimieren das Enzym. Zur Selektion in Bakterien kodiert es außerdem eine Resistenz gegen Ampicillin.

Bei der I-Sce 1 Endonuklease handelt es sich um eine Endonuklease aus *Saccharomyces cerevisiae* mit der 18 bp spezifischen Erkennungssequenz TAGGGATAACAGGGTAAT. Durch die Länge der Sequenz und die Spezifität der Endonuklease wird gewährleistet, dass nur ein einmaliger Schnitt in den Zellen erzeugt wird (Rouet et al. 1994).

### 3.2 Amplifikation der Plasmide pGC und pSceMJ

Für die nachfolgenden Experimente wurden die benötigten Plasmide in ausreichender Menge produziert und ohne Verunreinigungen in wässriger Lösung zur Verfügung gestellt. Ausgehend von einer kleinen Menge des in H<sub>2</sub>O bidest. vorliegenden Plasmids wurde dieses in zur Transformation kompetente *E. coli* Bakterien des Stamms DH10B eingebracht, welche in der Lage sind, das Plasmid biologisch zu vermehren. Aus einer vitalen Kultur der so transformierten Bakterien wurde nach Lyse der Bakterien die Plasmid-DNA selektiv gewonnen und in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Durch Einsatz mehrerer Restriktionsenzyme und anschließende Elektrophorese der DNA-Fragmente wurde Identität, Integrität und Reinheit des Plasmids überprüft. Als Nährmedien für die Bakterien wurden Luria Broth (LB) bzw. durch Agar verfestigte LB verwendet. Die Bakterienkulturen wurden bei 37°C inkubiert, Flüssigkulturen wurden dabei mit 225 rpm in einem Schüttler bewegt. Um eine vitale Kultur mit hoher Zelldichte zu gewinnen wurden 5 ml Selektionsmedium mit einer isoliert wachsenden Kolonie von einer Agarplatte beimpft und 6 h inkubiert. Diese Startkultur wurde dann mit Selektionsmedium 1/2000 verdünnt und über Nacht im 37°C warmen Schüttler inkubiert.

#### 3.2.1 Elektrotransformation

Als Transformation bezeichnet man die genetische Veränderung eines Bakteriums. Wird ein Plasmid, das über einen eigenen Replikationsursprung verfügt, in ein Bakterium eingebracht, so kann dieses Plasmid chromosomal unabhängig vermehrt und an Tochterzellen weitergegeben werden. So kommt es zu einer sehr starken Vermehrung des Plasmids in einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur. Verwendet wurden ElectroMAX DH10B Bakterien der Firma Invitrogen, Carlsbad (USA). Dieser Stamm kompetenter *E. coli* Bakterien ist besonders zur Elektrotransformation geeignet.

Die Transformation der Bakterien erfolgte durch Elektroporation analog der Transfektion eukaryotischer Zellen; dabei wurden alle verwendeten Materialien auf Eis gekühlt. Für einen 30  $\mu\text{l}$  Ansatz wurde 1 ng des Plasmids in 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidest. mit 10  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension vermischt. Nach dem Überführen in eine Elektroporationsküvette wurde ein Puls mit einer Ausgangsfeldstärke von  $E_0 = 18 \text{ kV/cm}$  ausgelöst; die Zeitkonstante  $\tau$ , nach der das Feld auf  $E_0/e$  abgefallen ist, lag zwischen 4 und 5 ms.

Die Bakterien wurden nach der Transformation 1 h in LB inkubiert und dann auf Agarplatten ausgestrichen, welche mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum versetzt waren.

### 3.2.2 Präparation der Plasmide

Zur Extraktion des vermehrten Plasmids aus den Bakterien wurde ein Plasmidextraktionskit verwendet, welches in seinen verschiedenen Bausätzen sowohl die Extraktion kleiner Mengen an DNA (Mini bis 20  $\mu\text{g}$ ), mittlerer (Maxi bis 500  $\mu\text{g}$ ) als auch sehr großer Mengen (Mega bis 2,5 mg) ermöglicht. Das Verfahren basiert auf alkalischer Lyse der Bakterien und Bindung der Plasmid-DNA an ein Anionenaustauscherharz bei niedrigem Salzgehalt und pH-Wert. Durch einen Puffer mit hohem Salzgehalt kann die DNA von diesem Harz wieder gelöst und durch Fällung mit Isopropanol konzentriert und entsalzt werden. Das Anionenaustauscherharz wird in Einwegsäulen geliefert, durch die Flüssigkeiten von der Schwerkraft angetrieben langsam durchsickern können. Das Protokoll entspricht den Angaben des Herstellers (QIAGEN Plasmid Purification Handbook 12/2002). In einen Maxi-Ansatz wurden die Bakterien aus 100 ml vitaler Flüssigkultur 15 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert und in 10 ml P1 Puffer aufgenommen. Dem wurden 10 ml Lysepuffer P2 hinzugefügt und der Ansatz nach vorsichtigem Durchmischen 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von 10 ml des Neutralisationspuffers P3 und erneutes Mischen durch vorsichtiges Invertieren wurde die Lyse der Zellen gestoppt. Im Verlauf der folgenden Inkubation für 20 min auf Eis fiel ein Präzipitat aus Zelldebris, genomischer DNA und SDS aus. Dieses wurde bei 10°C und 12000 rpm über 30 min sedimentiert, der Überstand in ein frisches Zentrifugenröhrchen dekantiert und zur vollständigen Klärung erneut 15 min zentrifugiert.

In der Zwischenzeit wurde eine neue Säule durch Auftragen von 10 ml QBT Puffer equilibriert. Nach Durchlaufen des Puffers wurde das geklärte Lysat auf die Säule aufgebracht; die gelöste DNA bindet beim Durchlaufen an das Harz und wird so von der Lösung getrennt.

Durch zweimaliges Waschen mit je 30 ml QC Waschpuffer wurden Verunreinigungen entfernt bevor die DNA mit 15 ml QF Elutionspuffer wieder von der Säule gelöst wurde. Das Eluat wurde mit 10,5 ml Isopropanol gefällt und 30 min bei 10°C und 12000 rpm zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut 10 min zentrifugiert, dann bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 250 µl Tris-Cl Puffer aufgenommen. Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration ergab eine Ausbeute von etwa 400 µg DNA pro Maxi-Ansatz; aus einem Mega-Ansatz konnten etwa 2 mg Plasmid gewonnen werden.

### **3.2.3 Qualitätsbestimmung der amplifizierten Plasmide**

Nach der Präparation sollte sichergestellt werden, dass ausschließlich das gewünschte Plasmid vollständig und ohne Verunreinigungen amplifiziert wurde. Zu diesem Zweck wurden auf dem Plasmid definiert vorliegende DNA-Abschnitte mittels Restriktionsenzymen nachgewiesen. Ein Restriktionsenzym bezeichnet eine bakterielle Endonuklease, die in der Lage ist, eine definierte Basenfolge zu erkennen und innerhalb dieser Sequenz einen Schnitt in den DNA-Strang zu setzen. So können Fragmente unterschiedlicher Länge erzeugt werden, die dann unter Ausnutzung der Ladungseigenschaften der DNA im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe voneinander getrennt werden. Dies entspricht dem Prinzip der Gelelektrophorese, bei der die Auftrennung im elektrischen Feld innerhalb einer Matrix aus Agarose stattfindet; dabei wandern kleinere Fragmente schneller als große. Alle Fragmente einer Größe laufen in einer bestimmten Zeit die gleiche Strecke von ihrer Ausgangsposition und befinden sich in unmittelbarer Nähe zueinander im Gel. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können sie dort als Bande visualisiert werden.

Ein Ansatz aus 1 µg DNA, 5 U Enzym, den vom Hersteller empfohlenen Puffern und H<sub>2</sub>O bidest. ad 20 µl wurde 1 h bei 37°C inkubiert.

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid vorbereitet und in einer Elektrophoresekammer mit 0,5x TBE überschichtet. Die Hälfte des Restriktionsansatzes wurde zusammen mit 5 µl Auftragspuffer in eine Tasche des Gels pipettiert und in einem elektrischen Feld von 5 V/cm 1 h aufgetrennt. Daneben wurde ein DNA-Längenstandard aufgetragen, der die Zuordnung der Banden ermöglicht. Anschließend wurde das Gel im UV-Durchlicht fotografiert.

### 3.2.4 Linearisieren des Plasmids pGC

Die Ausbeute an transfizierten Zellen ist größer, wenn man die Zellen mit zuvor linearisierter DNA transfiziert (Neumann et al. 1982). Um das Plasmid pGC vor der Transfektion zu linearisieren, wurde es mit dem Restriktionsenzym Xmn I geschnitten, das glatte DNA-Enden ohne Überhang erzeugt. Ein 50 µl Ansatz mit 10 µg DNA und 5 U Xmn I wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Enzym 20 min bei 62°C inaktiviert und das Ergebnis des Restriktionsschnitts mittels eines 1% Agarosegels dokumentiert.

### 3.3 Transfektion

Zunächst sollten Zellen der beiden Ausgangszelllinien CHO-K1 und xrs5 stabil mit dem Rekombinationssubstrat pGC transfiziert werden: Dabei bedeutet stabile Transfektion, dass rekombinante DNA in die Zelle eingebracht und dort in das Genom integriert wird. Die genetische Information des Plasmids wird durch die Zelle exprimiert und bleibt erhalten, solange ein kontinuierlicher Selektionsdruck besteht. Der Selektionsdruck wird durch Zugabe eines Antibiotikums erzeugt, dessen Resistenzgen sich ebenfalls auf dem integrierten Plasmid befindet. Die chromosomale Integration erfolgt allerdings nicht zielgerichtet, sondern ereignet sich spontan in einer kleinen Fraktion der transfizierten Zellen; diese können durch Selektion in einem Medium, welches das Antibiotikum enthält, isoliert werden.

In einem zweiten Transfektionsschritt wurden die Zellen transient mit dem Expressionsvektor pSceMJ für die I-Sce 1 Restriktionsendonuklease transfiziert. Die transiente Transfektion führt nur zu einer vorübergehenden Integration des Plasmids; in Ermangelung eines Replikationsursprungs kommt es nur zu einer kurzzeitigen Expression der auf dem Plasmid befindlichen Gene. Für den Zeitraum des Experiments kommt es in der Zelle zu einer Expression der Restriktionsendonuklease I-Sce 1, des Enzyms, das in der Lage ist, pGC an der vorgesehenen Stelle zu schneiden. So wird ein DSB erzeugt, der von der Zelle durch die ihr zur Verfügung stehenden Reparaturmechanismen prozessiert wird.

Ein weiterer Transfektionsschritt erfolgte zur posttranskriptionalen Hemmung der RAD51 Expression mittels RNA-Interferenz (RNAi). Dazu wurden die Zellen mit RNA-Fragmenten (siRNA) transfiziert, welche den Abbau spezifischer mRNA-Sequenzen vermitteln können.

Die Transfektion erfolgte mittels Elektroporation (Plasmide) und Lipofektion (siRNA).

### 3.3.1 Elektroporation

Elektroporation bezeichnet einen physikalischen Prozess, bei dem Zellmembranen durch einen elektrischen Puls vorübergehend permeabel gemacht werden. Dies ermöglicht die Aufnahme von unterschiedlichsten Molekülen, wie auch Plasmiden, in die Zelle. (nach: Gene Pulser II Manual)

Dabei geht man davon aus, dass es durch das kurzzeitige Wirken eines starken elektrischen Feldes zu einer reversiblen Ausbildung von Poren in der Lipidkomponente der Zellmembran kommt, da polare Kopfgruppen der Membranlipide mit dem Feld interagieren (Neumann et al., 1982). Die Elektroporation diente im Verlauf dieser Arbeit sowohl der Transfektion eukaryotischer Zellen mit DNA aus bakteriellen Plasmiden, als auch der Transformation von Bakterien zur Amplifikation der Plasmide.

Bei der stabilen Transfektion wurden für jeden Ansatz 0,5 µg des zu transfizierenden Plasmids in 50 µl H<sub>2</sub>O bidest. vorbereitet sowie 3x10<sup>6</sup> Zellen trypsinisiert und in 10 ml PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 750 µl PBS resuspendiert, mit der Plasmidlösung vereinigt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Elektroporiert wurde mit einer Ausgangsfeldstärke  $E_0$  von 0,625 kV/cm; die Zeitkonstante  $\tau$ , nach der das Feld auf  $E_0/e$  abgefallen ist, wurde protokolliert und lag bei allen Experimenten zwischen 11 und 14 ms. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen in eine mit 10 ml Medium gefüllte, auf 37°C vorgewärmte, T75 Gewebekulturflasche gegeben und im Brutschrank inkubiert.

Die transiente Transfektion des I-Sce 1 Expressionsvektors erfolgte nach dem gleichen Protokoll mit je 50 µg des Plasmids pro Ansatz.

### 3.3.2 Lipofektion

Die Lipofektion wurde in dieser Arbeit verwendet, um Zellen mit kleinen RNA-Fragmenten für die RNA-Interferenz zu transfizieren. Bei der Lipofektion werden die zu transfizierenden Nukleinsäuren in Liposomen verpackt, die mit der Zellmembran fusionieren und ihren Inhalt an die Zelle abgeben.

Man verwendet geeignete kationische Lipide, die als präformierte Liposomen kommerziell erhältlich sind. Diese kationischen Lipide interagieren aufgrund ihrer Ladung spontan mit Nukleinsäuren und bilden Komplexe, in denen die negativ geladenen Nukleinsäuren von Liposomen aufgenommen werden. Die positive Ladung dieser Komplexe erlaubt dann eine Assoziation mit der negativ gelade-

nen Oberfläche der Zellen und vermittelt so die Transfektion (Felgner et al. 1987).

Ein detailliertes Protokoll der einzelnen Verfahrensschritte findet sich im Abschnitt 3.6 RNAi zum Knockdown von RAD51.

### **3.4 Integration des Rekombinationssubstrats pGC**

Für die vorliegende Arbeit wurden Zellen der Zelllinien CHO-K1 und xrs5 untersucht und bezüglich der Häufigkeit von HR- Reparaturereignissen verglichen. CHO-K1 ist ein Subklon der Linie CHO, die ursprünglich aus dem Ovar eines adulten chinesischen Hamsterweibchens etabliert wurde. Die Zelllinie xrs5 wurde durch Ethyl-Methansulfonat-(EMS)-Mutagenese aus CHO-K1 Zellen erzeugt (Jeggo und Kemp 1983). Xrs5-Zellen weisen einen Defekt im nicht-homologen Endjoining auf, der durch eine humane *Ku80* cDNA komplementiert werden kann. Man nimmt an, dass CHO-K1 Zellen zwei Kopien des *Ku80*-Gens enthalten, von denen eine in einer inaktiven Form vorliegt. Eine Mutation der zweiten, aktiven Kopie des Gens durch die EMS-Mutagenese führt zu einer geringen Expression von KU80 und erklärt den Phänotyp der xrs5-Zellen (Singleton et al. 1997).

#### **3.4.1 Zellkulturtechniken**

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank mit vertikalem Luftstrom durchgeführt. Die Stammhaltung der Zellen erfolgte in T25 Gewebekulturflaschen unter einer 37°C warmen, wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>. Als Nährmedium diente  $\alpha$ -Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin und 5% FCS. Zur Erhaltung von Klonen, die eine Puromycinresistenz tragen, wurden dem Medium zusätzlich 10  $\mu$ g/ml Puromycin für CHO-K1 Klone bzw. 5  $\mu$ g/ml für xrs5 Klone zugegeben. Sämtliche Flüssigkeiten, die mit lebenden Zellen in Kontakt kommen sollten wurden zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Die Zellen wurden alle zwei bis vier Tage passagiert. Das Medium wurde verworfen und die Zellen mit 4 ml PBS zur Entfernung von Mediumresten kurz inkubiert. Das PBS wurde verworfen und der Zellrasen mit 0,7 ml Trypsin 1 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden durch Klopfen vereinzelt und das Trypsin durch Zugabe von Nährmedium inaktiviert. Die Zelldichte wurde mit einer Coulter Zählkammer ermittelt und die Zellen in einer neuen Gewebekulturflasche subkultiviert. Zur Synchronisation der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase wurde eine hohe Eingabe von Zellen über drei Tage bis zur Konfluenz inkubiert.

### 3.4.2 Ermittlung der zellulären Toleranz gegen Puromycin

Zur Sicherstellung der ausschließlichen Kultivierung von Zellen mit einem integrierten Plasmid sollte diejenige Konzentration an Puromycin im Medium bestimmt werden, die nicht resistente Zellen sicher abtötet. Dazu wurden jeweils  $10^5$  Zellen in eine T25 Gewebekulturflasche gegeben und 1 h inkubiert, bevor Puromycin in neun unterschiedlichen Zielkonzentrationen zugegeben wurde. Für CHO-K1 Zellen lagen diese zwischen 0,5 µg/ml und 20 µg/ml, für xrs5 Zellen zwischen 0,1 µg/ml und 10 µg/ml. In den darauffolgenden Tagen wurden die Zellen täglich inspiziert; der Zeitpunkt des Absterbens wurde für jeden Ansatz protokolliert und die ideale Konzentration für die jeweilige Zelllinie ermittelt.

### 3.4.3 Klonale Aufzucht

Zur Gewinnung von Klonen, die das Rekombinationssubstrat pGC stabil in ihr Genom integriert haben, wurden  $3 \times 10^6$  Zellen mit 0,5 µg des linearisierten Plasmids transfiziert. Nach 18 h erfolgte ein Mediumwechsel, um die Überreste bei der Elektroporation zerstörter Zellen zu entfernen. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen in zwei Zelldichten vollständig auf T75 Gewebekulturflaschen verteilt, wobei jeweils 666 Zellen/cm<sup>2</sup> und 1333 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät wurden. Die Selektion resistenter Zellen erfolgte 48 h nach der Transfektion durch Zugabe von 10 µg Puromycin pro ml Medium für CHO-K1 Klone bzw. 5 µg/ml Puromycin für xrs5 Klone. In den folgenden Tagen wurde das Nährmedium täglich gewechselt, bis nach 7-10 Tagen aus den verbliebenen resistenten Zellen kleine Kolonien hervorgegangen waren. Zur weiteren Aufzucht wurden nur isoliert wachsende Kolonien herangezogen. Um diese zu ernten und in eine Multianzucht-Platte zu überführen, mussten sie markiert und der direkten Manipulation zugänglich gemacht werden: Das Medium wurde verworfen und die Zellen mit 10 ml PBS bedeckt, um sie vor der thermischen Einwirkung des Lötkolbens zu schützen, mit dem jeweils über der zu erntenden Kolonie ein daumennagelgroßes Loch in die Gewebekulturflasche geschmolzen wurde. Nach dem Entfernen des PBS wurde die Kolonie zwei min mit einem Tropfen Trypsin inkubiert, dann in 10 µl Medium aufgenommen und in eine mit 500 µl Medium gefüllte Vertiefung einer Anzuchtplatte mit 48 Vertiefungen überführt. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Klone in ein größeres Kulturgefäß passagiert bis sie nach 5-6 Passagen in T75 Gewebekulturflaschen vorlagen.

