

KfK 4181
Januar 1987

**Veränderung der
Strahlenresistenz eukaryotischer
Zellen durch Transfer von
genomischer Wildtyp-DNA und
Metallothionein-Genen**

H. Lohrer
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie
von Spaltstoffen

KfK 4181

Veränderung der Strahlenresistenz eukaryotischer
Zellen durch Transfer von genomischer Wildtyp-DNA
und Metallothionein-Genen

Horst Lohrer

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe G.m.b.H., Karlsruhe

Als Manuskript vervielfältigt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden Versuche beschrieben, die Strahlensensitivität von Säugetierzellen durch Gentransfer zu beeinflussen. Ionisierende Strahlen (γ - oder Röntgen-Strahlen) erzeugen Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche in der DNA, die von einem unbekanntem Reparatursystem wiederverknüpft werden. Hochgradig sensitiv gegenüber ionisierenden Strahlen sind Zellen mit einem defektem Reparatursystem. Ausgangsmaterial meiner Experimente waren reparaturdefiziente immortalisierte Zellen von einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia und zwei röntgensensitive Chinese Hamster Ovary (CHO) Zelllinien. Durch Gentransfer eines intakten DNA-Reparaturgens oder eines Metallothionein-Gens sollten die Zellen die Strahlenresistenz des Wildtyps wiedergewinnen.

1) Transfer eines Reparaturgens: Der strahlensensitive Phänotyp bleibt nach Subklonierung und nach dem Transfer eines Antibiotika-Resistenzgens erhalten; die Reversionsrate wurde zu 5×10^{-6} pro Zelle und Generation bestimmt. Ein Röntgenselektionssystem wurde erstellt, um wenige Wildtypzellen aus einer Million Mutantenzellen zu isolieren. Der Transfer eines menschlichen Reparaturgens wurde nach der Methode des DNA-vermittelten Gentransfers durchgeführt: Hochmolekulare menschliche DNA aus Normalzellen wurde zusammen mit einem Plasmid für Antibiotika-Resistenz in die Mutantenzellen cotransfiziert. Mit Hilfe der Röntgenselektion konnten einige strahlenresistente CHO-Klone isoliert werden und in der DNA weniger Klone menschliche DNA nachgewiesen werden. In sekundären Transfektionen wurden ebenfalls phänotypische CHO-Revertanten isoliert, die jedoch nicht korrelierbar waren mit dem Transfer definierter DNA-Sequenzen. Von Ataxia Zellen wurden keine phänotypische

Revertanten isoliert.

2) Transfer eines Metallothionein-Gens: Metallothioneine (MT) sind niedermolekulare cysteinreiche Proteine, deren nachgewiesene Funktionen in vivo die Detoxifizierung von Schwermetallsalzen und die Me^{2+} -Donation auf metallabhängige Enzyme sind. Darüber hinaus reagieren die MT in vitro hochspezifisch mit OH-Radikalen, dem wichtigsten Radiolyseprodukt des Wassermoleküls. Zellen mit angereichertem MT-Protein sollten demnach gegenüber den toxischen Wirkungen ionisierender Strahlung besser geschützt sein als Zellen mit normalem MT-Gehalt.

MT-Gene wurden in die Zellen eingeschleust und die Transfektanten durch die erworbene Resistenz gegenüber Schwermetallsalzen isoliert. Die fremden MT-Gene sind im Genom der Transfektanten in hoher Kopienzahl nachweisbar. Nach der Induktion durch Cd^{2+} - und Zn^{2+} -Salze steigt der Gehalt an MT-mRNA in den Zellen bis auf das 20-fache und die Menge an MT-Protein bis auf das 100-fache an. Vergleicht man Überlebenskurven nach γ -Bestrahlung von Cd^{2+}/Zn^{2+} induzierten und nicht-induzierten MT-Klonen ist jedoch, weder unter oxidischen, noch unter hypoxischen Bedingungen, eine Schutzfunktion des Metallothioneins nachweisbar. Der einzige beobachtbare Effekt liegt in einer Verminderung des Überlebens der meisten MT-Zelllinien nach γ -Bestrahlung verglichen mit den parentalen Zelllinien.

Die Befunde dieser Arbeit sind: i) zur erfolgreichen und effizienten Reparatur von DNA-Schäden benötigen die Zellen ein intaktes DNA-Reparatursystem, ii) das MT Protein schützt die Zellen nicht vor den Effekten der ionisierenden Strahlen und iii) darf die Homöostase der zweiwertigen Kationen in den Zellen nicht gestört sein.

ABSTRACT

Alterations in radioresistance of eucaryotic cells after the transfer of genomic wildtype DNA and metallothionein genes.

The presented paper describes experiments concerning the alteration of radiosensitivity of eucaryotic cells after gene transfer. Ionizing radiation (γ - or X-ray) induces DNA single- or double strand breaks, which are religated by an unknown repair system. Repair deficient cells are highly sensitive to ionizing radiation. In the experiments described, cells from a patient with the heritable disease Ataxia telangiectasia were used as well as two X-ray sensitive CHO mutant cell lines. After gene transfer of an intact human DNA repair gene or a metallothionein gene the cells should regain radioresistance.

1) Transfer of a human DNA repair gene: The radiosensitive phenotype of the mutants is stable to subcloning and to the transfer of a gene responsible for antibiotic resistance. An X-ray selection system was established, to select a few wildtype cells from one million mutant cells. DNA-mediated gene transfer was used to cotransfect high molecular weight human DNA and a plasmid coding for antibiotic resistance into the mutant cell lines. After selection for antibiotic resistance followed by X-ray selection, some radioresistant CHO-cell clones which had human DNA integrated in their genomes were isolated. Secondary transfections with the DNA of these clones either yielded no radioresistant CHO-clone, or it was found that the CHO revertant cell genome did not contain any specific human DNA fragments. From cells from Ataxia patients no clones with the reverted phenotype were isolated.

2) Transfer of a metallothionein-gene: Metallothioneins (MT)

are small cystein-rich proteins. Their function in vivo is detoxification of heavy metal salts and the Me^{2+} -donation to metal depending enzymes. In addition MTs are highly specific scavengers to OH-radicals (the main products of radiolysis of water molecules). Cells with enriched MT protein therefore should be better protected from the effects of ionizing radiation than normal cells.

I transfected MT genes into human and CHO cell lines. The transfectants acquired resistance to heavy metals. In their genomes the transfected MT genes were present at high copy number. After the induction of the MT genes with Cd^{2+}/Zn^{2+} -salts the cellular content of MT-mRNA increased 20 times and the amount of MT protein increased 100 times. However the survival of the MT-cell clones after irradiation with γ -rays after Cd^{2+}/Zn^{2+} -induction is not different from non-induced cells. This is true for both aerobic and hypoxic conditions. No protection of the MT enriched cells against the effects of ionizing radiation was found. The only effect is a slight sensitivation of most of the MT-cell clones to ionizing radiation compared to parental cell lines.

The findings of this work support the hypothesis, that i) for a successful and efficient repair of DNA damage, the cells need an intact DNA repair system, ii) the MT protein does not protect cells from the effects of ionizing radiation, and iii) the homeostasis of Me^{2+} -ions must be maintained to guarantee full repair capacity.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT	3
INHALTSVERZEICHNIS	7
ABKÜRZUNGEN	10
KAPITEL A: EINLEITUNG	11
KAPITEL B: MATERIAL UND METHODEN	
1. Materialien	17
2. Puffer und Lösungen	18
3. Rekombinante DNA-Vektoren	19
4. Zellkulturen	20
5. Protokolle der Experimente:	21
5.1. Überlebenskurven:	21
5.1.1. γ -Dosis-Effekt-Kurven	21
5.1.2. Röntgen-Dosis-Effekt-Kurven	22
5.1.3. Cd ²⁺ -Dosis-Effekt-Kurven	22
5.2. Röntgenselektion	22
5.3. Koloniebildungsfähigkeit von CHO-xrs Zellen während einer Röntgenselektion	23
5.4. Transfektion	24
5.5. Selektionsmedien	25
5.6. Methoden zur Extraktion von DNA:	25
5.6.1. Extraktion hochmolekularer Placenta-DNA	25
5.6.2. DNA-Präparation aus Zellkulturen	27
5.6.3. HIRT-Extraktion niedermolekularer DNA	28
5.6.4. Isolierung von Plasmiden	28
5.6.5. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
5.7. Extraktion von RNA	30
5.8. Tagging von DNA	31

5.9.	Gelelektrophorese von Nucleinsäuren:	32
5.9.1.	Gelelektrophorese von DNA	32
5.9.2.	Gelelektrophorese von RNA	32
5.9.3.	Probenbehandlung für RNA-Gele	32
5.10.	Nick-Translation von DNA-Proben	33
5.11.	Southern "unblots"	33
5.12.	Transfer von Nucleinsäuren auf Nitrocellulosefilter	34
5.13.	Vorhybridisierung und Hybridisierungsbedingungen	35
KAPITEL C:	ERGEBNISSE VON TEIL I	
	Versuche zur Klonierung eines Reparaturgens	36
1.	Konstanz der Zellcharakteristika	37
1.1.	AT-Zelllinien: Konstanz der γ -Überlebens-Kurve nach Subklonierung, Transfektion und chron. Bestrahlung	37
1.2.	CHO-Zelllinien: Konstanz des Phänotyps von Wildtyp und xrs-Mutanten	39
1.2.1.	γ -Dosis-Effekt-Kurven von CHO Zelllinien	39
1.2.2.	Überleben des CHO Wildtyps bei Doppelbestrahlungen	41
1.2.3.	γ -Überlebenskurven von CHO-Revertanten	42
2.	Röntgenselektion	43
2.1.	Anwendung bei menschlichen Fibroblasten:	44
2.1.1.	Koloniebildungsfähigkeit von AT-Zellen und GM637 Normalfibroblasten während einer Röntgenselektion	44
2.1.2.	Das Überleben von GM637 Zellen in Abhängigkeit vom Röntgenselektions-Regime	46
2.1.3.	Spontane Reversionsrate von AT-Zellen	47
2.2.	Anwendung der Röntgenselektion bei <u>CHO-Zellen:</u>	48
2.2.1.	Überleben des CHO-Wildtyps unter verschiedenen Röntgenselektions Protokollen	48
2.2.2.	Reversionsraten der CHO xrs-Mutanten	50
2.2.3.	Koloniebildungsfähigkeit von CHO xrs-Mutanten	

	während der Röntgenselektion	52
3.	Versuche zum Transfer eines Reparaturgens:	54
3.1.1.	Aufnahme fremder DNA durch AT-Zellen	55
3.1.2.	DNA-Transfer in AT-Zellen	59
3.2.	DNA-Transfer in CHO xrs-Mutanten	62
3.2.1.	Transfektionen in CHO xrs-2 und xrs-4 Mutanten	62
3.2.2.	Integration fremder DNA in CHO-Zellen	64
4.	Diskussion der Ergebnisse des Teil I	71
KAPITEL D: ERGEBNISSE VON TEIL II		
	Versuche zur Erhöhung der Strahlenresistenz eukaryotischer Zellen durch den Transfer eines Metallothionein-Gens	78
1.	Transfektion von Metallothionein-Genen in CHO- und menschliche Zelllinien	78
2.	Cd ²⁺ -Resistenz der Transfektanten	80
3.	Nachweis der transfizierten Metallothionein-Gene	83
4.	Expression der exogenen Metallothionein-Gene	88
5.	Überleben von Zellklonen mit transfizierten Metallothionein-Genen nach Gammabestrahlung	93
5.1.	Überlebenskurven der Transfektante Kl-2/MT ₃ und des Wildtyps Kl-2 nach γ -Bestrahlung	94
5.2.	Überlebenskurven menschlicher Zelllinien und ihrer Metallothionein-Transfektanten nach γ -Bestrahlung	96
6.	Diskussion des Teil II	101
KAPITEL F: Literaturverzeichnis		106

ABKÜRZUNGEN

AT	Ataxia telangiectasia
bp	Basenpaare
BPV	Bovine Papilloma Virus
CHO	Chinese Hamster Ovary
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEK	Dosis-Effekt-Kurve
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatiumsalz
FCS	Fetales Kälberserum
G418	Geneticin
kb	Kilobasen
MT	Metallothionein
PE	Plating Efficiency
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TPA	12-0-Tetradecanolyphorbol-13-Acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WT	Wildtyp
XP	Xeroderma pigmentosum
xrs	X-ray sensitive

KAPITEL A: EINLEITUNG

Viele Jahrzehnte lang, nach der Entdeckung der DNA als die Erbsubstanz der Organismen, wurde die DNA als außerordentlich stabiles Makromolekül begriffen, damit die Forderung nach Konstanz der Erbinformation erfüllt war. Entsprechend wurde die natürliche radioaktive Hintergrundstrahlung als Auslöser der spontanen Mutationen aufgefaßt. Erst 1930 konnte gezeigt werden, daß nur ein kleiner Anteil der spontan auftretenden Mutationen von der Hintergrundstrahlung resultieren kann (78) und statt dessen intracelluläre Mechanismen den Hauptanteil der spontanen Mutagenese ausmachen. Die Veränderungen in der Basensequenz resultieren aus Ungenauigkeiten bei der DNA Synthese (69), oder der chemischen Instabilität der Nucleotide durch Tautomerisierung (107) und Deaminierung (19). Nicht zuletzt erzeugen auch viele vom Menschen künstlich in die Umwelt emittierte Stoffe, Schäden in der DNA.

Die Wiederherstellung der Integrität der DNA ist entscheidend für die Replikationsfähigkeit der Zellen. Diese Funktion erfüllt ein Reparatursystem, bestehend aus einer Reihe meist noch unbekannter biochemischer Funktionen, von denen nicht allein der biochemische Ablauf, sondern darüber hinaus ihre Regulation (konstitutiv oder induziert) und ihre Fehlerhaftigkeit (fehlerfrei oder mutagen) interessiert (32).

In eucaryotischen Zellen ist das Wissen über Reparaturprozesse an der DNA rudimentär. Die klinischen Symptome einiger Erbkrankheiten werden auf Mutationen im Reparatursystem zurückgeführt. Die am besten untersuchten sind Xeroderma pigmentosum (XP) (UV-sensitiv) (12) und Ataxia telangiectasia (AT) (hypersensitiv gegenüber Röntgen- und γ -Strahlen).

Wegen der Parallelität von Entwicklungsstörungen, Neoplasmen des

lymphoreticularen Systems und Röntgensensitivität, galt der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia (AT) (Louis Barr Syndrom) unser besonderes Interesse. Die klinischen Symptome dieser Erbkrankheit wurden im Jahre 1965 mit einer Reparaturdefizienz von DNA-Schäden in Verbindung gebracht, als zwei Patienten während einer routinemäßigen Strahlentherapie starben (77). Die Krankheit wird autosomal, rezessiv vererbt und die Heterogenität der Symptome läßt eine Einteilung in 7 Typen zu (30). Von der Mutation sind physiologische Funktionen betroffen: Die Entwicklung des Cerebellums, des Immunsystems und der Haut (61, 15, 4, 85). Alle in vitro untersuchten Zellen von Ataxia-Patienten sind hypersensitiv gegenüber ionisierenden Strahlen (84, 104), gegen Bleomycin (40), und Neocarcinostatin (97). Die Suche nach der molekularen Ursache der Strahlensensitivität der AT-Zellen erbrachte, daß, verglichen mit normalen menschlichen Fibroblasten, die semikonservative Replikation in den AT-Zellen paradoxerweise strahlenresistenter ist (70, 22, 37, 113, 43, 44, 83). Nach ionisierender Bestrahlung ist die Rate der wiederverknüpften Doppelstrangbrüche in AT-Zellen ähnlich der Rate in Normalfibroblasten (29, 102), aber in AT-Zellen bleiben fünfmal mehr nichtreparierte Doppelstrangbrüche in der DNA erhalten (14). Bisher wurden bezüglich der radioresistenten DNA-Synthese, fünf Komplementationsgruppen bestimmt (79, 45). Die Auslösung von Mutationen in AT-Zellen durch γ -Bestrahlung wird kontrovers beschrieben (4, 100). Die Neigung betroffener Personen zu Tumoren wird vermutlich nicht durch somatische Mutationen, sondern durch einhergehende Immundefizienzen ausgelöst (10, 6, 21). Heterozygot betroffene Individuen sind bei einem erhöhten Krebsrisiko, äußerlich normal, primäre Zellen von ihnen sind nur wenig strahlensensitiver als die primären Zellen gesunder Menschen (60,

97). Die charakteristische Strahlensensitivität bleibt auch nach der Immortalisierung von AT-Zellen erhalten (4).

Die fünf AT-Komplementationsgruppen legen die Vermutung eines komplexen DNA-Reparatursystems nahe. Der Rückgriff auf etablierte Zelllinien und deren Mutation zu röntgensensitiven Klonen, kann ein einfacheres System für Reparaturdefizienz liefern. P. A. Jeggo et al isolierten 1982 röntgensensitive Mutanten der Chinese Hamster Ovary (CHO) Zelllinie Kl (49). Diese Mutanten gehören einer Komplementationsgruppe an und unterscheiden sich untereinander in ihrer Sensitivität gegenüber Röntgenstrahlen (48). γ -Strahlen-induzierte Einzelstrangbrüche werden von den Mutanten repariert, jedoch werden Doppelstrangbrüche der DNA nur zu etwa 20% wiederverknüpft, verglichen mit dem CHO Wildtyp (59). Nach der Bestrahlung verharren die Mutanten in der G2-Phase des Zellzyclus (109) und die Mutanten zeigen keine strahlenresistente DNA-Synthese (47). Gerade die beiden letztgenannten Charakteristika machen deutlich, daß die CHO xrs-Mutanten nicht als Modellsystem für AT-Zellen gelten können.

Ziel des ersten Teils meiner Experimente war die Klonierung eines menschlichen Reparaturgens und seine Charakterisierung. Der Ansatz zur Genklonierung geschieht über das Einbringen einer komplementierenden Aktivität in die strahlensensitiven Mutanten. Vier Wege sind dazu beschrieben:

a) Zellfusion: Durch Hybridbildung zwischen einer Mutante und dem Wildtyp muß der Phänotyp der Mutante verschwinden. Dieser Ansatz wird bei der Ermittlung der Komplementationsgruppen von AT-Zelllinien beschritten und von erfolgreicher Komplementation gesprochen, wenn die strahlenresistente DNA-Synthese aufgehoben ist.

b) Micro-Zell Fusionen und Transfektion von Metaphasechromosomen:

Der Vorteil dieser Methode liegt in der höheren Stabilität der Fusionsprodukte und der besseren Repräsentation des übertragenen Materials. Erfolgreich wurde die Methode zur Komplementation von Xeroderma pigmentosum angewandt (42).

c) Microinjektionen von Zell- oder RNA-Extrakten des Wildtyps in die Mutante: HeLa-Zellextrakte und poly(A)⁺-RNA Extrakte aus HeLa Zellen wurden erfolgreich zur transienten Komplementation von XP-Zellen benutzt (106, 62).

d) Beim DNA-vermittelten Gentransfer (Transfektion) wird DNA in eukaryotische Zellen übertragen. Durch eine anschließende Selektion für den gewünschten Phänotyp kann ein Zellklon isoliert und die komplementierende fremde DNA reisoliert werden (110).

Für unsere Aufgabenstellung, der Isolierung eines menschlichen Reparaturgens, ist nur die Methode des DNA-vermittelten Gentransfers verwendbar, da die komplementierende DNA mit molekularbiologischen Methoden handhabbar ist, sie stabil integriert vorliegt und reisolierbar aus dem Genom der Transfektante ist.

Der experimentelle Weg zur Isolierung eines menschlichen DNA-Reparaturgens (Kapitel C , Teil I meiner Arbeit) kann folgendermaßen skizziert werden: Immortalisierte AT-Zellen, oder CHO xrs-Mutanten werden mit hochmolekularer menschlicher DNA und einem Resistenzplasmid cotransfiziert. In einer ersten Selektion werden die Transfektanten durch die erworbene Antibiotika-Resistenz isoliert. Dieser Schritt ermöglicht die Bestimmung der Transfektionseffizienz und gleichzeitig die Selektion der stabil transfizierten Zellen von den Nichttransfizierten. Bei gleichzeitiger Übertragung des komplementierenden DNA-Reparaturgens hat diese Transfektante die Strahlenresistenz des Wildtyps erhalten. Um diesen Zellklon zu isolieren ist eine Röntgenselektion notwendig, die nur den strahlenresistenten Klon

überleben läßt. Wird eine solche phänotypische Revertante beobachtet, präpariert man deren genomische DNA und führt eine zweite Runde der Transfektion und Selektion durch. Die limitierte Größe der stabil integrierten fremden DNA führt zur direkten Nachbarschaft des komplementierenden Reparaturgens zum Resistenzplasmid im Genom der sekundären Transfektante. Wird von der genomischen DNA der sekundären Transfektante eine Genbank angelegt, können daraus die Sequenzen der transfizierten DNA reisoliert und das Reparaturgen charakterisiert werden.

AT-Zelllinien sind gegenüber Agentien hypersensitiv, die mit einem Radikal-Mechanismus mit der DNA reagieren (96). Auch ionisierenden Strahlen entfalten 90% ihrer Schäden über den "indirekten" Weg mittels erzeugter OH-Radikale bei der Radiolyse von Wassermolekülen.

Eukaryotische Zellen haben gegen die im Stoffwechsel anfallenden Superoxid-Radikale und Wasserstoffperoxid-Moleküle zwei Enzymsysteme als Schutzmechanismen entwickelt: Die Superoxiddismutase (SOD) und die Katalase. Aktivitätsmessungen des Enzyms SOD ergaben für fünf getestete AT-Zelllinien keinen statistisch signifikanten Unterschied zu Normalfibroblasten; die Katalaseaktivität dagegen war in den AT-Zellen leicht erhöht (94). Auch Tumorpromotoren auf der Basis von Phorbolestern, z.B. PMA, entfalten ihre biochemischen Effekte, neben der Aktivierung der Proteinkinase C, durch die Erzeugung von Sauerstoff-Radikalen und Peroxid-Anionen (33). Eine Reihe homozygoter Ataxia-Primärfibroblasten erwies sich als hypersensitiv gegenüber den cytotoxischen Effekten des Tumorpromotors PMA (95). In unserem Labor wurde gefunden, daß der Tumorpromotor TPA in Normalfibroblasten das Metallothionein-IIA Gen und das Kollagenase-Gen induziert (2).

Zwei weitere Beobachtungen aus unserem Labor verknüpfen das Metallothionein-Gen mit der Strahlensensitivität von menschlichen Zellen: H. Rahmsdorf (3) beobachtete ein Ansteigen des MT-mRNA Gehaltes von menschlichen Fibroblasten, nach ihrer Immortalisierung durch das SV40 Virus. Und, beim Vergleich von primären und den SV40-transformierten Abkömmlingen menschlicher Zellen in γ -Dosis-Effekt-Kurven, fand Frau C. Lücke-Huhle (3), daß die transformierten Zelllinien sämtlich gegen ionisierende Strahlung resistenter geworden waren. Dieser Effekt war auch bei AT-Zellen nachweisbar. Es läßt sich die Hypothese aufstellen, daß das zusätzliche Metallothionein-Protein den Fibroblasten hilft, die letalen Effekte der ionisierenden Strahlen durch Abfangen der OH-Radikale, zu vermindern. Dieser Metallothionein-vermittelte Schutzeffekt sollte durch die Transfektion und erhöhte Expression eines Metallothionein-Gens zu verstärken sein. Diese Experimente sind mit CHO-Linien und den SV40 transformierten menschlichen Zelllinien AT5BI-VA und GM637 in Teil II (Kapitel D) meiner Arbeit wiedergegeben.

MATERIAL UND METHODEN1. Materialien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose, Typ II und VII	Sigma, München
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Aminopterin	Serva, München
E.coli-DNA	Boehringer, Mannheim
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Fetal Calf Serum	Gibco Europe, Karlsruhe
Geneticin, G418	Gibco Europe, Karlsruhe
Harnstoff (ultrapure)	Schwarz und Mann, New York, USA
Hygromycin	Boehringer, Mannheim
Lachsspermien-DNA	Sigma, München
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Nick Translation Kit	Amersham Buchler, Braunschweig
Nitrocellulosefilter	Schleicher und Schüll, Dassel
N, N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Oxisorb-Patronen	Messer Griesheim, Düsseldorf
Penicillin/Streptomycin	Gibco Europe, Karlsruhe
Plasmide: pBLUR8	repetitiven Alu-Sequenzen (50)
pmMT ₁	Resistenz gegen Cadmium (25)
pMT ₁₁ -BPV(-)	Resistenz gegen Cadmuim (56)
pSV2neo	Resistenz gegen Geneticin (98)
py3	Resistenz gegen Hygromycin (9)
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Quickszint	Zinsser, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim
Sephadex G50-Säulenmaterial	Deutsche Pharmacia, Freiburg
Stickstoff: N ₂ 5.5	Messer Griesheim, Düsseldorf

T4 DNA Ligase	Bio Rad Laboratories, München
T4 Polynukleotid Kinase	P-L Biochemicals, St. Goar
TEMED	Bio Rad Laboratories, München
Tris	Boehringer Mannheim
α - ³² P-dATP	Amersham Buchler, Braunschweig

Alle anderen verwendeten Substanzen wurden p.a. von den Firmen Merck, Serva und Sigma bezogen.

2. Puffer und Lösungen

Bakterien-solution I:

50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl (pH 8.0).

Bakterien-solution II:

0.2 M NaOH; 1% SDS.

Blot-Neutral:

121 g Trizma-Base; 124 ml conc. HCl; in 1 l bidest. Wasser

Denhardts, 100 x:

2% BSA; 2% Ficoll; 2% PVP.

DNA-Homogenisationspuffer, entspricht Kernpuffer:

0.3 M Saccharose; 10 mM NaCl; 1.5 mM Mg-acetat;

10 mM Tris (pH 8.0); 1 mM DTT; 0.1% MP40.

Färbelösung für DNA/RNA auf Nitrocellulose-Filtern:

0.5 M Na-ac (pH 5.2); 0.04% Methylenblau.

Hepes (2x):

140 mM NaCl; 25 mM Hepes; 0.75 mM Na₂HPO₄; (pH 7.1).

HIRT-Lysis-Puffer:

0.6% SDS; 0.01% EDTA; 0.1 M NaCl; 0.05 M Tris (pH 8.0).

HIRT-Wash-Puffer:

0.1 M NaCl; 0.05 M Tris (pH 7.5); 0.01 M EDTA.

PB:

0.2 M Na₂HPO₄, 0.2 M NaH₂PO₄, pH 6.25.

PBS:

0.14 M NaCl; 2.7 mM KCl; 0.7 mM CaCl₂*2H₂O; 0.6 mM MgCl₂*6H₂O; 6.5 mM Na₂HPO₄*2H₂O; 1.5 mM KH₂PO₄.

Phenol, TNE gesättigt:

Phenol bei 80°C schmelzen + 100 ml 1xTNE.

PIPPI:

0,2 M NaH₂PO₄; 0.3 M Na₂HPO₄; 1.5% Na₄P₂O₇.

RNA-Denaturierungslösung:

50 µl 20xPB; 500 µl DMSO; 195 µl Glyoxal 30%, das über AG 501-X8 deionisiert wurde.

RNA-Lysispuffer:

7 M Harnstoff; 2% SDS; 0.35 M NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl; pH 8.0.

SSC:

20x: 3 M NaCl; 0.3 M tri-Na-Citrat (pH 6.5).

TE:

50 mM Tris; 1 mM EDTA.

TEN:

20 mM Tris; 1 mM EDTA; 1.5 M NaCl (pH 7.5)

TNE:

0.1 M NaCl; 5 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl (pH 7.5)

3. Rekombinante DNA-Vektoren

3.1. pSV2neo:

Aus dem Transposon Tn5 wurde das Resistenzgen für das Antibiotikum Kanamycin isoliert (8). Die neo-codierende Sequenz wurde an den SV40 early promotor ligiert und die SV40 Sequenzen für das t-Intron und das SV40 Polyadenylierungs-Signal schließen die Genkonstruktion in 3'-Richtung ab (98). pBR322-Sequenzen mit der Ampicillin-Resistenz ermöglichen die Vermehrung des Plasmids

im Bakterienstamm HB100. In eukaryontischen Zellen vermittelt das Plasmid die Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin, G418.

3.2. py3:

Das Hygromycin-Resistenzgen steht unter der Kontrolle des MoSV-Promotors und wird von dem MoSV-Polyadenylierungs-Signal abgeschlossen. Einkloniert in den Vektor pBR322 kann das Plasmid in Bakterien vermehrt werden (9).

3.3. pmMT_I:

Das Metallothionein-IA-Gen der Maus ist mit dem vollständigen Metall-regulierenden Promotorelementen in das pBR322 Plasmid kloniert. Das Plasmid enthält nur unique DNA (25).

3.4. pMT_{II}-BPV(-):

Das menschliche Metallothionein-IIA-Gen, mit den 5'-flankierenden Sequenzen wurden zusammen mit 69 % des BPV-Genoms und pBR322 kovalent ligiert. Die BPV-Sequenzen garantieren die episomale Replikation der rekombinanten Sequenzen. Das Metallothionein Protein erhöht die Resistenz gegen Schwermetalle (56).

3.5. λMNT:

In den Vektor λgt11 sind neo-Sequenzen und eine cDNA Bank einkloniert (81).

4. Zellkulturen

AT5BI-VA: Die SV40-transformierte Ataxia-Zelllinie wurde freundlicherweise von A. LEHMANN, Brighton, zur Verfügung gestellt. Subklone dieser Fibroblasten-Zelllinie wurden auf ihre Eigenschaft für den Gentransfer untersucht. Höchste Transfektionseffizienz zeigte der Subklon AT5BI-VA/s4 (ATs4).

GM637: SV40-transformierte normale menschliche Fibroblasten erhielten wir von J. E. CLEAVER, Universität von Kalifornien, San Francisco.

Chinese Hamster Ovary (CHO): Wildtypzellen und die

strahlensensitiven Mutanten xrs-2 und xrs-4 wurden uns freundlicherweise von P. JEGGO, MRC London, überlassen. Die erhaltenen Zelllinien wurden subkloniert (49).

NFB München: Primäre Hautfibroblasten einer gesunden Person; die Zellen wurden als feeder-layer bei Dosis-Effekt-Kurven eingesetzt.

Alle menschlichen Zelllinien, AT5BI-VA, NFB (Passage 11) und GM637 wurden in Eagle's MEM-Medium mit Earle's Salzen mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die CHO-Zelllinien wurden in α -MEM Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin vermehrt.

5. Protokolle der Experimente

5.1 Überlebenskurven

5.1.1 γ -Dosis-Effekt-Kurven:

24 Stunden (CHO-Zellen) bzw. 48 Stunden (menschliche Zellen) vor der Bestrahlung wurden 2×10^5 Zellen in 5 cm große Petri-Schalen überimpft. Zur Aufnahme oxischer DEK wurden die Proben unter Normalatmosphäre bis zu 6 Gy in einer Co-Gamma-Quelle (Gammacell 200, Atomic Energy of Canada) mit der Dosisleistung von 1 Gy/min bestrahlt. Sofort nach Einwirkung der γ -Strahlen wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und ausplattiert. Die menschlichen Zellen müssen zur Verbesserung ihrer Plating efficiency (PE) auf 3×10^4 NFB feeder-layer Zellen (bestrahlt mit 30 Gy) plattiert werden. Nach 10 - 14 Tagen werden die gewachsenen Kolonien gefärbt und gezählt. Die Überlebensrate (N/N_0) wurde folgendermaßen berechnet:

$$\frac{N}{N_0} = \frac{\text{gezählte Kolonien} * \frac{1}{PE}}{\text{Anzahl ausgesäter Zellen}}$$

Um hypoxische Bedingungen zu erzielen wurden die Zellen in 25 cm² Flaschen überimpft und eine Stunde vor der Bestrahlung mit Stickstoff 5.5 (O₂-Absorption mit Oxysorb Patronen) begast (67, 68). Nach der Bestrahlung wurde wie unter oxischen Bedingungen verfahren.

Cd²⁺-resistente Klone wurden die Woche vor der Bestrahlung in Normalmedium ohne 20 µM Cd²⁺ und 70 µM Zn²⁺ gehalten.

5.1.2 Röntgen-Dosis-Effekt-Kurven

Die Kulturen wurden in einer Philips X-ray Röhre Mo 300 bei 250 kV Spannung und einem 1 mm dicken Kupfer-Filter bestrahlt. Die Dosisleistung der Quelle betrug 1.25 Gy/min. Der Kolonietest für das Überleben der Zellen nach Röntgenbestrahlung wurde analog Kapitel B, Punkt 5.1.1., durchgeführt.

5.1.3 Überleben gegenüber Cd²⁺

In 5 cm Petri-Schalen wurden 10², 10³, bis 10⁵ Zellen ausplattiert und steigenden Konzentrationen von CdCl₂ (5 - 400 µM) ausgesetzt. Während der 10 - 14 Tage bis zur Koloniebildung war Cd²⁺ im Medium anwesend. Die Kolonien wurden mit Kristallviolett gefärbt und gezählt. Die Überlebensrate N/N₀ wurde wie unter Kapitel B, Punkt 5.1.1., berechnet.

5.2. Röntgen-Selektion

Ziel der Röntgen-Selektion war die Isolierung weniger Wildtyp Zellen aus einer großen Anzahl strahlensensitiver Mutanten. Die Unterschiede im Überleben von Wildtyp- und Mutanten-Zellen nach γ-Bestrahlung, erzwangen ein Selektionsregime mit häufig wiederholter Bestrahlung. Wegen der Generationszeiten von 11 - 12 Stunden für CHO Zellen und 20 - 24 Stunden für menschliche immortalisierte Zelllinien, wurden tägliche Bestrahlungen gewählt.

Um die Überlebenschance von 100 Wildtyp-Zellen unter verschie-

denen Röntgen-Selektionsregimen zu ermitteln wurde folgendermaßen vorgegangen: 100 GM637 Zellen wurden auf feeder-layer in 9 cm Petrischalen plattiert und nach 3 - 4 Stunden der ersten Bestrahlung (Dosis von 0.5 bis 2.2 Gy) ausgesetzt. Parallel wurden 10^6 Ataxia Zellen in 9 cm Petrischalen plattiert und mit der gleichen Dosis bestrahlt. Im Abstand von 24 Stunden folgten die weiteren Bestrahlungen mit identischer Dosis. Aus der Überlebenskurve der Ataxia-Zellen konnte geschlossen werden, wie häufig 10^6 Ataxia-Zellen mit einer bestimmten Dosis bestrahlt werden müßten, um weniger als eine überlebende Zelle zu erhalten. Die so berechnete Anzahl der Bestrahlungen ist als "Endpunkt der Selektion" definiert. Die während der Röntgenselektion gewachsenen Kolonien der 100 überimpften Wildtypzellen wurden gefärbt und gezählt. Das Überleben der 100 Wildtypzellen (in Prozent der nichtbestrahlten Kontrolle) wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis tabelliert.

In Petrischalen mit 10^6 AT-Zellen überlebten wenige Zellen die Röntgenselektion. Diese Zellen wurden vermehrt und Überlebenskurven aufgenommen. (siehe Kapitel C, Punkt 1.1.).

5.3 Koloniebildungsfähigkeit von CHO xrs-Subklonen während einer Röntgen-Selektion

Die Anwendung der Röntgenselektion bei CHO-Zellen lieferte auch in Petrischalen, in die nur xrs-Mutanten plattiert worden waren, phänotypische Revertanten. Die Koloniebildungsfähigkeit von CHO xrs-2 Subklonen während einer Röntgenselektion wurden deswegen untersucht. In einer Petrischale wurden 10^6 Zellen verschiedener Subklone der Linie xrs-2 plattiert und nach 4 Stunden das erste Mal röntgenbestrahlt. Als Dosis wurden 2.0 Gy gewählt, da unter diesem Selektionsregime gerade 50 % anfänglich vorhandener Wildtypzellen überleben. Die Bestrahlung wurde alle 24 Stunden

wiederholt, 6 mal pro Woche. Nach jeder dritten Bestrahlung wurden drei Petrischalen trypsiniert, die Zellen jeweils in Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:1000 ausplattiert und im Brutschrank belassen, um die Koloniebildungsfähigkeit zu prüfen. Nach 10 Tagen wurden die Kolonien gefärbt und gezählt. Die Anzahl der entstandenen Kolonien, verrechnet mit der jeweiligen Verdünnung, ergab die Zahl der koloniebildungsfähigen Zellen in der Kultur.

5.4 Transfektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden 1×10^6 menschliche Zellen oder 2×10^5 CHO-Zellen in 9 cm Petrischalen plattiert. Nach der Vorschrift von GRAHAM und VAN DER EB (26) und den Modifikationen von WIGLER (112) wurden pro Petrischale 20 μg hochmolekularer DNA und 2 μg eines selektionierbaren Markers cotransfiziert.

Folgender Ansatz für die Bildung des Calcium-Phosphat-Präzipitats gilt für eine Petrischale: 20 μg der Carrier-DNA und 2 μg des Markerplasmids werden in 125 μl d.dest. Wasser gelöst und 125 μl 2.5 M CaCl_2 Lösung zugegeben. Die gut durchmischte Lösung wird in 250 μl 2 x HEPES-Puffer (pH 7.05) getropft und gut geschüttelt. Nach 20 Minuten ist die Bildung des Calcium-Präzipitats abgeschlossen.

Transfektion: Das Medium wird von den Zellen abgesaugt und pro Petrischale 500 μl der Präzipitationslösung auf die Zellen pipettiert und verteilt. Die Petrischalen werden für 10 Minuten in den Brutschrank zurückgestellt und danach 9 ml des Normal-Mediums aufgefüllt. Wegen der Toxizität von CaCl_2 wird bei Transfektionen mit AT Zellen das fertige Präzipitat mit der gleichen Menge Medium verdünnt und dann 1 ml auf die Zellen aufgetragen. 12 - 14 Stunden nach der Transfektion muß das Präzipitat durch Mediumwechsel entfernt werden. Am dritten Tag nach der Transfektion werden die Zellen trypsiniert und im Ver-

hältnis 1:3 oder 1:4 in Petrischalen mit Selektionsmedium verteilt. Das Selektionsmedium muß alle 3-4 Tage erneuert werden.

5.5. Selektionsmedien zur Isolierung marker-positiver

Transfektanten:

Resistenz gegenüber G418 (13): Transfektanten mit dem stabil integrierten Plasmid pSV2neo werden mit dem jeweiligen Normalmedium, das 500 µg/ml G418 enthält, selektioniert. Das Genetizin-Pulver wird in bidestilliertem, sterilem Wasser gelöst (100 mg/ml). Die Stammlösung wird bei 4°C aufbewahrt.

Resistenz gegenüber Hygromycin (9, 27): Diese Resistenz wird vom Plasmid py3 vermittelt. Transfizierte Zellen selektioniert man durch Anwesenheit von 400 µg/ml Hygromycin im Normalmedium. Die Stammlösung mit 100 mg Hygromycin/ml bidestilliertem Wasser wird bei 4°C aufbewahrt.

Resistenz gegenüber Schwermetallsalzen: Die Plasmide pMT_{II}-BPV(-) und pmMT_I vermitteln erhöhte Resistenz gegenüber Schwermetallionen. Dem Normalmedium werden zur Selektion der transfizierten Zellen CdCl₂ zur Endkonzentration von 20 µM und ZnCl₂ zu 70 µM zugegeben. Stammlösungen (10⁻² M) der beiden Salze werden angesetzt, steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

5.6. Methoden zur Extraktion von DNA

5.6.1 Extraktion hochmolekularer Placenta-DNA

Frische Placenta wird in flüssigem Stickstoff zum Transport eingefroren. Langsam im Eis aufgetaut, wird sie noch in gefrorenem Zustand in kleine Stücke geschnitten und 0° kalter Homogenisationspuffer zugegeben. Das Gewebe wird homogenisiert und durch 2 Lagen Verbandsmull filtriert. Von 30 ml Filtrat werden die Zellkerne abzentrifugiert (1°C, 5 Minuten, 1500g), in

10 ml Kernpuffer resuspendiert, nochmals abzentrifugiert, und in 1xTNE aufgenommen. Die Kerne lysiert man in 0.5% SDS und mit 2 mg Proteinase K wird über Nacht bei 37°C das Protein abgebaut. Nach dem Proteinverdau wird der Ansatz in einen siliconisierten Erlenmeyer Kolben (3 oder 5 l) gegeben, das gleiche Volumen TNE-gesättigtes Phenol eingefüllt und die Mischung vorsichtig für 1 Stunde geschwenkt. Nach der Zugabe des gleichen Volumens an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) werden die beiden Lösungsmittelphasen durch vorsichtiges Schwenken eine Stunde lang gemischt. Die untere, organische Phase wird mit einer 50 ml Vollpipette abgezogen und 1 Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1 Vol/Vol) ergänzt und das Extraktionsgemisch über Nacht bei RT leicht geschwenkt. Die Chloroform/Isoamyl Extraktion wird noch zweimal (jeweils 10 - 14 h) wiederholt. Die organische Phase darf bei der letzten Extraktion nicht mehr milchig-trübe sein. Die letzte Abtrennung der organischen Phase geschieht im Scheidetrichter, um das Chloroform möglichst quantitativ zu entfernen.

Mit dem doppelten Volumen an absolutem Alkohol (-20° C) wird die DNA nach vorsichtigem Durchmischen gefällt und über Nacht bei -20°C gelagert. Die gefällte DNA kann mit einem Glashaken abgehoben und zweimal mit 80% Alkohol (0.1 M NaAc) gewaschen werden. Gelöst wird die DNA in wenigen ml bidestilliertem Wasser, nachdem Reste organischer Lösungsmittel im Exsikator unter Vakuum ausgetrieben worden sind.

Die Konzentration der DNA wird photometrisch bei 260 nm bestimmt: 1 OD₂₆₀ entsprechen 50 µg DNA/ml. Die Menge Protein wird bei 280 nm gemessen. Das DNA/Protein-Verhältnis sollte 1.6 - 1.8 sein. Die Messung der Absorption bei 320 nm bestimmt den Anteil an Fremdmaterial und sollte 1-2% des DNA-Wertes nicht überschreiten.

5.6.2 DNA-Präparation aus Zellkulturen

Aus 80 - 90 % konfluent gewachsenen Zellkulturen in 9 cm Petrischalen wird das Medium abgesaugt und einmal mit 5 ml PBS gewaschen (71). In 5 ml eiskaltem PBS werden, mit einem sterilen Gummiwischer, die Zellen von 5 Petrischalen abgelöst und in ein 15 ml Corex-Glas gegeben und zentrifugiert (5 Minuten, 1500g, 4°C). Das Pellet wird in 10 ml Kernpuffer resuspendiert und die Zellen homogenisiert. Mikroskopisch wird die Freisetzung der Kerne kontrolliert.

Es folgen drei Zentrifugationsschritte (5 min, 1500g, 4°C) mit jeweiliger Resuspension in Kernpuffer. Zuletzt werden die Kerne in 10 ml 1 x TNE aufgenommen und in einen siliconisierten Erlenmeyerkolben gegeben. Der Proteinverdau wird durch Zugabe von 0.1 ml Proteinase K Lösung und 0.25 ml 20% SDS für mindestens drei Stunden, bei 37°C durchgeführt.

Die klare Lösung des Proteinase-K-Verdaus wird mit 10 ml TNE-gesättigtem Phenol versetzt und geschüttelt und mit 10 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) intensiv vermischt und zentrifugiert (1500g, 5 Minuten). Der Überstand (wässrige DNA-Phase) wird abgehoben. Die organische Phase (Chloroform, Phenol, Protein) bleibt zurück. Die Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion wird noch mindestens zweimal wiederholt, bis kein Protein mehr in der Interphase anfällt. Der Überstand wird mit 2 Volumeneinheiten absoluten Alkohols (-20°C) gemischt und 2 Stunden bei -70° oder über Nacht bei -20°C belassen. Durch eine Zentrifugation (15 Minuten, 8000g, 0°C) trennt man die DNA ab und wäscht das Pellet mit wenigen ml 80% Äthanol/0.1 M NaAc pH5 (-20°). Die DNA wird im Exsikator getrocknet und über Nacht in 1 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Die Konzentration der gelösten DNA wird photometrisch bestimmt (siehe Pkt. 5.6.1.).

5.6.3 HIRT-Extraktion niedermolekularer DNA

Zur Extraktion episomaler DNA muß ein Verfahren Verwendung finden, das die hochmolekulare chromosomale DNA von der niedermolekularen episomalen abtrennt. Das Protokoll geht auf HIRT zurück (35).

Die Petrischalen mit 90% konfluentem Zellrasen werden in TEN gewaschen. Die Lyse der Zellen erreicht man durch Überschichtung mit 2 ml Hirt-Lyse-Puffer für 10 Minuten bei RT. Danach wird die hochvisköse Lösung abgeschabt und mit 5 M NaCl die Lösung auf 1 M NaCl eingestellt. Die hochmolekulare DNA und die Proteine werden über Nacht bei 4°C gefällt. Das präzipitierte Material wird bei 15000g (4°C) abgetrennt und der Überstand mit Proteinase K (Endkonzentration 0.1 mg/10ml) für 3 Stunden bei 37°C verdaut. Zur Phenolextraktion durchmischt man den Proteinase-K-Verdau mit gleichem Volumen TNE-gesättigten Phenols. Nach der Zugabe von 1 Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wird intensiv geschüttelt, bevor die Phasen durch eine Zentrifugation (5 Minuten, 1500g) getrennt werden. Der Überstand wird nochmals mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, zentrifugiert (s.o.) und die DNA über Nacht (-20°C) durch Zusatz von zwei Volumenteilen Äthanol ausgefällt. Die präzipitierte DNA wird abzentrifugiert (30 Minuten, 4°C, 10000g), das Pellet mit 80% Äthanol gewaschen, im Exsikator getrocknet und die DNA in 1 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Die Bestimmung der DNA-Konzentration wird wie unter Punkt 5.6.1 ausgeführt.

5.6.4. Isolierung von Plasmiden

Plasmide werden nach der Methode der alkalischen Denaturierung (71) gewonnen. Die Bakterien, Träger des gewünschten Plasmids, werden auf einer Agar-Nährplatte mit 50 µg/ml Ampicillin

ausgestrichen, über Nacht kultiviert und eine Einzelkolonie in 2 ml L-Broth mit 50 µg/ml Ampicillin inokuliert. Nach 12 Stunden wird die Bakteriensuspension in 500 ml L-Broth mit Ampicillin (50 µg/ml) gegeben und in einen 5 l Erlenmeyerkolben bei 30°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wird abzentrifugiert (5 min, 3500g, 4°C) und in 9 ml Solution I resuspendiert. Mit 20 mg Lysozym wird die bakterielle Zellwand (30 min, 4°C) verdaut, bevor die Lyse der Bakterien mit 20 ml Solution II durchgeführt wird. Danach wird die Lösung neutralisiert, die Proteine mit 15 ml 3 M Na-acetat ausgefällt (60 Minuten, 4°C) und die Debris abzentrifugiert (20 Minuten, 15000g). Die DNA im Überstand wird mit doppeltem Volumenteil Ethanol präzipitiert.

Die ausgefallene DNA zentrifugiert man bei 10000g (10 min, 0°C), wäscht mit 80% Ethanol und löst das Pellet in 10 ml TE. Die nochmalige Fällung der DNA mit 25 ml abs. Ethanol, Zentrifugation und Lösen in TE befreit die DNA von einem Großteil des anhaftenden Proteins. Zu den 10 ml Lösung gibt man 9.54 g CsCl und 1 ml Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) und zentrifugiert in einem SW40-Rotor bei 32 krpm für 60 h (20°C) in einer Beckmann Ultrazentrifuge. Die im UV-Licht fluoreszierende DNA wird abgezogen und mit 2 Volumenteilen TNE versetzt. Das Ethidiumbromid wird mit CsCl-gesättigtem Propanol extrahiert. Nach einer weiteren Äthanol-fällung wird die Plasmid-DNA in 500 µl biDestilliertem Wasser gelöst.

5.6.5. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird mit der Hilfe von DE81-Papier durchgeführt (7). Nach dem Abbau von Plasmiden mit Restriktionsenzym, werden die DNA-Fragmente in 0.6 bis 1.0 %igen Agarosegelen getrennt. Nach Ethidiumbromidfärbung wird 2 mm vor der gewünschten DNA-Bande quer zur Laufrichtung das Gel

eingeschnitten und DE81-Papier in den Spalt gesteckt. Durch Elektrophorese läuft das gewünschte DNA-Fragment auf das Papier, wird dort adsorbiert und mit dem Papier herausgenommen. In 300 μ l 1 x TEN (pH 7.5) bei 65°C (15 Minuten) wird die DNA vom DE81-Papier gelöst. Durch Glaswolle wird die Lösung in ein Eppendorfröhrchen abzentrifugiert. Aus dem Filtrat wird mit wassergesättigtem Butanol das Ethidiumbromid aus der DNA entfernt. Die DNA wird mit 1 ml Ethanol (-20°C, über Nacht) ausgefällt und das Präzipitat in einer Eppendorf Zentrifuge für 20 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 80 %igem Ethanol gewaschen, im Exsikator getrocknet und in wenigen μ l bidestilliertem Wasser wieder aufgenommen.

5.7. Extraktion von RNA

Die Zellen werden in 9 cm Petrischalen bis zu 90-%iger Konfluenz kultiviert (71). Pro Ansatz wäscht man 5 Petrischalen mit eiskühlem PBS. In 5 ml Lysispuffer werden die Zellen der ersten Petrischale lysiert und mit einem Gummispatel die viskose Flüssigkeit in die zweite Petrischale transferiert usw., bis zur fünften Petrischale. Die hochmolekulare DNA zerkleinert man durch zweimaliges Aufziehen in einer 5 ml Pipette, bevor in einem vorgekühlten 500 ml Erlenmeyerkolben die Lösung mit einer Volumeneinheit Phenol und einer Volumeneinheit Chloroform kräftig geschüttelt wird. Die Phasen werden durch Zentrifugation (3500g, 4°C, 10 Minuten) getrennt. Der Überstand wird noch zweimal mit Chloroform extrahiert. In der wässrigen Phase werden 0.4 g CsCl/ml gelöst. Die Trennung der RNA von DNA geschieht über ein "Kissen" aus 2 ml 5.7 M CsCl in 0.1 M EDTA, auf das die Präparationslösung überschichtet wird und 16 Stunden bei 32 krpm und 20°C in dem SW40-Rotor einer Beckmann Ultrazentrifuge zentrifugiert wird. Danach wird der Überstand abgesaugt und das

RNA Pellet in 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH7.5) durch kräftiges Kratzen mit der Pipettenspitze gelöst. Äthanolpräzipitation, zentrifugieren (30 min, 10000g, 4°C), Waschen des Pellets mit 80% Äthanol (0.1 M NaAc, pH 5.0) und anschließendem Trocknen im Exsikator schließen sich an den Reinigungsprozeß an. Aufgenommen wird das Präzipitat in 1 ml 10 mM Tris HCl (pH 7.5). Die Konzentration wird photometrisch bestimmt ($1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g RNA/ml}$) und die Lösung bei -80°C gelagert.

5.8. Tagging von DNA

4 mg hochmolekulare Placenta DNA wird in einem Volumen von 15 ml mit 140 U Sau 3A partiell geschnitten. Die Inkubation bei 37°C für 10 Minuten liefert DNA-Fragmente von 50 kb Durchschnittsgröße. Behandlung mit Phenol, Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 Vol/Vol) und einer Ethanolpräzipitation ergibt nach vorsichtigem Lösen in 16 ml CiP Puffer das Substrat für die Dephosphorylierung. Mit Calf intestinal phosphatase (CiP, 1 U für 10 μg DNA) wird bei 37°C für 15 min in zwei Schritten dephosphoryliert. Erhitzen der Reaktionslösung auf 56°C für 15 Minuten destabilisiert die DNA-Enden, ohne das Enzym vollständig zu inaktivieren, und erleichtert so den Angriff auf die Phosphorsäurereste. Die Reaktion stoppt man durch Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten. Die DNA wird mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, in Ethanol präzipitiert und in 3.5 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen. 2.0 mg der DNA und insgesamt 740 μg BamHI-linearisiertem pSV2neo Plasmid werden in drei Reaktionsschritten ligiert. Katalysiert wird die Reaktion von 12000 U T4 DNA Ligase (BRL, 400000 U/ml) bei 15°C für jeweils 16 Stunden. Nach jedem Schritt wird die DNA auf einem 0.5%igen Agarosegel überprüft und auf die Überführung der Plasmid-Bande in eine hochmolekulare Form geachtet. Zusätzlich werden Southern

Blot Experimente durchgeführt: Nick-translatierte pSV2neo-Sequenzen hybridisieren intensiv mit allen Größenfragmenten der DNA.

5.9. Gelelektrophorese von Nucleinsäure

5.9.1. Gelelektrophorese von DNA

Für die Größentrennungen von DNA-Molekülen wird in einer horizontalen Gelapparatur ein 0.8% Agarosegel (in 1 x TAE) gegossen und mit 1 x TAE-Puffer beschickt (71). Das spezifische Gewicht der Proben wird mit Sample Buffer erhöht, und der beigegebene Farbstoff Methyleneblau zeigt die Lauffront der Elektrophorese. Von genomischer DNA werden pro Spur 10 µg aufgetragen, von linearisierten Plasmiden 200 µg oder wenige pg in Gelen für Southern Blot Hybridisierungen. Nach Beendigung der Trennung wird die DNA für 10 Minuten in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt. Im UV-Licht wird die Trennung kontrolliert und das Gel fotografiert.

5.9.2. Gelelektrophorese von RNA

Ein Slabgel wird aus hitzesterilisierten Glasplatten und SDS-gewaschenen Spacern zusammengesetzt (71). Ein Polyacrylamidkissen wird vorgelegt (8 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0.8%; 1 ml Ammoniumpersulfat 1%; 40 µl TEMED 10%), nach dessen Polymerisation ein 1% Agarosegel in 1 x PB eingefüllt und ein steriler Kamm eingesetzt wird. Die Elektrophorese erfolgt bei 100 Volt und 30 mA für 3 Stunden bei 4°C.

5.9.3. Probenbehandlung für RNA-Gele

Die Proben (10 µg total-RNA) werden über Nacht bei -80°C in Äthanol präzipitiert, abzentrifugiert und getrocknet (71). Die Pellets werden in 5 µl bidestilliertem Wasser wiederaufgenommen

und 20 μ l wasserfreie Denaturierungslösung zugegeben. Zur Denaturierung stellt man die Proben bei 50°C für 3 Minuten ins Wasserbad und kühlt danach auf Eis ab.

5.10. Nick-Translation von DNA-Proben

Die Verwendung eines Nick Translations Kits (Amersham Buchler, Braunschweig) vereinfacht die radioaktive Markierung von DNA Sequenzen (88). 200 ng der gewählten DNA werden in 28.5 μ l bidestilliertem Wasser gelöst, 10 μ l der Lösung I (Reaktionspuffer und Nucleotiden) und 5 μ l der Lösung II (DNAse I und DNA Polymerase I) zugegeben, bevor 6.5 μ l $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (spezifische Aktivität 400 Ci/mmol; 10 mCi/ml) zupipettiert werden und die Reaktion drei Stunden bei 15°C inkubiert wird. Die Reaktion stoppt man mit 50 μ l TNE.

Die markierte DNA trennt man mit Hilfe einer G50-Säule von den nicht eingebauten Nucleotiden. Das Säulenvolumen (2 ml) wird mit TE äquilibriert. Das Eluat sammelt man in 100 μ l Fraktionen, die in einem Szintillationszähler (1211 Minibeta, CKB) in Cerenkow-Counts bestimmt werden. Die Fraktionen maximaler Aktivität werden vereinigt und können als Proben in 2 - 3 Hybridisierungen verwendet werden.

5.11. Southern-"unblots"

Die Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten in Agarosegelen, kann ohne den Zwischenschritt des Transfers der DNA auf Nitrocellulosefilter, zur Hybridisierung mit spezifischen Proben verwendet werden (73). Dazu wird das Agarosegel, nach dem Färben mit Ethidiumbromid, auf Whatman-Filterpapier gelegt, in einem Gelrockner zuerst 60 Minuten bei RT, dann 60 Minuten mit eingeschalteter Heizung getrocknet. Die Verbindung des Papierfilters und des getrockneten Agarosegels wird während der Denaturierung der DNA

in 1 N NaOH (20 Minuten bei RT) gelöst. Das durchsichtige Gel quillt dabei ganz leicht auf und bekommt eine ledrige Konsistenz. Renaturiert wird 40 Minuten in Blot-neutral. Vorhybridisierung und Hybridisierung mit einer spezifischen Probe können analog den Methoden der Nitrocellulose-Blots durchgeführt werden. Die Matrix des getrockneten Gels ist in 4 x SSC bei 65°C, stabil.