### 3.4.4 Kryokonservierung

Subkonfluent gewachsene Zellen wurden trypsinisiert und in Nährmedium aufgenommen. Die Zelldichte wurde auf  $10^6$ /ml bis  $3 \times 10^6$ /ml eingestellt. Diese Zellsus-

pension wurde im Verhältnis 1:1 mit Einfriermedium verdünnt, gemischt und zügig in auf 4°C gekühlte Kryoröhrchen abgefüllt. Die Zellen wurden 1 h auf Eis inkubiert, über Nacht bei -80°C und langfristig bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Wiederanzucht wurden die gefrorenen Zellsuspensionen im Wasserbad leicht angetaut und dann in eine mit 37°C warmem Nährmedium beschickte Kulturflasche überführt. Nach einem Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

### **3.5 Nachweis der stabilen Integration**

Aus beiden Zelllinien waren zahlreiche Klone hervorgegangen, die eine Resistenz gegen Puromycin aufwiesen. Es sollte gezeigt werden, dass diese Resistenz durch die chromosomale Integration des transfizierten Plasmids hervorgerufen wird. Die genomische DNA der Zellen wurde extrahiert und aus der so gewonnenen DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein von der Antibiotikaresistenz unterschiedlicher Abschnitt des transfizierten Plasmids amplifiziert. Hierfür wurde der Bereich der Erkennungssequenz der I-Sce 1 Restriktionsendonuklease gewählt.

#### **3.5.1 Extraktion von genomischer DNA**

Die genomische DNA wurde mit einem Extraktionskit aus den Zellen gewonnen. Dabei werden die zellulären Proteine durch enzymatische Zersetzung zerstört und das Lysat auf eine Kieselerdegel-Membran transferiert. Die DNA wird selektiv gebunden, während das Zelllysate durch die Membran zentrifugiert wird. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit dem mitgelieferten Waschpuffer kann die DNA mit Tris-Cl Puffer eluiert werden. Das Protokoll folgte den Angaben des Herstellers:

$5 \times 10^6$  Zellen wurden trypsiniert, in Medium aufgenommen und 5 min bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal in jeweils 10 ml PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Das PBS wurde verworfen und das Zellsediment in 200 µl PBS resuspendiert. Unmittelbar nach der Zugabe von 30 µl Proteinase K Lösung und 200 µl Lysepuffer wurde der Ansatz durch Aufschütteln gründlich gemischt und 10 min bei 70°C inkubiert. Dem Lysat wurden 200 µl 100% Ethanol zugegeben und erneut gemischt; dabei fiel ein Präzipitat aus. Die gesamte Probe wurde bei 10000 rpm 1 min durch die Membran zentrifugiert; dabei bindet die genomische DNA an die Membran.

Es folgten die beiden Waschpuffer AW1 mit 1 Minute bei 8000 rpm und AW2 mit 3 Min bei 14000 rpm. Um die DNA von der Membran zu lösen wurde diese zunächst mindestens 1 min mit 200 µl Elutionspuffer inkubiert, bevor sie 1 min

bei 8000 rpm zentrifugiert wurde. Für eine maximale Ausbeute wurde dieser Schritt wiederholt. Im Anschluss wurde das Eluat mit 40 µl 3 M Natriumacetat und 1 ml 100% Ethanol gefällt und 15 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die DNA wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl 10 mM Tris-Cl Puffer aufgenommen.

### 3.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist die universelle Methode zur Vervielfältigung einer DNA-Sequenz *in vitro*. Sie beruht auf der enzymatischen Verdopplung einer gewählten Ausgangssequenz durch eine DNA-Polymerase. Als Startpunkt werden zwei Primer benötigt, Oligonukleotide, die komplementär homolog zu dem (+) Strang des einen Endes und zum (-) Strang des anderen Endes der zu amplifizierenden DNA-Sequenz sind. Es wurde ein Primerpaar gewählt, das zu einem 421 bp langen Produkt innerhalb des linearisierten Plasmids pGC führt. Zusätzlich sollte das Produkt nicht die Kasette mit der Puromycin-Resistenz einschließen, da die Klone durch Selektion mit Puromycin gewonnen worden waren und somit dieser Abschnitt des Plasmids ohnehin mit hoher Wahrscheinlichkeit im Genom nachweisbar wäre.

Durch kurzzeitiges Erhitzen auf 95°C werden die beiden Stränge des ursprünglichen DNA-Moleküls voneinander getrennt, sodass bei der anschließenden Abkühlung des Ansatzes auf 55°C bis 70°C die Primer mit der Matrize hybridisieren können. Die optimale Temperatur für diese Hybridisierung ist von der Länge und dem G/C-Gehalt der Primer abhängig. Ausgehend von den beiden Primern synthetisiert die DNA-Polymerase bei einem Temperaturoptimum von 72°C eine Kopie der Ausgangssequenz, die beim nächsten Durchlaufen des Zyklus ebenfalls als Matrize zur Verfügung steht. So kommt es nach wenigen Zyklen zu einer exponentiellen Vermehrung der Kopienzahl der Zielsequenz.

Für einen Reaktionsansatz wurden 1 Perle Fertigreagenz, 100 ng extrahierte genomische DNA, und jeweils 25 pmol beider Primer mit H<sub>2</sub>O bidest. ad 25 µl gemischt. Der Ansatz wurde zunächst 5 min bei 95°C denaturiert und dann 35 Zyklen nach folgendem Schema inkubiert:

- 1 min bei 95°C: Denaturierung
- 1 min bei 62°C: Hybridisierung der Primer
- 1:20 min bei 72°C: Synthese

Zum Schluss wurde noch 7 min bei 72°C inkubiert.

Der Erfolg der PCR wurde auf einem 2% Agarosegel dokumentiert.

### 3.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie strömen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Zellen einzeln durch eine Kapillare und werden dort von einem Laser mit 488 nm Wellenlänge angestrahlt. Das von den Zellen abgestrahlte Licht wird aufgefangen und in mehreren Kanälen, nach Frequenz und Ausbreitungsrichtung getrennt, verstärkt und aufgezeichnet. Die angeschlossene Software erlaubt die Darstellung dieser Parameter einzeln als Histogramm oder einer beliebigen Kombination als Dot Blot.

Der Forward Scatter (FSC) bezeichnet das Licht, das in Richtung des Strahlengangs aufgefangen wird; Streulicht, das beim Bestrahlen einer Zelle in Abhängigkeit ihrer Größe entsteht. Dieses Licht hat dieselbe Wellenlänge wie die anregende Lichtquelle. Der Sideward Scatter (SSC) bezeichnet das Licht, das mit derselben Wellenlänge wie die erregende Lichtquelle, aber senkrecht zum Strahlengang registriert wird. Dieser Parameter ist ein Maß für die Granularität des angestrahlten Körpers. Werden in einem Diagramm für eine Reihe von Ereignissen der FSC gegen den SSC aufgetragen, so lässt sich in der Punktwolke eine Population intakter Zellen von kleineren, homogeneren Zellfragmenten ebenso abgrenzen wie von größeren Konglomeraten von Zellen.

Die Kanäle FI1 -rot, FI2 -grün, und FI3-gelb messen Lichtintensitäten verschiedener Wellenlängen senkrecht zum Strahlengang; dieses Licht entsteht durch Fluoreszenz. Zur Bestimmung des Anteils grün fluoreszierender Zellen in einer Zellpopulation wurde am Durchflusszytometer die Intensität des von den Zellen emittierten Lichts in zwei Wellenlängen, grün und rot, aufgezeichnet. In einer logarithmischen Darstellung von rot auf der Abszisse gegen grün auf der Ordinate lassen sich so zwei Punktwolken unterscheiden, wobei die steilere die grün fluoreszierenden Zellen repräsentiert.

48h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen und gezählt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 10 ml PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand erneut verworfen und die Zellen in 1 ml PBS pro  $10^6$  Zellen resuspendiert, in FACS-Röhrchen filtriert und gemessen.

### 3.7 RNAi zum Knockdown von RAD51

RNA-Interferenz bezeichnet eine Technik zur posttranskriptionalen Gensuppression. Die Transfektion einer kleinen, interferierenden, doppelsträngigen RNA (= small interfering RNA, siRNA) führt dabei zu einer möglichst weitgehenden Inhibi-

tion der Expression des Zielproteins. (Elbashir et al. 2001) Man geht davon aus, dass die siRNA in der Zelle mit einer Reihe weiterer Proteine den RNA-induced silencing complex (RISC) bildet. Dieser Komplex, der eine Endonukleaseaktivität enthält, bindet an die zu unterdrückende mRNA und vermittelt deren Abbau (Hammond 2001).

Das Protokoll folgt den Vorgaben von Büttner (2004) in Anlehnung an die Herstellerhinweise: Konfluente, in der G1-Phase des Zellzyklus synchronisierte Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und anschließend transfiziert. Während der G1-Phase des Zellzyklus ist der Gehalt an RAD51 am geringsten, so dass die Bedingungen für die Gensuppression optimal sind (Büttner 2004]. Die Zellzahl wurde auf 625.000/ml eingestellt und 2,5 ml der Zellsuspension pro T25 Kulturflasche ausgesät. Bei dieser Zelldichte ist gewährleistet, dass die Zellen bis zum Ende des Experiments keine Konfluenz erreichen. Als Kulturmedium diente RNasefreies  $\alpha$ -Medium mit 5% FCS ohne Zusatz von Antibiotika (=Transfektionsmedium).

Die Zellen wurden 1 h im Brutschrank inkubiert, bevor die Transfektion erfolgte. Währenddessen wurden 36  $\mu$ l siRNA mit 264  $\mu$ l OA-Medium verdünnt und vermischt. Parallel wurden 22  $\mu$ l TransIT-TKO mit 253  $\mu$ l OA-Medium verdünnt, durch invertieren vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 275  $\mu$ l der verdünnten siRNA-Lösung zum verdünnten TransIT-TKO gegeben, die Lösungen durch invertieren gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bilden sich Komplexe zwischen TransIT-TKO und siRNA; 500  $\mu$ l dieser Komplexe wurden dann zu den Zellen gegeben und im Brutschrank inkubiert. Nach 4 h ist die Aufnahme der siRNA weitgehend abgeschlossen; um die toxischen Nebeneffekte der Transfektion zu minimieren wurden 2,5 ml Transfektionsmedium zugegeben und die Zellen für weitere 24 h inkubiert.

Als Kontrolle wurden sowohl scrRNAs eingesetzt als auch nur mit OA-Medium behandelte Zellen mitgeführt. Die Versuche wurden mit RNase-freien Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen durchgeführt; alle eingesetzten Medien und Lösungen wurden mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O bidest. angesetzt.

### **3.8 Nachweis des enzymatisch induzierten DSB durch $\gamma$ H2AX-Focibildung**

DNA-Doppelstrangbrüche führen zu einer Aktivierung einer Signalkaskade, deren Aufgabe die Steuerung des zelleigenen DNA-Reparatursystems ist. Ein wichtiger Schritt innerhalb dieser Signalkaskade ist die Phosphorylierung des Histons

H2AX. Mit Hilfe spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper ist *in vitro* die Darstellung intranukleärer Bereiche möglich, die Chromatin mit phosphoryliertem H2AX enthalten. Diese Bereiche sind in der Fluoreszenzmikroskopie als sogenannte „ $\gamma$ -H2AX-Foci“ erkennbar. Die Anzahl der Foci entspricht dabei der Anzahl der induzierten Doppelstrangbrüche (Rogakou et al., 1999). Mit Abschluss der Reparatur eines Doppelstrangbruches wird das  $\gamma$ -H2AX wieder dephosphoryliert, sodass man eine enge Korrelation zwischen dem Entfernen von  $\gamma$ -H2AX-Foci und erfolgter DNA-Doppelstrangbruchreparatur postulieren kann (Nazarov et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit sollte der durch die I-Sce 1 Endonuklease induzierte DSB in Abhängigkeit von der Zeit nach Transfektion untersucht werden. Dabei wurde das phosphorylierte Histon H2AX mittels indirekter immunhistochemischer Markierung nachgewiesen: Die Markierung des gesuchten Proteins erfolgte durch die Inkubation der Zellen mit einem spezifischen Primärantikörper und nachfolgend mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war. Es wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Spezies Maus gegen das  $\gamma$ -H2AX Protein als Primärantikörper angewendet sowie ein mit dem Fluorochrom Alexa Fluor 594 markierter Antikörper gegen das Mausimmunglobulin aus der Spezies Ziege als Sekundärantikörper.

Für jeden Zeitpunkt wurden  $3 \times 10^6$  Zellen trypsinisiert und mit dem I-Sce 1 Expressionsvektor transfiziert. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert und zu verschiedenen Zeiten nach Transfektion fixiert. Dazu wurden die Zellen nach Trypsinierung in Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min mit 1200 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS um Mediumreste zu entfernen. Im Anschluss wurde die Zellzahl auf  $10^6$ /ml eingestellt. Jeweils 150  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden mittels Cytospin auf Objektträger zentrifugiert und in 2% Formaldehydlösung für 15 min fixiert. Um die Formaldehydlösung zu entfernen erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils 10 min auf dem Schüttler. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 4°C mit der Permeabilisierungslösung behandelt, um die intranukleäre Proteinmarkierung vorzubereiten. Um unspezifische Proteinmarkierungen zu verhindern wurden die Zellen danach mit 3% BSA-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Detektion des  $\gamma$ -H2AX Proteins wurden 60  $\mu$ l des Anti- $\gamma$ -H2AX-Antikörpers (1:100) aufgetragen und für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurde unspezifisch gebundener Antikörper mittels dreimaligen Waschens in Tween-20-BSA Lösung für jeweils 10 min unter leichtem Schütteln entfernt. Die eigentliche Detektion erfolgte dann durch Zugabe von 60  $\mu$ l des fluoreszenzmarkierten Anti-Maus Antikörpers (1:600) für 1 h in einer feuchten Kam-

mer und im Dunklen. Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch viermaliges Waschen für 10 min in Tween-20-PBS-Lösung unter leichtem Schütteln entfernt. Zur Gegenfärbung der DNA erfolgte die Zugabe von 15  $\mu$ l Dapi-.Antifade-Lösung (0,1 $\mu$ l DAPI/ml Antifade). Zum Abschluss wurden die Proben mit Deckgläschen versehen, die überschüssige Lösung wurde im Filterblock ausgestrichen und die Kanten wurden mit Nagellack versiegelt. Sie konnten so bei 4°C für 2-4 Wochen gelagert werden.

Die Auswertung der  $\gamma$ -H2AX-Foci erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 1.000facher Vergrößerung unter Verwendung passender Kombinationsfilter für die simultane Darstellung der rotfluoreszierenden  $\gamma$ -H2AX-Foci mit blaufluoreszierender Zellkerngegenfärbung. Pro Zelllinie und Zeitpunkt wurden insgesamt mindestens 200 Zellkerne bewertet. Die Ergebnisse wurden als durchschnittliche  $\gamma$ -H2AX-Foci pro Zelle angegeben. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte softwaregestützt (GraphPad Prism® 4.03).

### **3.9 Metaphasen-Technik zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit**

Kennzeichnendes Merkmal der xrs5 Zellen ist ihre Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Bestrahlung, die sich in einer erhöhten Rate von Chromosomenaberrationen niederschlägt. Diese wird durch eine Defektmutation im *Ku80*-Gen hervorgerufen. Es sollte gezeigt werden, dass die *Ku80*<sup>-/-</sup> Mutation auch nach Integration des Rekombinationssubstrates und Klonierung weiterhin in den Zellen vorhanden war.

Alle Untersuchungen zu Aberrationen, gleichgültig welchen Typs, finden stets an sogenannten Metaphasepräparationen, benannt nach der Metaphase der Mitose, statt. Nur in der Mitose des Zellzykluses sind die einzelnen Chromosomen so stark kondensiert, dass sie nach speziellen Färbungen einer differenzierten licht- oder fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zugänglich werden. Um sicherzustellen, dass sich in einer zu untersuchenden Probe eine ausreichend große Anzahl an Zellen in der Mitose befindet, wird der Zellkultur über einen bestimmten Zeitraum Colcemid, ein synthetisches Analogon des Spindelfasergiftes Colchicin, zugesetzt. Die Ausbildung des Spindelapparats, ohne den in der Metaphase der Mitose letztlich das Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden der einzelnen Chromosomen unmöglich ist, wird gehemmt und dadurch die Chromosomen praktisch in der Äquatorialebene des Metaphasezellkerns blockiert.

Für die Untersuchungen von Chromosomenaberrationen in der G1-Phase wurden die Zellen bestrahlt, bei 37°C inkubiert, 16h nach Bestrahlung dem Medium 0,2 µg/ml Colcemid zugesetzt und für weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die mitotischen Zellen vom Flaschenboden durch hartes Aufklopfen der Flaschen auf den Labortisch unter Ausnutzung der reduzierten Anhaftung der Zellen in der Mitose abgelöst und in das Medium überführt. Das Medium wurde mit einer Spritze in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment wurde zweimalig durch Zugabe von PBS mit nachfolgender Zentrifugation gewaschen. Das so gewaschene Zellsediment wurde in 1 ml PBS aufgenommen. Im Anschluss wurde tropfenweise unter vorsichtigem Schütteln 9 ml einer 0,075 mol KCL-Lösung hinzugefügt. Diese hypotone Lösung führt zur vermehrten Wasseraufnahme, dem Anschwellen mit nachfolgendem Platzen der Zellen, so dass nur noch Zellkerne in der Lösung verbleiben. Die Lösung wurde für 5 min bei 1200 rpm erneut zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment durch tropfenweise Zugabe von 9 ml Carnoy's Fixativ fixiert. Dieser Fixierungsschritt wurde nach einer erneuten Zentrifugation nochmals durchgeführt und das verbleibende Sediment wurde zum Schluss in 1 ml Carnoy's Fixativ resuspendiert. Nachfolgend wurde die Zellzahl bestimmt und auf  $10^6$  /ml eingestellt. Die so fixierten Zellkerne können über Monate hinweg bei -20°C gelagert werden.

Für die Untersuchung wurden dann auf Objektträgern Metaphasen-Präparate hergestellt. Mit Hilfe von wassergetränktem Filterpapier wurde ein dünner Wasserfilm auf einem fettfreien Objektträger ausgebracht, auf den zügig 30 µl der Zellsuspension getropft wurden. Durch den Sog des an der Grenze zwischen Wasser und Fixativlösung reißenden Wasserfilmes werden die Zellkerne über den Objektträger ausgebreitet, wobei die empfindlicheren Kernmembranen der Metaphasekerne zerstört werden und dadurch die einzelnen, zu einer Metaphase gehörenden Chromosomen in einem jeweils engen Bereich gut ausgebreitet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frequenz des Auftretens zusätzlicher azentrischer Fragmente und dizentrischer Chromosomen nach Röntgenbestrahlung mit 4 Gy bestimmt um sicherzustellen, dass es sich bei den untersuchten Klonen um Subklone von CHO-K1-Zellen einerseits und xrs5-Subklone andererseits handelte.

Die Metaphasen-Präparate wurden anschließend für 15 min in 4,5% Giemsa-PBS-Lösung gefärbt, die überschüssige Farblösung in drei kurzen Waschschr-

ten entfernt, die Objektträger luftgetrocknet und anschließend für die Lichtmikroskopie mit einem Kunstharz überschichtet und mit einem Deckgläschen permanent versiegelt. Die in der Giemsa-Lösung enthaltenen Farbstoffe bilden mit DNA einen purpurroten Komplex.