5.12. Transfer von Nucleinsäuren auf Nitrozellulosefilter

Transfer von DNA auf Nitrocellulose-Filter ("Southern Blots") (73, 99). Die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente denaturiert man in 1 M NaOH für 20 Minuten und neutralisiert in Blot--neutral für 40 Minuten. Zur Anpassung des Gels an die Salzkonzentration während des Blottens wird das Gel in 20 x SSC gehalten.

Die Nitrozellulose läßt man erst in 6 x, dann in 20 x SSC quellen. Die Blotapparatur wird mit 20 x SSC gefüllt, das Gel auf mehrere Whatman-Filter gelegt, darüber der Nitrozellulosefilter und wiederum mehrere Whatman-Filter darüber. Mit einem Stapel Papierhandtücher ermöglicht man das Durchströmen des Puffers durch Gel und Nitrozellulose. Dabei wird die DNA auf das Nitrozellulosefilter transferiert und durch elektrostatische Wechselwirkungen dort festgehalten. Drei Stunden, oder über Nacht wird die Apparatur so belassen. Danach wird der Transfer der DNA durch Färbung des Gels kontrolliert. Der NC-Filter wird 2 Stunden bei 80°C im Vakuumofen gebacken, um die DNA kovalent daran zu binden.

Transfer von RNA auf Nitrocellulose-Filter ("Northern Blot") (73): Nach der Gelelektrophorese von RNA in vertikalen Slab-Gelapparaturen, wird die Blotapparatur wie oben beschrieben zusammengestellt und über Nacht der Transfer der RNA auf das NC-Filter durchgeführt. Die RNA wird durch zweistündiges Backen

im Vakuumofen bei 80°C kovalent an die Nitrozellulose gebunden. Die Kontrolle des Transfers der RNA erfolgt durch Färbung des NC-Filters in einer 0.05-%igen Lösung von Metylenblau in 5% Essigsäure für 10 Minuten. Die RNA hebt sich dunkelblau vom hellblauen Hintergrund ab.

5.13. Vorhybridisierung und Hybridisierung mit einer spezifischen Probe

In einem Vorhybridisierungsschritt werden sowohl bei RNA wie bei DNA-Blots die noch nicht besetzten Bindungsmöglichkeiten für Nucleinsäuren abgesättigt (73). Bei 65°C wird der NC-Filter in einem Gesamtvolumen von 200 ml 4 x SSC, 1 x Denhardt's Lösung und 3.3% Pippi eine Stunde unter mäßigem Schwenken inkubiert. Dieser Prozeß wird mit der gleichen Lösung wiederholt, jetzt aber mit 20 µg/ml Carrier DNA (Salmon Sperm DNA oder Kalbsthymus DNA). Danach werden die Filter in einen Plastiksack eingeschweißt. Nun werden 10 ml der Hybridisierungslösung aus 4 x SSC, 10 mM EDTA und 0.1% SDS eingefüllt. Die nick-translatierte DNA-Probe und 200 µg der Carrier-DNA werden 10 Minuten bei 100°C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und zur Hybridisierungslösung zugegeben. Bei 65°C im Schüttelwasserbad läßt man über Nacht hybridisieren.

Nichtspezifische Hybridisierungen werden in einer Reihe von Waschgängen mit fortschreitender Senkung des SSC-Gehaltes entfernt: Von 2 x SSC, über 1 x SSC, zu 0.5 x SSC, jeweils mit 0.1% SDS und 3.3% Pippi bei 65°C für 30-45 Minuten.

Stringentes Waschen wird in 0.1% SSC und 0.2% SDS für 45 Minuten bei 65°C durchgeführt. Noch im feuchten Zustand muß das Nitrozellulosefilter in einen Plastiksack eingeschweißt und einem Röntgenfilm exponiert werden. Es empfiehlt sich die Verwendung von Verstärkerfolie.

KAPITEL C: ERGEBNISSE TEIL IVersuche zur Klonierung eines Reparaturgens

Dem ersten Teil meiner Arbeit lag die Absicht zugrunde, ein menschliches Reparaturgen zu klonieren. Die mir zur Verfügung stehenden Mutanten von CHO-Zellen (xrs-2 und xrs-4) und immortalisierten Zellen eines Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia, sind hypersensitiv gegenüber ionisierenden Strahlen. Mit der Methode des DNA-vermittelten Gentransfers wird hochmolekulare DNA aus Normalfibroblasten, oder aus Placenta, mit einem Resistenzplasmid in die strahlensensitiven Zellen cotransfiziert. Die erste Selektion für Antibiotika-resistente Zellen isoliert stabile Transfektanten. In der anschließenden Röntgenselektion werden daraus strahlenresistente Klone isoliert. Sekundäre und tertiäre Runden des Transfektions/Selektions Schemas reduzieren die ursprünglich transfizierte hochmolekulare DNA auf die Sequenzen eines Reparaturgens. Für die Reisolierung der komplementierenden DNA muß dabei folgendes beachtet werden: In CHO-Transfektanten ist vor dem Hintergrund der CHO-DNA die transfizierte menschliche DNA durch die spezifischen hochrepetitiven Alu-Sequenzen nachweisbar. Bei den menschlichen AT-Zellen muß jedoch die hochmolekulare menschliche DNA mit einem "tag" spezifischer nicht-menschlicher DNA kovalent versehen werden, um ein Wiederfinden der Sequenzen in der DNA der Transfektante zu ermöglichen.

Vorbedingung zum eigentlichen Klonierungsexperiment ist die genaue Kenntnis des Überlebens der Ausgangslinien und ihrer Subklone nach γ - und Röntgenbestrahlung. Es muß dabei gezeigt werden, daß kein Unterschied im Überleben der Zellen besteht, wenn zur Bestrahlung, statt einer Co- γ -Quelle, eine Röntgen-Röhre verwendet wird. Dies ist nötig, da, wegen technischer Gegeben-

heiten, die Selektion der strahlenresistenten Klone in einer Röntgen-Apparatur geschehen muß. Wegen des geringeren technischen Aufwandes werden die Überlebenskurven nach Bestrahlung in einer Co- γ -Quelle ermittelt.

1. Konstanz der Zellcharakteristika nach verschiedener Behandlungen der Zellen

1.1. AT-Zellen: Konstanz der γ -Überlebenskurven nach Sub- klonierung, Transfektion und chronischer Bestrahlung

Menschliche immortalisierte Normalfibroblasten GM637 überleben, bezüglich der Endpunktsbestimmung des Kolonietests, die ionisierende Strahlung einer Co- γ -Quelle, sehr viel besser als die reparaturdefizienten immortalisierten Zellen eines AT-Patienten AT5BI-VA ($D_{0AT} = 0.9$ Gy, $D_{0GM} = 2.2$ Gy). Die γ -DEK der Stammlinien GM637 und AT5BI-VA sind in Abbildung 1 (siehe nächste Seite) wiedergegeben, ebenso die des AT-Subklons ATs4 und dessen pSV2neo Transfektanten ATsneo6 und ATsneo8.

In seinem Überleben nach Röntgenbestrahlung zeigt der Subklon ATs4 keinen Unterschied zur Co- γ -DEK. Damit ist gezeigt, daß, unter unseren Bedingungen, die ionisierenden Strahlen einer Co- γ -Quelle und die ionisierenden Strahlen einer Röntgenröhre für das Überleben der Zellen identische Effekte haben.

Mit Hilfe einer Röntgen-Selektion werden später aus einem Rasen von AT-Zellen wenige strahlenresistente Normalzellen isoliert (siehe Kapitel B, Pkt. 5.2.). In einem Röntgen-Selektionssystem wurden AT-Zellen täglich mit 0.75 Gy bestrahlt und die Behandlung 20-mal wiederholt. Von 10^8 plattierten AT-Zellen überlebten wenige Zellen die Selektion. Die beiden Klone ATxssl und ATxss5 wurden vermehrt, einem γ -Überlebenstest unterworfen und die Werte in Abbildung 1 eingetragen. Trotz 20-maliger Bestrahlung mit 0.75

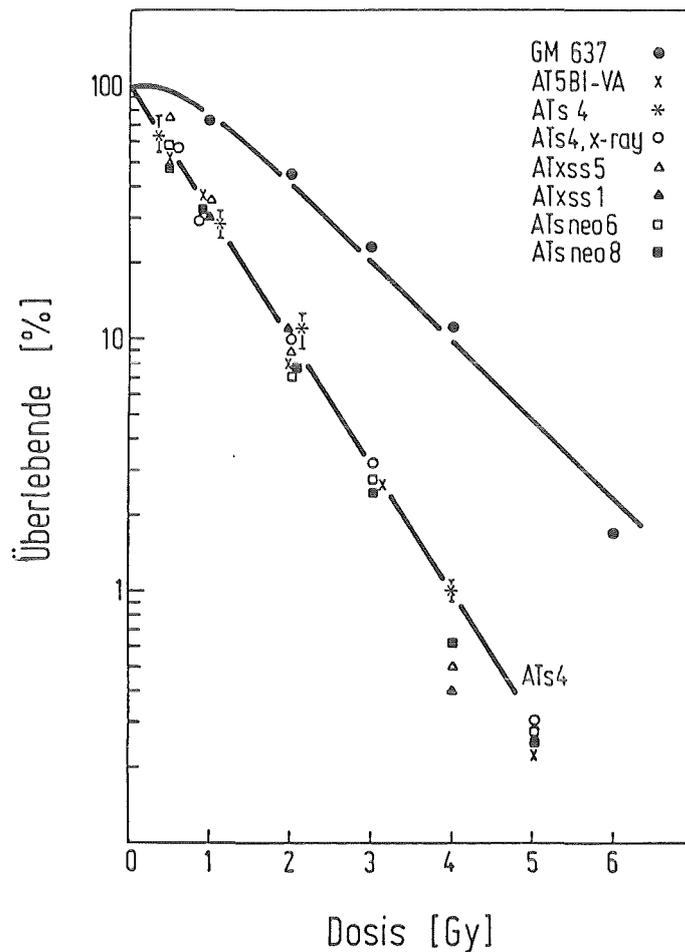


Abbildung 1: Überlebenskurven nach ^{60}Co - γ -Bestrahlung von menschlichen immortalisierten Zelllinien und ihren Subklonen. Normalfibroblasten GM637 (●); AT5BI-VA (x) und ihr Subklone ATs4 (*) nach ^{60}Co - γ -Bestrahlung, und ATs4 nach Röntgenbestrahlung (o); ATxss5 (△) und ATxss1 (▲) sind überlebende Klone einer Röntgenselektion und ATs4neo6 (□) und ATs4neo8 (■) G418-resistente Transfektanten.

Gy sind keine Veränderung im Überleben festzustellen. Ein langandauerndes Bestrahlungsregime produziert somit keinen revertierten Phänotyp.

Verschiedene Weisen des Subklonierens der AT5BI-VA Zelllinie führen nicht zu Zelllinien, die sich in der γ -DEK von der Stamm-
linie unterscheiden. Selbst die Überlebenden chronischer

Röntgenbestrahlung haben keinen veränderten Phänotyp. Damit sind wichtige Vorbedingungen für die Experimente zum Transfer eines menschlichen Reparaturgens erfüllt.

1.2. CHO Zelllinien: Konstanz des Phänotyps von Wildtyp und xrs-Mutanten

Die experimentellen Einzelschritte auf dem Weg zur Klonierung eines Reparaturgens dürfen nicht per se das Überleben der Zellen gegenüber Röntgenstrahlen verbessern. Es gilt also nachzuweisen, daß nach Subklonierung und Transfektion der CHO Stammlinien xrs-2 und xrs-4 ihre charakteristische Strahlensensitivität erhalten bleibt. Auch die Stabilität des Wildtyps Kl-2 bei Mehrfachbestrahlungen muß gesichert sein.

1.2.1. γ -Überlebenskurven der CHO-Linien, ihrer Subklone und Transfektanten

In Abb. 2A ist das Überleben des Wildtyps Kl-2 ($D_0 = 3.05$ Gy) und der Mutanten xrs-2 ($D_0 = 1.0$ Gy) und xrs-4 ($D_0 = 0.5$ Gy) nach γ -Bestrahlung eingetragen. Die beiden Mutanten unterscheiden sich vor allem bei niederen Dosen in ihren γ -Überlebenskurven.

Die γ -Überlebenskurven von Subklonen der CHO Stammlinien und ihrer Transfektanten sind in Abbildung 2B zusammengefaßt. Subklone der Mutantenlinie von xrs-2 (Bc2, Bc3) haben verglichen mit der Stammlinie unveränderte Strahlensensitivität. Der Subklon Bc2 wurde mit dem Plasmid pSV2neo transfiziert. Die G418-resistenten Transfektanten Bc2neo1, Bc2neo3 und Bc2neo4 behalten nach dem Gentransfer und der Selektion auf Antibiotika-Resistenz den strahlensensitiven Phänotyp.

Die isolierten Subklone der Mutante xrs-4, bezeichnet als Ic1, Ic2 und Ic4, liegen im Überlebenstest nach γ -Bestrahlung in der

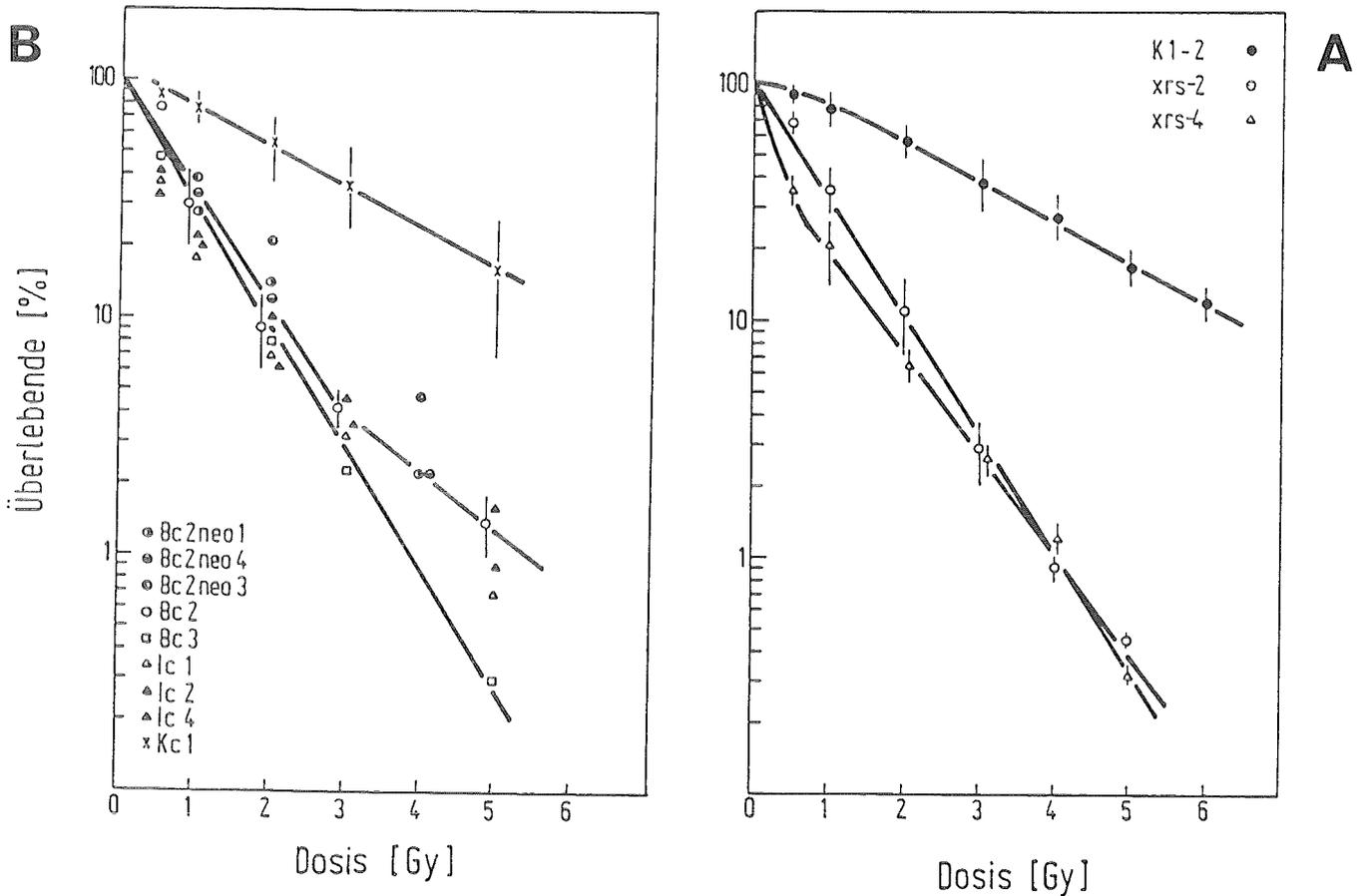


Abbildung 2 A: Überlebenskurven nach ^{60}Co - γ -Bestrahlung von CHO Zelllinien: Wildtyp K1-2 (\bullet); Strahlensensitive Mutanten xrs-2 (\circ) und xrs-4 (Δ).

Abbildung 2 B: Überlebenskurven von CHO-Zelllinien nach ^{60}Co - γ -Bestrahlung; Kc1 (\times) ein Subklon des Wildtyp K1-2; Ic1 (Δ), Ic2 (\blacktriangle), Ic4 (\triangle) sind Subklone von xrs-4; Bc2 (\circ), Bc3 (\square) sind Subklone von xrs-2; Bc2neo1 (\circ), Bc2neo3 (\circ), Bc2neo4 (\circ) sind G418-resistente Transfektanten von Bc2.

Schwankungsbreite der Stammlinie. Nur die Bestrahlung mit 5.0 Gy zeigt größere Abweichungen.

Ein Subklon des Wildtyps K1-2 (Kc1) überlebt ionisierende Strahlung genauso wie Zellen der Stammlinie.

Als Resume dieser Vorexperimente kann festgestellt werden, daß die geplanten Teilschritte auf dem Weg zur Klonierung eines Reparaturgens (Subklonierung, Transfektion und Selektion für Antibiotika-Resistenz) den strahlensensitiven Phänotyp der CHO Mutanten nicht verändern.

1.2.2. Überleben des CHO Wildtyps bei Doppelbestrahlungen

Ein Röntgenselektionsregime beinhaltet eine lange Folge täglich wiederholter Bestrahlungen. Deswegen wurde das Überleben von CHO

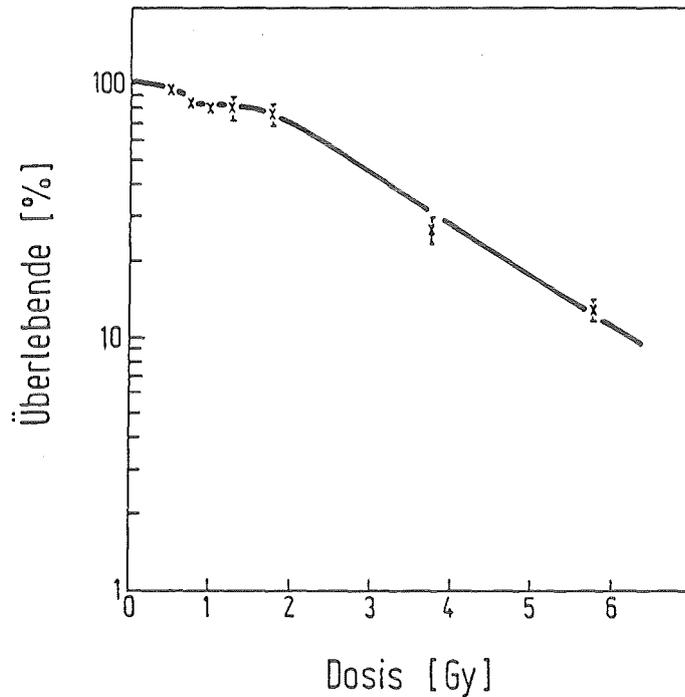


Abbildung 2 C: Überlebenskurve des CHO-Wildtyps nach Doppelbestrahlung in einer ^{60}Co - γ -Quelle. 5 Stunden nach der ersten γ -Bestrahlung mit 0.75 Gy erfolgen zweite Bestrahlungen mit steigender Dosis.

Wildtypzellen nach zwei kurz aufeinander folgenden Bestrahlungen untersucht. Fünf Stunden nach der ersten γ -Bestrahlung mit 0.75 Gy werden die Zellen noch einmal mit verschiedenen Dosen bestrahlt.

In Abbildung 2 C ist das Überleben des CHO Wildtyps nach γ -Doppelbestrahlung dargestellt. Deutlich folgt der ersten Schulterkurve eine zweite. Nach fünf Stunden sind die Reparaturprozesse abgeschlossen, die überlebenden Zellen

"erinnern" sich nicht mehr an die erste Strahlung und reagieren wie unbehandelte Zellen. Das Überleben der Zellen ist wegen der Ausbildung der zweiten Schulterkurve verbessert, verglichen mit Zellen nach Einzelbestrahlung mit gleicher Dosis. Der Wildtyp wird also ein Röntgen-Selektionsregime, bestehend aus einer langen Folge täglich wiederholter Bestrahlungen, mit guten Chancen überleben.

1.2.3. Das Überleben von phänotypischen Revertanten nach ionisierender Strahlung

Mit einer Frequenz von ca. 10^{-6} entwickeln die Mutanten xrs-2 (siehe Kapitel C, Pkt. 2.2.2.) den revertanten Phänotyp und überleben so die Röntgenselektion. γ -Überlebenskurven solcher Revertanten sind in Abb. 2 D wiedergegeben (siehe nächste Seite). Der revertante Phänotyp ist unter normalen Kulturbedingungen auch nach 10 Wochen stabil. Die Revertanten unterscheiden sich in ihren γ -DEK nicht vom Wildtyp.

Die Reversion der strahlensensitiven CHO Zellen zum Wildtyp ist eine Störungsquelle bei dem Versuch ein Reparaturgen zu klonieren. Durch den Transfer heterologer menschlicher DNA in die CHO xrs-Mutanten sollten die "Transfektanten" von den "Revertanten" durch den Nachweis spezifischer menschlicher Sequenzen unterscheidbar sein. Im folgenden werden Versuche beschrieben, die die Reversionsfrequenzen der strahlensensitiven Zellen quantifizieren. Benutzt wird dazu ein Röntgenselektionssystem, das wenige Wildtyp Zellen aus einer großen Anzahl von Mutanten zu isolieren vermag.

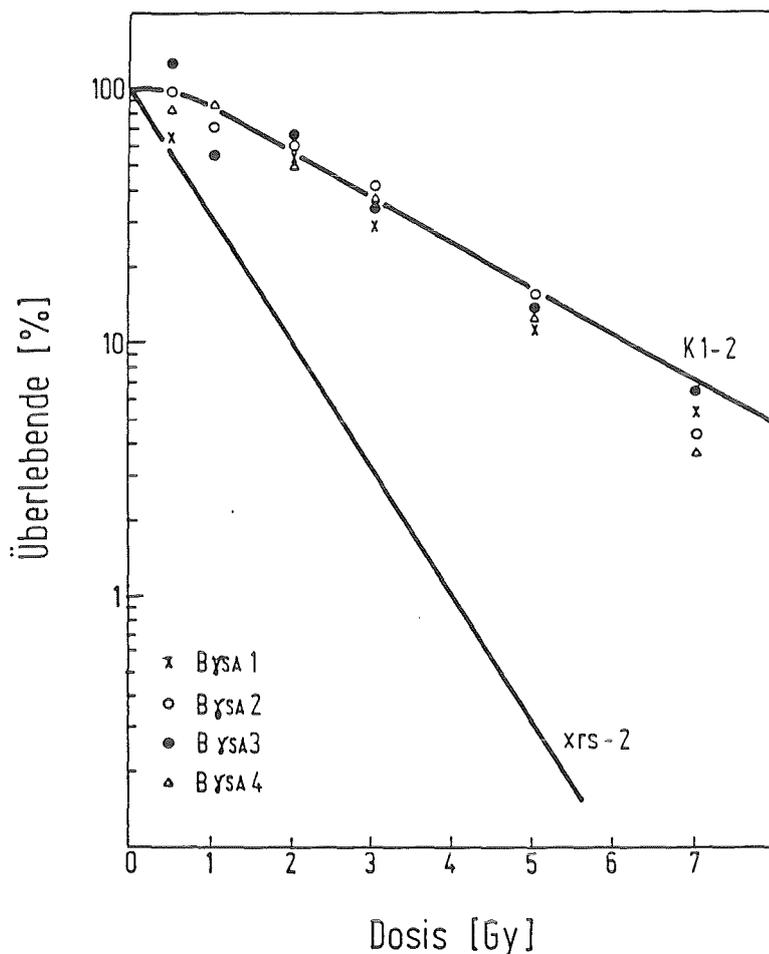


Abbildung 2 D: Überlebenskurven nach ^{60}Co - γ -Bestrahlung von Revertanten der CHO Zellelinie xrs-2 (Subklon Bc2). Die Überlebenskurven des Wildtyps K1-2 und der Mutante xrs-2 sind eingetragen (durchgezogene Linien).

2. Röntgen-Selektion

Auf der Basis der γ -Überlebenskurven ist es möglich, ein Röntgen-Selektionsprotokoll aufzubauen, mit dessen Hilfe wenige Wildtypzellen aus einer großen Zahl strahlensensitiver Mutanten isoliert werden können. Im folgenden werden die Ergebnisse verschiedener Protokolle der Röntgenselektion für die menschlichen und für die CHO-Zelllinien getrennt aufgeführt.

2.1 Anwendung der Röntgenselektion bei menschlichen

Fibroblasten

2.1.1. Koloniebildungsfähigkeit von AT-Zellen und Normal- fibroblasten während einer Röntgenselektion

In 9 cm Petrischalen werden 10^6 Ataxia-Zellen plattiert. Parallel werden 100 GM637 Normalfibroblasten auf 3×10^5 NFB bestrahlte feeder-layer Zellen gesät. In einem milden Selektionsregime sollen pro Bestrahlung 50% der AT-Zellen getötet werden. Dies entspricht einer Dosis von 0.6 Gy. Die erste Bestrahlung erfolgt 5 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen. 24 Stunden später folgt die zweite Bestrahlung und in täglichem Abstand alle weiteren. Um weniger als eine überlebende ATs4-Zelle aus 10^6 Zellen zu erhalten, muß 24mal bestrahlt werden (Modellrechnung siehe unten). Nach der 14ten Bestrahlung der ATs4-Zellen werden drei Petrischalen unter Normalkulturbedingungen weiterkultiviert, um die Koloniebildung der überlebenden ATs4-Zellen zu ermöglichen. Genauso wurde nach der 16., 18., 20., 22., und 24. Bestrahlung verfahren. Nach 10 bis 14 Tagen unter Normalkulturbedingungen werden die Petrischalen gefärbt und die Kolonien gezählt. Von 100 plattierten GM637 Normalfibroblasten entstehen, trotz dieser chronischen Bestrahlung, etwa 70 Kolonien, das sind 80% der unbestrahlten Kontrollen. Die GM637 Zellen teilen sich während der Prozedur und bilden große Kolonien. In Abbildung 3 ist die Koloniebildungsfähigkeit der ATs4-Zellen dargestellt. Im beobachteten Zeitraum nimmt sie ständig ab (lang-gestrichelte Linie) und schneidet die Abszisse, gleich 1 Kolonie aus 1 überlebenden ATs4-Zelle, nach 23 Bestrahlungen. Die Kolonienzahl der GM637 Normalfibroblasten (kurz-gestrichelte Linie) bleibt dagegen unverändert.

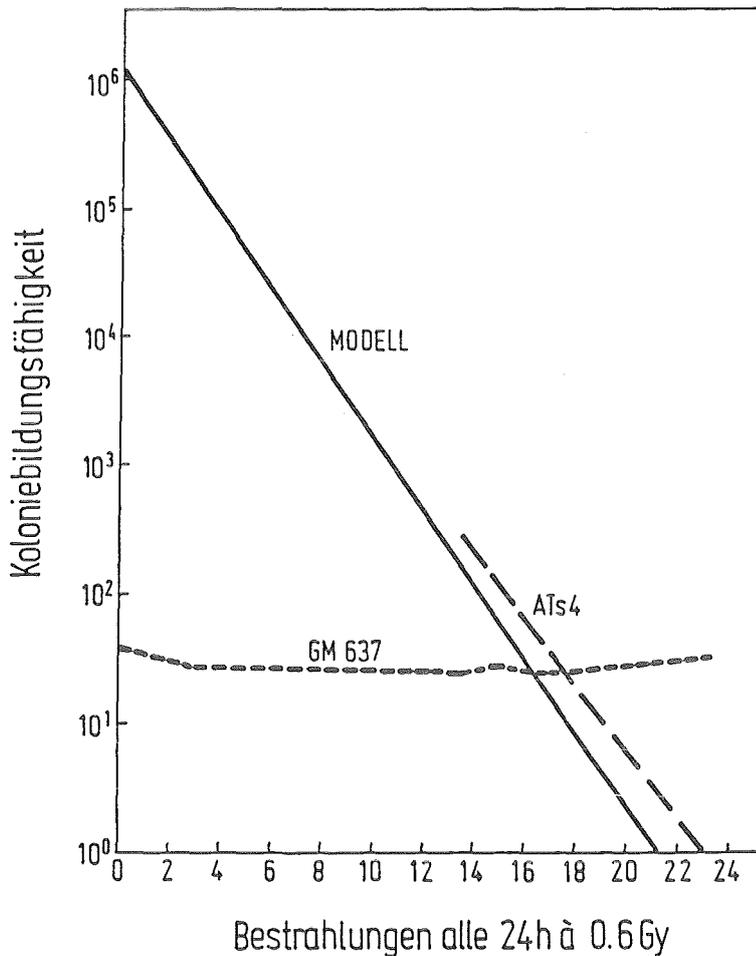


Abbildung 3: Koloniebildungsfähigkeit von ATs4-Zellen und Normalfibroblasten, GM637, während einer Röntgenselektion mit täglicher ⁶⁰Co- γ -Bestrahlung 0.6 Gy über einen Zeitraum von 24 Tagen. (Erklärung der Modellrechnung siehe Text).

Eine Modellrechnung bezüglich der ATs4 Zellen, beinhaltet neben der Abtötungsrate von 50% (bei Bestrahlung mit 0.6 Gy) auch die Annahme, daß sich, während des Bestrahlungszeitraumes, die Zellen nicht teilen. Man errechnet 21 Bestrahlungen, um von 10⁶ ATs4-Zellen eine Überlebende zu isolieren (durchgezogene Linie). Die experimentellen Daten ergeben 23 Bestrahlungen, um nur eine AT-Zelle mit der Fähigkeit zur Koloniebildung überleben zu lassen.

Die Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit der AT-Zellen

während eines Selektionsregimes ergibt, daß sich die AT-Zellen in den täglichen Intervallen nicht teilen. Die reparaturkompetenten GM637 Normalfibroblasten, mit vergleichbarer Generationszeit von 20 bis 22 Stunden, teilen sich dagegen weiter und bilden während der Röntgenselektion großflächige Kolonien.

2.1.2. Das Überleben von GM637 Zellen in Abhängigkeit vom Röntgenselektions-Regime

Ausgehend von dem oben erläuterten Bestrahlungsprotokoll erreicht man eine wesentliche Verkürzung der Zahl der Bestrahlungen durch Erhöhung der Strahlendosis, wie sich dies auf das Überleben des

Dosis [Gy]	Zahl der nötigen Bestrahlungen	Oberlebende des WT [% PE]
0,5	25	92
0,6	23	82
0,75	11	42
1,05	14	54
1,25	14	42
1,35	14	35
1,53	7	21
1,7	8	21
1,8	7	18
2,0	7	13
2,2	6	11

Tabelle 1: Überleben von GM637 Normalfibroblasten nach verschiedenen Röntgenselektionsprotokollen. Auf NFB feeder-layer Zellen werden 100 GM637 Zellen plattiert und einer Röntgenselektion unterworfen. Der Endpunkt der Selektion ist erreicht, wenn, in parallelen Bestrahlungen von 10^6 ATs4 Zellen, weniger als 1 ATs4-Zelle überlebt. Die Bestrahlungen erfolgen täglich mit der ausgewiesenen Dosis. Die entstandenen Kolonien der GM637 Zellen werden gefärbt, gezählt und in Prozent der nichtbestrahlten Kontrollen angegeben.

Wildtyps auswirkt, zeigen die Ergebnisse in Tabelle 1.

Der Endpunkt einer Röntgenselektion ist definiert als die Anzahl von Bestrahlungen, um, bei einer gegebenen Dosis, 10^6 AT-Zellen zu inaktivieren (hier experimentell ermittelt), daß, je höher die Dosis, desto früher wird der "Endpunkt der Selektion" erreicht. Gleichzeitig sinkt mit steigender Dosis das Überleben von GM637 Normalfibroblasten. Die Sprünge in der Spalte der Endpunktsbestimmung resultieren aus der geringen Anzahl unabhängiger Experimente (2 - 3) und aus der Tatsache, daß manche Versuche erst nach Monaten wiederholt wurden und das Kulturmedium und die Raumtemperatur bei der Bestrahlung variierten. Bestrahlungen mit mehr als 1.05 Gy reduzieren das Überleben des Wildtyps auf weniger als 50 %.

2.1.3. Spontane Reversionsrate von ATs4 Zellen

Die Transfektion eines DNA-Reparaturgens in ATs4-Zellen mit Hilfe genomischer DNA ist wegen der großen Verdünnung des single-copy Gens in der DNA, ein sehr seltenes Ereignis. Die Komplementation des AT-Defektes wird nur in wenigen Transfektanten gelingen. Die spontane Reversionsrate der AT-Zellen zum strahlenresistenten Wildtyp ist deswegen ein kritisches Maß für meine Transfektionsexperimente.

10^6 ATs4-Zellen werden in 9 cm Petrischalen plattiert und 5 Stunden später mit einer Dosis von 1.25 Gy bestrahlt. Einen Tag später wird die Röntgenbestrahlung wiederholt. Die Dosis von 1.25 Gy wird gewählt, da die einmalige Anwendung nur 33% ATs4-Zellen überleben läßt und somit die Zahl der notwendigen Bestrahlungen auf 18 reduziert. Außerdem bietet dieses Selektionsregime dem Wildtyp etwa 50% Überlebenschancen. Nach 18 täglichen Bestrahlungen werden die Petrischalen noch zwei Wochen lang unter Normalbedingungen kultiviert.

Insgesamt wurden 5×10^8 ATs4 Zellen betrachtet, ohne daß jemals ein revertierter Phänotyp isoliert wurde. Das heißt, die spontane Reversionsrate muß unter 5×10^{-8} pro Zelle und Generation liegen, wenn wir annehmen, die mögliche Reversion wäre in der letzten Zellteilung vor der Bestrahlung entstanden. Hinzu kommt, daß eine lange Behandlung mit Röntgenstrahlen die Reversionsfrequenz nicht beeinflusst.

2.2. Anwendung der Röntgenselektion bei CHO Zellen

Auch für das CHO-System mußte eine Röntgenselektions-Methode gefunden werden, die aus einer großen Zahl reparaturdefizienter Mutanten-Zellen, wenige Wildtyp-Zellen isoliert.

2.2.1. Überleben des CHO-Wildtyps unter verschiedenen Röntgenselektions-Protokollen

Zuerst wurde das Überleben des CHO Wildtyps Kl-2 in verschiedenen Röntgen-Selektionen untersucht. Wegen der guten Plating efficiency (PE) der CHO Zellen von 80 - 90%, erübrigt sich die Verwendung von feeder-layer Zellen.

100 CHO Kl-2 Zellen werden in 9 cm Petrischalen plattiert und nach 5 Stunden zum ersten Mal bestrahlt. Im Abstand von 24 Stunden folgt die zweite Bestrahlung und so fort. Jeden 4. Tag wird das Medium gewechselt. Bis zu der Einzeldosis von 2.2 Gy werden die Kulturen 20-mal bestrahlt, bei höheren Dosen 10 - 15 mal. Die gewachsenen Kolonien werden gefärbt und gezählt. In Tabelle 2 ist das Überleben der Kl-2 Wildtyp Zellen in Abhängigkeit von der Dosis der Röntgenselektion, in Prozent der nichtbestrahlten Kontrollen, angegeben.

Es zeigt sich, daß mit steigender Dosis das Überleben des Wildtyps sinkt. Bis zu einer täglichen Dosis von ca. 2.0 Gy überleben mehr als 50% der Wildtyp Zellen die Selektion. Da sich

die Zellen zwischen den Einzelbestrahlungen teilen, hinterläßt die erste Bestrahlung die Hauptwirkung bei der Reduzierung des Überlebens der Zellen.

Bestrahlungsdosis [Gy]	Überleben der CHO K1-2 [% PE]
0,9	93 ± 8
1,0	81 ± 1
1,1	73 ± 1
1,7	60 ± 13
1,8	58 ± 12
2,0	53 ± 7
2,2	47 ± 14
3,0	36
4,0	21
5,0	9

Tabelle 2: Überleben von CHO Wildtyp Zellen K1-2 in verschiedenen Röntgenselektionen. 100 K1-2 Zellen werden plattiert und nach 5 Stunden das erste Mal mit der angegebenen Dosis bestrahlt. 24 Stunden später folgt die zweite Bestrahlung mit gleicher Dosis. Die gefärbten Kolonien werden gezählt und in Prozent der nichtbestrahlten Kontrollen angegeben.

Im Gegensatz zu den Experimenten in Tabelle 1 wurde im CHO-System darauf verzichtet einen "Endpunkt der Röntgenselektion" zu definieren. Wegen der Reversion von xrs-Mutanten zum Wildtyp ist eine solche Bestimmung unmöglich (siehe Kapitel C, Punkt 2.2.2.). Auffällig ist beim Vergleich der Tabelle 1 und 2, daß im CHO-System eine erheblich höhere Dosis bei den Einzelbestrahlungen möglich ist, bevor 50% der Wildtypzellen inaktiviert werden (2.0 Gy), als im menschlichen System (1.05 Gy). Hier findet die höhere Strahlenresistenz der CHO K1-2 Wildtyp Zellen ihre Entsprechung.

2.2.2. Reversionsraten der CHO xrs-Mutanten

Zu Ermittlung der Reversionsraten der CHO xrs-Mutanten zum radioresistenten Wildtyp werden 10^6 Mutantenzellen plattiert und

Klone	Rev. Rate
Bc1	$2 - 60 \times 10^{-6}$
Bc3.	43×10^{-6}
Bc4	21×10^{-6}
Bc5	$4 - 30 \times 10^{-6}$
Bc7	7×10^{-6}
Bc8	$0,4 \times 10^{-6}$
Bc9	10×10^{-6}
Bc10	34×10^{-6}
Bc11	$0,4 \times 10^{-6}$
Bc12	$7 - 90 \times 10^{-6}$
Bc17	8×10^{-6}
Ic1	2×10^{-6}
xrs-2	400×10^{-6}
xrs-4	200×10^{-6}

Tabelle 3: Reversionsraten von CHO xrs-Zellen. 10^6 Zellen werden plattiert und nach 5 Stunden mit einer Dosis von 2.0 Gy Röntgen-bestrahlt. Alle 24 Stunden werden die Bestrahlungen wiederholt, insgesamt 20-mal. Die Revertanten-Kolonien werden gefärbt, gezählt und die Reversionsrate berechnet. Subklone der Mutante xrs-2 sind mit dem Präfix "Bc" versehen. Der Subklon Ic1 entstammt der xrs-4 Zelllinie.

einem Selektionsregime unterworfen mit 20 täglichen Bestrahlungen mit einer Dosis von 2.0 Gy. Die erzielten Werte sind in Tabelle 3 zusammengefaßt).

Die Reversionsraten der röntgensensitiven Mutanten zum Wildtyp sind fast ausnahmslos größer als 10^{-6} . Obwohl sämtliche Klone mit

dem Präfix "Bc" Subklone der Stammlinien xrs-2 sind, variieren die Reversionsraten erheblich. Die niedrigste Reversionsrate wird für die Klone Bc11 und Bc8 zu 4×10^{-7} pro Zelle und Generation bestimmt, wenn man die Reversion in der letzten Zellteilung vor dem Experiment annimmt. Der Durchschnittswert für alle xrs-2 Subklone liegt bei 5×10^{-6} . Man findet Unterschiede der Reversionsraten nach mehreren Experimenten, von mehr als einer Zehnerpotenz bei den Subklonen Bc1, Bc5 und Bc12. Diese stark schwankenden Werte in den genannten Subklonen resultieren aus monatelang auseinanderliegenden Experimenten, bei ständiger Kultivierung der Zellen. Die höchsten Reversionsraten zeigen die Stammlinien xrs-2 und xrs-4.

Die Reversionen sind spontane Ereignisse der Zellen in Kultur und nicht durch die Bestrahlungen induziert. Das Selektionsregime isoliert bereits vorhandene Revertanten aus der Kultur. Der revertierte Phänotyp scheint einen geringen Wachstumsvorteil gegenüber den Mutantenzellen zu besitzen (Generationszeit für Kl-2 Zellen 11 Stunden, für xrs-2 Zellen 12 Stunden; Daten nicht gezeigt). Mit Dauer der Kultivierung reichert sich somit die Revertante in der Kultur an. Die Zusammenstellung von Experimenten zur Röntgenselektion in Tabelle 4 beweist diesen Sachverhalt. Zugrunde liegen folgende Experimente: 10^6 xrs-2 Zellen werden täglich mit 1.7, 2.0 oder 2.2 Gy bestrahlt. Nach 18 Bestrahlungen werden die gewachsenen Kolonien gefärbt und gezählt. Setzt man die Zahl der Kolonien bei 1.7 Gy zu 100% und berechnet davon ausgehend die Werte für 2.0 und 2.2 Gy, erhält man das angegebene "Überleben". Übertragen in die γ -DEK der Abb. 2A erhält man eine Gerade mit einer Steigung entsprechend der des CHO-Wildtyps. Bei einer Bestrahlung von 2.2 Gy überleben 50% des Wildtyps das Selektionsregime. Von 10^6 plattierten xrs-2 Zellen wachsen ca 400 Revertantenkolonien. Daraus läßt sich berechnen,

daß die Stammkultur xrs-2 einen Anteil von 0.08% Wildtypzellen enthält.

Bestrahlungsdosis während der Selektion [Gy]	Zahl der isolierten Revertanten	"Überlebende" bezüglich der Bestrahlung mit 1,7 Gy
1,7	440 ± 50	100 %
2,0	410 ± 55	99 %
2,2	320 ± 40	73 %

Tabelle 4: Reversionsraten der CHO Zelllinie xrs-2 in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis. 10^6 xrs-2 Zellen werden plattiert, nach 5 Stunden der ersten Bestrahlung einer Röntgenselektion der jeweils angegebenen Dosis ausgesetzt. Die isolierten Revertanten werden gezählt. Die Anzahl der Revertanten bei der niedrigsten Dosis wird als "100 % Überleben" gesetzt.

Für das Experiment zur Transfektion und Klonierung eines DNA-Reparaturgens mit Hilfe des CHO-Systems bedeuten diese Ergebnisse folgendes: Schon bei der Transfektion der CHO xrs-Mutanten mit hochmolekularer menschlicher DNA und einem Resistenzplasmid befinden sich phänotypische Revertanten in dem Ansatz. Mit geringer Wahrscheinlichkeit werden diese Zellen transfiziert (10^{-4} pro Zelle) und als Antibiotika-resistente Klone selektioniert. Spontane Reversion findet weiterhin auch unter den Tranfektanten statt. Die Röntgenselektion führt zur Isolierung des revertanten Phänotyps.

Eine Unterscheidung von echten Transfektanten und spontanen Revertanten ist erst nach sekundären und tertiären Runden der Transfektion und Selektion möglich, wenn in den Transfektanten die komplementierende, menschliche DNA nachgewiesen wird.

2.2.3. Koloniebildungsfähigkeit von CHO xrs-2 Subklonen während der Röntgenselektion

Die Koloniebildungsfähigkeit einiger CHO xrs-2 Subklone während einer Röntgenselektion wurde untersucht. Dazu werden 10^6 Zellen in 9 cm Petrischalen plattiert und nach 5 Stunden zum ersten mal mit 2.0 Gy Röntgenbestrahlt. Die Bestrahlungen werden alle 24 Stunden wiederholt, sechs mal pro Woche. Nach der jeweils 3., 5., 7., 9., 11. und 13. Bestrahlung werden die Petrischalen

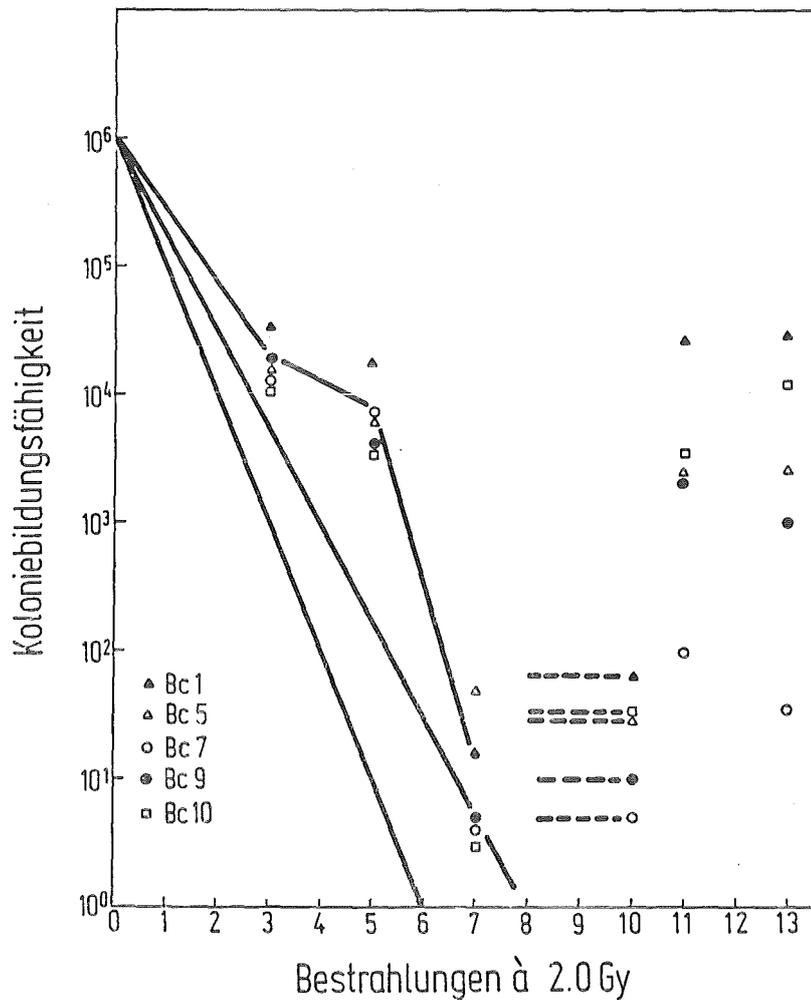


Abbildung 4: Koloniebildungsfähigkeit von xrs-2 Subklonen während einer Röntgenselektion mit täglicher ^{60}Co - γ -Bestrahlungen 2.0 Gy über einen Zeitraum von 13 Tagen.

trypsiniert und in einer Verdünnungsreihe (1:10; 1:100; 1:1000) ausplattiert. Die Anzahl der nun wachsenden Kolonien gibt

Auskunft über die Zahl der Zellen in der bestrahlten Kultur, die noch Koloniebildungsfähigkeit besitzen.

In Abbildung 4 ist die Koloniebildungsfähigkeit der CHO xrs-2 Subklone Bc1, Bc5, Bc7, Bc9 und Bc10 in Abhängigkeit von der Bestrahlungshäufigkeit mit 2.0 Gy dargestellt.

Bis zur 7. Bestrahlung nimmt die Fähigkeit zur Koloniebildung der Mutanten rasch ab. Die beiden in diesem Bereich eingezeichneten Linien entstammen Modellrechnungen, die entweder keine Teilungen (untere Linie) oder eine Zellteilung jeweils zwischen den Bestrahlungen (obere Linie) erlaubt. Für die 9. Bestrahlung ist kein Koloniewachstum mehr nachweisbar. Die hier eingetragenen gestrichelten Linien sind die Zahlen von Revertantenkolonien, die parallel ermittelt wurden (nicht trypsiniert). Mit der 11. Bestrahlung ist wieder Koloniebildung nachweisbar. Die jetzt ansteigenden Werte repräsentieren den Anstieg der Zellzahl in den Revertantenklonen.

Die sponatane Reversion der CHO xrs-Mutanten zum strahlenresistenten Wildtyp impliziert mehrere Bedingungen für die Röntgenselektion:

- Tägliche Bestrahlungen 2.0 Gy haben über eine 9-malige Anwendung hinaus keinen Sinn, denn die Mutantenzellen sind dann ausgeschaltet und Wachstum zeigt nur noch der Wildtyp.
- Härtere Bestrahlungen als 2.0 Gy sind möglich.
- Die Röntgenselektion sollte möglichst schnell nach der Isolierung Antibiotika-resistenter Transfektanten, mit weniger als 10^6 Zellen begonnen werden.

3. Versuche zum Transfer eines Reparaturgens

Tranfektionen von Resistenzplasmiden in die Stammlinie AT5BI-VA gelangen in meinem Ansatz (siehe Kapitel B, Punkt 5.4.) mit einer Effizienz von etwa 10^{-5} . Dies entspricht 5 Antibio-

tika-resistenten Transfektanten pro μg eingesetzter Plasmid-DNA pro 10^6 Zellen. Der Transfer eines single-copy-Gens aus genomischer DNA-Carrier ist wegen der hohen Verdünnung des gesuchten Gens, ein sehr viel selteneres Ereignis. Die Effizienz sinkt dann auf Werte von 10^{-5} bis 10^{-8} , je nach untersuchtem Zelltyp (51). In Maus L-Zellen wird die Menge an stabil integrierter DNA in den Transfektanten mit ca. 1000 kb pro Zelle angegeben. Das menschliche Genom ist in 6.4×10^6 kb codiert. Danach benötigt man, um ein Genom in Transfektanten zu repräsentieren, 6.4×10^3 stabile Transfektanten. Mit einer Transfektionseffizienz von 10^{-5} wächst die Zahl der zu behandelnden Kulturschalen in Größenordnungen, die nicht mehr zu handhaben sind. Andere Methoden als die Ca-Phosphat-Präzipitation der DNA, z.B. mit DEAE-Dextran als Polykation zur Komplexierung der DNA, oder die physikalische Methode der Elektropulse, führten zu keiner Steigerung der Transfektionseffizienz (Daten nicht gezeigt). Nur durch Subklonierung der Stammlinien konnten die Transfektionseffizienzen auf 10^{-4} - 10^{-3} gesteigert werden (entsprechen 50 bis 500 Antibiotika-resistente Kolonien pro μg Plasmid-DNA pro 10^6 Zellen). Der AT-Subklon mit der höchsten Transfektionseffizienz, ATs4, wurde in allen folgenden Versuchen eingesetzt. Die Subklone der CHO Stammlinie xrs-2 erhielten das Präfix "Bc", diejenigen der Linie xrs-4 das Präfix "Ic".

3.1.1. Aufnahme fremder DNA durch ATs4-Zellen

Der Transfer eines Reparaturgens hängt im wesentlichen davon ab, in welchem Ausmaß die Rezipientenzelle transfizierte DNA in ihr Genom integriert. Die Versuche, ein menschliches Reparaturgen in AT-Zellen zu transfizieren, wurden mit homologer DNA durchgeführt. In der DNA der Transfektanten konnte diese DNA nicht durch Hybridisierung mit einer spezifischen Probe nachge-

wiesen werden. Zum Nachweis integrierter DNA wurde ein

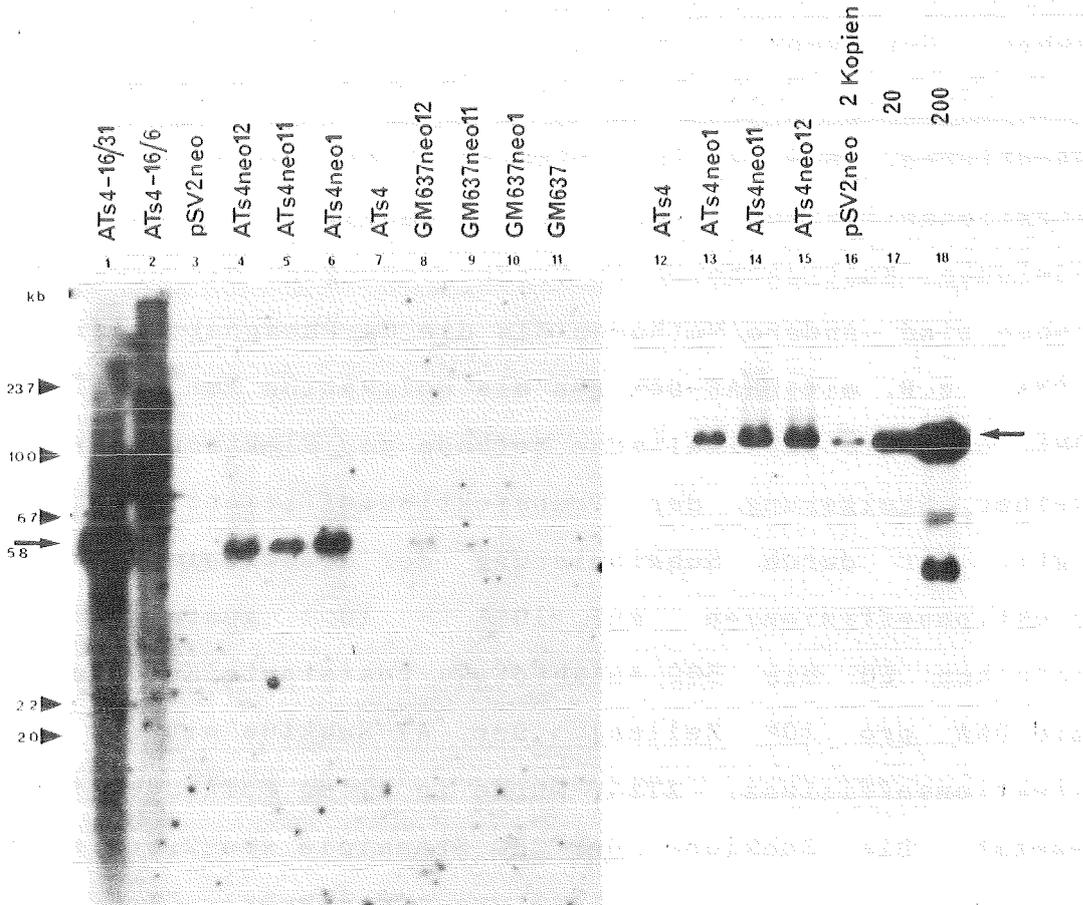


Abbildung 5 A: Autoradiogramme von Southern-Blot Experimenten mit DNA aus G418-resistenten Transfektanten der Zelllinien ATs4 und GM637. Je 10 µg genomischer DNA und DNA des Plasmids pSV2neo wurden mit EcoRI geschnitten, in einem 0.8% Agarose-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Filter übertragen und mit ^{32}P -nick-translatierten neo-Sequenzen hybridisiert. Der Größenmarker 5.8 kb (Pfeil) gibt die Größe des linearisierten Plasmids pSV2neo an.

heterologes System benötigt. Deswegen cotransfizierte ich in normale menschliche GM637-Zellen und ATs4-Zellen das Markerplasmid pSV2neo mit der CHO-carrier-DNA. Die DNA der isolierten G418-resistenten Klone wurde in Southern-Blot Experimenten gegen Nick-translatierte Proben der neo-Sequenz und CHO-DNA hybridisiert.