Strahleninduzierte, nicht reparierte DNA-Doppelstrangbrüche führen zu strukturellen Veränderungen (=Aberrationen) in den Chromosomen. Bei einer Bestrahlung in der präreplikativen G1-Phase betreffen diese – nach erfolgreicher DNA-Replikation in der S-Phase – stets beide Chromatiden der in der Metaphasepräparation sichtbaren Chromosomen. Des Weiteren können die strukturellen Veränderungen innerhalb einzelner Chromosomen (intrachromosomal) auftreten oder mehrere Chromosomen (interchromosomal) involvieren. Aberrationen, die in der (ersten) Mitose verloren gehen, sind also nicht in beiden Tochterzellen wiederzufinden, bezeichnet man als instabil. Zu den instabilen intrachromosomalen Aberrationen zählen die terminale und die interstitielle Deletion, die beide mit der Bildung azentrischer Fragmente einhergehen. Zu den instabilen interchromosomalen Aberrationen gehören dizentrische Chromosomen, die ebenfalls mit meistens einem azentrischen Fragment assoziiert sind. In der sich nach der G1-Phasen-Bestrahlung anschließenden S-Phase des Zellzyklus werden die azentrischen Fragmente und die dizentrischen Chromosomen mitrepliziert, sodass man in der ersten folgenden Mitose typischerweise aus zwei Chromatiden bestehende azentrische Fragmente und dizentrische Chromosomen findet.

Die Auswertung der mit Giemsa gefärbten Präparate erfolgte lichtmikroskopisch unter Ölimmersion bei einer 1.000fachen Vergrößerung. Zur Verbesserung der Auswertung wurde eine computergestützte Bildauswertung (Optimas 6.51) hinzugezogen. Pro Bestrahlungswert wurden zwei Objektträger angefertigt und pro Objektträger mindestens 25 Metaphasen ausgezählt. Die Auszählung erfolgte verblindet. Bei der Zählung wurde die Anzahl aller Chromosomen einschließlich aller Fragmente pro Metaphase bestimmt (= Chromosomenfragmente). Die pro Bestrahlungswert aufgetretenen zusätzlichen azentrischen Fragmente ergaben sich aus der jeweiligen Differenz dieser Anzahl zu der Anzahl der Chromosomenfragmente in den unbestrahlten Kontrollen. Dizentrische Chromosomen wurden extra gezählt. Die letalen Chromosomenaberrationen pro Metaphase ergaben sich aus der Summe der zusätzlichen azentrischen Fragmente und der dizentrischen Chromosomen pro Metaphase. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte softwaregestützt (GraphPad Prism® 4.03).

### **3.10 Bestrahlung und Dosimetrie**

Die Bestrahlung erfolgte mit einer technischen Röntgenröhre bei 20 mA und 200 kV. Zur Aufhärtung der Strahlung wurde ein 0,5 mm starker Kupferfilter angebracht. Die Röntgenröhre wurde mit einem Duplexdosimeter geeicht, welches mit einer Strontium-Radium-Quelle kalibriert worden war. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte je nach Größe der Kulturflasche und der benötigten Gesamtdosis mit 1 Gy/min bzw. 2 Gy/min.

### 3.11 Material

#### 3.11.1 Geräte und Software

sterile Werkbank	Herasafe, Heraeus, Hanau
Coulter Partikelzähler	Modell Z1, Beckmann Coulter, Krefeld
Elektroporator	Gene Pulser II, BioRad, München E.coli Pulser, BioRad, München
Photometer	Bio-Photometer, eppendorf, Hamburg
Heizblock	Thermostat 5320, eppendorf, Hamburg
Schüttler	Mod. G560, Vortex – Genie 2, Scientific Industries Inc, Bohemia (USA)
Elektrophoresekammer	Criterion Cell, BioRad, München
Zentrifugen	5810 R, eppendorf, Hamburg Rotoren: A-4-62 (<= 4000 rpm) F-34-6-38 (<= 12000 rpm) 5415 D, eppendorf, Hamburg Rotor: F-25-24-11 (<= 13200 rpm) Microfuge R, Beckmann-Coulter, Krefeld Rotor: F 24 15 (<= 11000 rpm) Cytospin, Shandon Southern, Astmoore (GB)
Thermocycler	Robocycler, Stratagene Cloning Systems, La Jolla (USA)
Durchflußzytometer	BD FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg
Röntgenröhre	Isovolt 320, Seifert & Co, Ahrensburg
Dosimeter	Dosimentor SN4, PTW, Freiburg
Mikroskop	Axioplan 2, Carl Zeiss, Göttingen CK 2, Olympus, Hamburg
GraphPad Prism 4.03	GraphPad Software, San Diego (USA)
Optimas 6.51	Media Cybernetics, Silver Spring (USA)
CellQuest Pro 4.0.2	Becton Dickinson, Heidelberg

### 3.11.2 Reagenzien und Medien

$\alpha$ -Medium	MEM- $\alpha$ -Pulver, Invitrogen, Carlsbad (USA) 0,22% (w/v) NaHCO <sub>3</sub> 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin H <sub>2</sub> O bidest. ad 1 l steril filtrieren 5% (v/v) FCS
Einfriermedium	$\alpha$ -Medium ohne Zusätze 10% (v/v) DMSO steril filtrieren 20% (v/v) FCS
Transfektionsmedium	MEM- $\alpha$ -Pulver, Invitrogen, Carlsbad (USA) 0,22% (w/v) NaHCO <sub>3</sub> Rnase-freies H <sub>2</sub> O ad 1 l, Invitrogen, Carlsbad (USA) steril filtrieren 5% (v/v) FCS
OA-Medium	MEM- $\alpha$ -Pulver, Invitrogen, Carlsbad (USA) 0,22% (w/v) NaHCO <sub>3</sub> Rnase-freies H <sub>2</sub> O ad 1 l, Invitrogen, Carlsbad (USA)
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
1x Trypsin-EDTA	Invitrogen, Carlsbad (USA) 0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA
Luria Broth (LB)	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl
Selektionsmedium/Bakterien	0,01% (w/v) Ampicillin in LB
Agarplatten	1,5% (w/v) Agar in LB aufkochen in Petrischalen abfüllen

### 3.11.3 Lösungen und Puffer

Das verwendete Wasser wurde mit einer Millipore-Anlage (Milli-Q academic, Millipore, Billerica (USA)) aufbereitet. Es wird im Folgenden als H<sub>2</sub>O bidest. bezeichnet. Wenn angegeben wurden Lösungen für 20 min bei 121 °C und 100 kPa autoklaviert (2540 El, Tuttnauer, GD Breda, NL) bzw. steril filtriert (Steritop, Millipore, Billerica (USA)). Die Elektrolytlösung Isoton II für den Coulter Counter wurde von Beckmann Coulter, Krefeld bezogen, FACSRinse, FACSClean und FACSTFlow für das Durchflußzytometer von Becton Dickinson, Heidelberg.

1xPBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> autoklaviert
5xTBE	0,445 M Tris Borat 0,002 M EDTA pH 8,3
1% Agarosegel mit Ethidiumbromid	1 % (w/v) Agarose in 0,5xTBE aufkochen 0,003 % Ethidiumbromid
Auftragspuffer	0,5% (v/v) SDS 0,25 % (v/v) Bromphenolblau 0,25 % (v/v) Xylencyanol 31% (w/v) Glycerol 25 mM EDTA in H <sub>2</sub> O bidest.
Colcemid	0,02% Demecolcine in PBS steril filtrieren
Carnoy's Fixativ	75% (v/v) Methanol 25% (v/v) Eisessig
4,5% Giemsa-Lösung	4,5% (v/v) Giemsa Farbstoff in 1x PBS
2% Formaldehyd	5,4% Formaldehyd in 1x PBS
Permeabilisierungslösung	1 % (w/v) BSA 0,6 % (v/v) Triton X-100

**3.11.4 Chemikalien und Fertiglösungen**

Agar	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Agarose	BioRad, München
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Demecolcine	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Serva, Heidelberg
EDTA	Serva, Heidelberg
Eisessig	J.T. Baker, Deventer (NL)
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Giemsa Farbstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	Merck, Darmstadt
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Deventer (NL)
NaCl	J.T. Baker, Deventer (NL)
$\text{NaHCO}_3$	Merck, Darmstadt
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris Borat	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 3.11.5 DNA-Extraktionskits

Zur Gewinnung von DNA aus Bakterien ebenso wie aus kultivierten Säugerzellen wurden geeignete Extraktionskits von der Firma QIAGEN GmbH, Hilden bezogen:

DNA	Bezeichnung	Säule	Puffer
Plasmid	Maxi Kit	QIAGEN-tip 500	P1, P2, P3,
	Mega Kit	QIAGEN-tip 2500	QBT, QC, QF
genomische DNA	DNeasy Tissue Kit	Dneasy Mini Spin Columns	Proteinase K Lysepuffer (AL) Waschpuffer (AW1, AW2) Elutionspuffer (AE)

Pufferzusammensetzung:

P1	Resuspensionspuffer	50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
P2	Lysepuffer	200mM NaOH, 1% SDS (w/v)
P3	Neutralisationspuffer	3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5
QBT	Äquilibrierungspuffer	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol (v/v) 0,15% Triton X-100 (v/v)
QC	Waschpuffer	1,0 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol (v/v)
QF	Elutionspuffer	1,25 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol (v/v)

Die Zusammensetzung der übrigen Puffer ist nur dem Hersteller bekannt.

### 3.11.6 Restriktionsenzyme+Puffer

Alle Enzyme und die zugehörigen Puffer wurden bezogen von New England Biolabs, Ipswich (USA).

Name	Konzentration	Erkennungssequenz
Xmn1	20000 U/ml	GAANNNTTC
Pvu1	5000 U/ml	CGATCG
Spe1	10000 U/ml	ACTAGT
Xho1	20000 U/ml	CTCGAG

### 3.11.7 PCR- Primer und -Fertigreagenz

PCR-Primer wurden synthetisiert von der Firma MWG-Biotech Ag, Ebersberg.

FSP46\_for: 5'-CCTTCGGGCATGGCGGACTT-3'

FSP 45 b: 5'-CCCGCGCATGGCCGAGTTGA-3'

PCR-Fertigreagenz-Perlen: puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads, Amersham Biosciences, Freiburg

Laut Hersteller enthalten die Fertigreagenz-Perlen Stabilisatoren, BSA, 2,5 U Taq-Polymerase, dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie Reaktionspuffer.

Rehydriert man eine Perle in einem Gesamtvolumen von 25 µl, so enthält der Ansatz je 200 µM jedes Nucleotids in 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl und 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

### 3.11.8 Antikörper:

Primärantikörper:

Anti-phospho-Histone H2AX (Ser 139) (1µg/µl) der Firma Upstate, Lake Placid (USA)

Sekundärantikörper:

Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (2µg/µl) der Firma Molecular Probes, Leiden (NL)

### 3.11.9 RNA-Interferenz

Es wurden synthetisierte siRNAs der Firmen Dharmacon, Lafayette (USA) und QIAGEN-Xeragon, Köln verwendet. Die siRNAs wurden lyophilisiert geliefert und nach Herstellerempfehlungen rehydratisiert, so dass die Endkonzentration bei 20 µM lag. Die gelöste siRNA wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Die Transfektion von siRNA erfolgte durch Lipofektion mit dem kationischen Lipid TransIT-TKO der Firma Mirus, Madison (USA).

Name	Sequenz	GC-Gehalt	Nukleotide im Target
siRNA1	GCUGGUUCCAUACGGUGG TT TT CGACCAAAGGUAUGCCACC	52,4 %	A: 2 U: 6 G: 7 C: 4
siRNA2	GUGGAUGGAGCAGCCAUGU TT TT CACCUACCUCGUCGGUACA	52,4 %	A: 4 U: 4 G: 8 C: 3
scrRNA1	UGUGCGAGAGUUGCACGAG TT ACACGCUCUCAACGUGCUC	52,4 %	A: 4 U: 4 G: 8 C: 3
scrRNA2	UAGGCAUUGC GCGUGUGUC TT TT AUCCGUAACGCGCACACAG	52,4 %	A: 2 U: 6 G: 7 C: 4

### 3.11.10 DNA-Längenstandard:

Bei der Agarosegel – Elektrophorese wurde die Länge der DNA-Fragmente in den Gelbanden durch Vergleich mit folgenden Größenstandards abgeschätzt:

1 KB DNA Ladder, Gibco-Invitrogen, Carlsbad (USA).

Amplisize Molecular Ruler, Bio Rad, München

**3.11.11 Verbrauchsmaterial**

Verbrauchsmaterialien wurden im Allgemeinen über die Firmen Becton Dickinson (Heidelberg), Brand (Melsungen), Corning(Corning, USA), eppendorf (Hamburg), greiner bio-one (Frickenhausen) und Sarstedt (Nürmbrecht) bezogen. Elektroporationsküvetten stammten von BioRad (München).

## 4 Ergebnisse

Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) spielt eine entscheidende Rolle für den Erhalt der genomischen Stabilität der Zelle. Die beiden Hauptwege, die der Zelle zur Reparatur von DSB zur Verfügung stehen sind das nicht-homologe Endjoining (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR). Das Zusammenspiel der beiden Wege ist von zentraler Bedeutung für die erfolgreiche Reparatur ebenso wie für den Erhalt der funktionellen Integrität der Zelle, da die Wahl eines ungeeigneten Reparaturwegs weitreichende Veränderungen der Basensequenz zur Folge haben kann (Helleday et al. 2007).

In dieser Arbeit sollte die Relevanz der HR für die Reparatur von zweiseitigen DSB überprüft werden, und zwar sowohl in Zellen mit intaktem NHEJ (CHO-K1), als auch in solchen, bei denen dieser andere Hauptweg durch eine Defektmutation des Schlüsselproteins KU80 (*xrs5*) beeinträchtigt ist.

Zu diesem Zweck wurde ein Reparatursubstrat in das Genom der Zellen integriert, das die Induktion eines DSB durch restriktionsendonukleolytische Spaltung seiner Sequenz erlaubt und das die Messung der Frequenz von HR-Ereignissen zur Reparatur dieser DSB ermöglicht: Durch Genkonversion (GC) kommt es zur Rekonstitution eines Reportergens, dessen Genprodukt sich aufgrund seiner Fluoreszenz durchflusszytometrisch nachweisen lässt. Anschließend wurde die Expression von RAD51 unterdrückt, eines Proteins mit zentraler Bedeutung für die HR (Helleday et al. 2007), und auch vor diesem Hintergrund die Frequenz von HR-Ereignissen bestimmt.

### 4.1 Methodische Vorarbeiten

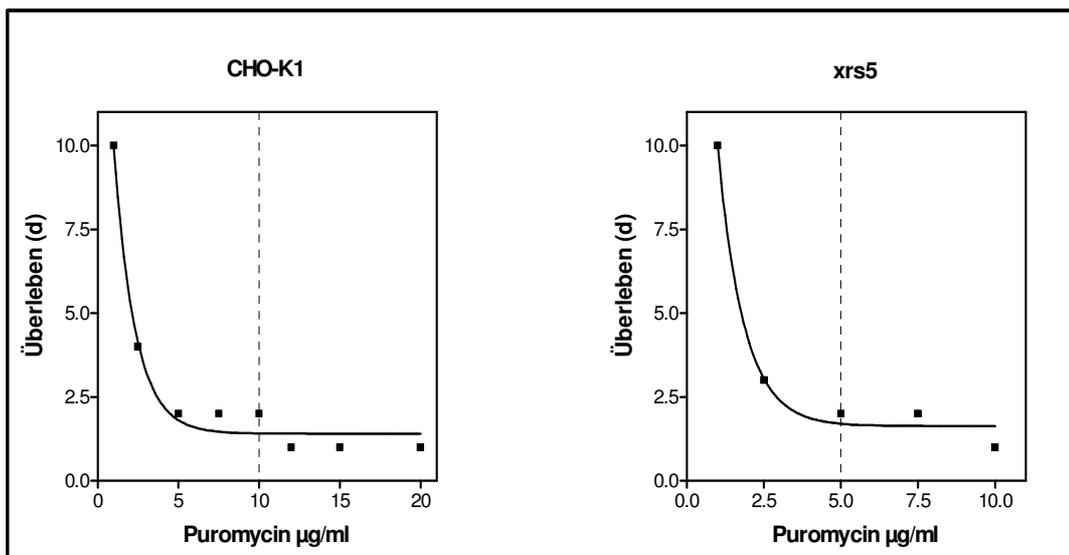
In den methodischen Vorarbeiten mussten zunächst Bedingungen identifiziert werden, unter denen ausschließlich stabil mit dem Rekombinationssubstrat transfizierte Zellen überleben können. Eine ausreichende Menge der Plasmide pGC und pSceMJ wurde amplifiziert und das Zeitintervall zwischen der Transfektion des I-Sce 1 Expressionsvektors und dem Auftreten des DSB durch Detektion von  $\gamma$ H2AX-Foci bestimmt.

#### 4.1.1 Ermittlung der zellulären Puromycintoleranz

Es sollte die Konzentration an Puromycin ermittelt werden, die Zellen der Linien CHO-K1 bzw. *xrs5* nicht überleben können, ohne ein entsprechendes Resistenzgen integriert zu haben. Zu diesem Zweck wurden jeweils  $10^5$  Zellen ausgesät und mit ansteigenden Konzentrationen von Puromycin im Brutschrank inkubiert, wobei für CHO-K1 Zellen neun Ansätze mit Konzentrationen zwischen 0,5  $\mu$ g/ml

und 20 µg/ml vorbereitet wurden; für xrs5 Zellen neun Ansätze zwischen 0,1 µg/ml und 10 µg/ml. Die Zellen wurden täglich inspiziert und der Zeitpunkt protokolliert, an dem keine lebenden Zellen mehr zu erkennen waren; als Kriterium diente der Verlust der Adhärenz an das Kulturgefäß, bei schon zuvor deformierten und sichtbar geschädigten Zellen.

Abb. 7 zeigt die Überlebenszeit der Zellen in Abhängigkeit von der Puromycin-Konzentration. Die dargestellten Kurven wurden aus den Werten mittels einer nicht-linearen Regression ermittelt. Für CHO-K1 Zellen konnte bei Konzentrationen von 5 µg/ml oder mehr ein Überleben bis höchstens zwei Tage beobachtet werden, ab einer Konzentration von 12 µg/ml waren die Zellen bereits am ersten Tag der Beobachtung abgestorben. Xrs5 Zellen überlebten bei Konzentrationen größer 2,5 µg/ml höchstens zwei Tage, ab einer Konzentration von 10 µg/ml weniger als einen Tag. Die zur Selektion verwendete Konzentration an Puromycin ist 10 µg/ml für CHO-K1 bzw. 5 µg/ml für xrs5.

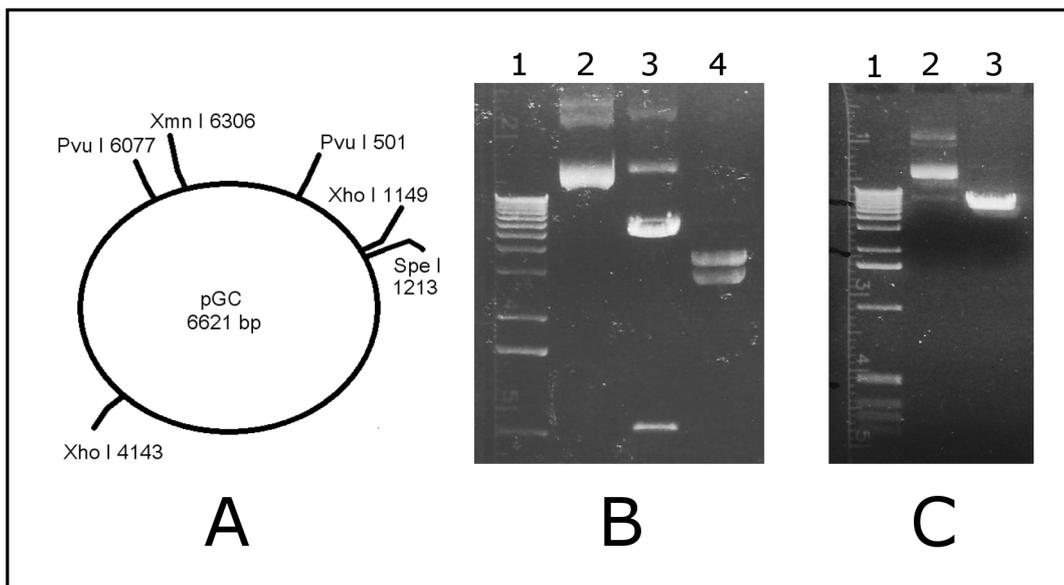


**Abb. 7:** Puromycintoleranz der Zellen als Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Puromycinkonzentration im Medium. Je  $10^5$  Zellen wurden mit einer Konzentration an Puromycin inkubiert und der Zeitpunkt bestimmt, an dem die Zellen abgestorben waren. Kurvenanpassung: nicht-lineare Regression. Gestrichelte Linie: Zur Selektion verwendete Puromycinkonzentration.