Abbildung 5A gibt die Menge an integriertem Markerplasmid an: Alle aufgetragenen DNAs sind mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut worden. Von den genomischen DNAs sind jeweils 10 µg aufgetragen worden. Hybridisiert wurden die DNAs mit den neo-Sequenzen aus dem Insert des Plasmid pSV2neo (isoliert durch Doppelverdau mit HindIII und SalI). In den Spuren 7 und 11 sind die DNAs der Rezipientenzellen ATs4 und GM637, aufgetragen. In den Spuren 4 bis 6 und 14 - 16 sind DNAs von G418 resistenten AT-Klonen aufgetragen. DNA aus Transfektanten der Normalfibroblasten GM637 finden sich in den Spuren 8 bis 10. Der Vergleich von DNAs von G418 resistenten AT- und GM-Klonen zeigt eindeutig, daß die Menge an integriertem Markerplasmid in ATs4-Klonen bis zu 20 x höher ist, als in GM637 Transfektanten. In den DNA-Spuren von ATs4neo11 und ATs4neo12 erscheinen außerdem schwache Hybridisierungssignale im hochmolekularen Bereich. Das Hybridisierungssignal entspricht der Wanderung des linearisierten Plasmids. Die zahlreichen Kopien des Markerplasmids in ATs4-neo-Klonen liegen als tandem-repeats im Genom vor. Mit den in den Spuren 16, 17 und 18 aufgetragenen pSV2neo Standards (entsprechend 2, 20 und 200 Kopien) läßt sich die integrierte Kopienzahl der neo-Klone abschätzen: Zwischen 5 und 20 Kopien pSV2neo sind in der DNA der ATs4-neo-Klone integriert. Dagegen findet man in GM637-Transfektanten nur 1 - 3 Kopien des pSV2neo Plasmids im Genom integriert.

Die Hybridisierung mit radioaktiv markierter CHO-DNA ist in dem

Autoradiogramm Abbildung 5 B wiedergegeben. Alle DNAs, bis auf den Größenmarker λ /HindIII, sind mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten. Als radioaktiv markierte Probe wurde nick-translatierte CHO- und λ -DNA im Verhältnis 1000:1 eingesetzt. Zum Vergleich der Hybridisierungssignale sind Mischungen von ATs4 und CHO DNA aufgetragen: In Spur 12 ATs4 : CHO = 100:1 und in Spur 6 gleich 1000:1. Die DNAs der Rezipienten GM637 und ATs4 sind in den Spuren 2 und 6 getrennt worden. Die

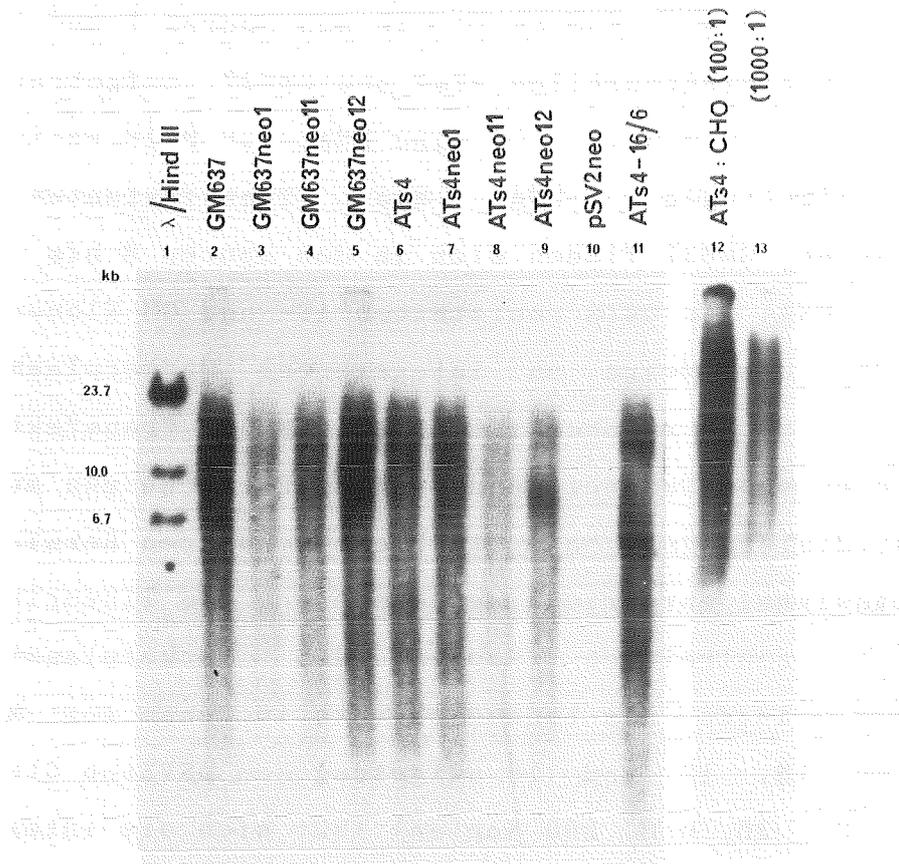


Abbildung 5 B: Autoradiogramm eines Southern-Blot Experiments mit DNA aus G418-resistenten Transfektanten der Zelllinien ATs4 und GM637. 10 μ g jeder genomischen DNA wurden mit EcoRI geschnitten, in einem 0.8% Agarose-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Hybridisierung mit 32 P-nick-translatierter CHO-DNA mit 1/1000 λ -DNA.

DNAs von drei transfizierten Klonen der Kontrollzelle GM637 sind in den Spuren 3 bis 5, diejenigen der Zelllinie ATs4 in den Spuren 7 bis 9 aufgetragen. Sämtliche genomische DNAs zeigen eine geringe Hybridisierung mit der CHO-Probe, nicht zu unterscheiden von der Zumischung von 1/1000 der CHO-DNA zur menschlichen DNA. Die Menge an stabil integrierter fremder DNA liegt also in menschlichen Zellen unterhalb von 1/1000 des eigenen Genoms.

Folgende Überlegung steht jedoch im Widerspruch zu der Annahme einer schlechten DNA-Aufnahme von AT-Zellen: Die Transfektion von DNA aus G418-resistenten CHO-Klonen (siehe Tabelle 5 Zeile 11 und 12) in ATs4-Zellen liefert mit einer Frequenz von ca. 10^{-7} G418 resistente AT-Klone (Ats4-16/31 und ATs4-16/6 wurden untersucht). Diese haben neo-Sequenzen in ihrem Genom integriert, wie in den Southern-Blot-Experimenten in Abb. 5A die Spuren 1 und 2 zeigen. Transfiziert man ATs4-Zellen mit dem Markerplasmid pSV2neo, dann erhält man G418-resistente Klone mit einer Frequenz von 10^{-4} . Von 10^7 Zellen sind also nur 10^3 kompetent zur DNA-Aufnahme und DNA-Integration. Andererseits muß ein CHO-neo-Genom in diesen 10^3 "Transfektanten" repräsentiert sein, sonst wäre kein G418-resistenter Klon zu erwarten. Im Durchschnitt muß jeder der putativen "Transfektanten" 6.4×10^3 kb an fremder DNA aufgenommen haben. In den Southern-Blot Experimenten der Abbildung 5 B in der Spur 11 hybridisiert die DNA der Transfektante ATs4-16/6 mit nick-translatierter CHO-DNA ohne spezifisches Bandenmuster. Die flankierenden CHO-Sequenzen zum neo-Gen sind offensichtlich stark rearrangiert worden.

3.1.2. DNA-Transfer in Ataxia-Zellen

In Tabelle 5 sind alle Transfektionen aufgelistet, die mit dem Ziel, der Komplementation des AT-Defektes durch genomische menschliche DNA, durchgeführt wurden. Insgesamt wurden 4.25×10^8

Zellen transfiziert und ca. 65000 Antibiotika-resistente Klone selektioniert. Der positive Selektionsmarker war in allen aufgeführten Fällen das neo-Gen aus Tn5, integriert in den Vektor pSV2. Das pSV2neo Plasmid wurde entweder mit menschlicher hochmolekularer DNA cotransfiziert oder war kovalent mit Placenta-DNA verknüpft (Zeile 3 und 5). Eine cDNA-Bank, einkloniert in den recombinanten λ -Phagen λ NMT (81) wurde ebenfalls in die ATs4-Zelllinie transfiziert (41). Die G418-resistenten Kolonien aus jeweils 5 Petrischalen wurden zusammentrypsiniert und in der anschließenden Röntgenselektion, der revertierte Phänotyp gesucht. Nach Beendigung der Röntgenselektion wuchsen 26 Kolonien, deren γ -DEK aufgenommen wurde. Sie erwiesen sich sämtlich als identisch zur Rezipientenlinie ATs4. Es handelt sich also um Überlebende des Röntgenselektionsregimes und nicht um phänotypische Revertanten. Sekundäre und tertiäre Runden der Transfektion/Selektion waren unmöglich, da kein revertierter Phänotyp isoliert worden war. Es könnte möglich sein, daß der Transfer hochmolekularer DNA in ATs4-Zellen, im Gegensatz zu cirkulärer Plasmid-DNA, unmöglich ist. Es wurde deswegen untersucht, ob die ATs4 Zellen aus hochmolekularer DNA ein Resistenzgen aufnehmen ("retten") können. Hochmolekulare DNA wurde aus G418-resistenten CHO Zellen (Bcl208a2 und Bcl208c3 siehe Tabelle 6) präpariert. Die CHO-Transfektanten haben in ihrem Genom 5 bzw. 25 Kopien des Plasmids integriert. ATs4 Zellen wurden mit hochmolekularer DNA transfiziert und G418-resistente Klone isoliert (die DNA von zwei dieser Klone, ATs4-16/31 und ATs4-16/6 sind in der Abbildung 5A und 5B in Southern-Blot Experimenten gezeigt). Die Transfektionseffizienz von 7×10^{-8} bis 5×10^{-7} resultiert aus der großen Verdünnung des neo-Gens in der genomischen DNA (112).

Zelle	transfizierte ATs4 Zellen	DNA	G418 resistente Kolonien	Klone nach der Röntgenselektion
1	5.0×10^7	pSCVneo/GM637	2 700	2
2	4.6×10^7	pSV2neo/GM637	7 200	0
3	14.0×10^7	Placenta-neo-tag	45 000	0
4	3.5×10^7	pSV2neo/Placenta	4 200	0
5	3.0×10^7	GM-neo-tag	1 350	0
6	5.0×10^7	pSV2neo/GM637	900	0
7	1.4×10^7	pSV2neo/GM637	500	15
8	1.0×10^7	pSV2neo/GM637	2 200	9
9	3.0×10^7	c-DNA (λ NMT)	600	0
10	2.0×10^7	c-DNA (λ NMT)	250	0
	<u>42.5×10^7</u>		<u>$\sim 65\ 000$</u>	
11	2.2×10^7	Bc1208a2 (sek)	12	0
12	2.7×10^7	Bc1208c3 (sek)	2	0

Tabelle 5:

Transfektionen verschiedener DNAs in ATs4-Zellen zur Isolierung eines Reparaturgens. Die Zahl der transfizierten ATs4-Zellen, die Ca-Phosphat-präzipitierte DNA und die Zahl der isolierten G418-resistenten Klone ist angegeben. Die nach der Röntgenselektion nachgewachsenen Klone erweisen sich als röntgensensitiv wie die Rezipientenlinie ATs4.

Da die verwendeten DNAs von CHO Transfektanten mit revertiertem Phänotyp stammten, wurden die AT-neo-Transfektanten auf ihr Überleben gegenüber ionisierender Strahlung untersucht: Sie entsprachen alle dem Rezipienten ATs4.

3.2. DNA-Transfer in CHO xrs-Mutanten:

3.2.1. Transfektionen in die CHO Mutanten xrs-2 und xrs-4

Auf Grund der Vorteile des heterologen Systems (CHO Zellen und menschliche DNA) erübrigen sich Vorexperimente zur Überprüfung der DNA-Aufnahme der Zellen. Denn auf jeder Stufe des geplanten Versuchsschemas ist die menschliche DNA in den CHO Transfektanten durch Southern-Blot Experimente nachweisbar.

In Tabelle 6 sind alle Transfektionen in CHO-Mutanten aufgelistet, die mit dem Ziel durchgeführt wurden, ein Reparaturgen zu klonieren. Subklone der CHO Linie xrs-2 (Bc2, Bc11 und Bc12) und xrs-4 (Ic2) wurden in der primären Runde der Transfektion mit einem selektionierbaren Markerplasmid und hochmolekularer menschlicher DNA cotransfiziert (Zeilen 1 bis 8).

Insgesamt wurden annähernd 4×10^8 Zellen transfiziert. Die Selektion für die Aufnahme des Markerplasmids erbrachte ca. 12000 Antibiotika-resistente Kolonien. Diese wurden der Röntgenselektion unterworfen. Im Gegensatz zu den Transfektionsexperimenten mit der AT-Zelllinie, erhielten wir von xrs-2 Transfektanten einige phänotypische Revertanten. Die γ -DEK dieser Revertanten entsprachen der des Wildtyps Kl-2 (109). Aus diesen Revertanten-Klonen wurde DNA präpariert und in Southern Blot Experimenten die menschliche DNA nachgewiesen (siehe Kapitel C, Punkt 3.2.2.). Hochmolekulare DNA dieser phänotypischen

Zeile	Zelllinie	Transfizierte Zellen	DNA	Marker-resistente Klone	phänotypische Revertanten	isolierte DNA
primär						
1	Bc12	6 x 10 ⁷	py3/Placenta	1 000	1	
2	Bc12	5.5 x 10 ⁷	pSV2neo/GM637	2 600	6	
3	Bc12	6.5 x 10 ⁷	pSV2neo/GM637	2 200	18	Bc1210g,-c1
4	Bc12	0.8 x 10 ⁷	pSV2neo/GM637	300	5	
5	Bc2	2.7 x 10 ⁷	pSV2neo/GM637	3 800	6	
6	Bc2	5.9 x 10 ⁷	pSV2neo/GM637	500	8	Bc203a
7	Ic2	5.8 x 10 ⁷	pSV2neo/Placenta	200	0	
8	Ic2	5 x 10 ⁷	pSV2neo/Placenta	1 500	0	
		39.2 x 10 ⁷		12 100		
sekundär						
9	Bc11	2 x 10 ⁷	Bc1210g	1	0	
10	Bc11	3.7 x 10 ⁷	Bc1210g	0	0	
11	Bc11	5.4 x 10 ⁷	Bc1210g/pSV2neo	1 020	0	
12	Bc12	5.0 x 10 ⁷	Bc203a/pSV2neo	3 000	27	Bc1208c3,-e,
13	Bc12	7.2 x 10 ⁷	Bc203a	0	0	
tertiär						
14	Bc12	5.4 x 10 ⁷	Bc1208c3/pSV2neo	540	5	Bc1215A1,-B,-C,-D,-E

Tabelle 6:

Transfektionen verschiedener menschlicher DNA und DNA aus primären und sekundären Transfektionen in röntgensensitive CHO-Zellen. Bc2, Bc11, Bc12 sind Subklone der Stammlinie xrs-2; Ic2 ein Subklon der Stammlinie xrs-4. Die Zahl der transfizierten Zellen, die dabei eingesetzte DNA und die isolierten marker-positiven Klone sind angegeben. Durch die Röntgenselektion wurde aus den Transfektanten eine Anzahl phänotypischer Revertanten isoliert. Die DNA einiger dieser phänotypischen Revertanten, aufgeführt in der letzten Spalte der Tabelle, wurde in weiteren Runden der Transfektion eingesetzt.

Revertanten wurde in einer zweiten Transfektionsrunde eingesetzt und wiederum phänotypische Revertanten durch die Röntgenselektion isoliert. Analog der sekundären Transfektionsrunde wurde eine tertiäre Runde angeschlossen und auch hier wurden 5 Petrischalen mit Revertanten isoliert.

Sollte in primären Transfektanten das Reparaturgen benachbart zum Markerplasmid ins Genom integriert sein (91) dann könnte ohne Cotransfektion, allein durch das "Retten" des neo-Markers in sekundären Transfektionen das Reparaturgen mittransferiert werden. Isolierte G418-resistente Klone sollten dann auch Strahlenresistenz erworben haben. In den Zeilen 9, 10 und 13 der Tabelle 6 sind solche Experimente aufgeführt. Der einzige solcherart isolierte G418-resistente Klon erwies sich als röntgensensitiv.

3.2.2. Integration fremder DNA in CHO Zellen

Die CHO Stammlinien xrs-2 und xrs-4 wurden subkloniert, um Klone höherer Transfektionseffizienz zu isolieren (80). In der primären Runde der Transfektion wurde menschliche DNA aus Placenta oder GM637-Zellen mit einem Selektionsmarker cotransfiziert. In Southern Blot Experimenten konnte mit geeigneten Proben die integrierte fremde DNA nachgewiesen werden.

Die Integration des Selektionsmarkers pSV2neo ins CHO-Genom ist in Abbildung 6 A gezeigt. Aus primären, sekundären und tertiären Transfektanten, alle mit circulärem Plasmid transfiziert, wurde DNA präpariert, mit EcoRI geschnitten und die Fragmente durch Elektrophorese getrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulosefilter wurde die DNA der Transfektanten mit dem neo-spezifischen HindIII/SalI - Fragment des Vektors pSV2neo hybridisiert. In fast allen Spuren zeigte sich eine intensive Hybridisierung mit einem DNA Fragment von der Größe des linearisierten Plasmids. In diesen

DNAs konnte man daneben ganz schwache Hybridisierungssignale bei höhermolekularen und niedermolekularen DNA-Fragmenten beobachten. Das transfizierte Markerplasmid pSV2neo wurde also zumeist in tandem-repeats im Genom integriert.

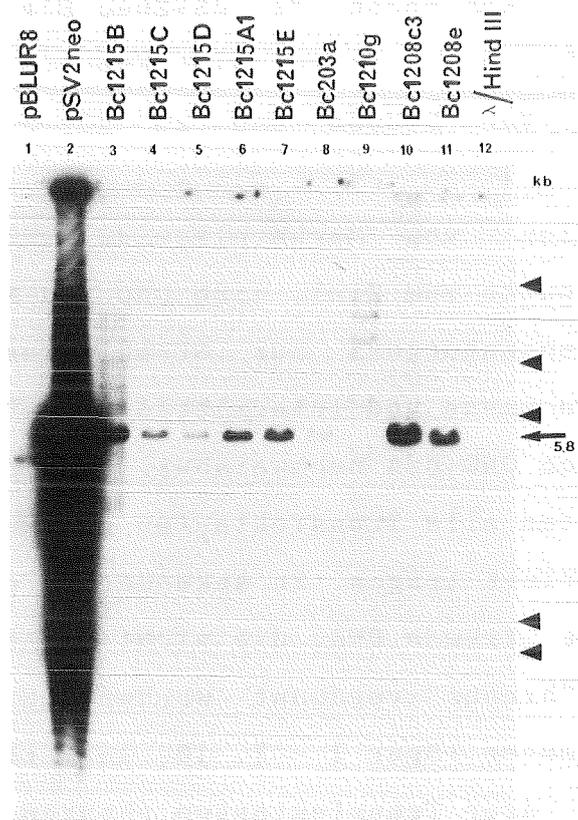


Abbildung 6 A: Autoradiogramm eines Southern-Unblot Experiments mit genomischer DNA aus primären, sekundären und tertiären Transfektanten von CHO xrs-2 Subklonen. 10 µg jeder genomischen DNA und der DNA der Plasmide wurde mit EcoRI geschnitten, in einem 0.8% Agarose-Gel aufgetrennt, das Gel getrocknet und mit ^{32}P -nick-translatierten Sequenzen des neo-Gens hybridisiert. Der Größenmarker 5.8 kb (Pfeil) gibt die Größe des linearisierten Plasmids pSV2neo an. Je 200 ng der DNA der Plasmide pBLUR8 und pSV2neo sind zur Kontrolle der Hybridisierung in Spur 1 und 2 aufgetragen; tertiäre CHO-Transfektanten in den Spuren 3 - 7; sekundäre Transfektanten in den Spuren 10 und 11; primäre Transfektanten in den Spuren 8 und 9.

Anders die Spur 3 mit der DNA des tertiären Transfektanten Bcl2l5B: neben dem Hauptsignal mit der Größe des linearisierten Plasmids erscheint eine Leiter an Hybridisierungssignalen. Auch die DNA des primären Klons Bcl2l0g (Spur 9), zeigt eine Leiter von mindestens 13 Hybridisierungssignalen; keines entsprechend der Länge des linearisierten Plasmids. Für diese beiden Klone gilt, daß eine ganze Reihe von Integrationsstellen in der DNA vorliegen muß. Die Kopienzahl des pSV2neo Plasmids pro Genom in den Transfektanten wurde in Dot-Blot Experimenten (Daten nicht gezeigt) von 3-5 für Bc203a und zu 25 Kopien für Bcl208c3 bestimmt.

Die Co-Transfektion von Markerplasmids und hochmolekularer menschlicher DNA hatte zum Ziel, eine CHO xrs-Mutante, durch den Transfer eines Reparaturgens zur Strahlenresistenz zu revertieren. Die aufgenommene und integrierte menschliche DNA ist vor dem Hintergrund von CHO-DNA nachweisbar. In der ersten Runde der Transfektion sollten alle Transfektanten nachweisbar menschliche DNA im Genom integriert tragen. In sekundären, oder gar tertiären Runden sollte die fremde DNA, die nicht mit dem "Reparaturgen" assoziiert ist, "hinaus"-verdünnt werden. In Abbildung 6B sind eine Auswahl primärer (Spur 1 - 7, 15, 16), sekundärer (Spur 17 und 18) und tertiärer Transfektanten (Spuren 10 - 14) in einem Autoradiogramm eines Southern "Unblot" Experimentes gegen radioaktiv markierte GM637-DNA hybridisiert.

Von den primären Transfektanten ragt nur die Hybridisierung der DNA des Klons Bcl2l0g (Spur 5) heraus. Sie liegt deutlich über dem Hintergrund, der durch die DNA der Rezipientenzelle Bcl2 (Spur 8) definiert wird. Im Unterschied zu allen anderen Spuren hybridisieren spezifische Fragmente der EcoRI-verdauten DNA mit der radioaktiv markierten menschlichen DNA. Sekundäre Transfektionen mit hochmolekularer Bcl2l0g-DNA (siehe Tabelle 6)

ergaben keinen revertanten Phänotyp.

Sekundäre Transfektion mit der Bc203a-DNA erbrachten etliche Revertanten, doch deren DNA zeigten kein spezifisches Hybridisierungsmuster mit einer GM637-Probe (Spuren 17 und 18 in Abb. 6 B). Auch eine tertiäre Runde der Transfektion mit der DNA des Klons Bcl208c3, änderte am Hybridisierungs-"Schmier" nichts. In meinen Überlegungen ging ich davon aus, daß ein stabiler

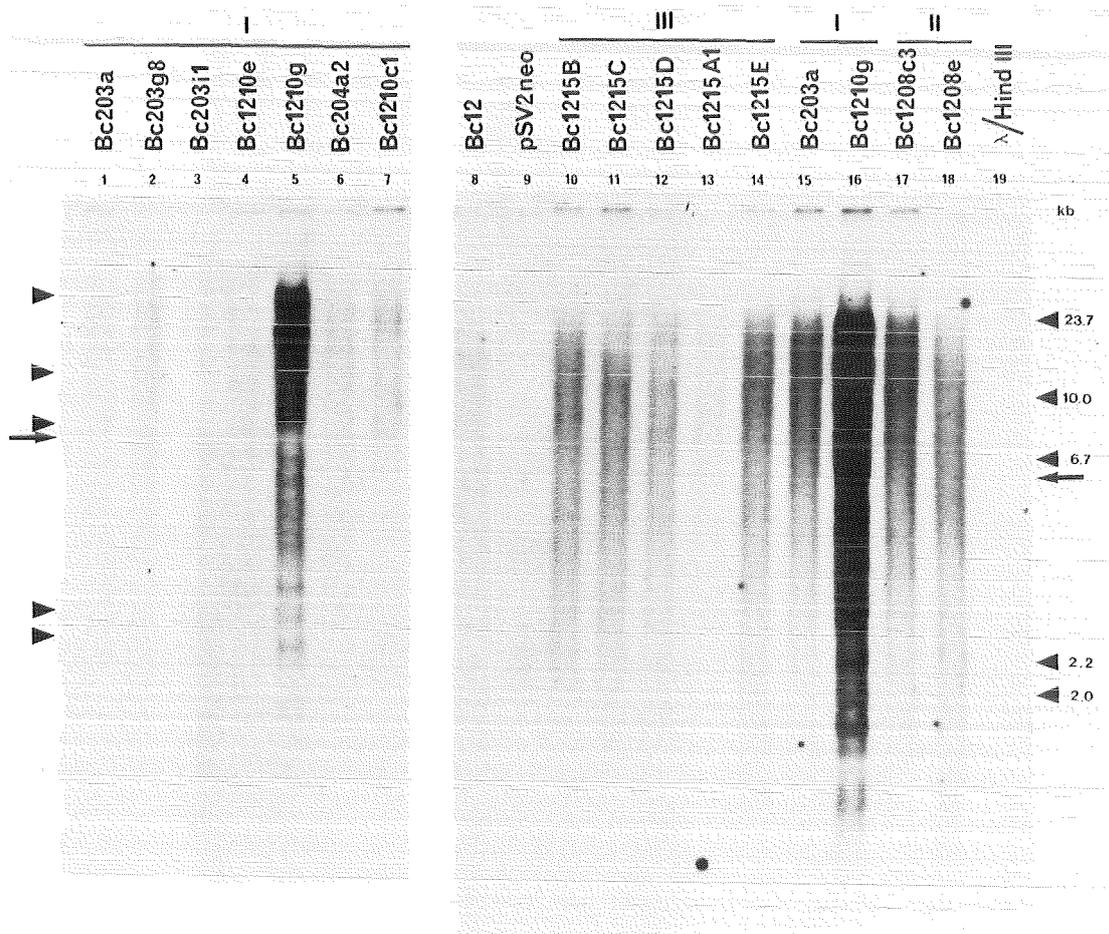


Abbildung 6 B: Autoradiogramme von Southern-Unblot Experimenten mit genomischer DNA aus primären (I) (Spur 1 -7, 15 und 16), sekundären (II) (Spur 17 und 18) und tertiären (III) (Spur 10 - 14) Transfektanten von CHO xrs-2 Subklonen. Die DNA des Rezipienten Bcl2 ist in Spur 8 aufgetragen. 10 µg jeder DNA wurden mit EcoRI geschnitten, in einem 0.8% Agarose-Gel aufgetrennt, das Gel getrocknet und mit 32 P-nick-translatierter menschlicher DNA hybridisiert. Der Pfeil gibt die Größe des linearisierten Plasmids pSV2neo an.

Transfektant etwa 1/1000 der DNA seines eigenen Genoms an carrier-DNA integrieren kann. Eine Mischung der fraglichen DNAs sollte das zu erwartende Hybridisierungssignal vorgeben. In dem Autoradiogramm des Southern-Unblot Experiments in Abbildung 6 C sind in den Spuren 7, 8, 9 solche Mischungsexperimente mit 1/1000-, 1/100- und 1/10-Anteil GM637-DNA an Bcl2-DNA aufgetragen.

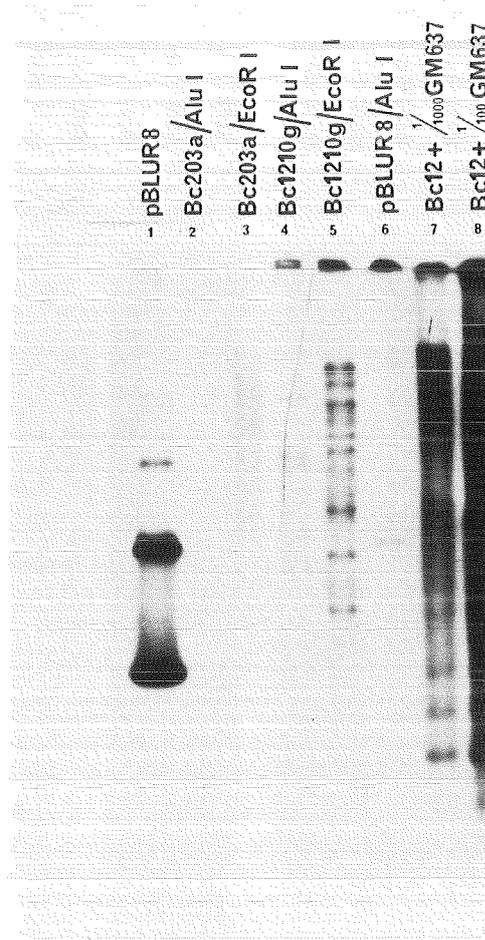


Abbildung 6 C: Autoradiogramm von Southern-Unblot Experimenten mit genomischer DNA von zwei primären CHO xrs-2 Transfektanten. 10 µg jeder DNA wurden mit EcoRI oder AluI geschnitten, in einem 0.8% Agarose-Gel getrennt, das Gel getrocknet und mit ³²P-nick-translatiertem Insert des Plasmids pBLUR8 (Alu-Sequenzen) hybridisiert. Zum Vergleich der Hybridisierungssignale sind Mischungen von DNAs aus Bcl2 und menschlichen GM637 Zellen (jeweils EcoRI geschnitten) aufgetragen (Spuren 7 - 9).

Geprobt wurde mit den radioaktiv markierten, hochrepetitiven menschlichen Alu-Sequenzen (36), isoliert nach BamHI-Verdau aus dem Plasmid pBLUR8. Die Intensität der Schwärzung steigt mit steigendem Anteil an menschlicher DNA in der Spur. DNA aus dem primären Transfektanten Bcl210g wurde entweder mit EcoRI oder AluI geschnitten und in den Spuren 4 und 5 getrennt. Entsprechend geschnittene DNAs des primären Transfektanten Bc203a befinden sich in den Spuren 2 und 3. Wenn die Transfektion hochmolekularer menschlicher DNA zur Integration von 1/1000 der DNA-Menge des CHO-Genoms führt, dann erwartet man ein Hybridisierungssignal ähnlich der Spur 7. Das Autoradiogramm in Abbildung 6 C beweist, daß in den primären CHO-Transfektanten nur verschwindende Mengen an menschlicher DNA stabil integriert sind.

In Southern-Blot Experimenten ließ sich nachweisen, daß die strahlensensitiven CHO-Mutanten nach Transfektionen hohe Copienzahlen des Markerplasmids in ihr Genom integriert hatten. Die integrierten Sequenzen finden sich in der DNA der meisten Transfektanten hintereinander ligiert (tandem repeats). Nur in wenigen Klonen waren Einzelkopien an verschiedenen Stellen integriert.

Der Nachweis der cotransfizierten menschlichen DNA gelang nur in der Transfektante Bcl210g. Der Beweis, daß ihr revertierter Phänotyp durch Transfer eines Reparaturgens entstanden war, ließ sich in sekundären Transfektionen nicht erbringen.

Die Masse der isolierten phänotypischen Revertanten aus primären Transfektionen zeigte Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Proben menschlicher DNA. Sekundäre und tertiäre Transfektionen führten zwar zur Isolierung phänotypischer Revertanten, deren DNA zeigte jedoch mit menschlichen DNA-Proben, keine Eingrenzung der Hybridisierungssignale auf spezifische Banden. Damit konnte die Reversion der CHO xrs-Mutanten zum Wildtyp nicht auf die

Weitergabe bestimmter DNA-Sequenzen zurückgeführt werden.
Deswegen wurde auf die Reisolierung der menschlichen Sequenzen
verzichtet.

4. Diskussion der Ergebnisse des 1. Teils

In die Reihe von Erbkrankheiten, bei denen die Defizienz eines Reparatursystems der DNA angenommen wird, gehört Ataxia telangiectasia (Louis Bar Syndrom). Körperzellen von Ataxia-Patienten sind unter anderem besonders sensitiv gegenüber ionisierenden Strahlen. Diesem Phänotyp untergeordnet scheinen die Beobachtungen der radioresistenten DNA-Synthese (37, 83), der verminderten Reparatur-Synthese (86), und dem Bestehenbleiben von M. Luteus-sensitiven-sites nach γ -Bestrahlung in Ataxia-Zellen im Gegensatz zu Normalfibroblasten (86), zu sein. Mit Hilfe der Methoden des Gentransfers und der anschließenden Selektion einer phänotypischen Revertanten, hoffte ich, die komplementierenden Sequenzen reisolieren zu können.

Die Etablierung eines Selektionssystems zur Unterscheidung von sensitiven Mutantenzellen und phänotypischen Revertanten ist die Grundlage aller Experimente. Mit hoher Effizienz lassen sich wenige menschliche Normalfibroblasten aus einem Rasen von AT5BI-VA Zellen herausfinden. Es wird darüberhinaus gezeigt, daß Subklonierung der AT-Stammlinie nichts an deren Röntgensensitivität ändert. Selbst AT-Zellen, die das Röntgenselektionsregime überlebt haben, bleiben strahlensensitiv. Mit meinem Transfektionsansatz werden Resistenzplasmide mit einer Frequenz von 10^{-4} bis 10^{-3} stabil in die ATs4 Zellen übertragen. Der gleichzeitige Transfer von hochmolekularer DNA ist gering, wie die Experimente mit heterologer CHO-DNA beweisen. Die Transfektion von 4.2×10^8 ATs4 Zellen mit hochmolekularer menschlicher DNA führt nicht zur Komplementation des AT-Defektes in einer der 65000 Transfektanten.

Die Strahlensensitivität der CHO xrs-Mutanten bleibt nach Subklonierung und Transfektion ebenfalls erhalten. Das

Röntgenselektionssystem isoliert wenige Wildtypzellen aus 10^6 Mutanten. Allerdings revertieren Subklone der xrs-Zelllinien mit einer Rate von 5×10^{-6} pro Zelle und Generation. Dies führt zur Isolierung einiger phänotypischer Revertanten durch die Röntgenselektion. Die Integration spezifischer menschlicher DNA kann in wenigen Fällen bewiesen werden. Z.B. der primäre Transfektant Bcl210g hat nachweisbare Mengen menschlicher DNA ins Genom integriert. Sekundäre Transfektionen mit der DNA dieses Klons ergeben keine phänotypischen Revertanten. Sekundäre und tertiäre Transfektionsrunden mit der DNA anderer primärer Transfektanten, führen zur Isolierung von phänotypischen Revertanten. In Southern-Blot Analysen der DNA dieser Revertanten kann jedoch keine Begrenzung der Hybridisierungssignale auf wenige Fragmente gezeigt werden.

Warum brachte der DNA-vermittelte Gentransfer, weder in unserem noch in anderen Labors (64), eindeutig positive Ergebnisse? Sowohl für die menschlichen AT-Zellen als auch für das CHO xrs-System sind 5 Gründe möglich:

1. Hochmolekulare DNA wird selten stabil in das Genom einer Transfektanten integriert: Gute Transfektionseffizienzen sind mit Plasmiden zu erreichen, auf deren Präsenz schon nach wenigen Zellgenerationen nach der Transfektion selektioniert wird. Die Präsenz der cotransfizierten hochmolekularen DNA wird erst nach vielen Zellgenerationen überprüft. In der Zwischenzeit kann die fremde Sequenz verloren gehen, oder durch Rearrangements ihren Informationsgehalt verlieren. Das "Retten" des neo-Gens aus der hochmolekularen DNA von G418-resistenten Klonen gelingt mit einer Frequenz von 10^{-8} bis 10^{-7} . Damit ist die Übertragungswahrscheinlichkeit eines kleinen single-copy Gens (das neo-Gen mit den flankierenden

SV40-Sequenzen ist ca 3 kb groß) angegeben.

2. Das jeweils komplementierende "Reparaturgen" ist zu groß: Sollte sich die codierende Sequenz des gesuchten Reparaturgens über mehr als 30 kb erstrecken, dann ist während der DNA Präparation oder während der Transfektion eine Fragmentierung des Gens wahrscheinlich.
3. Von A. LEHMANN (63) wurde eine AT-Revertante isoliert, die einerseits wie menschliche Normalfibroblasten ionisierende Strahlung überlebt, deren radioresistente DNA-Synthese aber andererseits wie in AT-Zellen weiterläuft. Dies würde bedeuten, daß in allen AT-Komplementationsgruppen 2 Gene gleichzeitig mutiert haben. Dann müßte das Gen für "DNA-Synthese" benachbart dem Gen für "γ-Überleben" liegen, und eine Deletion beide Funktionen zerstört haben. In diesem Fall wäre eine Komplementation des Defekts durch Gentransfer sehr unwahrscheinlich.
4. Sowohl für AT-Zellen als auch für CHO xrs-Mutanten könnte gelten, daß die verlorene Enzymfunktion in ihrer Aktivität sehr genau auf andere Funktionen abgestimmt sein muß. Diese Feinabstimmung ist durch Gentransfer nur schwer zu erreichen. Zuviel Genprodukt könnte allein durch die Integration der DNA in transkriptionell aktive Bereiche des Chromatins entstehen.
5. Für die CHO xrs-Mutanten gibt es Hinweise auf die Art der Mutation: Wie Untersuchungen von P. JEGGO (46) ergaben, steigt nach Behandlung von xrs-Mutanten mit 5-Azacytidin, die Reversionsrate bis auf 10^{-2} an. 5-Azacytidin demethyliert die DNA behandelter Zellen. Für die CHO xrs-Mutanten scheint folgendes zu gelten: Das mutierte Gen liegt nicht auf dem X-Chromosom; von den 2 Allelen des CHO Wildtyps Kl-2 ist eines methyliert und damit inaktiviert, das andere wurde durch die

Behandlung mit EMS mutiert (und dadurch xrs-Mutanten isoliert). Die Hypermethylierung des inaktiven Allels kann durch 5-Azacytidin entfernt und damit das Gen aktiviert werden. Die "Reversion" ist phänotypisch sichtbar, obwohl genetisch die Mutation weder revertiert noch supprimiert wurde.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß die Komplementierung von strahlensensitiven Zellen mit Hilfe des DNA-Transfers nicht gelang. Die Gründe könnten an der mangelnden DNA-Aufnahme der Zellen, oder der Komplexität der zu vermittelnden Prozesse liegen. Die Reversionsrate der CHO-xrs Zellen von 10^{-6} führte zur Isolierung von phänotypischen Revertanten. Die integrierten menschlichen DNA-Sequenzen einer CHO-Revertante bewirkten in sekundären Transfektionen nicht die Reversion des Pänotyps. Von menschlichen strahlensensitiven AT-Zellen wurden keine Revertanten isoliert.

KAPITEL D: ERGEBNISSE TEIL II:Versuche zur Erhöhung der Strahlenresistenz eukaryotischer Zellen durch den Transfer eines Metallothionein-Gens

Metallothioneine sind in Eukaryonten vorkommende Proteine mit niedrigem Molekulargewicht, sie sind cystein-reich (30% der Aminosäuren) und sie binden Metallkationen wie Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} und Ag^+ mit steigender Affinität. Elektrophoretisch lassen sich zwei Gruppen, MT I und MT II, mit jeweils verschiedenen Formen (A, B, C) unterscheiden. (53, 52, 108, 92). Das menschliche Genom enthält 12 verschiedene MT-Gene von denen etwa die Hälfte funktionell ist (31). Die Transkriptionsrate des menschlichen MT-IIA Gens (hMT-IIA) macht etwa 50% aller MT-Gene aus, die in menschlichen Zellen oder der Leber exprimiert werden (58). Als biochemische Funktion, neben der Detoxifizierung von Schwermetallsalzen, wird die Übertragung von Cu^{2+} und Zn^{2+} auf Enzyme diskutiert (24, 65, 28, 101). Die Induzierbarkeit des Metallothioneins bleibt bei Genamplifikationen (72) oder Transfektionen von MT erhalten (56).

Der Induktionsprozess für Metallothionein verläuft folgendermaßen: Induktion ist möglich mit Schwermetallen, Glucocorticoid-Hormonen (55), ionisierende Strahlen (34), Interferon (23), TPA (2), UV (66, 93) und Interleukin-I (54); die mRNA-Synthese erreicht ihr Maximum nach ca. 4 Stunden (dieser Prozess ist Actinomycin D, nicht Cycloheximid sensitiv) (20). Die MT-Proteinsynthese beginnt nach drei Stunden und das Protein akkumuliert bis zu 20 Stunden; die Entfernung der Induktionsfaktoren führt zum Abbau der MT-Proteine mit einer Halbwertszeit von 4 Stunden (57); nach 48 bis 72 Stunden ist der Grundzustand wieder erreicht; Metalle induzieren das MT-Protein

20 - 50 fach, Glucocorticoid 2 - 4 fach (11).

Eine Funktion der Metallothioneine wurde in der Übertragung von Zn^{2+} -Ionen auf metallabhängige Enzyme beschrieben (105). Dadurch würden potentiell alle biochemischen Prozesse beeinflusst, die von Zn^{2+} -abhängigen Enzymen katalysiert werden.

In vitro ist die Funktion der Metallothioneine als spezifischer Reaktionspartner für Hydroxyl-Radikale nachgewiesen (103). Metallothioneine könnten somit in der Zelle ein guter Schutz gegen die indirekte Strahlenwirkung der Radiolyseprodukte des Wassers darstellen. Für Zellen konnte diese Funktion nicht nachgewiesen werden und nur wenige Experimente deuten eine solche Funktion an. Mausfibroblasten, die an hohe Konzentrationen von Cd^{2+} adaptiert waren, haben neben erhöhten Konzentrationen von MT-Proteinen auch erhöhte Mengen an proteingebundenen und nicht-proteingebundenen Sulfhydrylgruppen in ihrem Cytoplasma; diese Zellen erwiesen sich als deutlich resistenter gegenüber γ -Bestrahlung als der Wildtyp, jedoch menschliche epitheliale Zellen mit den gleichen Parametern waren in ihren γ -Überlebenskurven unverändert (5).

In unserem Labor wurde nach der SV40-Transformation menschlicher Hautfibroblasten eine erhöhte Menge an MT-mRNA gefunden und gleichzeitig ein verbessertes Überleben der Zellen nach ionisierender Bestrahlung festgestellt (3).

In beiden oben zitierten Befunden ist die Rolle der Metallothionein-Proteine als Radioprotektoren nicht nachgewiesen. Das Metallothionein-Protein als Kausativ für die erhöhte Strahlenresistenz zu isolieren, war Ansatzpunkt für eine zweite Serie von Experimenten. Durch Transfektion eines MT-Gens sollte untersucht werden, ob die Strahlenresistenz der Transfektanten erhöht wird. Zum Gentransfer wurde uns von M. Karin das Plasmid pMT₁₁-BPV(-) zur Verfügung gestellt (56), das die codierenden und

regulatorischen Sequenzen des menschlichen Metallothionein-IIA Gens trägt. Der rekombinante Genvektor wurde auf der Basis des Bovine Papilloma Virus (BPV) konstruiert und bleibt deswegen nach dem Transfer in Säugerzellen in einem episomalen Zustand. Dadurch bietet er den Vorteil keine Störungen durch seine Integration in die genomische DNA der Rezipientenzelle auszulösen. In CHO Zellen bot die Transfektion des menschlichen MT-IIA Gens die Vorteile eines heterologen Systems: die transfizierten Sequenzen waren auf der Ebene der DNA und der RNA durch Hybridisierung mit spezifischen Proben nachweisbar.

Außerdem stand mir das Plasmid pmMT_I für Gentransferexperimente zur Verfügung (25). Es trägt die codierenden und regulatorischen Sequenzen des Maus-MT-I Gens und ist damit sowohl menschlicher wie CHO-DNA heterolog. Dieses Plasmid integriert in das Genom des Transfektanten.

Nach der Transfektion der MT-codierenden Plasmide, können die Transfektanten durch den Phänotyp der Schwermetallresistenz isoliert werden. In Cd²⁺-Dosis-Effekt-Kurven muß die Cd²⁺-Resistenz quantifiziert und bewiesen und die fremde DNA nachgewiesen werden.

1. Transfektion von Metallothionein-Genen in CHO- und menschlichen Zelllinien

In 9 cm Petrischalen behandelt man 10^6 Zellen mit Präzipitat aus der DNA des MT-Gen Vektors und Carrier-DNA. Verwendung fand das episomal replizierende Plasmid pMT_{II}-BPV, das für das menschliche MT-II_A Gen codiert und das Plasmid pmMT_I, das für das MT-I_A Gen der Maus codiert. 14 Stunden nach der Transfektion wird das Medium gewechselt. Einen Tag später trypsiniert man die Zellen und selektioniert die Transfektanten in einem Medium mit 20 μM Cd²⁺ und 70 μM Zn²⁺.

Die Transfektionen mit dem Plasmid pMT_{II}-BPV sind in Tabelle 7 Absatz 1 bis 3 aufgeführt. Die eingesetzte DNA und die isolierten Klone, die in weiteren Experimenten eingesetzt wurden, sind aufgeführt.

Die niedrige Effizienz bei der Selektion schwermetallresistenter Klone, versuchte ich durch Cotransfektionen mit dem Selektionsmarker für G418-Resistenz (pSV2neo) zu umgehen. Nach der Transfektion wurde zuerst auf G418-Resistenz selektioniert und dann auf Cd²⁺/Zn²⁺-Resistenz. In Absatz 4 sind Cotransfektionen der Vektoren pSV2neo und pmMT_I (in äquimolaren Mengen) aufgeführt. Selektioniert man auf G418-Resistenz, so erhält man Transfektionseffizienzen von ca 10^{-4} . Selektioniert man die G418-resistenten Klone weiter auf Cd²⁺/Zn²⁺-Resistenz, so überleben weniger als 10% dieser Klone die zweite Selektion. Während der ersten Selektion auf G418-Resistenz haben die allermeisten Transfektanten das cotransfizierte MT-codierende Plasmid verloren, oder die Resistenz gegen Schwermetalle ist von den Transfektanten schwerer zu erfüllen.

Zeile	Zellen	DNA Plasmid/Carrier	G418-resistente Klone/angesetzte Petrischalen	Cd ²⁺ /Zn ²⁺ -resistente Klone/angesetzte Petrischalen	isolierte Klone
1	ATs4 GM637 K1-2 Bc11 Ic2	2 µg pMT _{II} -BPV/ 20 µg E. coli	- - - -	60/4 40/4 - -	ATs4/MT ₂ -2 GM637/MT ₂ -22 - -
2	K1-2 Bc11 Ic2	1 µg pMT _{II} -BPV/ 20 µg Bc12	- - -	1/4 0/4 0/4	K1-2/MT ₃ - -
3	rat 2 Bc11 Ic2 K1-2	2 µg pMT _{II} -BPV/ 20 µg Ic2	- - - -	0/4 1/4 0/4 2/4	- Bc11/MT ₄ - K1-2/MT ₄ A, -B
4	ATs4 GM637 Ic2 Bc11	2 µg pSV2neo + 2 µg pmMT _I 4 µg pSV2neo + 4 µg pmMT _I /10 µg ATs4	140/4 20/4 176/4 90/4	3 MK 3 MK 1/4 2/4	ATs4/MT ₅ A;-B;-C GM637/MT ₅ A;-B;-C Ic2/MT ₆ A Bc11/MT ₆ A;-B

Tabelle 7:

Transfektion von Metallothionein-Genen in menschliche Fibroblasten und CHO Zellen. Die Zellen wurden mit den aufgeführten DNAs cotransfiziert. Bei Cotransfektionen mit dem pSV2neo Plasmid wurde zuerst auf G418-Resistenz selektiert bevor mit Cd²⁺ und Zn²⁺ auf den schwermetallresistenten Phänotyp selektiert wurde. Die isolierten Klone oder Massenkulturen, die für weitere Experimente herangezogen wurden, sind in der letzten Spalte aufgeführt.

Nach der Cotransfektion von pSV2neo und pmMT_I menschlichen Zellen (Absatz 4), wurden die G418-resistente Klone trypsiniert, bevor sie auf Cd²⁺/Zn²⁺-Resistenz geprüft wurden. Pro Petrischale wurden 20 - 30 schwermetallresistente Klone beobachtet, die in den folgenden Versuchen als Massenkulturen (MK) eingesetzt wurden.

Aus der Zusammenstellung in Tabelle 7 ergibt sich, daß Transfektionen vom Mt-Genen in CHO oder menschliche Zelllinien mit nachfolgender Selektion des Phänotyps "Schwermetallresistenz" mit der Effizienz von 10⁻⁶ bis 10⁻⁷ gelingen. Nach Transfektionen mit dem Plasmid pMT_I-BPV konnten in allen Zelllinien schwermetallresistente Klone isoliert werden, wenn auch nicht in jeder durchgeführten Transfektion. Das Plasmid pmMT_I wurde in Cotransfektionen mit dem Plasmid pSV2neo eingesetzt und in der zuerst durchgeführten G418-Selektion wurden zahlreiche Klone isoliert; eine nachfolgende Cd²⁺/Zn²⁺-Selektion überleben jedoch nur wenige Prozent dieser Transfektanten.

2. Cd²⁺-Resistenz der Transfektanten

Zum Beweis der Schwermetallresistenz der isolierten Klone wurden Cd²⁺-Dosiseffektcurven aufgenommen. In 5 cm Petrischalen wurden 10², 10³ bis 10⁵ Zellen plattiert und steigenden Konzentrationen an CdCl₂ ausgesetzt. Nach etwa zwei Wochen wurden die Kolonien gefärbt, gezählt und das Überleben der Zellen in Prozent der unbehandelten Kontrollen berechnet. Die ermittelten Cd²⁺-DEK sind in Abbildung 7 zusammengefaßt.

ATs4- und GM637-Transfektanten des pmMT_I-Plasmids sind in Abbildung 7A in ihrer Koloniebildungsfähigkeit bei Anwesenheit steigender Konzentrationen Cd²⁺ gezeigt. Die Transfektanten sind gegenüber den toxischen Eigenschaften des Schwermetalls 5 bis 8 mal resistenter als die Rezipientenzelllinien.

Nach der Transfektion des Plasmids pMT_{11} -BPV in ATs4 und GM637 Zellen, wurden die Klone ATs4/MT₂-2, ATs4/MT₂-1A und GM637/MT₂-22 isoliert, deren Cd²⁺-Überlebenskurven in Abbildung 7 gezeigt sind. Die Transfektanten sind gegenüber Cd²⁺ 10-mal resistenter als der Rezipient. Aus den Schwellenkurven können für die Transfektanten LD₅₀-Werte von 40 bis 70 μ M Cd²⁺ abgelesen werden. Die LD₅₀ der Rezipienten liegt bei 1 - 2 μ M Cd²⁺.

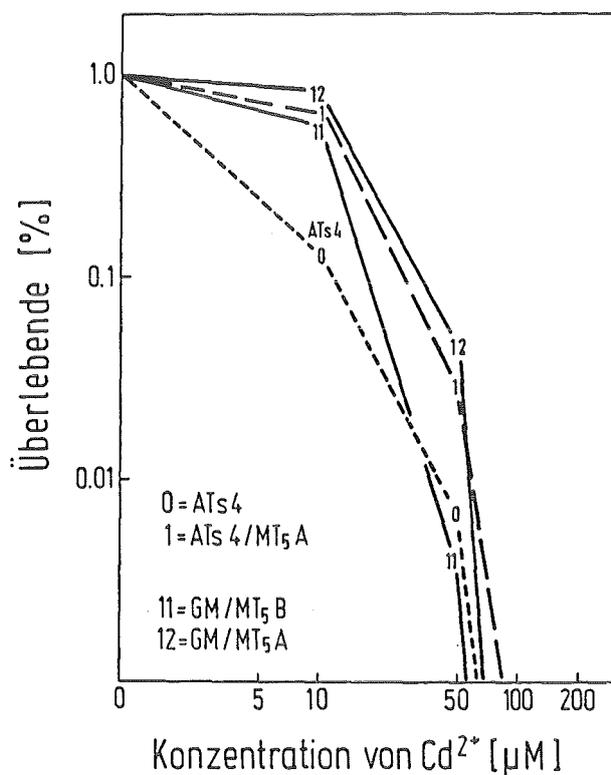


Abbildung 7 A: Cd²⁺-Überlebenskurven menschlicher Zelllinien nach Transfektion der Plasmide pSV2neo und pMT₁. Transfektanten und die parentale Zelllinie ATs4 wurden auf feeder-layer Zellen plattiert und steigenden Konzentrationen von Cd²⁺ ausgesetzt. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien gefärbt, gezählt und die überlebenden Zellen im Vergleich zu den nichtbehandelten Kontrollen berechnet.

Abbildung 7C zeigt die Cd^{2+} -DEK verschiedener Transfektanten der CHO Zelllinien. Die Rezipienten Kl-2, Bcl1 (xrs-2) und Ic2 (xrs-4) sind sehr empfindlich gegenüber den Wirkungen des Schwermetalls Cd^{2+} . Der Wildtyp Kl-2 unterscheidet sich darin nicht von den röntgensensitiven Mutanten. Transfektanten des pMT_{11} -BPV Vektors zeigen eine 100 fach erhöhte Resistenz; die LD_{50} Werte liegen im Bereich von 30 bis 50 μM Cd^{2+} .

Im Vergleich der Diagramme der Abb.7 fällt auf, daß Transfektionen mit dem pMT_{11} -BPV Vektor zu höherer Resistenz, führen als solche, mit dem Plasmid pmMT_1 . Es läßt sich kein Unterschied in der Cd^{2+} -Resistenz der MT-Transfektanten zwischen reparatur-

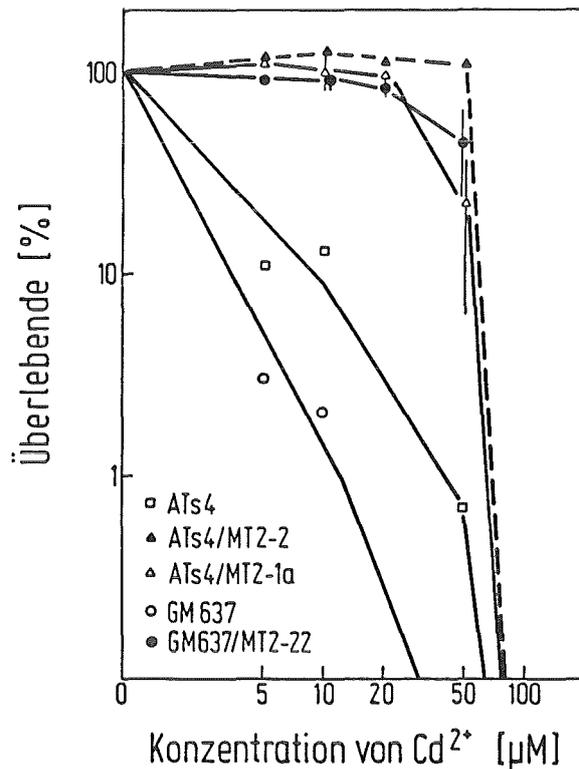


Abbildung 7 B: Cd^{2+} -Überlebenskurven menschlicher Zelllinien nach Transfektion des Plasmids pMT_{11} -BPV. Transfektanten und die parentalen Zelllinien ATs4 und GM637 wurden auf feeder-layer Zellen plattiert und steigenden Konzentrationen von Cd^{2+} ausgesetzt. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien gefärbt, gezählt und die überlebenden Zellen im Vergleich zu den nichtbehandelten Kontrollen berechnet.

profizienten und reparaturdefekten Zelllinien erkennen.

3. Nachweis der transfizierten MT-Gene

Von Cd^{2+} -resistenten Transfektanten wurde DNA präpariert: Im Fall des transfizierten Plasmids pmMT_1 wurde die hochmolekulare DNA der Kerne isoliert; bei Transfektion unter Verwendung des Plasmids pmMT_{11} -BPV, muß die niedermolekulare DNA des Kerns isoliert werden.