#### 4.1.2 Präparation der Plasmide pGC und pSceMJ

Die verwendeten Plasmide pGC und pSceMJ mussten amplifiziert werden, um in ausreichender Menge zur Erzeugung von Klonen sowie Induktion von DSB in den Klonen zur Verfügung zu stehen. Kompetente *E. coli* Bakterien wurden mit

dem Plasmid pGC transformiert und in einer Flüssigkultur vermehrt. Die Plasmid-DNA wurde selektiv extrahiert, in H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen und die DNA-Konzentration in der Lösung fotometrisch ermittelt. Die Qualität des Amplifikats wurde überprüft, indem es mit mehreren Restriktionsendonukleasen geschnitten und das Bandenmuster in der Elektrophorese mit dem theoretisch für das Plasmid zu erwartenden Muster verglichen wurde. Vor der Transfektion wurde das Plasmid pGC mit dem Restriktionsenzym Xmn I linearisiert, um die Ausbeute stabil transfizierter Zellen zu erhöhen (Neumann et al. 1982).



**Abb. 8:** Qualitätskontrolle des amplifizierten Plasmids pGC. A) Schematische Darstellung des Plasmids pGC mit Schnittstellen ausgewählter Enzyme B) Gelelektrophorese des mit Pvu I (Spur 3) und Xho I (Spur 4) geschnittenen Plasmids pGC C) mit Xmn I linearisiertes Plasmid.

Abb. 8A zeigt eine schematische Darstellung des Plasmids pGC mit den Schnittstellen einiger Enzyme. Das Enzym Pvu I schneidet das zirkuläre Plasmid in zwei Fragmente von 1020 bp und 5601 bp, mit Xho I lassen sich zwei Fragmente von 2987 bp und 3634 bp Länge erzeugen.

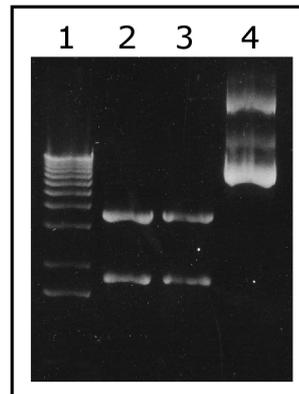
Abb. 8B zeigt das Ergebnis der Elektrophorese: Spur (1) zeigt den Längensstandard, (2) das ungeschnittene Amplifikat, (3) das Ergebnis des Schnitts mit Pvu I sowie (4) das Ergebnis des Schnitts mit Xho I. Das ungeschnittene Plasmid (2) ergibt drei Banden: diese entsprechen den Zuständen offen zirkulär (oz), coiled (c) und supercoiled (sc) des Plasmids. Auf (3) erkennt man von oben nach unten zunächst zwei Banden, die denen des ungeschnittenen Plasmid entsprechen, d.h. die Enzymreaktion wurde gestoppt, bevor die gesamte DNA im Ansatz umgesetzt werden konnte. Darunter zeigen sich in zwei weiteren Banden die

beim Restriktionsschnitt erzeugten Fragmente. Im Vergleich mit dem Größenstandard erkennt man, dass die obere dieser beiden Banden mit der 5090 bp Bande des Standards gelaufen ist, während die untere sich auf Höhe der 1018 bp Bande des Standards befindet: Beide Banden sind vereinbar mit einem Restriktionsschnitt des Plasmids pGC durch das Enzym Pvu I. Auf Spur (4) sieht man zwei Banden, die auf Höhe der 4072 bp und 3054 bp Bande des Größenstandards gewandert sind: Diese Banden sind vereinbar mit einem Schnitt des Plasmids pGC durch das Enzym Xho I.

Abb. 8C zeigt die Elektrophorese des mit Xmn I linearisierten Plasmids pGC. Auf Spur (1) der Größenstandard, auf Spur (2) das ungeschnittene Plasmid in seinen drei Zuständen wie im Teil B der Abbildung und auf Spur (3) das mit Xmn I geschnittene Plasmid. Das Plasmid pGC verfügt über eine einzige Erkennungsstelle dieses Enzyms; ein Schnitt mit Xmn I erzeugt keine Fragmente sondern spaltet die ringförmig geschlossene DNA und überführt sie in eine lineare Form mit zwei Enden. Diese kennt keine weiteren Zustände und ergibt in der Elektrophorese eine einzelne Bande.

Das in den transformierten Bakterien amplifizierte Plasmid zeigt beim Schneiden mit Restriktionsendonukleasen die für das Plasmid pGC theoretisch zu erwartenden Banden, d.h. das Plasmid pGC wurde erfolgreich amplifiziert.

**Abb. 9:** Qualitätskontrolle des amplifizierten Plasmids pSceMJ. Gelelektrophorese des mit Afl III geschnittenen Plasmids. Spur 1: Größenstandard, 2 u.3: geschnitten mit Afl III, 4: Kontrolle.



Das Plasmid pSceMJ wurde ebenfalls in transformierten Bakterien vermehrt und zur Qualitätskontrolle mit dem Enzym Afl III geschnitten: Ein intaktes Plasmid pSceMJ wird von Afl III in zwei Fragmente von 1875 bp und 3577 bp Länge geschnitten. Abb. 9 zeigt auf Spur (1) den Größenstandard, auf (2) und (3) das geschnittene und auf (4) das ungeschnittene Amplifikat. Auf Spur (2) und (3) erkennt man zwei Banden, die durch den Schnitt mit Afl III erzeugt wurden: Im Vergleich mit dem Größenstandard ist die obere Bande zwischen 3054 bp und 4072 bp lang, die untere zwischen 1636 bp und 2036 bp. Im ungeschnittenen Zustand (4) erkennt man drei Banden als Hinweis auf ein intaktes, zirkuläres Plasmid in den Zuständen offen zirkulär, coiled und supercoiled.

Das Bandenmuster entspricht dem Ergebnis eines Schnitts des Plasmids pSceMJ mit dem Restriktionsenzym Afl III; das Plasmid wurde erfolgreich amplifiziert.

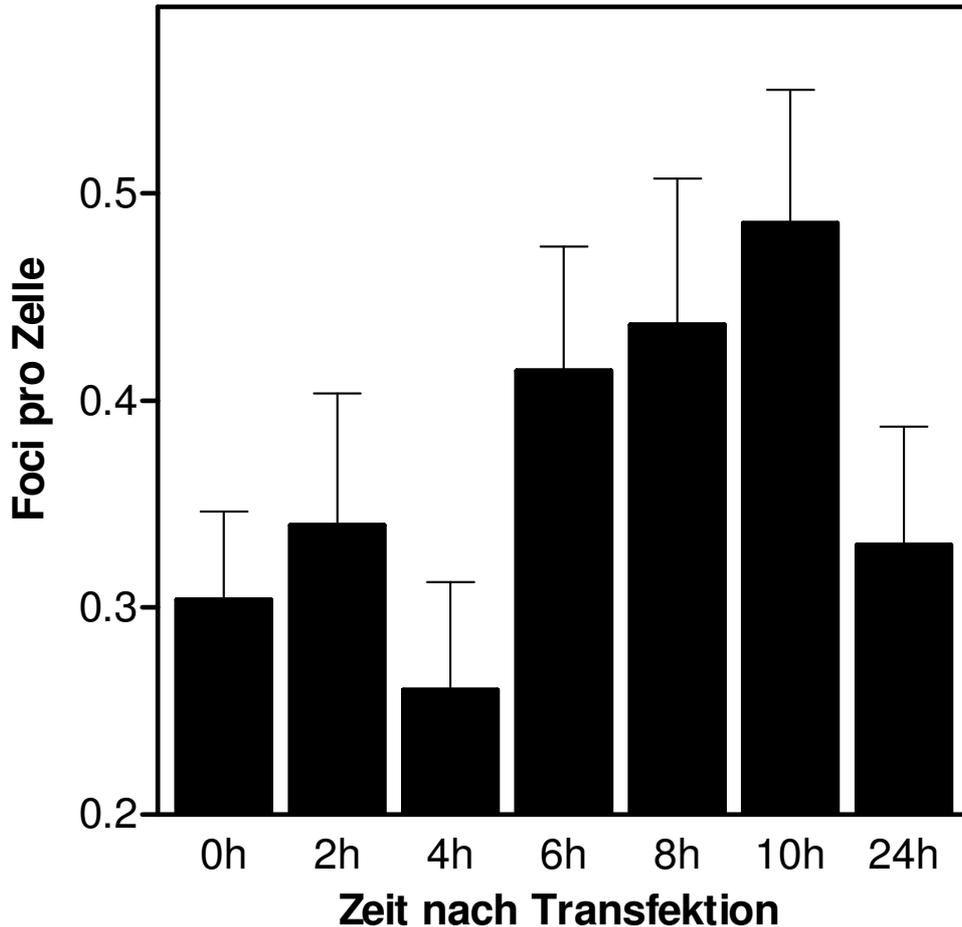
#### **4.1.3 Nachweis der induzierten DSB mittels $\gamma$ H2AX-Fokusbildung**

Für die Planung der Rekombinationsexperimente sollte ermittelt werden, nach welchem Zeitintervall nach Transfektion des I-Sce 1 Expressionsvektors es zur Induktion des DSB in den Klonen kommt. Die Visualisierung der DSB erfolgte in Form fluoreszenzmikroskopischer  $\gamma$ H2AX-Foci, deren Anzahl der Zahl der Doppelstrangbrüche in einer Zelle entspricht (Rogakou et al. 1999).

An sechs Zeitpunkten nach der Transfektion des I-Sce 1 Expressionsvektors wurden Zellen fixiert und  $\gamma$ H2AX-Foci präpariert. Untersucht wurde exemplarisch der Klon C-GC1, die Fixierung erfolgte 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h bzw. 24 h nach der Transfektion; als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen präpariert. Die Darstellung eines einzelnen zusätzlichen DSB hängt vom Hintergrund spontaner DSB in der Zelle ab; mit dem Klon C-GC1 wurde ein Klon der Ausgangszelllinie CHO-K1 gewählt, da diese eine geringere Rate spontaner DSB aufweisen als Tochterzellen der Linie xrs5.

Für jeden untersuchten Zeitpunkt wurden die  $\gamma$ H2AX-Foci von mindestens 200 Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt. Abb. 10 zeigt den Mittelwert für jeden Zeitpunkt, Fehlerbalken markieren den Standardfehler des Mittelwerts. Bei 2 h und 4 h schwankt der Mittelwert (0,34 bzw. 0,26 Foci pro Zelle) um den Wert der unbehandelten Kontrolle (0,3). Ab einem Zeitpunkt 6 h nach Transfektion zeigt sich jedoch eine Tendenz zu höheren Mittelwerten, die 10 h nach der Transfektion mit durchschnittlich 0,49 Foci pro Zelle ihren Höhepunkt erreicht. 24 h nach der Transfektion ist der Mittelwert mit 0,33  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle wieder auf dem Niveau der Kontrolle. Die Induktion der DSB zeigt sich 6 h nach der

Transfektion des I-Sce 1 Expressionsvektors; 24 h nach der Transfektion sind keine zusätzlichen  $\gamma$ H2AX-Foci mehr nachweisbar.



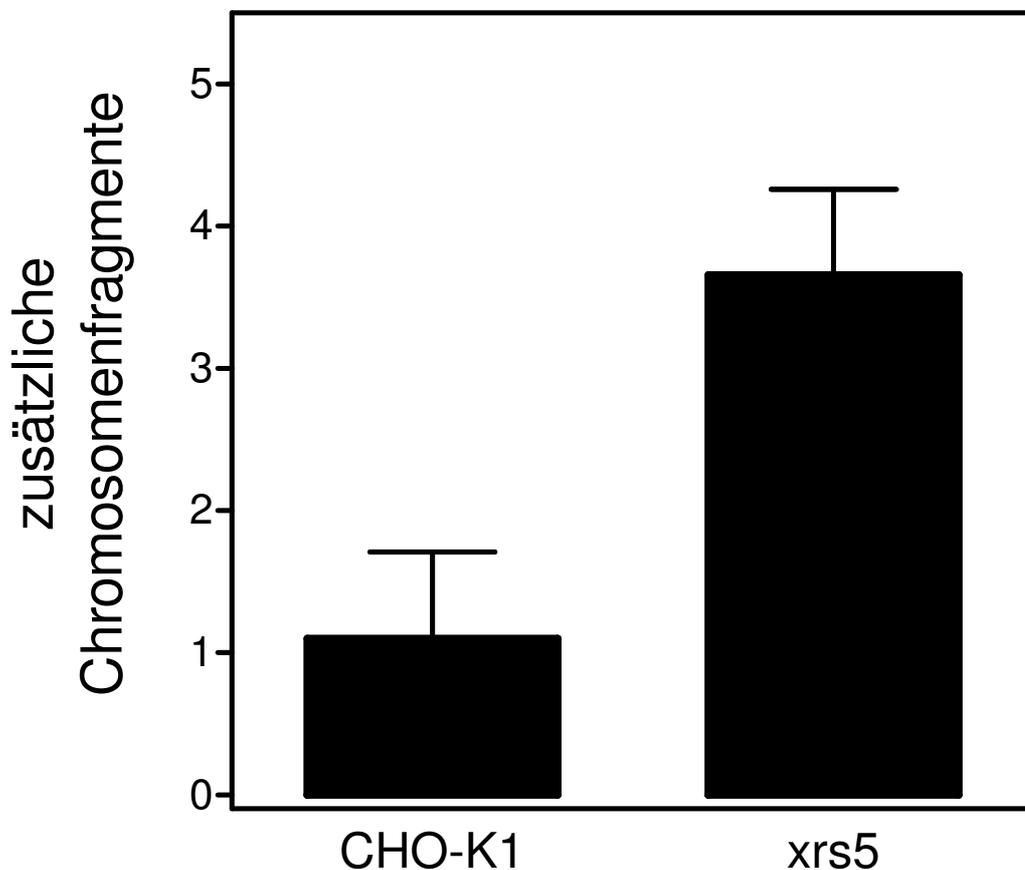
**Abb. 10:** Kinetik der Induktion von DSB in Klon C-GC1. Detektion der DSB mittels  $\gamma$ H2AX Foci in Abhängigkeit von der Zeit nach Transfektion des I-Sce 1 Expressionsvektors. Fluoreszenzmikroskopische Auszählung der  $\gamma$ H2AX-Foci von > 200 Zellen pro Zeitpunkt. Mittelwerte+SE

#### 4.1.4 Nachweis der erhöhten Strahlenempfindlichkeit der *xrs5* Zellen

In dieser Arbeit wurde die Frequenz an GC-Ereignissen in Klonen der Zelllinien CHO-K1 und *xrs5* verglichen. *Xrs5*-Zellen zeichnen sich durch ihre erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Bestrahlung aus, dieser Phänotyp ist Folge einer Mutation des *Ku80*-Gens (Singleton et al. 1997). Um die gemessenen Unterschiede der mittleren GC-Frequenz auf diese Mutation beziehen zu können,

sollte gezeigt werden, dass diese nach Integration des Rekombinationssubstrates und Klonierung weiterhin in den Zellen präsent war.

Die erhöhte Strahlenempfindlichkeit der *xrs5* Zellen wurde durch Auszählen strahleninduzierter Chromosomenaberrationen überprüft. Konfluente Zellen wurden mit 4 Gy bestrahlt und Metaphasen-Präparate hergestellt. Für jeden Bestrahlungswert wurden 3x 25 Metaphasen verschlüsselt ausgezählt und die Anzahl aller Chromosomen einschließlich aller Fragmente (= Chromosomenfragmente) bestimmt. Die zusätzlichen Chromosomenfragmente erhält man aus der Differenz dieser Zahl und der mittleren Zahl an Chromosomen in unbestrahlten Zellen (21 Chromosomen).



**Abb. 11:** Strahlenempfindlichkeit der *xrs5*-Zellen. Auszählung der zusätzlichen Chromosomenfragmente aus >200 Zellen der Klone C-GC3 und X-GC2 für CHO-K1 bzw. *xrs5* nach Bestrahlung mit 4 Gy. Mittelwerte+SD

Abb. 11 zeigt exemplarisch für die Klone X-GC2 und C-GC3 die Zahl zusätzlicher Chromosomenfragmente nach Bestrahlung mit 4 Gy. Im Mittel hatten *xrs5* Zellen 3,66 zusätzliche Fragmente, bei einem Standardfehler von 0,6, während CHO-K1 Zellen nach Bestrahlung mit 4 Gy im Mittel 1,1 zusätzliche Fragmente aufwiesen,

mit einem Standardfehler von 0,61. Die erheblich höhere Empfindlichkeit für ionisierende Bestrahlung der Zellen des Klons X-GC2 bestätigt den Fortbestand der *Ku80*<sup>-/-</sup> Mutation.

## 4.2 Stabile Integration des Rekombinationssubstrats

Die Messung der Frequenz an GC-Ereignissen erfolgte in dieser Arbeit *in vivo* an Klonen der Zelllinien CHO-K1 und *xrs5*, die das Rekombinationssubstrat pGC chromosomal integriert haben. Zur Herstellung dieser Klone wurden die Ausgangszellen mit dem linearisierten Plasmid pGC transfiziert; die Selektion stabil transfizierter Zellen begann 48 h nach der Transfektion durch Zugabe von 5 µg/ml Puromycin zum Medium für *xrs5*-Zellen und 10 µg/ml für CHO-K1-Zellen. Zahlreiche Kolonien puromycinresistenter Zellen wurden isoliert, klonal expandiert und zur weiteren Analyse kryokonserviert. Die genomische DNA aller Klone wurde isoliert und einer PCR unterzogen. Die verwendeten Primer flankieren einen 421 bp langen Abschnitt des Plasmids pGC, der die Erkennungsstelle der I-Sce 1 Restriktionsendonuklease einschließt. Die chromosomale Integration des Rekombinationssubstrats im jeweiligen Klon wurde durch den Nachweis dieses Abschnitts in der genomischen DNA gezeigt.