Die Massenkulturen $\text{ATs4/MT}_5\text{A}$, $\text{GM637/MT}_5\text{B}$, $\text{GM637/MT}_5\text{A}$ und der Klon $\text{Bcll/MT}_6\text{A}$ wurden nach der Transfektion des Plasmids pmMT_1 (cotransfiziert mit dem Plasmid pSV2neo) als schwermetall-

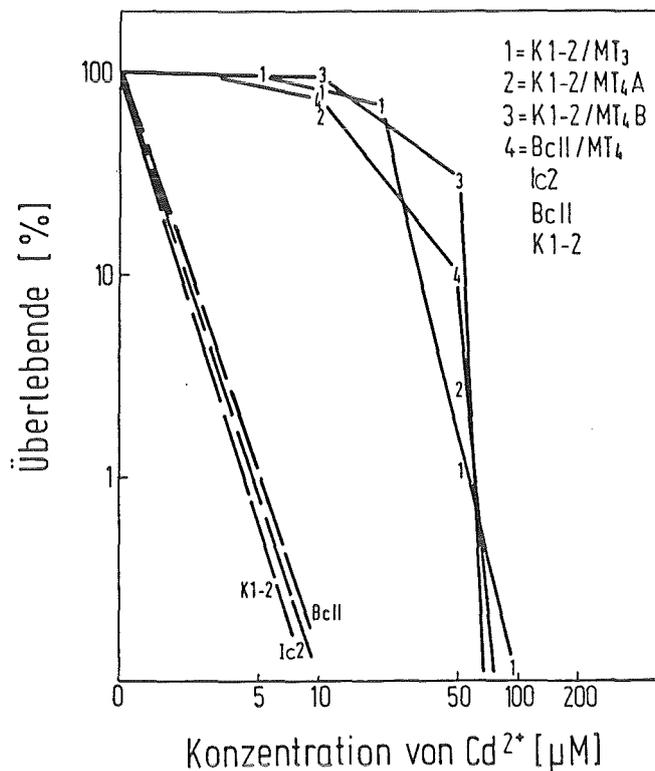


Abbildung 7 C: Cd^{2+} -Überlebenskurven von CHO Zellen nach Transfektion des Plasmids pmMT_{11} -BPV. Transfektanten und die parentalen Zelllinien Ic2, Bcll und K1-2 wurden steigenden Konzentrationen von Cd^{2+} ausgesetzt. Nach 12 Tagen wurden die Kolonien gefärbt, gezählt und die überlebenden Zellen im Vergleich zu den nichtbehandelten Kontrollen berechnet.

resistente Klone isoliert. Die Zellen wurden vermehrt und hochmolekulare DNA präpariert. In Southern-Blot Experimenten wurde die Anwesenheit des transfizierten Maus-MT-I Gens nachgewiesen. Abbildung 8 A zeigt das Autoradiogramm eines solchen Experiments.

Als Hybridisierungsprobe wurde das isolierte mMT_I-Insert (1.99 kb, nach Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII) des Plasmids pmMT_I, verwendet.

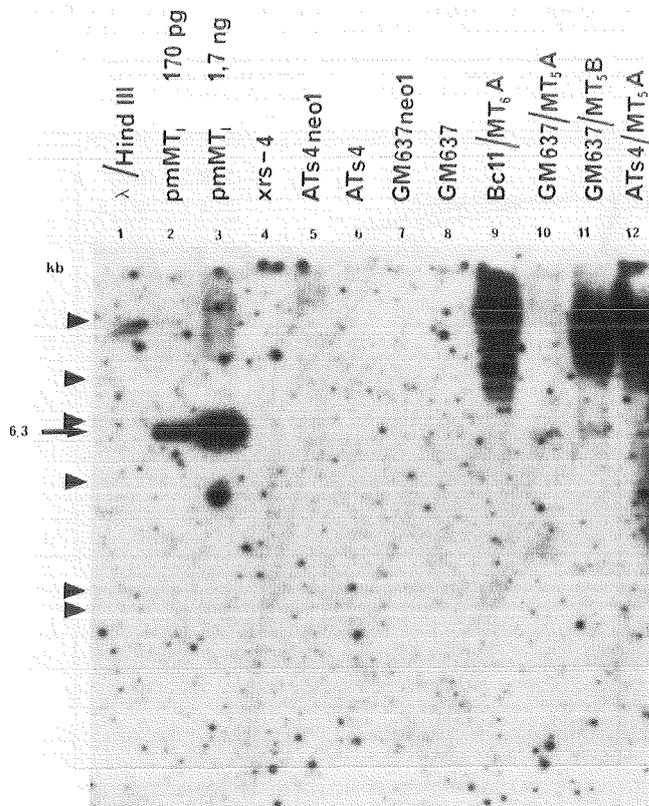


Abbildung 8 A: Autoradiogramm eines Southern-Blot Experiments zum Nachweis des Maus-MT-I Gens in schwermetallresistenten Transfektanten. Je 10 µg der genomischen DNAs wurden mit EcoRI geschnitten, ebenso die DNA des Plasmids pmMT_I, in einem 0.8% Agarose-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit ³²P-nick-translatierten Maus-MT-I Sequenzen hybridisiert. Kontroll-DNAs sind in den Spuren 4 bis 8, Transfektanten in den Spuren 9 bis 12 aufgetragen. Zur Kalibrierung der integrierten mMT-I-Gen Kopien sind 170 pg und 1.7 ng des linearierten Plasmids pmMT_I aufgetragen.

Im abgebildeten Autoradiogramm (Abbildung 8 A) sind in den Spuren 2 und 3 Standards des transfizierten Plasmids nach Linearisierung durch das Restriktionsenzym EcoRI aufgetragen. Das Hybridisierungssignal von 170 pg Plasmid DNA mit der radioaktiv markierten Probe, entspricht 17 Genkopien bezüglich der aufgetragenen 10 µg genomischer DNA (1.7 ng entsprechen 170 Genkopien). Verschiedene Kontroll-DNAs wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRI fragmentiert und in den Spuren 4 bis 8 aufgetragen. DNA aus CHO xrs-4 Zellen (Spur 4) hybridisiert unter stringenten Bedingungen nicht mit den Maus-MT₁ Sequenzen. Ebenso wenig zeigt sich ein Hybridisierungssignal in den menschlichen Rezipientenzelllinien ATs4 und GM637 (Spur 6 und 8). Das nick-translatierte Insert des Plasmids ist ausreichend gereinigt, um mit dem pSV2neo-Plasmid, integriert in der DNA der G418 resistenten Klone ATs4neol und GM637neol (Spuren 5 und 7), nur wenig Kreuzreaktion zu zeigen. Die DNAs der Cd²⁺/Zn²⁺-selektionierten Klone sind nur partiell mit dem Restriktionsenzym EcoRI fragmentiert worden. Die DNA des Klons Bcl1/MT₅A (Spur 9) hybridisiert intensiv mit dem mMT₁-Insert, was auf die Integration von ca 200 Genkopien schließen läßt. Die DNA der Massenkultur GM637/MT₅A (Spur 10) zeigt dagegen nur ein schwaches Hybridisierungssignal mit einem DNA-Fragment das dem Molekulargewicht des linearisierten Plasmids entspricht. Die DNA der Massenkulturen GM637/MT₅B und ATs4/MT₅A (Spur 11 und 12) sind nicht mit Restriktionsenzymen geschnitten worden. Ihr starkes Hybridisierungssignal im hochmolekularen Bereich deutet auf ca 200 integrierte Genkopien hin.

In Abbildung 8 B sind verschiedene DNAs von Transfektanten des pMT₁₁-BPV Vektors in einem Southern-Blot Experiment dargestellt. Die niedermolekulare Hirt-DNA dieser Transfektanten wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten und 10 µg der DNA-Fragmente

in einem 0.8%igen Agarose-Gel getrennt. Als spezifische Probe wurde das radioaktiv markierte Plasmid pMT₁₁-BPV verwendet. In den Spuren 9 und 10 sind 800 und 80 pg des EcoRI linearisierten Plasmids aufgetragen. In den Spuren 1, 2, 4 und 6 sind jeweils 10 µg HindIII-geschnittene genomische Kontroll-DNAs aufgetragen. Die genomische DNA von GM637-Zellen in Spur 1 zeigt eine spezifische Hybridisierung im niedermolekularen Bereich. Dieses Signal zeigt sich auch in der genomischen DNA des pSV2neo-Transfektanten GM637neol (Spur 2) und wird durch Hybridisierung mit dem 3.0 kb

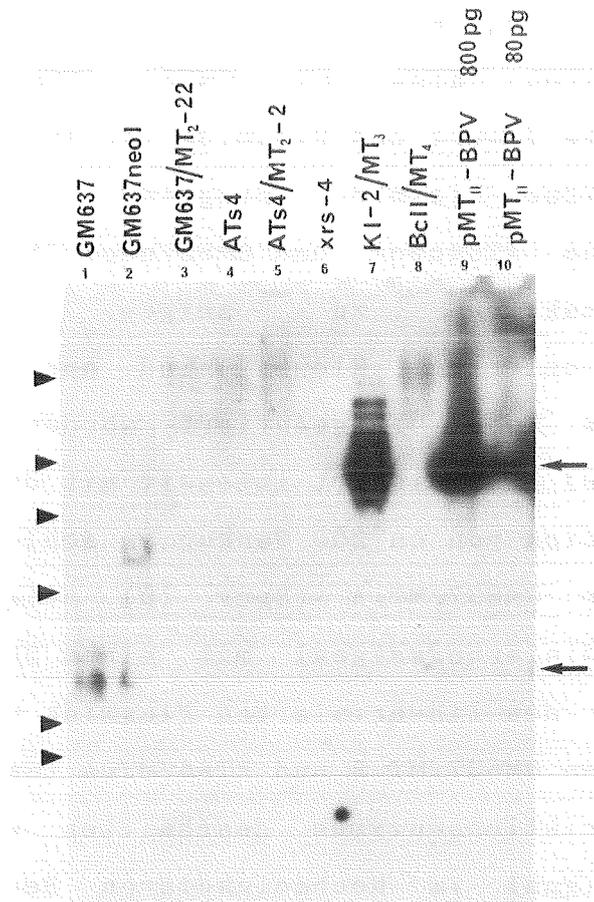


Abbildung 8 B: Autoradiogramm eines Southern-Blot Experiments zum Nachweis des Plasmids pMT₁₁-BPV in schwermetallresistenten Transfektanten. Je 10 µg Hirt-DNA Extrakt der Zellen Bcll/MT₄, Kl-2/MT₃, ATs4/MT₂-2 und GM637/MT₂-22 und das Plasmid pMT₁₁-BPV wurden mit EcoRI geschnitten. Je 10 µg der genomischen DNA der Zellen GM637, GM637neol, ATs4, und xrs-4 wurden mit HindIII geschnitten. Die DNAs wurden in einem 0.8% Agarose-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit ³²P-nick-translatiertem Plasmid pMT₁₁-BPV hybridisiert.

großen HindIII-Fragment des endogenen MT-IIA Gens (56) hervorgerufen. Das höhermolekulare (4.8 kb) zweite Signal in der DNA des Klons GM637neo1 entsteht durch Hybridisierung mit den bakteriellen Sequenzen der radioaktiv markierten Probe und den integrierten pSV2neo-Sequenzen (siehe Kapitel C, Punkt 3.1.1.). Die genomische DNA des Rezipienten ATs4 (Spur 4) war nicht vollständig verdaut worden, so daß das 3.0 kb Fragment des endogenen MT-Gens nur ganz schwach zu sehen ist und statt dessen Hybridisierungssignale im hochmolekularen Bereich aufleuchten. Die genomische DNA der CHO Mutante xrs-4 ist nach HindIII-Abbau in Spur 6 aufgetragen. Die Hirt-DNA Extrakte der MT-Transfektanten GM637/MT₂-22 (Spur 3) und ATs4/MT₂-2 (Spur 5) zeigen keine spezifischen Hybridisierungssignale mit der DNA-Probe. Das transfizierte Plasmid liegt in diesen Zellen nicht episomal vor. Die Hirt-Extrakte der Cd²⁺-resistenten Klone Kl-2/MT₃ (Spur 7) und Bcl1/MT₄ (Spur 8) wurden mit EcoRI abgebaut. Die DNA des Klons Kl-2/MT₃ hybridisiert intensiv mit der Probe. Die DNA des Klons Bcl1/MT₄ zeigt Hybridisierung im hochmolekularen Bereich. Als gesichert kann nur der Nachweis des transfizierten Plasmids pMT₁₁-BPV in dem Klon Kl-2/MT₃ gelten.

Das Plasmid pmMT₁ läßt sich in den Transfektanten GM637/MT₅A, GM637/MT₅B und ATs4/MT₅A nachweisen. Das Maß der Resistenz gegenüber Cd²⁺ korreliert jedoch nicht mit der Zahl integrierter Kopien.

Transfektanten des Plasmids pMT₁₁-BPV sind gegenüber den toxischen Eigenschaften des Cd²⁺ Kations besonders resistent. Die Transfektionseffizienzen des Plasmids waren in CHO-Zellen vergleichbar zu menschlichen Zellen, obwohl letztere für den BPV-Kern des Vektors nicht permissiv sind (90); hier könnten Rekombinationsereignisse mit der E.coli-Carrier DNA zu einer

stabilen Integration geführt haben, weshalb die Sequenzen dann auch nicht in der Hirt-DNA Extraktion nachweisbar sind. Gesichert ist die Anwesenheit und der episomale Zustand des Plasmids pMT₁₁-BPV in der CHO-Transfektante Kl-2/MT₃.

4. Expression der exogenen MT-Gene

Menschliche SV40-transformierte Fibroblasten ATs4 und GM637 und die CHO-Zelllinie Kl-2 und xrs-2 wurden mit Plasmiden transfiziert, die für MT-Proteine codieren. Isolierte Transfektanten aller Zelllinien zeigen eine verbesserte Toleranz gegen das Schwermetall Cd²⁺. In Southern-Blot Experimenten mit

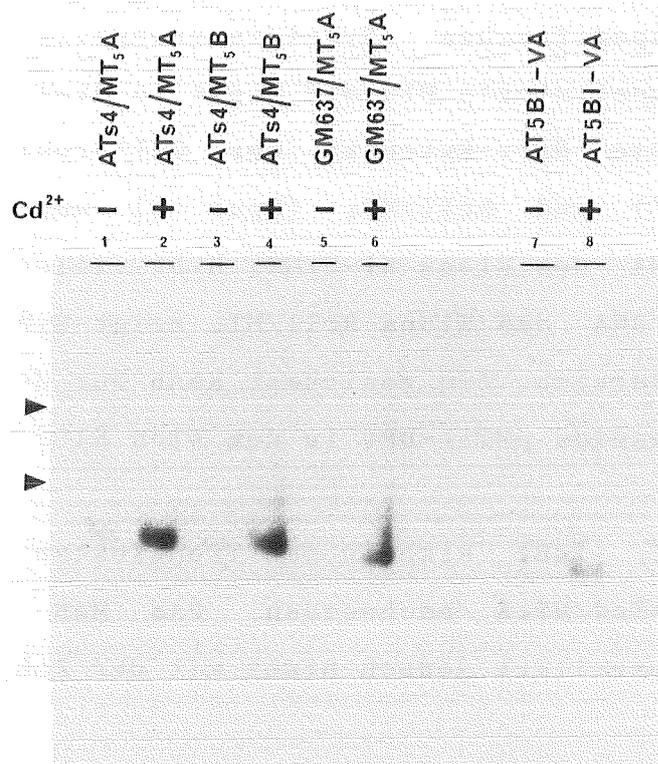


Abbildung 9 A: Autoradiogramm eines Northern-Blot Experiments zum Nachweis der Induktion der Maus-MT-I Genkopien in den Transfektanten ATs4/MT₅A (Spur 1 und 2), ATs4/MT₅B (Spur 3 und 4) und GM637/MT₅A (Spur 5 und 6) und Kontroll-RNA aus AT5BI-VA Zellen. Die total-RNAs wurden von unbehandelten Zellen (-) oder 7 Stunden nach Cd²⁺/Zn²⁺-Induktion (+) präpariert, jeweils 10 µg in einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose Filter transferiert und mit ³²P-nick-translatiertem Maus-MT-I Insert des Plasmids pMT₁ hybridisiert. Die Größenmarker geben die Wanderung der 28S und 18S rRNA an.

der Hirt-DNA der Transfektanten, wurde das Plasmid pMT_{II}-BPV mit Sicherheit nur in der Transfektante Kl-2/MT₃ nachgewiesen. Nach Transfektion des Plasmids pmMT_I ist das Maus-MT-I Gen in den Transfektanten Bcl1/MT₆A, GM637/MT₅A, GM637/MT₅B und ATs4/MT₅A nachweisbar. Von allen Cd²⁺-resistenten Klonen wurde total-RNA präpariert, um die Regulation des eingebrachten MT-Gens auf der Ebene der Transkription zu studieren. In Northern-Blot Experimenten werden jeweils 10 µg der total-RNA aufgetrennt. Die

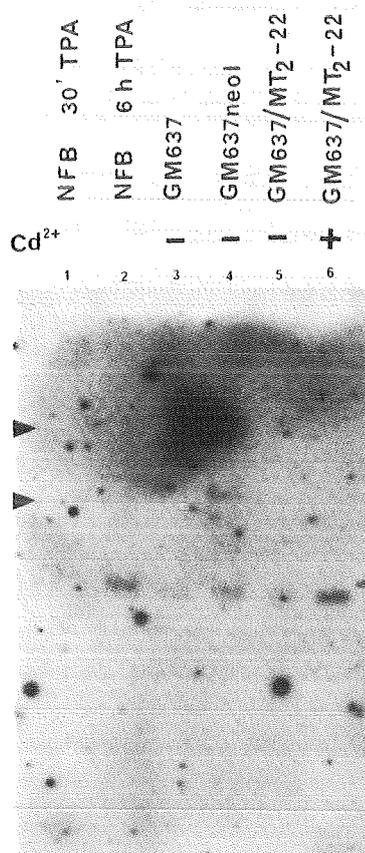


Abbildung 9 B: Autoradiogramm eines Northern-Blot Experiments zum Nachweis der Induktion des menschlichen MT-II_A Gen in dem schwermetallresistenten Klon GM637/MT₂-22 und Kontroll-RNAs aus GM637 und GM637neol Zellen. Die total-RNAs wurden von unbehandelten Zellen (-) oder 7 Stunden nach Cd²⁺/Zn²⁺-Induktion (+) präpariert, je 10 µg in einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose Filter transferiert und mit ³²P-nick-translatiertem hMT-II_A Insert des Plasmids pMT_{II}-BPV hybridisiert. Die Induktion des endogenen hMT-II_A Gens ist in NFB Primärfibroblasten 6 Stunden nach TPA-Zugabe zum Medium gezeigt. Die Größenmarker geben die Laufhöhe der 28S und 18S rRNA an.

Spuren mit dem Symbol (+) bezeichnen RNAs, die 6 Stunden nach Cd^{2+}/Zn^{2+} -Induktion (20 und 70 μM) präpariert wurden. Mit (-) sind Spuren von total-RNAs aus unbehandelten Zellen markiert.

Als Proben wurden die MT-Gen-Inserts der Plasmide verwendet: Das Maus-MT_I Gen wurde durch einen EcoRI und HindIII Doppelverdau aus dem Plasmid pmMT_I geschnitten. Das menschliche MT_{II}-Gen wird durch HindIII-Verdau aus dem Plasmid pMT_{II}-BPV isoliert.

In Abbildung 9A sind RNAs vor pmMT_I-Transfektanten aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit der radioaktiv markierten Probe des mMT_I-Inserts des Plasmids pmMT_I. Gewaschen wurde Northern-Blot unter nicht-stringenten Bedingungen, um die Kreuzreaktion mit menschlichen MT-mRNAs nicht auszuschließen. Die Hybridisierungssignale in Spur 7 und 8 beweisen, daß nach Cd^{2+}/Zn^{2+} -Stimulation das endogene MT der AT-Stammlinie induziert wird. In den Transfektanten ATs4/MT₅A, ATs4/MT₅B und GM637/MT₅A sind die basalen Mengen an mMT-mRNA höher als in der Rezipienten-Linie AT5BI-VA. Die Schwermetallinduktion verstärkt die Menge vorhandener mMT-mRNA um den Faktor 20 - 30. Das transfizierte Maus-MT-Gen wird in den menschlichen Fibroblasten korrekt reguliert und führt zu einer deutlichen Steigerung der Menge der MT-mRNA in den Zellen.

In Abbildung 9 B ist die total-RNA des Cd^{2+} -resistenten Klons GM637/MT₂-22 und einiger Kontroll RNAs aufgetragen. Hybridisiert wurde mit nick-translatiertem hMT-II_A-Insert des Plasmids pMT_{II}-BPV. In Spur 1 und 2 ist die endogene MT-Induktion in menschlichen primären Normalfibroblasten (NFB) nach Zugabe von TPA gezeigt: 30 Minuten nach TPA-Induktion ist noch keine MT-mRNA-Induktion sichtbar; nach 6 Stunden ist die höchste Menge an MT-mRNA erreicht. Die RNA von GM637 Rezipientenzellen und der pSV2neo-Transfektante GM637neol sind in den Spuren 3 und 4

aufgetrennt worden. Der Transfektant GM637/MT₂-22 besitzt im nicht-induzierten Zustand vergleichbare Mengen an MT-mRNA wie der Rezipient (Spur 5) und zeigt deutlich Akkumulation nach Cd²⁺/Zn²⁺-Induktion (Spur 6).

Die Induktion des exogenen menschlichen MT₁₁-Gens in den Transfektanten Kl-2/MT₃ ist in der Abbildung 9 C wiedergegeben. Total-RNA wurde aus CHO Wildtyp Kl-2 Zellen und aus der Transfektante Kl-2/MT₃ isoliert, jeweils 7 Stunden vor der Präparation der RNA wurde mit 20µM Cd²⁺ und 70µM Zn²⁺ induziert (+) oder nicht induziert (-) (Spuren 1 - 4). Als positive Kontrolle der Hybridisierung ist RNA aus menschlichen MCF7 Carcinoma Zellen

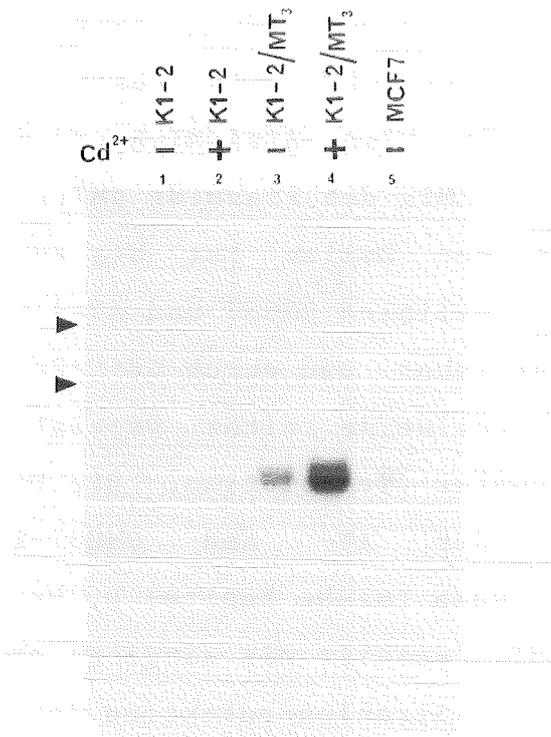


Abbildung 9 C: Autoradiogramm eines Northern-Blot Experiments zum Nachweis der Induktion des menschlichen MT-IIA Gens in der Transfektante Kl-2/MT₃. Total-RNA des Klons Kl-2/MT₃ und der parental Zelle Kl-2 wurde von unbehandelten Zellen (-) oder 7 Stunden nach Cd²⁺/Zn²⁺-Induktion (+) präpariert, je 10 µg in einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose Filter transferiert und mit ³²P-nick-translatiertem Plasmid pMT₁₁-BPV hybridisiert. Zur Kontrolle ist die total-RNA aus menschlichen MCF7 Carcinoma Zellen aufgetragen. Die Größenmarker geben die Laufhöhe der 28S und 18S rRNA an.

aufgetragen (Spur 5). Hybridisiert wurde mit dem menschlichen MT₁₁-Gen aus dem Plasmid pMT₁₁-BPV und stringent gewaschen. Die RNA aus den menschlichen MCF7 Zellen zeigt ein schwaches Signal mit der spezifischen Probe. In der Rezipientenzelle Kl-2 ist keine Kreuzhybridisierung mit dem endogenen MT-Gen nachweisbar. Das menschliche MT₁₁-Gen in der Transfektante Kl-2/MT₃ unterliegt der Regulation durch Schwermetalle (Spuren 3 und 4). Die Induktion mit Cd²⁺ und Zn²⁺ steigert die Menge des MT₁₁-mRNA der Zellen um das 20-fache.

Zusammenfassend kann zur Expression der transfizierten MT-Gene folgendes festgestellt werden:

In allen untersuchten Cd²⁺/Zn²⁺-resistenten Klonen werden die übertragenen MT-Gene durch das Schwermetall Cd²⁺ induziert. Gezeigt wird dies für schwermetallresistente Transfektanten des Plasmids pmMT₁: ATs4/MT₅A, ATs4/MT₅B und GM637/MT₅A und für den Transfektanten Kl-2/MT₃ des Plasmids pMT₁₁-BPV. Die Anreicherung der MT-mRNAs in den Zellen ist bis auf das 20-fache. In den immortalisierten Zelllinien GM637 und ATs4 sind erhebliche Mengen an MT-mRNA nachweisbar und durch Cd²⁺/Zn²⁺-Induktion weiter zu steigern (Daten teilweise nicht gezeigt). Diese Anreicherung könnte, bei erhöhter Translation, die Ursache für die relativ hohe Resistenz der AT- und GM637-Zellen gegenüber dem Schwermetall Cd²⁺ sein (siehe Kapitel D, Punkt 2.).

Der Klon Kl-2/MT₃ erfüllt die eingangs erwähnten Prämissen für die Frage nach der Strahlenprotektion der MT-Proteine besonders eindeutig: Das transfizierte Plasmid ist episomal nachgewiesen, das hMT-IIA Gen wird transkribiert und durch Schwermetalle induziert. Bestimmungen des MT-IIA Gehaltes dieser Zellen von M. KARIN, La Jolla (USA), ergaben eine 100-fache Anreicherung des hMT-IIA-Proteins nach Induktion (Daten nicht gezeigt, persönliche Nachricht).

5. Überleben von Zellklonen mit transfizierten
Metallothionein-Genen nach Gamma-Bestrahlung

OH-Radikale sind die wichtigsten Radiolyseprodukte des Wassers. Die hohe Reaktivität des OH-Radikals führt zu sofortiger Reaktion mit organischen Strukturen der Zelle. Die "indirekte Strahlenwirkung" beruht auf der Reaktion dieser Radikale mit der DNA, und können die Basen der DNA oder deren Zucker-Phosphat-Rückgrad betreffen (17). Das Metallothionein Protein erweist sich *in vitro*, als hochreaktiver Partner für OH-Radikal Reaktionen (103): Metallothionein-Proteine reagieren mit OH-Radikalen 100 schneller, als dies andere Proteine tun.

In den folgenden Experimenten wurde geklärt, ob durch Anreicherung des Metallothionein-Proteins in den Zellen ein Schutzeffekt vor ionisierender Strahlung entsteht. Dazu wurden γ -Überlebenskurven der Zelllinien aufgenommen, wobei das MT-Gen Cd^{2+}/Zn^{2+} -induziert, oder nicht induziert wurde und jeweils oxische und hypoxische Bedingungen während der Bestrahlung getestet wurden.

Eine Woche vor der Bestrahlung wurden die Zellen, ohne Addition von Zn^{2+} und Cd^{2+} zum Medium, kultiviert. Einen Tag vor der Bestrahlung wurden 2×10^5 Zellen in 25 cm^2 Flaschen plattiert. 6 - 7 Stunden vor der γ -Bestrahlung wurde bei der Hälfte der Ansätze, die Schwermetallkonzentration des Mediums auf folgende Werte eingestellt: Cd^{2+} zu $20 \text{ }\mu\text{M}$ und Zn^{2+} zu $40 \text{ }\mu\text{M}$. Vier parallele γ -DEK wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen:

- a) (+) O_2 : Cd^{2+}/Zn^{2+} -induziertes MT-Gen, aerobe Bedingungen.
- b) (+) N_2 : Induziertes MT-Gen, hypoxische Bedingungen.
- c) (-) O_2 : Nicht-induziertes MT-Gen, aerobe Bedingungen.
- d) (-) N_2 : Nicht-induziertes MT-Gen, hypoxische Bedingungen.

Mit den Rezipientenzelllinien wurden die gleichen Experimente ausgeführt. In diesen Fall durfte die Induktion des endogenen MT-Gens mit Schwermetallsalzen höchstens mit folgenden Konzentrationen durchgeführt werden: Cd^{2+} zu 3 μM , Zn^{2+} zu 10 μM .

5.1. Überlebenskurven der Transfektante Kl-2/MT₃ und des Wildtyps Kl-2 nach γ -Bestrahlung

In Abbildung 10 A sind die Werte von vier unabhängigen γ -DEK des Klons Kl-2/MT₃ gemittelt. Die jeweils ausgefüllten Symbole repräsentieren die γ -DEK nach Schwermetallinduktion.