Abb. 12 zeigt das Ergebnis der Elektrophorese der PCR-Produkte. (S) bezeichnet den Größenstandard, von dem jeweils die 400 bp, 500 bp und 700 bp Bande auf dem Ausschnitt zu erkennen sind. Als Kontrolle (K) wurde bei der PCR immer ein Ansatz mit in H<sub>2</sub>O bidest. gelöstem Plasmid pGC mitgeführt. Die Bezeichnung von Klonen der Linie CHO-K1 beginnt mit einem C-, *xrs5*-Klone beginnen mit einem X-. Auf dem oberen Ausschnitt sieht man für die Klone C-GC1, C-GC2 und C-GC3 der Ausgangszelllinie CHO-K1 jeweils eine Bande. Diese Banden sind das Produkt der PCR mit der genomischen DNA des jeweiligen Klons als Matrize. Sie befinden sich auf derselben Höhe im Gel wie das PCR-Produkt, das aus dem nativen Plasmid amplifiziert wurde (K). Im Vergleich mit dem Größenstandard liegen sie zwischen 400 bp und 500 bp; es handelt sich um den gesuchten Ausschnitt des chromosomal integrierten Plasmids pGC. Auf dem mittleren Ausschnitt sieht man für die Klone X-GC2 und X-GC4 der Ausgangslinie *xrs5* ein PCR-Produkt, das auf einer Höhe mit der Kontrolle gewandert ist; bei einer Größe zwischen 400 bp und 500 bp handelt es sich um den gesuchten Ausschnitt des chromosomal integrierten Plasmids pGC. Das PCR-Produkt aus den Klonen C-GC4 sowie X-GC1 und X-GC3 auf dem unteren Ausschnitt ist ebenfalls gleich groß wie die Kontrolle.

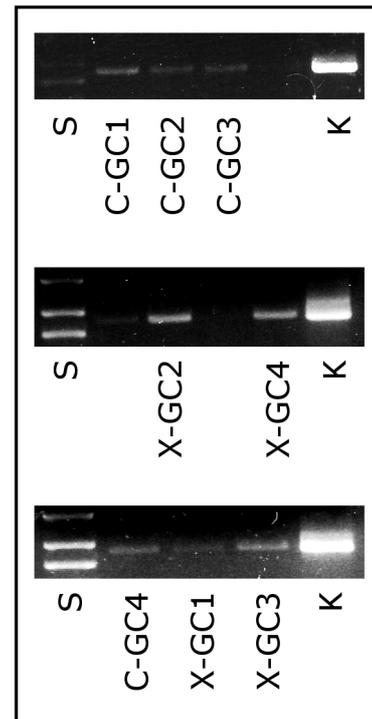
Die chromosomale Integration des Rekombinationssubstrats wurde in vier Klonen beider Ausgangszelllinien gezeigt: aus CHO-K1 für die Klone C-GC1, C-

GC2, C-CC3 und C-GC4 sowie aus den xrs5-Klonen X-GC1, X-GC2, X-GC3 und X-GC4. Diese Klone wurden für die nachfolgenden Experimente verwendet.

**Abb. 12:** Nachweis der chromosomalen Integration. Amplifikation eines 421 bp langen Fragments des Rekombinationssubstrats aus genomischer DNA von vier Klonen jeder Zelllinie:

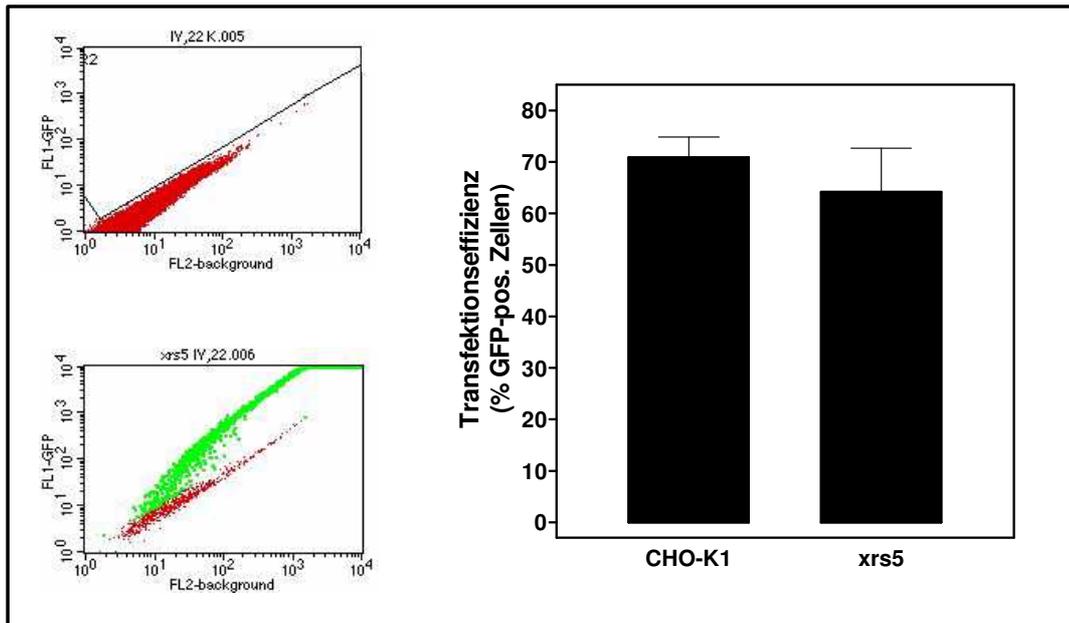
CHO-K1 (C-GC1,...,C-GC4)

xrs5 (X-GC1,...,X-GC4)



### 4.3 Transfektionseffizienz

Die GC-Frequenz, die nach Transfektion mit dem I-Sce 1 Expressionsvektor für die einzelnen Klone gemessen wird, hängt von der Wahrscheinlichkeit ab, mit der eine Zelle bei der Transfektion die angebotene DNA aufnimmt. Diese Transfektionseffizienz wurde nach Transfektion eines Expressionsvektors (pEGFP-N1, Clontech) für das Green-Fluorescent-Protein im Durchflusszytometer gemessen. Die Parameter der Transfektion: angebotene DNA-Konzentration, Ausgangsfeldstärke  $E_0$  und Kapazität des Elektroporators wurden zuvor optimiert und unverändert für die nachfolgenden Rekombinationsexperimente verwendet. Die Transfektionseffizienz wurde für jeden Klon einzeln bestimmt und Mittelwerte für alle Töchter einer Ausgangszelllinie gebildet.



**Abb. 13:** Transfektionseffizienz. Links: Durchflusszytometrische Detektion der GFP-positiven Zellen. Rechts: Transfektionseffizienz in % GFP-pos. Zellen 48h nach Transfektion des GFP Expressionsvektors pEGFP-N1. Mittelwerte+SD

Abb. 13 zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Im linken Teil der Abbildung sind zwei Einzelmessungen als Streudiagramme dargestellt: Oben eine untransfizierte Kontrolle und darunter derselbe Klon nach Transfektion von 43,4  $\mu\text{g}$  pEGFP-N1. In den Streudiagrammen repräsentiert jeder Punkt eine einzelne Zelle, die vom Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angestrahlt wurde. Die Intensität des emittierten Lichts wird nach Farben getrennt in zwei Kanälen aufgezeichnet: FL1 misst rotes Licht, FL2 grünes Licht. Die Koordinaten des Punktes stellen das Verhältnis der Farbintensitäten im von der Zelle emittierten Spektrum dar. Das obere Diagramm zeigt eine Kontrolle untransfizierter Zellen: In der logarithmischen Darstellung ergibt sich eine Punktwolke mit einem annähernd konstanten Verhältnis der Intensitäten von rot und grün. Anhand der Kontrolle wird ein Grenzwert für dieses Verhältnis festgelegt, bei dessen Überschreitung eine Zelle als grün fluoreszierend gewertet wird. Diese Grenze ist im Bild als diagonale schwarze Linie eingezeichnet. Nach Transfektion des Expressionsvektors für das EGFP zeigt sich im unteren Streudiagramm eine weitere Punktwolke: Bei diesen Zellen ist das Verhältnis zugunsten des in FL2 gemessenen, grünen Lichts verschoben, die Punkte liegen oberhalb des Grenzwerts und repräsentieren grün fluoreszierende Zellen.

Der Anteil erfolgreich transfizierter, grün fluoreszierender Zellen an allen gemessenen, lebenden Zellen wurde für vier Klone jeder Zelllinie bestimmt und

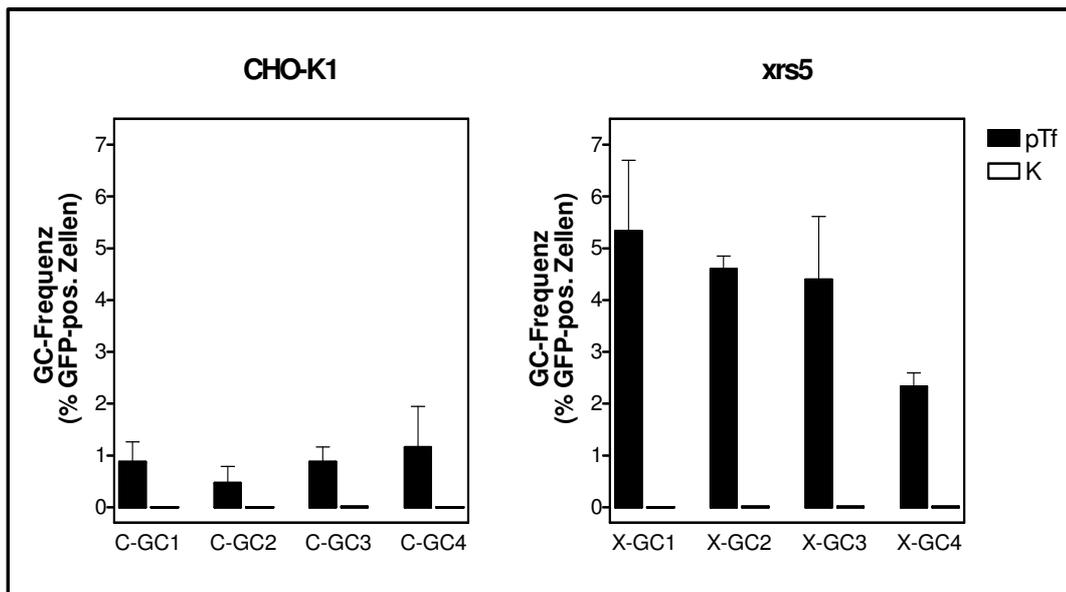
Mittelwerte gebildet. Das Balkendiagramm im rechten Teil der Abb. 13 zeigt diese Transfektionseffizienz, die für CHO-K1 Klone bei 70% lag, mit einer Standardabweichung von 3,96%. Die Transfektionseffizienz von xrs5 Klonen war 64% mit einer Standardabweichung von 8,43%. Diese Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test,  $p=0,2022$ ), für die nachfolgenden Rekombinationsexperimente wurde eine vergleichbare Transfektionseffizienz der Klone beider Zelllinien angenommen.

#### 4.4 GC-Frequenz

Die Frequenz an GC-Ereignissen wurde für jeweils 4 Klone der Zelllinien CHO-K1 und xrs5 gemessen. Die Zellen wurden transient mit dem Expressionsvektor für die I-Sce 1 Restriktionsendonuklease transfiziert und 48 h inkubiert; in dieser Zeit findet die Reparatur der entstandenen DSB statt. In Zellen, die den DSB mittels homologer Rekombination mit GC reparieren, kommt es zur Rekonstitution des EGFP-Reportergens und die Zellen exprimieren in der Folge das Green-Fluorescent-Protein; die relative Häufigkeit grün fluoreszierender Zellen spiegelt direkt die Frequenz an GC-Ereignissen wieder. Die Bestimmung der Grünfluoreszenz erfolgte am Durchflusszytometer analog der Messung der Transfektionseffizienz. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen des jeweiligen Klons gemessen.

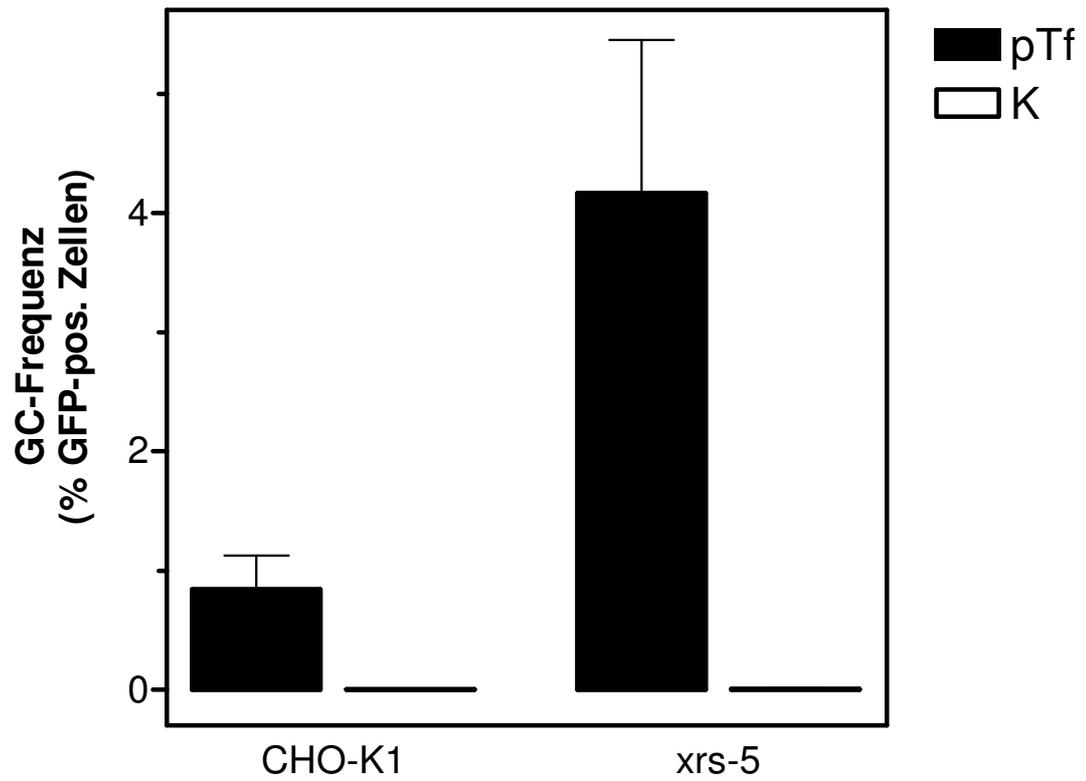
Abb. 14 zeigt die mittlere Häufigkeit von GC-Ereignissen für vier Klone jeder Zelllinie. Für jeden Klon wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und je 100.000 Zellen gemessen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus drei Experimenten, Fehlerbalken markieren eine Standardabweichung. Das linke Diagramm zeigt die mittlere GC-Frequenz für die Klone C-GC1-4 der Ausgangszelllinie CHO-K1. Für Klon C-GC1 wurde in 0,87% der lebenden Zellen mittels Genkonversion repariert, die Standardabweichung betrug 0,39%. Für die Klone C-GC2, C-GC3, und C-GC4 betrug die mittlere Frequenz an GC-Ereignissen 0,46%, 0,87% bzw. 1,15%. Die Standardabweichung betrug für C-GC1 0,39%, C-GC2 0,31%, C-GC3 0,28% und für C-GC4 0,79%.

Die mittleren GC-Frequenzen der xrs5-Klone X-GC1-4 zeigt das rechte Diagramm. Sie sind für Klon X-GC1 5,33%, für X-GC2 4,60%, für X-GC3 4,39% und X-GC4 2,33%. Die Standardabweichungen sind 1,37%, 0,25%, 1,21% bzw. 0,26%. In den untransfizierten Kontrollen aller Klone wurde eine spontane Grünfluoreszenz in maximal 0,01% der Zellen gemessen.



**Abb. 14:** GC-Frequenz der einzelnen Klone. Frequenz von GC-Ereignissen in % GFP-pos. Zellen von je vier Klonen der Zelllinien CHO-K1 und xrs5 48 h nach Transfektion des I-Sce 1 Expressionsvektors. Mittelwerte+SD

Die Mittelwerte dieser GC-Frequenzen für alle Klone einer Ausgangszelllinie zeigt Abb. 15. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 4 Klonen, für die jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt wurden. Überlebende Töchter der Linie CHO-K1 reparierten in 0,84% mittels GC, wogegen xrs5-Klone in Mittel 4,16% GC-Ereignisse zeigten, die Standardabweichungen betragen 0,28% bzw. 1,28%. Die spontane Grünfluoreszenz in den untransfizierten Kontrollen war in Klonen beider Ausgangszelllinien zu vernachlässigen (CHO-K1: 0,0025%; xrs5: 0,0075%). Xrs5 Zellen hatten im Mittel fast fünfmal häufiger den Weg der GC beschritten, um den enzymatisch induzierten DSB zu reparieren, als die Klone von CHO-K1. Diese Erhöhung der GC-Frequenz in *Ku80*<sup>-/-</sup> defizienten xrs5 Zellen wurde als Folge der Hemmung des NHEJ-Reparaturwegs interpretiert, für den das Genprodukt KU80 wichtige Funktionen hat (Helleday et al. 2007).



**Abb. 15:** Mittlere GC-Frequenz der Zelllinien CHO-K1 und xrs5. Mittelwerte+SD aus drei unabhängigen Experimenten mit je vier Klonen.

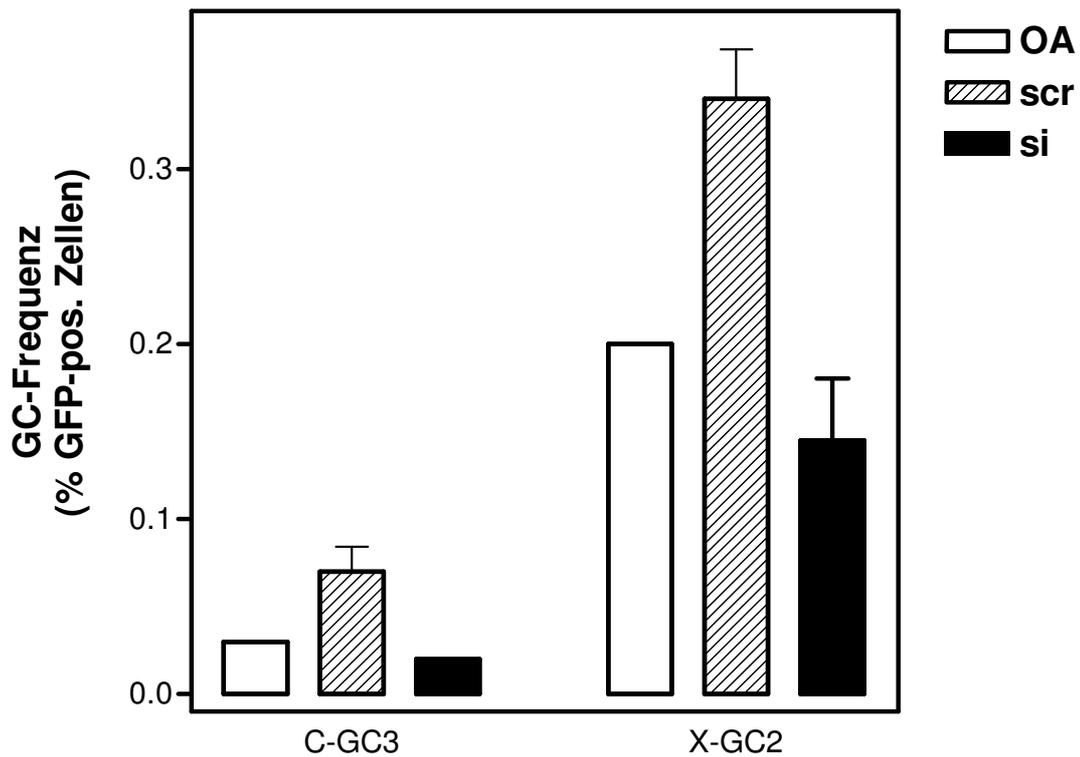
#### 4.5 GC-Frequenz nach RNAi zur Inhibition von RAD51

In einem weiteren Schritt sollte die GC-Frequenz in beiden Zelllinien untersucht werden, wenn die HR durch reduzierte Expression von RAD51 beeinträchtigt ist. RAD51 ist ein Protein von zentraler Bedeutung für das zelluläre Überleben insgesamt ebenso wie für den GC-Weg zur Reparatur von DSB (Sonoda et al. 1998). Die Expression von RAD51 wurde mittels RNAi vorübergehend gehemmt, weil konstitutionelle Knockout-Mutanten nicht lebensfähig sind (Lim und Hasty 1996; Tsuzuki et al. 1996); im Intervall, während der Expressionshemmung, wurden erneut die GC-Frequenzen beider Zelllinien bestimmt.

Konfluente Zellen wurden mit siRNA transfiziert und 24 h inkubiert, bevor sie mit dem I-Sce 1 Expressionsvektor transfiziert wurden. Die Frequenz an GC Ereignissen wurde nach weiteren 48 h Inkubation am Durchflusszytometer bestimmt. Als Kontrolle wurden sowohl mit scrambled RNA transfizierte (scrRNA), als auch gänzlich unbehandelte Zellen, die im selben Transfektionsmedium kultiviert wurden (OA), gemessen. Verwendet wurden jeweils zwei unterschiedliche siRNAs bzw. scrRNAs, deren Effektivität zur Expressionshemmung von RAD51 zuvor demonstriert wurde (Büttner 2004).

Abb. 16 zeigt die mittlere GC-Frequenz für einen Klon jeder Zelllinie (C-GC3 bzw. X-GC2) nach Inhibition der Expression von RAD51. Die mit scrRNA transfizierten Kontrollen zeigen für X-GC2 mit 0,34 % (SD: 0,03) eine fast fünffach höhere Rate an GC-Ereignissen als die C-GC3 mit im Mittel 0,07 % GC-Ereignissen (SD: 0,01). Diese Daten bestätigen die fünffach höhere Rate an GC-Ereignissen in *xrs5* Zellen (Abb. 15).

Bei den gänzlich unbehandelten Kontrollen (OA) ist der Anstieg mit 0,2 % in *xrs5* Zellen im Vergleich zu 0,03 % in den unbehandelten CHO-K1 Zellen sogar mehr als sechsfach; die rund zweifache Zunahme der GC-Frequenz von unbehandelten Kontrollen zu den scrRNA-Kontrollen zeigt sich bei beiden Zelllinien und ist auf unspezifische Wirkungen der Behandlung mit scrRNA zurückzuführen. Nach Hemmung der Expression von RAD51 mittels RNAi sanken die gemessenen GC-Frequenzen auf 0,02% für C-GC3 bzw. 0,15 % für X-GC2. Die relative Reduktion der GC-Frequenz bezogen auf die jeweilige scrRNA Kontrolle war für C-GC3 71 %, für X-GC2 57 %. Vergleicht man die insgesamt sehr niedrigen Werte zwischen siRNA transfizierten Zellen beider Zelllinien, so zeigen *xrs5* Zellen eine rund siebenfach höhere Frequenz an GC-Ereignissen als CHO-K1 Zellen.



**Abb. 16:** GC-Frequenz nach RNAi zur Inhibition von RAD51, exemplarisch für die Klone C-GC3 (CHO-K1) und X-GC2 (*xrs5*). Transfektion mit dem I-Sce 1 Expressionsvektor 24 h nach Transfektion der siRNA. Messung der GC-Frequenz nach weiteren 48 h Inkubation. OA: unbehandelte Kontrolle (nur Medium), scr: scrambled RNA (Kontrolle), si: mit siRNA gegen RAD51 behandelte Zellen. Mittelwerte+SD.

Die Unterdrückung der Expression von RAD51 ist in beiden Zelllinien in der Lage, die Frequenz an GC-Ereignissen zu vermindern. Dieser Rückgang scheint in den KU80 defizienten *xrs5* Zellen geringfügig schwächer auszufallen als in CHO-K1 Zellen, wodurch sich die höhere GC-Frequenz dieser Zellen auch nach Knockdown von RAD51 bestätigt (0,145 in *xrs5* Zellen gegenüber 0,020 in CHO-K1).

## 5 Diskussion

Die genomische Stabilität einer Zelle ist Voraussetzung für eine korrekte Ausführung ihrer Funktionen und ihren Fortbestand; eine reduzierte Stabilität der genetischen Information bedeutet ein vermehrtes Auftreten von Mutationen, die in der Summe zur malignen Entartung der Zelle und somit zu Krebs führen können. DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), die sowohl physiologisch als auch als Folge der Behandlung mit ionisierender Bestrahlung oder genotoxischen Substanzen auftreten, stellen eine Bedrohung dieser Stabilität dar und erfordern Mechanismen zur Schadensbegrenzung bzw. zur Reparatur dieser potentiell mutagenen Läsionen.

In den letzten Jahren wurden mehrere Wege entdeckt, mit denen Zellen dieser Gefahr begegnen können, und diese DSB-Reparaturwege lassen sich zwei Hauptmechanismen zuordnen: Nicht-homologes Endjoining (NHEJ) vermittelt die sequenzunabhängige Ligation der Bruchenden, wogegen homologe Rekombination (HR) die an der Bruchstelle zerstörte Sequenz unter Verwendung einer homologen Matrize rekonstruiert. Die Wahl des Reparaturwegs für einen bestimmten DSB wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst, darunter die Zellzyklusphase und die Konfiguration des DSB mit einem oder zwei freien Bruchenden (Helleday et al. 2007).

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der HR für die Reparatur von zweiseitigen DSB überprüft werden, und zwar sowohl in Zellen mit intaktem NHEJ (CHO-K1) als auch in solchen, bei denen dieser andere Hauptweg durch eine Defektmutation im Schlüsselprotein Ku80 beeinträchtigt ist (*xrs5*). Zu diesem Zweck wurde ein Reparatursubstrat in das Genom der Zellen integriert, das die Induktion eines DSB durch restriktionsendonukleolytische Spaltung seiner Sequenz erlaubt und das die Messung der Häufigkeit von HR-Ereignissen zur Reparatur dieser DSB ermöglicht: Die Rekonstitution des Reportergens *EGFP* erfolgt dabei ausschließlich durch Genkonversion (GC) und kann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Zur Vorbereitung der stabilen Integration des Rekombinationssubstrats wurden geeignete Selektionsbedingungen ermittelt; Vorarbeiten der Rekombinationsexperimente umfassten den Nachweis der chromosomalen Integration des Rekombinationssubstrats, die Ermittlung der Transfektionseffizienz sowie einer Kinetik der enzymatischen DSB-Induktion. Die verwendeten *xrs5* Zellen wurden auf die Persistenz des strahlenempfindlichen Phänotyps kontrolliert.

Nach Transfektion des Expressionsvektors für I-Sce 1 zeigte die Durchflusszytometrie eine fünffache Häufigkeit von GC-Ereignissen der xrs5 Zellen im Vergleich mit CHO-K1.

Anschließend wurde die GC-Frequenz nach Hemmung der Expression von RAD51 ermittelt, einem Protein mit zentraler Bedeutung für die HR (Helleday et al. 2007). Die nachfolgend beobachtete starke Reduktion deutet darauf hin, dass die gemessenen GC-Ereignisse das Ergebnis RAD51 abhängiger HR sind. Die größere Häufigkeit von GC-Ereignissen in xrs5 Zellen relativ zu CHO-K1 blieb jedoch auch auf dem unterdrückten Niveau bestehen.

### **5.1 Bedingungen zur Selektion stabil transfizierter Zellen**

Durch Selektion mit dem Antibiotikum Puromycin können Zellen identifiziert werden, die das Rekombinationssubstrat pGC stabil in ihr Genom integriert haben. Zu diesem Zweck musste zuvor diejenige Konzentration an Puromycin im Medium ermittelt werden, die Zellen ohne transgene Puromycinresistenz nicht überleben können. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antibiotikums inkubiert und der Zeitpunkt des Absterbens für jeden Ansatz protokolliert. Abb. 7 zeigt das Überleben in Abhängigkeit der Puromycinkonzentration, dabei fällt die Überlebenszeit mit steigender Antibiotikumkonzentration ab bis ein Plateau erreicht ist. Zur Selektion wurde die kleinste maximal wirksame Puromycinkonzentration verwendet, bei der die Überlebenszeit auf dem Niveau des Plateaus ist, und die unter Erfüllung dieser Bedingung so niedrig wie möglich ist, um unspezifisch toxische Wirkungen zu vermeiden. Diese ist für CHO-K1 10 µg/ml bzw. für xrs5 5 µg/ml.

Die zur Selektion geeignete Antibiotikumkonzentration wird von der Empfindlichkeit der nicht-transfizierten Zellen gegen das Antibiotikum bestimmt, weshalb für bestimmte Zelllinien beschriebene Konzentrationen nicht ohne Weiteres auf andere Zellen übertragen werden können. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Konzentrationen sind jedoch vergleichbar mit denen anderer Arbeiten, in denen zur Selektion von stabil transfizierten Nagerzellen Puromycinkonzentrationen im einstelligen µg/ml Bereich verwendet wurden, wie z.B. 2,5 µg/ml bzw. 5 µg/ml in Mausfibroblasten (Schmidt-Petersen 2003 bzw. Taylor et al. 1999) und 8,5 µg/ml in CHO Zellen (Paris et al. 2002). In Mutanten embryonaler Stammzellen aus der Maus genügten 1-2 µg Puromycin pro ml Medium zur Selektion stabil transfizierter Klone (Stark et al. 2004, Pierce et al. 2001). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Konzentration ist geeignet, das Überleben von CHO Zellen ohne transgene Puromycinresistenz zu verhindern.

## 5.2 Kinetik der DSB-Induktion

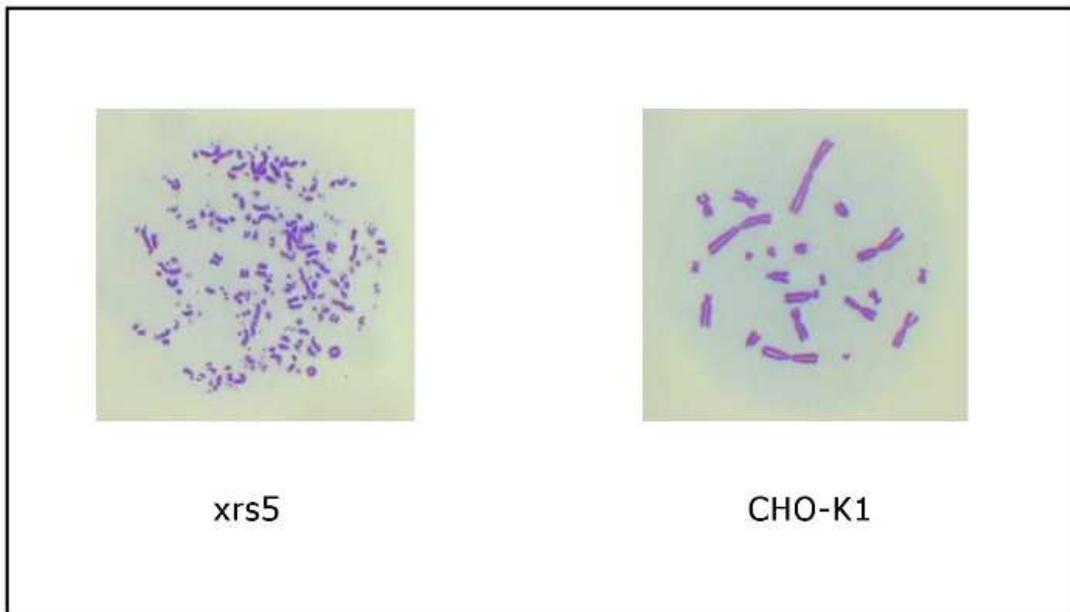
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Häufigkeit der HR zur Reparatur eines enzyminduzierten DSB unter verschiedenen Bedingungen zu ermitteln. Durch Transfektion mit einem Expressionsvektor der Restriktionsendonuklease I-Sce 1 wurde ein DSB innerhalb des chromosomal integrierten Rekombinationssubstrats erzeugt. Die erfolgreiche DSB-Induktion wurde durch Visualisierung fluoreszenzmikroskopischer  $\gamma$ H2AX-Foci demonstriert, deren Anzahl der Zahl der Doppelstrangbrüche in einer Zelle entspricht (Rogakou et al. 1999). Dazu wurde die mittlere Zahl an Foci aus je 200 Zellen an sechs Zeitpunkten nach der Transfektion ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Abb. 10 zeigt diese Kinetik der DSB Induktion, die ab einem Zeitpunkt 6 h nach der Transfektion des Expressionsvektors ansteigt und 24 h nach der Transfektion wieder auf dem Niveau der Kontrolle liegt. Induktion und Reparatur der zusätzlichen DSB sind zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen.

Für die durchflusszytometrische Detektion der GC-Ereignisse muss das rekonstituierte Markergen *EGFP* ausreichend stark exprimiert werden, weshalb die Messung der GC-Frequenz nach weiteren 24 h (48 h nach Transfektion des I-Sce 1 Expressionsvektors) erfolgte. Dieses Intervall ist vergleichbar mit anderen Arbeiten, in denen der I-Sce 1 Expressionsvektor mittels Elektroporation transfiziert wurde (Akyüz et al. 2002, Liang et al. 1996a). In Studien, für die mittels Kalzium-Phosphat Präzipitation bzw. Lipofektion transfiziert wurde, sind dagegen längere Intervalle bis zu 60 h üblich (Rouet et al. 1994, Taghian und Nickoloff 1997), was durch den größeren Zeitbedarf des Transfektionsprotokolls bedingt ist.

Das verwendete Intervall von 48 h zwischen Transfektion des I-Sce 1 Expressionsvektors und der Bestimmung der GC-Frequenz ermöglicht eine für die Durchflusszytometrie ausreichende Expression des Reportergens nach Abschluss der Reparatur des Doppelstrangbruchs, ohne das zelluläre Überleben zu beeinträchtigen.

## 5.3 Kontrolle des xrs Phänotyps

In dieser Arbeit wurde die Frequenz der HR zur Reparatur eines enzymatisch erzeugten DSB in *xrs5* Zellen mit der HR-Frequenz in CHO-K1 Zellen verglichen. Die Zelllinie *xrs5* wurde durch EMS-Mutagenese aus CHO-K1 Zellen gewonnen und zeichnet sich durch eine im Vergleich zur Ausgangszelllinie erhöhte Strahlenempfindlichkeit aus (Jeggo und Kemp 1983). Diese Strahlenempfindlichkeit beruht auf einem Defekt des NHEJ, der durch eine humane Ku80 cDNA



**Abb. 17:** Beispielhafte Metaphasenpräparate einer xrs5 Zelle und einer CHO-K1 Zelle nach Bestrahlung mit 4 Gy. Die Mehrzahl der xrs5 Zellen war nach 4 Gy so stark beschädigt, dass ein exaktes Auszählen der Aberrationen nicht möglich war. Die erhöhte Strahlenempfindlichkeit ist als Blickdiagnose eindeutig festzustellen.

komplementiert werden kann (Smider et al. 1994, Taccioli et al. 1994). Man nimmt an, dass CHO-K1 Zellen über zwei Kopien des Ku80 Gens verfügen, wovon eine in einer inaktiven hypermethylierten Form vorliegt (Jeggo und Holliday 1986, Singleton et al. 1997). Singleton et al. (1997) postulierten, dass durch die EMS-Mutagenese die zweite, noch aktive Kopie des Gens mutiert wurde und der Phänotyp durch die geringe Expression von KU80 hervorgerufen wird.

Diese Hypothese wird gestützt durch die Tatsache, dass xrs5 Zellen zu einem strahlenresistenten Phänotyp revertieren können, insbesondere, wenn sie mit 5-Azacytidin behandelt werden, das die DNA-Methylierung vermindert (Jeggo und Holliday 1986). Mit einer geringen Frequenz von  $4 \times 10^{-6}$  –  $6 \times 10^{-6}$  treten aber auch spontane Revertanten auf (Rathmell und Chu 1994), wodurch sich die Notwendigkeit ergibt, bei der Arbeit mit xrs5 Zellen die Persistenz des xrs-Phänotyps zu kontrollieren. Zu diesem Zweck wurde die Strahlenempfindlichkeit der verwendeten xrs5 Zellen bestimmt: Die Zahl zusätzlicher Chromosomenfragmente nach Bestrahlung mit 4 Gy wurde exemplarisch für die Klone X-GC2 (xrs5) und C-GC3 (CHO-K1) ermittelt, dabei wurden in Klon X-GC2 im Mittel 3,7 zusätzliche Chromosomenfragmente gezählt, im Gegensatz zu 1,1 zusätzlichen Fragmenten im CHO-K1 Klon C-GC3.

Bei den übrigen verwendeten Klonen wurde auf ein exaktes Auszählen der Fragmente verzichtet, da die xrs5 Zellen nach Bestrahlung mit 4 Gy so stark be-

schädigt waren, dass die erhöhte Strahlenempfindlichkeit als Blickdiagnose qualitativ eindeutig festzustellen war.

Eine erhöhte Zahl an Chromosomenaberrationen als Ausdruck der Strahlenempfindlichkeit der *xrs5* Zellen wird auch in der Literatur beschrieben: Die isoeffektive Dosis zur Erzeugung von Chromosomenaberrationen ist in *xrs5* Zellen deutlich geringer als in CHO-K1 (Nasonova et al. 1998, Darroudi und Natarajan 1987). Darüber hinaus beschreiben Darroudi und Natarajan (1987) ein vermehrtes Auftreten von Chromatidtyp-Aberrationen nach Bestrahlung der untersuchten KU80-Mutanten in der G<sub>1</sub>-Phase, was in den für die vorliegende Arbeit untersuchten Zellen ebenfalls auffallend war (pers. Beobachtung, vgl. Bild). Der Phänotyp der verwendeten *xrs5*-Zellen zeigte nach der klonalen Aufzucht keine Anzeichen einer Reversion und erlaubte so die Interpretation der nachfolgenden Experimente als Vergleich von CHO-K1 und KU80<sup>-/-</sup> *xrs5* Zellen.

#### 5.4 Nachweis der chromosomalen Integration

In dieser Arbeit wurde die Reparatur eines chromosomal integrierten Reparatursubstrates mittels HR untersucht. Zuvor sollte die erfolgreiche chromosomale Integration des Rekombinationssubstrats gezeigt werden. Zu diesem Zweck wurde aus der genomischen DNA jedes Klons mittels PCR ein Fragment des Rekombinationssubstrats amplifiziert (Abb. 12).

Dieses Vorgehen zum Nachweis der stabilen Integration wird auch von anderen Autoren verwendet, die DNA-Reparaturvorgänge mittels chromosomal integrierter Plasmide untersuchen, z.B. zum Nachweis des auch in dieser Arbeit verwendeten pGC-Konstrukts in 10.1 Mausfibroblasten (Schmidt-Petersen 2003) und zum Nachweis mehrerer Konstrukte, die sich anhand der PCR-Produkte unterscheiden lassen in humanen K562, TK6 und WTK1 Zellen (Akyüz et al. 2002). Auch Arbeiten, die aus ganz anderen Motiven stabil transfizierte Zellen verwenden, greifen auf die PCR zum Nachweis der Integration zurück, z.B. zum Nachweis viral transfizierter DNA in CHO Zellen (Merrihew et al. 2001) und zum Nachweis stabil transfizierter, künstlicher Hefechromosomen (YAKs) in CHO Zellen (Mogayzel et al. 1997). Dabei dient die PCR vornehmlich der einfachen Überprüfung zahlreicher Klone auf das Vorhandensein eines bestimmten Fragments. Wo detailliertere Aussagen getroffen werden sollen muss sie durch aufwändigere Analysen wie FISH, Southern Blotting oder Sequenzierung der PCR-Produkte ergänzt werden (Merrihew et al. 2001, Mogayzel et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde sichergestellt, dass funktionell zentrale Elemente des Plasmids chromosomal integriert worden waren, indem ein Fragment amplifiziert wurde, das die I-Sce 1 Schnittstelle einschließt und das von der

Antibiotikaresistenz verschieden ist. Für die nachfolgenden Experimente wurden ausschließlich Klone mit erfolgreichem Integrationsnachweis verwendet.

### 5.5 Einfluss der Transfektionseffizienz

Ziel dieser Arbeit war es, die relative Häufigkeit von HR-Ereignissen zur Reparatur eines enzymatisch induzierten DSB zu messen. Dabei hängt die gemessene Frequenz von der Wahrscheinlichkeit ab, mit der in einer Zelle durch Transfektion des I-Sce 1 Expressionsvektors tatsächlich ein DSB induziert wird. Diese Wahrscheinlichkeit, die transfizierte DNA zu exprimieren, wurde durch Transfektion eines Expressionsvektors für das *EGFP*-Reportergen bestimmt. Beide Zelllinien wurden unter gleichen experimentellen Bedingungen transfiziert und dieselben Bedingungen wurden auch für die nachfolgenden Rekombinationsexperimente verwendet. Die mittlere Transfektionseffizienz von 70% für CHO-K1 Klone und 64% für *xrs5* Klone (Abb. 8) gewährleistet eine hohe Ausbeute erfolgreich transfizierter Zellen. Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Werte nicht signifikant (t-Test,  $p=0,20$ ), weshalb darauf verzichtet werden konnte, die Daten der Rekombinationsexperimente zu normalisieren.

Ein solches Vorgehen findet sich auch in anderen Veröffentlichungen, die HR-Frequenzen mittels *in vivo* Spaltung chromosomal integrierter Reparatursubstrate messen: Die Transfektionseffizienz sechs verschiedener ES-Mutanten lag für alle Klone bei etwa 50%, weshalb auf eine Normalisierung der Rekombinationsfrequenzen verzichtet werden konnte (Pierce et al. 2001). Kein signifikanter Unterschied der Transfektionseffizienz von Wildtyp und Mutanten wurde auch für Hamsterzellen berichtet (CHO-K1 und *xrs6*), die den in der vorliegenden Arbeit verwendeten sehr ähnlich sind (Liang et al. 1996a).

Im Gegensatz dazu steht das Vorgehen, bei jedem Experiment eine Positivkontrolle mitzuführen und die gewonnenen Rekombinationsfrequenzen jeweils auf die parallel bestimmte Transfektionseffizienz zu beziehen (Akyüz et al. 2002). Dabei beschreibt auch diese Arbeit eine vergleichbare Transfektionseffizienz von  $27\% \pm 2\%$  für alle verwendeten Klone humaner Zellen.

Die in der vorliegenden Arbeit für die Transfektion verwendeten Bedingungen sind geeignet, Plasmid-DNA mit hoher Effizienz in die Zellen einzubringen. Die Effizienz ist dabei in beiden untersuchten Zelllinien vergleichbar, weshalb für die nachfolgenden Experimente keine Normalisierung erforderlich war.

### 5.6 Abhängigkeit vom NHEJ

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Häufigkeit von HR in Zellen mit intaktem bzw. defektem NHEJ für die Reparatur eines definierten DNA-

Doppelstrangbruchs. Verglichen wurden NHEJ-kompetente Hamsterzellen (CHO-K1) mit aus ihnen hervorgegangenen  $Ku80^{-/-}$  Mutanten (xrs5, Jeggo und Kemp 1983), die sich durch einen Defekt im NHEJ auszeichnen.

Die Messung der HR erfolgte mittels des chromosomal integrierten Rekombinationssubstrats pGC: Das Plasmid trägt eine Anordnung von inaktiven Fragmenten des Reportergens *EGFP*, das durch die Reparatur eines induzierbaren DSB mittels Genkonversion (GC) in eine aktive Form überführt werden kann. Die Expression des intakten *EGFP*-Gens in einer Zelle kann durchflusszytometrisch festgestellt werden und wurde als GC-Ereignis für die Reparatur des induzierten DSB in dieser Zelle interpretiert. Als ‚GC-Frequenz‘ wurde in dieser Arbeit die relative Häufigkeit EGFP-positiver Zellen aus allen zu diesem Zeitpunkt noch lebenden Zellen bezeichnet. Diese GC-Frequenz war in xrs5 Zellen mit im Mittel 4,16% fast fünfmal so hoch wie die in CHO-K1 Zellen mit 0,84%.

Eine deutliche Erhöhung der Rekombinationsfrequenz vor dem Hintergrund einer NHEJ-Beeinträchtigung konnte auch in anderen Studien beobachtet werden:

- Eine fünf bis sechsfach Erhöhung an GC-Ereignissen konnte von Pierce et al. (2001) in embryonalen Stammzellen der Maus beobachtet werden, wobei die Induktion der Rekombinationsfrequenz in KU-defizienten Klonen ausgeprägter war als nach Mutation anderer NHEJ Bestandteile.
- Eine Reduktion der Rekombinationsfrequenz infolge der Expression von *Ku70* konnte in  $Ku70^{-/-}$  DT40 Zellen des Huhns gezeigt werden (Fukushima et al. 2001).
- Eine Induktion der homologieabhängigen DNA-Reparatur konnte durch die Mutation des *Ku70* in Hefezellen hervorgerufen werden, die im Gegensatz zu höheren Eukaryoten DSB überwiegend mittels HR reparieren (Clikeman et al. 2001).
- Darüber hinaus wurde ebenfalls gezeigt, dass die Induktion der HR durch Deletion von *Ku70* in Maus-ES Zellen beide homologieabhängigen Mechanismen umfasst, d.h. in Abwesenheit von KU70 sind sowohl GC als auch SSA erhöht (Stark et al. 2004).
- Die Mutation von *Ku80* führt ebenfalls zu einer Stimulation von GC und SSA in adulten Hamsterzellen (Mansour et al. 2008).

Gemeinsam weisen alle diese Daten darauf hin, dass eine Mutation eines der beiden KU Proteine die homologieabhängige DNA-Reparatur stimulieren kann. Dabei scheint es nachrangig zu sein, welches der beiden KU-Proteine mutiert ist,

was sich durch die gegenseitige Stabilisierung von KU70 und KU80 zu einem Heterodimer erklären lässt, das DNA-Enden unabhängig von ihrer Basensequenz binden kann (Downs und Jackson 2004, Walker et al. 2001). Nach Pierce et al. (2001) konkurrieren HR und NHEJ um einen gegebenen DSB, indem die Bindung der Bruchenden durch KU den Zugang des HR-Apparats an die Stelle des Schadens verhindert. Demnach könnte KU direkt mit einem DNA bindenden Protein der HR konkurrieren, wie es z.B. für RAD52 vorgeschlagen wurde (Van Dyck et al. 1999). Alternativ könnte die Bindung von KU die nukleolytische Resektion in Vorbereitung der HR verhindern und so indirekt zu einer Konkurrenz der Reparaturwege beitragen (Pierce et al. 2001). Dieses Modell wird durch die Aussage gestützt, dass DNA-Enden durch die Bindung von KU vor nukleolytischem Abbau geschützt werden (Mimori und Hardin 1986, Walker et al. 2001) und eine Mutation des *Ku80* zu einer verstärkten Instabilität der DNA-Enden führt (Liang et al. 1996b).

Eine Stimulation der HR wird aber auch infolge einer Beeinträchtigung von KU nachgeschalteten Elementen des NHEJ beobachtet:

- In Abwesenheit der DNA-PK<sub>cs</sub> kommt es zu einer erhöhten Rekombinationsrate in CHO Zellen (Allen et al. 2002)
- Durch die Mutation des *Xrcc4* Gens erhöht sich die Rate an Rekombinationsereignissen im Vergleich zur Ausgangszelllinie (CHO (4364), Delacôte et al. 2002).
- Eine erhöhte Frequenz von HR in DNA-PK<sub>cs</sub> oder XRCC4 deletierten Zelllinien hatten auch Pierce et al. (2001) beobachtet, wenngleich die Erhöhung weniger stark ausgeprägt war als in den *Ku70*<sup>-/-</sup> Zellen (Pierce et al. 2001).

Zusammenfassend gibt es deutliche Hinweise, dass eine Unterdrückung des NHEJ auf unterschiedlicher Ebene zu einer verstärkten HR führen kann. Dieser Effekt KU nachgeschalteter NHEJ Komponenten lässt sich nicht unmittelbar durch eine Konkurrenz zwischen KU und einem Element der HR erklären. Zudem konnte gezeigt werden, dass KU und RAD52 unter gleichen Reaktionsbedingungen nicht um dieselben DNA-Enden konkurrieren (Ristic et al. 2003).

Zur Erklärung der vermehrten HR bei Hemmung jeglicher NHEJ-Komponenten könnte ein Modell verwendet werden, in welchem jeder denkbare Reparaturweg durch eine Wahrscheinlichkeit beschrieben wird, einen gegebenen DSB umzusetzen. Die experimentell bestimmbare Häufigkeit eines bestimmten Reparaturprodukts hängt dann nicht allein von der Wahrscheinlichkeit des zugehörigen Reparaturwegs ab, sondern ebenso von der Grundgesamtheit an DSB,

die für diesen Vorgang zur Verfügung stehen. Am Beispiel des NHEJ bedeutet dies, dass das Fehlen von KU sich direkt in einer reduzierten Wahrscheinlichkeit für NHEJ ausdrückt, da weniger NHEJ-vermittelndes KU zur Bindung der Bruchenden zur Verfügung steht. Durch diese Reduktion des quantitativ bedeutendsten Reparaturwegs lässt sich einerseits die erhöhte Strahlenempfindlichkeit KU defizienter Zellen erklären (Jeggo und Kemp 1983, Singleton et al. 1997). Zum Anderen könnten bei Mangel an KU vermehrt ungebundene DSB auftreten, die im freien Wettbewerb auch für andere Mechanismen zur Verfügung stehen, so dass es trotz einer unveränderten Wahrscheinlichkeit für z.B. die HR zu einer größeren Zahl an HR Reparaturereignissen kommt, weil die Grundgesamtheit an DSB unter den Bedingungen der Mutation größer geworden ist.

Das Fehlen eines KU nachgeschalteten Proteins könnte in dieser Vorstellung ebenso zu einer reduzierten Wahrscheinlichkeit des NHEJ führen, da unter diesen Bedingungen NHEJ nicht in der üblichen Weise abgeschlossen werden kann. Die Bruchenden können dann wieder für die Konkurrenz zugänglich werden, weil an DNA-Enden gebundenes KU sich in dynamischem Gleichgewicht mit gelöstem KU befindet und der Aufbau des NHEJ-Komplexes reversibel ist (Mari et al. 2006). Durch dieses erneute Eintreten in die Konkurrenz bekommt die HR eine neue Chance, den DSB wieder mit der ihr gegebenen Wahrscheinlichkeit umsetzen, weshalb die Zahl der vollendeten HR-Reparaturereignisse in der überlebenden Zellpopulation zunimmt. Die Zunahme der experimentell ermittelten GC-Frequenz bei Mutation KU nachgeschalteter NHEJ-Komponenten lässt sich durch eine größere Grundgesamtheit an DSB erklären, die durch das wiederholte Eintreten eines DSB in die Konkurrenz zur Verfügung gestellt wird.

Für diejenigen Reparaturereignisse, die trotz der reduzierten Wahrscheinlichkeit mittels NHEJ abgeschlossen werden, ließe sich in analoger Weise eine stärkere Prozessierung der DNA-Enden vorhersagen: Durch den mehrfachen Aufbau eines unvollständigen NHEJ-Komplexes würden die DNA-Enden wiederholt durch die vorhandenen Enzyme prozessiert werden, bevor es zum erfolgreichen Abschluss kommt.

Die Hemmung eines KU nachgeschalteten Schritts des NHEJ kann anstelle einer Mutation auch durch chemische Inhibierung der Funktion einer Komponente erfolgen (Allen et al. 2003, Cui et al. 2005). Auch in diesem Fall reduziert sich die Wahrscheinlichkeit des NHEJ, das aufgrund der fehlenden Aktivität nicht normal abgeschlossen werden kann. Falls die nach wie vor vorhandene, nun aber inaktive Komponente in der Lage ist, die Bindung von KU an die Bruchenden zu stabilisieren, so verhindert sie dadurch ein erneutes Eintreten des DSB in

die Konkurrenz und es würde in einem solchen Szenario trotz Hemmung des NHEJ nicht zu einer größeren Zahl an HR-Reparaturprodukten kommen. Dieses Modell steht in Einklang mit der Vorstellung von Allen et al. (2003), die postulierten, dass inhibierte DNA-PK<sub>cs</sub> die HR in dominant-negativer Weise hemmt (Allen et al. 2003).

Die Daten von Liang et al. (1996a), die in *Ku80*<sup>-/-</sup> xrs6 Zellen keine erhöhte Rate an HR Ereignissen im Vergleich zu CHO-K1 gefunden haben (Liang et al. 1996a) lassen sich ebenfalls auf diese Weise erklären. Dabei muss beachtet werden, dass xrs5 und xrs6 Zellen zwar zur gleichen Komplementierungsgruppe gehören (Jeggo 1985), sich aber in der in der Art der zugrundeliegenden Mutation unterscheiden: Während in xrs5 Zellen nur sehr wenig Ku80 Transkript nachweisbar ist, das in seiner Sequenz mit dem Wildtyp übereinstimmt, ist in xrs6 Zellen eine viel höheres Level eines mutierten Transkripts nachweisbar, das zur Expression eines verkürzten Proteins führt (Singleton 1997). Wenn dieses verkürzte Protein die Verfügbarkeit der DNA-Enden beeinträchtigt, wäre dies eine Erklärung für die trotz der *Ku80* Mutation mit dem Wildtyp vergleichbare Zahl an HR-Reparaturprodukten der xrs6 Zellen (Liang et al. 1996a).

Die Vorstellung gleichzeitig verfügbarer Wege zur Umsetzung eines definierten DSB wird durch die Beobachtung gestützt, dass KU und Proteine der HR an einem definierten DSB kolokalisieren können: Mittels Chromatin Immunopräzipitation lassen sich Proteine unterschiedlicher Reparaturwege an einem definiert erzeugten Bruchende nachweisen (Rodrigue et al. 2006). Mittels optischer Kolo-kalisation und FRET-Effekt lässt sich das gleichzeitige Auftreten von Elementen unterschiedlicher Reparaturwege in vivo auf verschiedenen Größenskalen zeigen (Rapp und Greulich 2004). Wenn sie dort mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit zu einem definierten Reparaturprodukt führen, so wird die experimentell bestimmbare Häufigkeit eines solchen Produkts von zwei Faktoren beeinflusst: Der Wahrscheinlichkeit des Reparaturwegs und der Grundgesamtheit an DSB, die diesem Weg zur Verfügung stehen.

## 5.7 RAD51-Abhängigkeit der GC-Ereignisse

Im obigen Abschnitt wurde die Frequenz an HR-Ereignissen in Zellen mit und ohne Mutation des *Ku80*-Gens verglichen; untersucht wurde der Einfluss eines beeinträchtigten NHEJ-Reparaturwegs auf die experimentell bestimmte Rekombinationsrate. In einem weiteren Schritt sollte gezeigt werden, dass die gemessenen Genkonversions-Ereignisse die Folge RAD51 abhängiger HR sind. RAD51 ist ein Protein mit zentraler Bedeutung für die HR (Helleday et al. 2007), was von zahlreichen Studien belegt wird:

- So konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Rekombinationsrate in immortalisierten humanen Zellen von einer durch die Immortalisierung stimulierten RAD51 Expression vermittelt wird (Xia et al. 1997)
- Eine erhöhte Rekombinationsrate konnte auch durch Überexpression von RAD51 in Hamsterzellen provoziert werden (Lambert et al. 2000, Arnaudeau et al. 1999, Vispé et al. 1998)
- Nur scheinbar im Widerspruch dazu steht die Aussage, dass durch eine Überexpression von RAD51 auch eine Hemmung der gemessenen GC-Frequenz erreicht werden kann und RAD51 somit auch dominant-negative Effekte auf die HR haben kann (Kim et al. 2001); bedenkt man, dass für die Katalyse des Strangaustausches noch eine Reihe weiterer Proteine erforderlich sind (Helleday et al. 2007, West 2003) und erfolgreiche Rekombination das Ergebnis der korrekten Koordination aller beteiligten Partner darstellt, so ist auch eine Reduktion der Rekombinationsrate als Folge einer experimentell forcierten Überexpression eines einzelnen Proteins möglich

Experimente, bei denen die Expression des zu untersuchenden Proteins unterdrückt wird, versprechen eindeutigere Aussagen über die Funktion eines stark vernetzten Proteins als solche, bei denen ein Protein überexprimiert wird (Vogelstein et al. 2000). Im Fall von RAD51 konnte das Verhalten von Null-Mutanten jedoch nicht detailliert untersucht werden, weil diese an einem frühen Punkt in der Embryonalentwicklung absterben und daraus hervorgegangene Zelllinien nicht proliferieren (Lim und Hasty 1996, Tsuzuki et al. 1996). Darüber hinaus führt die Hemmung der RAD51 Expression in B-Lymphozyten des Huhns mittels eines reprimierbaren Promotors zu einer Häufung von Chromosomenschäden, einem Stop in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus und schließlich zum Zelltod (Sonoda et al. 1998).

Um dennoch die Auswirkung einer Unterdrückung von RAD51 auf die homologe Rekombination erfassen zu können, wurde die Expression des Proteins in der vorliegenden Arbeit mittels RNA-Interferenz posttranslational unterdrückt; im Anschluss wurde enzymatisch ein DSB erzeugt und die Frequenz von GC-Ereignissen für die Reparatur dieses DSB gemessen (Abb. 16). Die Behandlung mit siRNA führte in beiden Zelllinien zu einer erheblichen Reduktion der GC-Frequenz, was zeigt, dass die gemessenen GC-Ereignisse RAD51 abhängig sind.

Interessanterweise zeigt sich sowohl in den Kontrollen, als auch nach Transfektion der siRNA, die zuvor beobachtete höhere GC-Frequenz der *xrs5* Zellen. Die Mutation im *Ku80*-Gen führt zu einer vermehrten HR im Vergleich zu CHO-K1, trotz der durch die doppelte Transfektion erheblich eingeschränkten Überlebensrate der Zellen und der unter diesen Voraussetzungen sehr viel niedrigeren Rekombinationsraten beider Zelllinien.

Die beobachtete Reduktion der GC-Frequenz könnte die Folge einer verminderten Wahrscheinlichkeit für HR sein, wenn weniger RAD51 zur Verfügung steht. Dies wäre im Einklang mit der Beobachtung, dass die Häufigkeit von GC-Ereignissen in beiden Zelllinien nach Behandlung mit siRNA stark abgenommen hat (71 % in C-GC3, bzw. 57 % in X-GC2, bezogen auf die jeweilige scr-Kontrolle). In *Ku80*<sup>-/-</sup> Zellen führt jedoch auch diese verminderte Wahrscheinlichkeit zu einer größeren Häufigkeit an GC-Ereignissen relativ zu CHO-K1, weil diese Zunahme an GC-Ereignissen auf der Vergrößerung der Grundgesamtheit durch den Mangel an KU beruht und durch die verminderte RAD51 Expression nicht berührt wird.

## 5.8 Zusammenfassung der Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Häufigkeit der HR für die Reparatur eines definierten DNA-Doppelstrangbruchs. Verglichen wurden Hamsterzellen (CHO-K1) mit einem intakten NHEJ und aus ihnen hervorgegangene *Ku80*<sup>-/-</sup> Mutanten (*xrs5*, Jeggo und Kemp 1983), die sich durch einen Defekt im NHEJ auszeichnen. Die gemessene GC-Frequenz beschreibt den Anteil aller lebenden Zellen, in denen ein enzymatisch induzierter DSB mittels Genkonversion (GC) repariert wurde; diese GC-Frequenz war in *xrs5* Zellen etwa fünfmal höher als in CHO-K1 Zellen (0,84%).

Nach Inhibierung der RAD51 Expression mittels RNAi wurden in beiden Zelllinien erheblich geringere GC-Frequenzen gemessen; nach wie vor zeigten *Ku80*<sup>-/-</sup> *xrs5* Zellen eine größere Frequenz als Zellen der Ausgangszelllinie CHO-K1.

Zur Erklärung dieser Daten wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem jeder Reparaturweg über eine Wahrscheinlichkeit verfügt, einen bestimmten DSB umzusetzen. In so einem stochastischen Modell der DSB-Reparatur hängt die experimentell bestimmbare Häufigkeit eines bestimmten Reparaturprodukts von zwei Faktoren ab:

Einerseits von der Wahrscheinlichkeit, mit welcher der zugehörige Reparaturweg eintritt. Durch Mutationen oder chemische Inhibierung bestimmter Aktivitäten verändert sich diese Wahrscheinlichkeit. Andererseits bestimmt die zur Ver-

fügung stehende Grundgesamtheit an DSB die experimentell ermittelte Häufigkeit eines Reparaturprodukts. Vergrößert sich das Angebot an DSB für einen Reparaturweg, so nimmt trotz gleichbleibender Wahrscheinlichkeit die gemessene Häufigkeit seines Reparaturprodukts zu.

Das KU-Heterodimer könnte eine wichtige Rolle bei der Regulation dieser Grundgesamtheit spielen, indem es die Zahl an ungebundenen DSB, die im freien Wettbewerb auch anderen Mechanismen zur Verfügung stehen, begrenzt. Durch seine Abundanz und hohe Affinität für DNA-Enden (Lieber et al. 2003) verhindert es den Zugang prinzipiell konkurrierender Mechanismen zu NHEJ-fähigen DSB.

## 6 Zusammenfassung

Hinsichtlich des Erhalts der genomischen Stabilität stellt der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) die folgenschwerste Läsion dar. Zur Reparatur dieser Läsionen stehen zwei vorrangige Mechanismen zur Verfügung: das nicht-homologe Endjoining (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR). NHEJ kann die sequenzunabhängige Ligation der Bruchenden vermitteln und gewährleistet so die strukturelle Integrität der DNA. HR ermöglicht durch Reparatursynthese die Rekonstruktion der zerstörten Sequenz.

In dieser Arbeit sollte die Relevanz der HR für die Reparatur von DSBs überprüft werden und dies sowohl für Zellen mit intaktem NHEJ (CHO-K1) als auch in solchen, bei denen dieser Hauptweg durch eine Defektmutation im Schlüsselprotein Ku80 (*xrs5*) beeinträchtigt ist. Zu diesem Zweck wurde ein Reparatursubstrat in das Genom der Zellen integriert, welches die Induktion eines DSB durch restriktionSENDONUKLEOLYTISCHE Spaltung seiner Sequenz erlaubt und damit die Messung der Frequenz von HR-Ereignissen zur Reparatur dieser DSB ermöglicht: Die Rekonstitution des Reportergens EGFP erfolgt dabei ausschließlich durch Genkonversion (GC) und kann durch die Fluoreszenz des Genprodukts durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

Zur Vorbereitung der stabilen Integration des Rekombinationssubstrats wurden geeignete Selektionsbedingungen ermittelt; Vorarbeiten der Rekombinationsexperimente umfassten den Nachweis der chromosomalen Integration des Rekombinationssubstrats, die Ermittlung der Transfektionseffizienz sowie einer Kinetik der enzymatischen DSB-Induktion. Die verwendeten *xrs5* Zellen wurden auf die Persistenz des strahlenempfindlichen Phänotyps kontrolliert.

Im Vergleich zu den CHO-K1-Zellen zeigten die NHEJ-defizienten *xrs5*-Zellen in den Rekombinationsexperimenten ein um den Faktor fünf gesteigerte Rate an GC-Ereignissen. Diese Ereignisse konnten eindeutig der HR zugeordnet werden, da eine Hemmung der posttranslationalen Expressionshemmung von RAD51 mittels RNAi in beiden Zelllinien eine Reduktion der GC-Frequenz um 60-70% bewirkte.

Damit zeigte diese Arbeit, dass für einen DSB immer mehrere Reparaturwege zur Verfügung stehen. Fehlt in einer ansonsten intakten Zelle das normalerweise dominierende NHEJ, so sind unter den vollendeten Reparaturereignissen vermehrt HR-Ereignisse zu erwarten. Steht diese ebenfalls nicht zur Verfügung, kommt vermehrt SSA zum Zug, das in Anwesenheit der beiden anderen Reparaturwege normalerweise unterdrückt wird. Somit zeigt sich eine deutliche Hierarchie der DNA-Reparaturwege.

## 7 Literaturverzeichnis

- Akyüz N, Boehden GS, Süsse S, Rimek A, Preuss U, Scheidtmann KH, Wiesmüller L (2002) DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 22(17):6306-6317
- Allen C, Kurimasa A, Brenneman MA, Chen DJ, Nickoloff JA (2002) DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6):3758-3763
- Allen C, Halbrook J, Nickoloff JA (2003) Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. *Mol Cancer Res.* 1(12):913-920
- Angrand PO, Woodroffe CP, Buchholz F, Stewart AF (1998) Inducible expression based on regulated recombination: a single vector strategy for stable expression in cultured cells. *Nucleic Acids Res.* 26(13):3263-3269
- Arnaudeau C, Helleday T, Jenssen D (1999) The RAD51 protein supports homologous recombination by an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol.* 1999 289(5):1231-1238
- Baumann P, Benson FE, West SC (1996) Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* 87(4):757-766
- Benson FE, Stasiak A, West SC (1994) Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *EMBO J.* 13(23):5764-5771
- Büttner K (2004) Effekt des Knockdowns von *Rad51* mittels RNA-Interferenz auf die Homologie-vermittelte DNA-Reparatur. Dissertation im Fachbereich Biologie, Universität Hamburg
- Burma S, Chen BPC, Chen DJ (2006) Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair* 5, 1042–1048

- Clikeman JA, Khalsa GJ, Barton SL, Nickoloff JA (2001) Homologous recombination repair of double-strand breaks in yeast is enhanced by MAT heterozygosity through yKU-dependent and -independent mechanisms. *Genetics* 157(2):579-589
- Cui X, Yu Y, Gupta S, Cho YM, Lees-Miller SP, Meek K (2005) Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell Biol.* 25(24):10842-10852
- Darroudi F, Natarajan AT (1987) Cytological characterization of Chinese hamster ovary X-ray-sensitive mutant cells xrs 5 and xrs 6. I. Induction of chromosomal aberrations by X-irradiation and its modulation with 3-aminobenzamide and caffeine. *Mutat Res.* 177(1):133-148
- Delacôte F, Han M, Stamato TD, Jasin M, Lopez BS (2002) An xrcc4 defect or Wortmannin stimulates homologous recombination specifically induced by double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 30(15):3454-3463
- Delacôte F, Lopez BS (2008) Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle* 7(1):33-38
- Dikomey E, Dahm-Daphi J, Kasten U (2001) DNA-Schäden und ihre Reparatur. In: Freyschmidt J (Hrsg) *Handbuch Diagnostische Radiologie*. Springer-Verlag, Berlin
- Downs JA, Jackson SP (2004) A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(5):367-378
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411(6836):494-498

Essers J, van Steeg H, de Wit J, Swagemakers SM, Vermeij M, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2000) Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. *EMBO J* 19(7):1703-1710

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21):7413-17

Fukushima T, Takata M, Morrison C, Araki R, Fujimori A, Abe M, Tatsumi K, Jasin M, Dhar PK, Sonoda E, Chiba T, Takeda S (2001) Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. *J Biol Chem.* 276(48):44413-44418

Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ (2001) Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet.* 2(2):110-119

Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP (2007) DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst).* 6(7):923-935

Jeggo PA (1985) Genetic analysis of X-ray sensitive mutants of the CHO cell line. *Mutat. Res.* 146:265–270

Jeggo PA, Kemp LM (1983) X-ray-sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell line. Isolation and cross-sensitivity to other DNA-damaging agents. *Mutat Res.* 112(6):313-27

Jeggo PA, Holliday R (1986) Azacytidine-induced reactivation of a DNA repair gene in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* 6(8):2944–2949

Kim PM, Allen C, Wagener BM, Shen Z, Nickoloff JA (2001) Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 29(21):4352-4360

Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386(6627):761, 763

- Lambert S, Lopez BS (2000) Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. *EMBO J.* 19(12):3090-3099
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396(6712):643-649
- Liang F, Romanienko PJ, Weaver DT, Jeggo PA, Jasin M (1996a) Chromosomal double-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(17):8929-8933
- Liang F, Jasin M (1996b) Ku80 deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. *J. Biol. Chem.* 271: 14405–14411
- Liang F, Han M, Romanienko PJ, Jasin M (1998) Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9):5172-5177
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(9):712-720
- Lieber MR (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem.* 283(1):1-5
- Lim D-S, Hasty P (1996) A Mutation in Mouse rad51 Results in an Early Embryonic Lethal That Is Suppressed by a Mutation in p53. *Mol Cell Biol.* 16(12):7133–43
- Mansour WY, Schumacher S, Roskopf R, Rhein T, Schmidt-Petersen F, Gatzemeier F, Haag F, Borgmann K, Willers H, 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(12):4088-4098
- Mari PO, Florea BI, Persengiev SP, Verkaik NS, Brüggewirth HT, Modesti M, Giglia-Mari G, Bezstarosti K, Demmers JA, Luider TM, Houtsmuller AB, van Gent DC (2006) Dynamic assembly of end-joining complexes requires interac-

- tion between Ku70/80 and XRCC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(49):18597-18602
- Merrihew RV, Clay WC, Condreay JP, Witherspoon SM, Dallas WS, Kost TA (2001) Chromosomal integration of transduced recombinant baculovirus DNA in mammalian cells. *J Virol.* 75(2):903-909
- Mimori T, Hardin JA (1986) Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem.* 261(22):10375-10379
- Mogayzel PJ Jr, Henning KA, Bittner ML, Novotny EA, Schwiebert EM, Guggino WB, Jiang Y, Rosenfeld MA (1997) Functional human CFTR produced by stable Chinese hamster ovary cell lines derived using yeast artificial chromosomes. *Hum Mol Genet.* 6(1):59-68
- Nasonova E, Ritter S, Fomenkova T, Kraft G (1998) Induction of chromosomal damage in CHO-K1 cells and their repair-deficient mutant XRS5 by X-ray and particle irradiation. *Adv Space Res.* 22(4):569-578
- Nazarov IB, Smirnova AN, Krutilina RI, Svetlova MP, Solovjeva LV, Nikiforov AA, Oei S-L, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM and Tomilin NV (2003) Dephosphorylation of Histone g-H2AX during Repair of DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells and its Inhibition by Calyculin A. *Radiat. Res.* 160, 309–317
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1 (7): 841-845
- Paris F, Servant N, Térouanne B, Sultan C (2002) Evaluation of androgenic bioactivity in human serum by recombinant cell line: preliminary results. *Mol Cell Endocrinol.* 198(1-2): 123-129
- Pâques F, Haber JE (1999) Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2): 349-404

- Petukhova G, Stratton S, Sung P (1998) Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature* 393(6680): 91-94
- Pierce AJ, Hu P, Han M, Ellis N, Jasin M (2001) Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev.* 15(24): 3237-3242
- Rapp A, Greulich KO (2004) After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. *J Cell Sci.* 117(Pt 21): 4935-4945
- Rathmell WK, Chu G (1994) Involvement of the Ku autoantigen in the cellular response to DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7623–7627
- Ristic D, Modesti M, Kanaar R, Wyman C (2003) Rad52 and Ku bind to different DNA structures produced early in double-strand break repair. *Nucleic Acids Res.* 31(18): 5229-5237
- RKI und GeKiD (2008) Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008
- Rodrigue A, Lafrance M, Gauthier MC, McDonald D, Hendzel M, West SC, Jasin M, Masson JY (2006) Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. *EMBO J.* 25(1): 222-231
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks In Vivo. *J Cell Biol* 146 (5): 905-916
- Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol.* 23(16): 5706-5715

- Rouet P, Smih F, Jasin M (1994) Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(13): 6064-68
- Rubnitz J, Subramani S (1984) The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 4(11): 2253-2258
- Schildkraut E, Miller CA, Nickoloff JA (2005) Gene conversion and deletion frequencies during double-strand break repair in human cells are controlled by the distance between direct repeats. *Nucleic Acids Res.* 33(5):1574-1580
- Schmidt-Petersen F (2003) Verwendung des Grün-Fluoreszenz-Protein Gens zur Messung von homologer und nicht homologer Rekombination in chromosomal integrierten Plasmiden. *Med. Dissertation. Universität Hamburg*
- Singleton BK, Priestley A, Steingrimsdottir H, Gell D, Blunt T, Jackson SP, Lehmann AR, Jeggo PA (1997) Molecular and biochemical characterization of xrs mutants defective in Ku80. *Mol Cell Biol.* 17(3):1264-73
- Smider V, Rathmell WK, Lieber MR, Chu G (1994) Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in mutant cells by Ku cDNA. *Science* 266(5183):288-291
- Solinger JA, Lutz G, Sugiyama T, Kowalczykowski SC, Heyer WD (2001) Rad54 protein stimulates heteroduplex DNA formation in the synaptic phase of DNA strand exchange via specific interactions with the presynaptic Rad51 nucleoprotein filament. *J Mol Biol.* 307(5):1207-1221
- Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, Bezzubova O, Shinohara A, Ogawa H, Takata M, Yamaguchi-Iwai Y, Takeda S (1998) Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J* 17(2):598-608
- Stark JM, Pierce AJ, Oh J, Pastink A, Jasin M (2004) Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Mol Cell Biol.* 24(21):9305-9316

- Sugawara N, Ira G, Haber JE (2000) DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 20(14): 5300-5309
- Sugiyama T, Kowalczykowski SC (2002) Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J Biol Chem.* 277(35):31663-31672
- Sugiyama T, Kowalczykowski SC (2002) Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J Biol Chem.* 277(35):31663-31672
- Sung P (1994) Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science* 265(5176):1241-1243
- Sung P, Robberson DL (1995) DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell.* 82(3):453-461
- Symington LS (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(4):630-670
- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33(1):25-35
- Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, Priestley A, Demengeot J, Mizuta R, Lehmann AR, Alt FW, Jackson SP, Jeggo PA (1994) Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* 265(5177):1442-1445
- Taghian DG, Nickoloff JA (1997) Chromosomal double-strand breaks induce gene conversion at high frequency in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 1997 17(11):6386-6393

- Taylor CS, Nouri A, Zhao Y, Takeuchi Y, Kabat D (1999) A sodium-dependent neutral-amino-acid transporter mediates infections of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type D retroviruses. *J Virol.* 73(5):4470-4
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17(18):5497-5508
- Thacker J (2005) The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett.* 219(2):125-135
- Thompson LH, Jeggo PA (1995) Nomenclature of human genes involved in ionizing radiation sensitivity. *Mutat Res.* 337(2):131-134
- Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, Matsushiro A, Yoshimura Y, Morita T (1996) Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13):6236-40
- Van Dyck E, Stasiak AZ, Stasiak A, West SC (1999) Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* 398:728-731
- Vispé S, Cazaux C, Lesca C, Defais M (1998) Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res.* 26(12):2859-2864
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408(6810):307-310
- Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412(6847):607-614
- West SC (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(6):435-445

West RB, Yaneva M, Lieber MR (1998) Productive and nonproductive complexes of Ku and DNA-dependent protein kinase at DNA termini. *Mol Cell Biol.* 18(10):5908-5920

Xia SJ, Shamma MA, Shmookler Reis RJ (1997) Elevated recombination in immortal human cells is mediated by HsRAD51 recombinase. *Mol Cell Biol.* 17(12):7151-7158

Yang YG, Saidi A, Frappart PO, Min W, Barrucand C, Dumon-Jones V, Michelon J, Herceg Z, Wang ZQ (2006) Conditional deletion of Nbs1 in murine cells reveals its role in branching repair pathways of DNA double-strand breaks. *EMBO J.* 25(23):5527-5538

## Abkürzungen

CHO	Chinese Hamster Ovary
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ssDNA	einzelsträngige DNA
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSB	Doppelstrangbruch/ -brüche
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EMS	Ethyl-Methansulfonat
GC	Genkonversion
HR	konservative homologe Rekombination
HJ	Holliday junction
K	Kontrolle
LB	Luria Broth
NHEJ	nicht-homologes Endjoining
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pTF	Nach Transfektion
rpm	Rotations per minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	freie Sauerstoffradikale
siRNA	small interfering RNA
SSA	single strand annealing
wt	Wildtyp
xrs	X-ray sensitive

## Danksagung

Allen, die dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit möglich wurde möchte ich ganz herzlich danken: Dr. Kerstin Borgmann hat mit unermüdlicher Begeisterung diese Arbeit betreut und war damit in allen Abschnitten eine Inspiration. Sie war stets ansprechbar für Sorgen aller Art, freute sich mit über Erfolge und war nie um einen guten Rat verlegen. Danke für alles, deine viele Arbeit, die endlosen Korrekturen und die viele Beratung, die Idee mit der alles anfang, die guten Gespräche auch jenseits von DNA-Reparatur, Grillen im Garten, lernen, wie man ein paper liest und und alles andere. Vielen Dank dafür und für die vielen Male, die Du mir suggeriert hast, mit etwas Glück und Ärmel hochkrepeln könnte die Arbeit ‚in ein paar Wochen‘ abgeschlossen sein.

Dr. Jochen Dahm-Daphi war ebenfalls vom ersten Moment an beteiligt; vielen Dank für die anregenden Diskussionen und die vielen guten Ratschläge, für die Du dir immer Zeit genommen hast, wenn sie gebraucht wurden.

Prof. Dr. E. Dikomey danke ich für die Aufnahme in das Labor für Strahlenbiologie und die entspannte Atmosphäre.

Wael Yassin Mansour und Agnieszka Wrona danke ich für den kollegialen Umgang mit einem ‚blinden Mediziner‘ und den lebhaften wissenschaftlichen Austausch.

Dem gesamten Laborteam danke ich dafür, so offen und freundlich aufgenommen worden zu sein und für alle Tricks und Rezepte, die ihr mir beigebracht habt. Vielen Dank Alex, Britta, Fruszina, Lena und Sylvia.

Claudia Neuweiler danke ich für die gute Atmosphäre beim gemeinsamen schreiben in unserem ‚Büro‘ und die Geduld bei endlosen Diskussionen über unzählige Details; vielen Dank, dass du mich die ganze Zeit der Klausur über ertragen hast.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern Karl-Heinz Roßkopf und Heidrun Roßkopf, sowie meinen Großeltern Paul und Erna Fehnle, ohne deren moralische ebenso wie großzügige finanzielle Unterstützung diese Arbeit ebenfalls kaum hätte abgeschossen werden können. Meiner Mutter Heidrun Roßkopf danke ich darüber hinaus für die abschließende Korrektur von Rechtschreibung und Interpunktion.

Allen meinen verbindlichsten Dank für alles was beigetragen wurde.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen 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.

Unterschrift.....