Nach $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ Induktion des Klons Kl-2/MT₃ ist das Überleben der Zellen nach γ -Bestrahlung nicht verändert, verglichen mit nicht-induzierten Zellen, weder unter oxischen noch hypoxischen Bedingungen. Die Induktion des Metallothionein-Gens im Klon Kl-2/MT₃, und die damit ausgelöste Erhöhung der Menge an Metallothionein-Protein (siehe Diskussion) in den Zellen schützt die Zellen nicht vor den Wirkungen der γ -Strahlen.

Die γ -DEK der Rezipientenzelllinie Kl-2 ist in Abbildung 10 B wiedergegeben. Die Durchschnittswerte aus drei Experimenten sind dargestellt. Die ausgefüllten Symbole beziehen sich wieder auf die Ansätze nach $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -Behandlung. Die Induktion des endogenen MT-Gens der Kl-2 Zellen ändert nicht deren Überleben nach γ -Bestrahlung, weder unter oxischen noch hypoxischen Bedingungen.

Im Vergleich der γ -DEK der Rezipientenzellen Kl-2 und der Transfektante Kl-2/MT₃ fällt auf, daß die Transfektante merklich empfindlicher gegenüber ionisierenden Strahlen geworden ist. Die Überlebensrate der Rezipientenzelle bei 5.0 Gy ist unter oxischen Bedingungen 0.17; bei 5.0 Gy ist das Überleben der Transfektante Kl-2/MT₃ hingegen 0.11 ! Auch in sauerstoffreier Atmosphäre ist die Überlebensrate der Transfektante gegenüber den Rezipien-

tenzellen reduziert. Wegen der geringeren Neigung der Geraden unter Hypoxie sind die Unterschiede hier auch geringer.

Die Erhöhung der MT-Konzentration nach Schwermetall-Induktion in dem Klon K1-2/MT₃ führt zu keiner Verbesserung des Überlebens der Zellen nach Behandlung mit ionisierenden Strahlen, sowohl unter oxischen, wie unter hypoxischen Bedingungen.

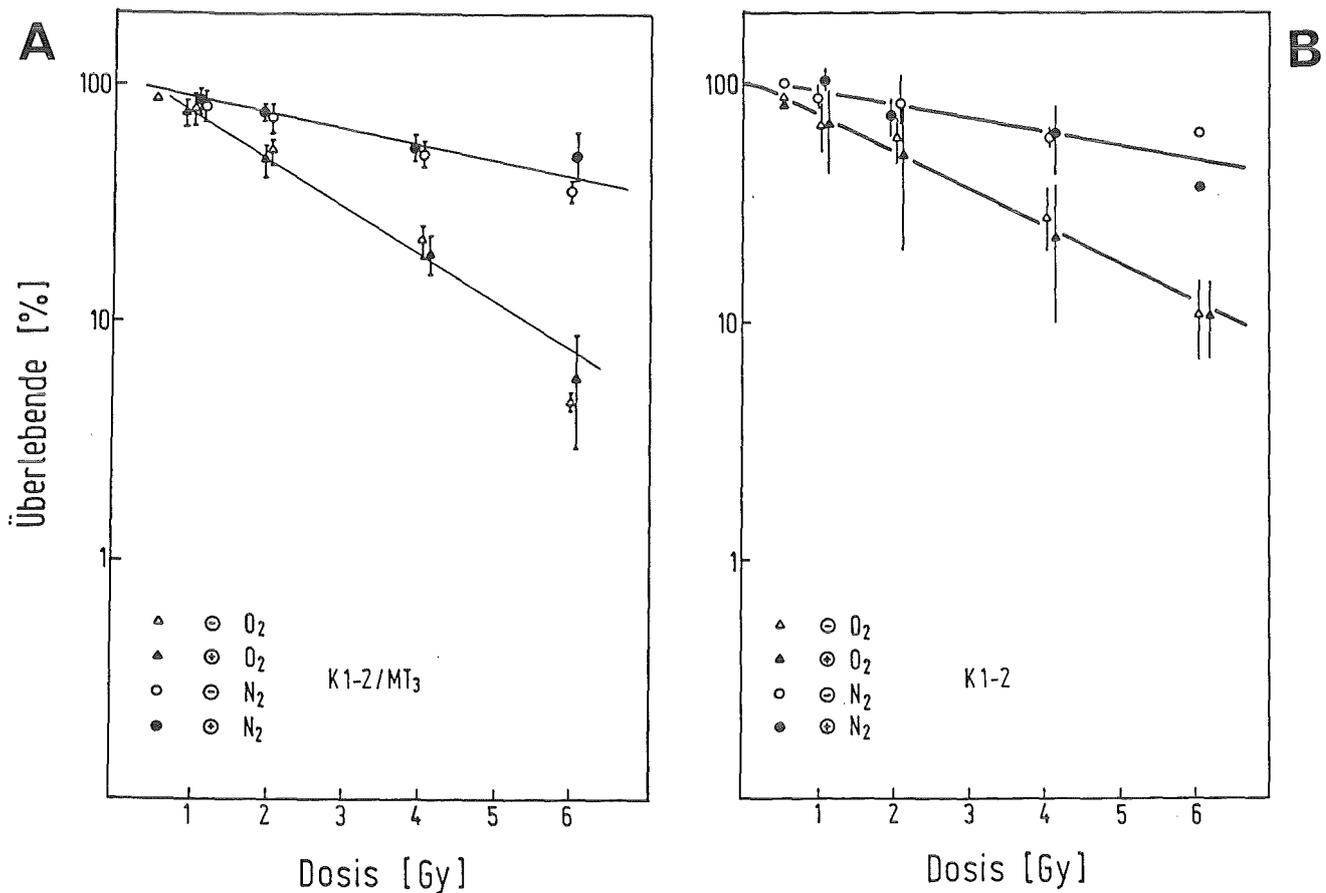


Abbildung 10 A: Überlebenskurven nach ⁶⁰Co-γ-Bestrahlung der CHO Transfektante K1-2/MT₃. 7 Stunden nach Cd²⁺/Zn²⁺-Induktion ((+), ausgefüllte Symbole) oder ohne Induktion des hMT-IIA Gens ((-), offene Symbole). Die Überlebenskurven wurden unter oxischen (Dreieck-Symbole) oder hypoxischen Bedingungen (Kreis-Symbole) aufgenommen.

Abbildung 10 B: Überlebenskurven nach ⁶⁰Co-γ-Bestrahlung der CHO Zelllinie K1-2, 7 Stunden nach Cd²⁺/Zn²⁺-Induktion ((+), ausgefüllte Symbole) oder ohne Induktion des endogenen MT Gens ((-), offene Symbole). Die Überlebenskurven wurden unter oxischen (Dreieck-Symbole) oder hypoxischen Bedingungen (Kreis-Symbole) aufgenommen.

5.2. Überlebenskurven menschlicher Zelllinien und ihrer Metallothionein-Transfektanten nach γ -Bestrahlung

Mit MT-Transfektanten der menschlichen Zelllinien ATs4 und GM637 wurden γ -Überlebenskurven aufgenommen, um einen Schutzeffekt des MT-Proteins vor den Radiolyseprodukten des Wassers nachzuweisen. In Abbildung 11 A und B sind verschiedene MT-Transfektanten des Plasmids pMT₁₁-BPV in ihrem Überleben nach γ -Strahlung aufgeführt.

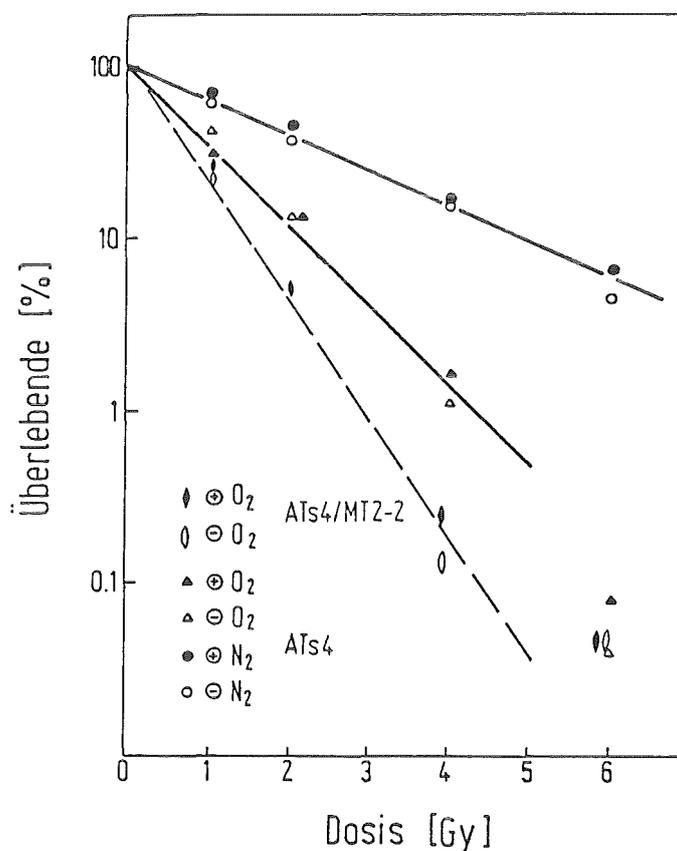


Abbildung 11 A: Überlebenskurven nach ^{60}Co - γ -Bestrahlung menschlicher Zelllinien. Der schwermetallresistente Klon ATs4/MT₂-2 und die parentale Zelllinie ATs4 wurden 7 Stunden nach $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -Induktion (+), ausgefüllte Symbole) oder ohne Induktion (-), offene Symbole) bestrahlt. Von der Zelllinie ATs4 wurden Überlebenskurven unter oxischen (+), Dreieck-Symbole) und hypoxischen Bedingungen aufgenommen (-), Kreis-Symbole).

Die Abbildung 11 A zeigt γ -Überlebenskurven der Stammlinie AT5BI-VA und der pMT₁₁-BPV-Transfektante AT/MT₂-2. Von der AT-Stammlinie wurden Überlebenskurven unter oxischen und hypoxischen Bedingungen gemessen. Von der Transfektante AT/MT₂-2 sind die oxischen γ -Überlebenskurven wiedergegeben. Die ausgefüllten Symbole beziehen sich auf Werte nach Cd²⁺-Induktion der Zellen. Die Überlebenskurven der Rezipientenzelllinie AT5BI-VA zeigen nach Schwermetallinduktion keine Veränderung. Auch die γ -DEKs für den Klon ATs4/MT₂-2 unterscheiden sich nicht nach Schwermetallinduktion oder Nichtinduktion. Jedoch läßt sich feststellen, daß die Überlebensrate der Transfektante verglichen mit der Rezipientenzelllinie erheblich verschlechtert ist. Nach einer γ -Bestrahlung von 4.0 Gy überleben 1 - 2% der AT5BI-VA Zellen, jedoch nur ca 0.2% der Zellen der Transfektante ATs4/MT₂-2.

Die Durchschnittswerte aus drei unabhängigen γ -DEK der Cd²⁺-resistenten Transfektante GM637/MT₂-22 sind in Abbildung 11 B wiedergegeben. Die ausgefüllten Symbole entsprechen den Werten nach Schwermetallinduktion. Wiederum ist kein Unterschied im Überleben der induzierten Zellen zu den nicht-induzierten Kontrollen zu beobachten. Im Vergleich zur γ -DEK der Rezipientenzelllinie GM637 hat sich die Überlebenskurve der Transfektante verändert (siehe Kapitel C, Abbildung 1). Die Neigung der Endgerade bei oxischen Bedingungen ist in den MT-Transfektanten abgeflacht, jedoch haben die Transfektanten den ausgeprägten Schulterbogen der parentalen Zelllinie verloren.

In Abbildung 11 C sind γ -DEK verschiedener menschlicher Cd²⁺-resistenter Transfektanten mit dem heterologen Maus-MT-I-Gen dargestellt.

Die ausgefüllten Symbole der Abbildung repräsentieren die Werte nach Schwermetallinduktion. Die Transfektanten GM637/MT₅A und

GM637/MT₅B sind in ihrem Überleben nach γ -Bestrahlung völlig unverändert zur parentalen Zelllinie GM637. Jedoch die Transfektanten ATs4/MT₅A und ATs4/MT₅B haben erhöhte Sensitivität gegenüber γ -Strahlen: eine Dosis von 4.0 Gy überleben 0.2 - 0.3% der Transfektanten jedoch 1 - 2% der parentalen Zelllinie.

Die Transfektion eines MT-Gens in eukaryotische Zellen führt zu Zellklonen, deren Überleben nach γ -Bestrahlung gegenüber der Rezipientenzelle verschlechtert ist. Dies gilt für CHO-Zellen mit transfiziertem menschlichen MT-II_A Gen, als auch für

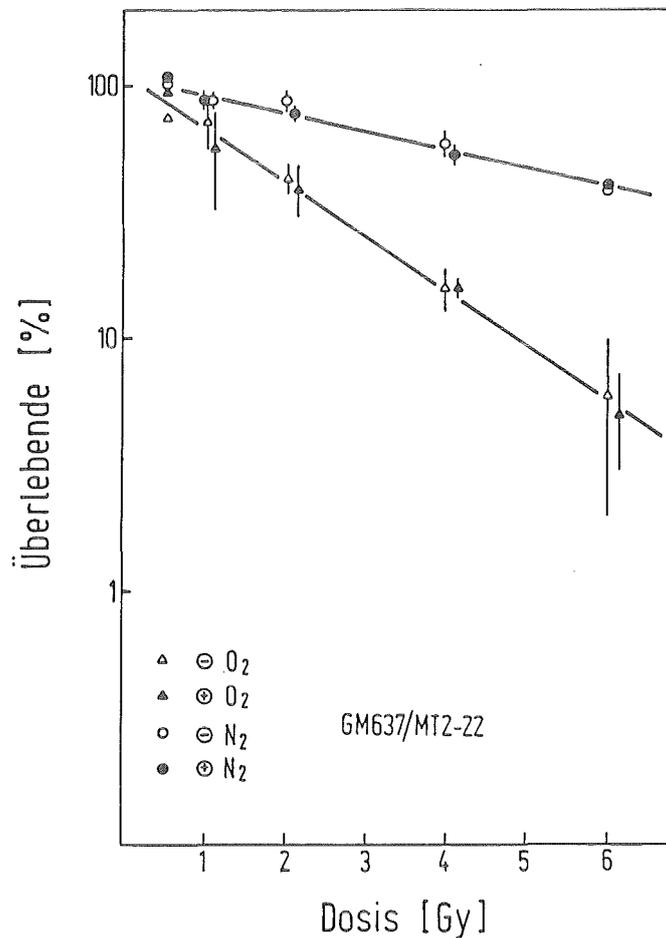


Abbildung 11 B: Überlebenskurven nach ^{60}Co - γ -Bestrahlung des schwermetallresistenten Klon GM637/MT₂-22. 7 Stunden nach $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -Induktion ((+), ausgefüllte Symbole) oder ohne Induktion ((-), offene Symbole), wurden die Zellen unter oxischen (Dreieck-Symbole) und hypoxischen Bedingungen (Kreis-Symbole) bestrahlt.

Transfektanten der menschlichen Zelllinien ATs4 und GM637 mit dem Plasmid pMT₁₁-BPV. Auch der Transfer des heterologen Maus-MT-I Gens in ATs4-Zellen führt zur Erhöhung der Strahlensensitivität. Jedoch sind GM637 Zellen nach der Transfektion des Maus-MT-I Gens in ihrem Überleben nach γ -Bestrahlung unverändert zur Rezipientenzelle.

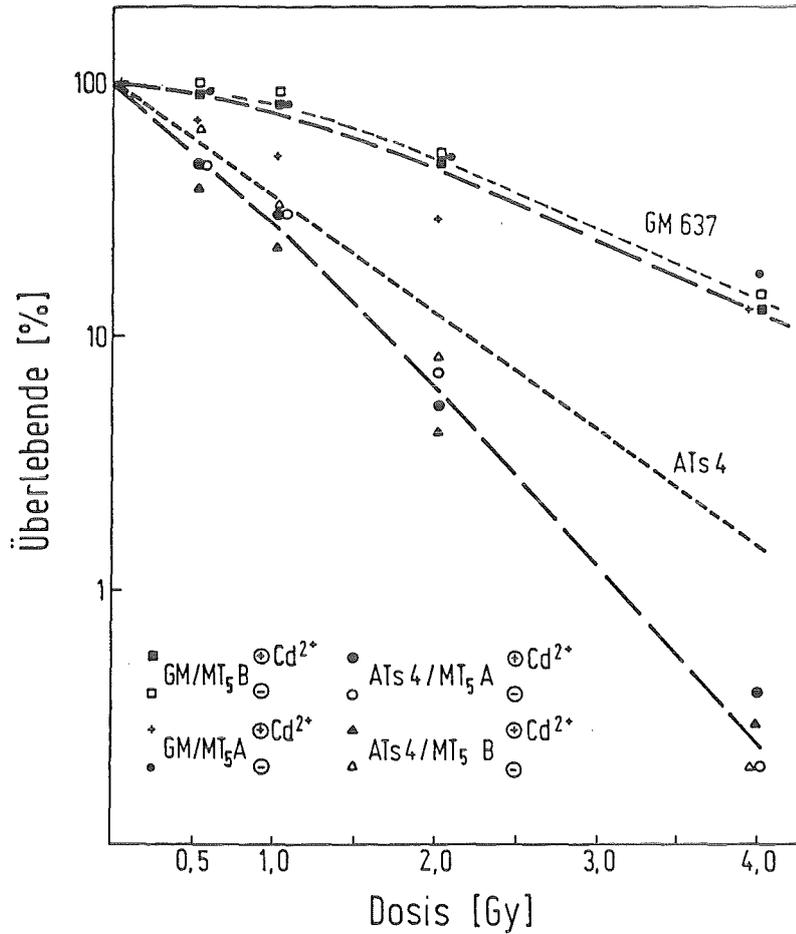


Abbildung 11 C: Überlebenskurven nach ^{60}Co - γ -Bestrahlung schwermetallresistenter Zelllinien nach dem Transfer des Maus-MT-I Gens. Die Zelllinien GM637/MT₅A, GM637/MT₅B, ATs4/MT₅A und ATs4/MT₅B wurden 7 Stunden nach Cd²⁺/Zn²⁺-Induktion ((+), ausgefüllte Symbole) oder ohne Induktion ((-), offene Symbole) unter oxidischen Bedingungen bestrahlt.

Durch den Transfer eines MT-Gens erhöht sich die Resistenz der Zellen gegenüber Schwermetallen. Die erhöhte Transkription der exogenen MT-Gene nach $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -Induktion führt nicht zu einem Schutz vor den indirekten Effekten ionisierender Strahlung. Selbst die 100-fache Erhöhung des hMT-II_A Proteins nach Schwermetallinduktion in dem Klon Kl-2/MT₃ (persönliche Nachricht von M. Karin), beeinflusst das Überleben der Zellen nach γ -Bestrahlung nicht.

6. Diskussion

In die menschlichen Zelllinien ATs4 und GM637, und die CHO Zelllinien Kl-2 und xrs-2 wurden Metallothionein-Gene transfiziert. Eingesetzt wurden zwei Plasmide: i) MT_{IIA}-BPV, ein in stabilen Transfektanten episomal vorkommender Vektor, der für das menschliche MT-II_A Gen codiert; ii) das Plasmid pmMT_I codiert für das Maus-Metallothionein-I_A Protein und integriert in die Kern-DNA des Rezipienten. Die Selektion stabiler Transfektanten erfolgte in Medium mit Zusätzen von CdCl₂ (20 µM) und ZnCl₂ (70 µM).

Nach dem Transfer des hMT-II_A Gens wurden die Klone Kl-2/MT₃, GM637/MT₂-22 und ATs4/MT₂-2 isoliert und näher untersucht. Nach Transfer des Maus-MT-I Gens wurden schwermetallresistente Kulturen isoliert, von denen ATs4/MT_{5A}, ATs4/MT_{5B}, GM637/MT_{5A} und GM637/MT_{5B} eingehender untersucht wurden. In Kontroll-Petrischalen nicht-transfizierter Zellen führte die Selektion auf Schwermetallresistenz in keinem Experiment zur Isolierung eines resistenten Klons.

In Cd²⁺-Überlebenskurven wurde die Resistenz der Zelllinien quantifiziert. Eine höhere Cd²⁺-Resistenz der Transfektanten mit dem hMT-II_A Gen gegenüber denjenigen des Maus-MT-I Gens wurde festgestellt. Untersuchungen ergaben, daß das hMT-II_A Gen 50% der MT-mRNA in menschlichen Zellen und Leberzellen liefert (58). Es könnte sein, daß die Transkription dieses Gens den isolierten Transfektanten eine ausgeprägtere Cd²⁺-Resistenz vermittelt als das Maus-MT-I Gen.

In Southern-Blot Experimenten wurden die transfizierten Plasmidsequenzen nachgewiesen: In Transfektanten des Maus-MT-I Gens ermittelte ich wenige, bis 200 Kopien. Im Hirt-Extrakt der niedermolekularen DNA, konnten die Sequenzen des Plasmids pMT_{IIA}-BPV nur im Klon Kl-2/MT₃ nachgewiesen werden. Da der BPV-Vektor für menschliche Zellen nicht kompatibel ist (90),

müssen Rekombinationsprozesse stattgefunden haben, zwischen der E.coli-carrier-DNA und den pBR322-Sequenzen des Vektors, gefolgt von einer Integration in die genomische DNA der menschlichen Zellen. Dies würde die schwachen Hybridisierungssignale in dem höhermolekularen Bereich in den Autoradiogrammen erklären (Verunreinigungen der Hirt-DNA mit genomischer DNA).

Sieben Stunden nach der Behandlung der Transfektanten mit Cd^{2+} und Zn^{2+} wurden erhöhte Mengen an MT-mRNA in den Zelllinien gefunden. Beispielsweise zeigte der Klon Kl-2/MT₃ eine 20-fache Anreicherung der hMT-II_A-mRNA. Die vergleichsweise hohe Menge an hMT-II_A-mRNA in diesem Klon ohne Schwermetall-Induktion geht auf die vermehrte Transkription des viralen Vektors zurück. Die erhöhte hMT-II_A-mRNA dieses Klons wird in MT-II_A-Protein translatiert, wie Bestimmungen von M. Karin, La Jolla (USA), ergaben: Der Klon Kl-2/MT₃ reicherte nach Schwermetall-Induktion die 100-fache Menge an hMT-II_A-Protein an, verglichen mit nicht-induzierten Zellen.

Unter oxischen und hypoxischen Bedingungen wurden jeweils von Cd^{2+}/Zn^{2+} -induzierten und nicht-induzierten Zellen Überlebens-tests nach γ -Bestrahlung ermittelt. Dabei wurde festgestellt, daß sich die γ -Dosis-Effekt-Kurven von induzierten und nicht-induzierten Zellen nicht unterscheiden. Die Anreicherung der Zellen mit MT-Proteinen führt zu keinerlei Schutzeffekt vor ionisierender Strahlung. Jedoch wurde beobachtet, daß die Klone Kl-2/MT₃, ATs4/MT₂-2, ATs4/MT₅A und ATs4/MT₅B signifikant strahlensensitiver sind als die parentalen Zelllinien. Außerdem hat der Klon GM637/MT₂-22 die ausgeprägte Schulterkurve der Rezipientenzelllinie verloren und zeigt eine flachere Endgerade der γ -Überlebenskurve. Die Klone GM637/MT₅A und GM637/MT₅B haben eine unveränderte γ -Überlebenskurve verglichen mit GM637-Zellen. Wie kann es zu einer Verschlechterung der Überlebenswahrschein-

lichkeit der Transfektanten gegenüber Röntgenstrahlen kommen? Nur wenige Eigenschaften der MT-Proteine sind beschrieben. Darunter ist die detoxifizierende Funktion bei Schwermetallvergiftungen am besten untersucht, jedoch für natürliche Biotope nicht relevant. Für den intrazellulären Stoffwechsel ist die Eigenschaft der Metalldonation von Interesse: In vitro überträgt das Zink-Thionein unter milden Bedingungen sein zweiwertiges Kation auf Apoenzyme (105). Durch die Aktivierung metallabhängiger Enzyme werden Metallothionein-Proteine potentiell befähigt in biologische Stoffwechselprozesse einzugreifen.

In vitro erfüllt das MT-IIA Protein seine Funktion als Radikalfänger. Die gemessene bimolekulare Reaktionskonstante der Radikal-Reaktion $K_{OH/MT} = 10^{12} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ gilt für Zink-Thionein (103). Rinder Serum Albumin und andere getestete Proteine, sind in ihrer Fähigkeit OH-Radikale zu neutralisieren, sehr viel weniger geeignet, obwohl ihr Molekulargewicht weit aus größer ist ($K_{OH/BSA} = 1.5 \times 10^{10} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). Die Anreicherung der MT-Proteine in den isolierten Transfektanten nach $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -Induktion führt in meinen Experimenten nicht zu einer erhöhten Strahlentoleranz. In γ -Überlebenskurven ist keine Schutzeffekt durch das Abfangen der OH-Radikale nachzuweisen. Die Strahlenprotektion durch das MT-Protein könnte an den räumlichen Gegebenheiten in der Zelle gescheitert sein. Für die Funktion der MT-Proteine als Radikalfänger ist es unerlässlich, daß das Protein ganz benachbart dem Ereignis der Radiolyse eines Wassermoleküls liegt. Denn, in jeder Flüssigkeit erleidet ein bestimmtes Molekül etwa 10^{13} binäre Zusammenstöße pro Sekunde. Die Lebensdauer eines OH-Radikals liegt bei 10^{-13} Sekunden. Das bedeutet, bei einer freien Weglänge, die kaum den Moleküldurchmesser überschreitet, daß schon nach wenigen Stößen das OH-Radikal neutralisiert wird (76). Die Präsenz der MT-Proteine nahe der DNA wäre unabdingbare

Voraussetzung für einen Schutzeffekt. Die Verteilung des MT-Proteins im Nukleus ist jedoch ungeklärt. Das Versagen der Schutzfunktion des MT-Proteins könnte in der Abwesenheit dieses Radikalfängers vom möglichen Schadensort, begründet sein.

Das Metallothionein verdankt seine hohe Reaktivität mit OH-Radikalen seinen zahlreichen Sulfhydryl-Gruppen. Für andere H-S-tragende Moleküle, z.B. Glutathion (GSH) oder Cysteamin (MEA), werden strahlenschützende Funktionen diskutiert. Nach dem Wettbewerbsmodell (1, 38) wetteifern das di-Radikal O_2 und Sulfhydryl-Gruppen um Radikalstellen in der DNA. Reagiert zuerst ein O_2 -Molekül mit dem Radikalrest an der DNA, dann wird der Schaden als Carboxyl-Gruppe fixiert. Reagiert eine H-S-Gruppe schneller, dann wird durch Protonenaustausch der Schaden rekonstituiert. Erhöhte Konzentrationen von GSH sollte die Zellen vor ionisierender Strahlung schützen, doch sind die diesbezüglich veröffentlichten Experimente widersprüchlich (74, 89, 75, 16, 87). Neuere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, daß der Strahlenprotector Cysteamin (MEA, beta-Mercaptoethylamin) seine Funktion, nicht durch die Rekonstitution des Radikalschadens an der DNA erfüllt, sondern durch die Beeinflussung des Stoffwechsels (18). Ein Experiment mit *recA*-Mutanten von *E. coli* konnte dies zeigen (39): Der Wildtyp *recA*⁺ und fünf *recA*⁻ Mutanten wurden unter aeroben Bedingungen bestrahlt, jeweils mit oder ohne 0.1 M Cysteamin im Kulturmedium. Die Berechnung der Dose Modifying Faktoren (DMF, das Überleben von Cysteamin-behandelten Zellen zu unbehandelten Zellen bei einer bestimmten Dosis) ergibt für *recA*⁺ den Wert von 1.90, für die fünf *recA*⁻ Mutanten Werte zwischen 1.00 und 1.50. Besonders die Mutante mit dem DMF von 1.00 beweist, daß Cysteamin in *E. coli* keinen Schutzeffekt durch das Abfangen von OH-Radikalen bewirkt. Den besten Schutz erreicht man in *recA*⁺ Wildtypzellen, da hier

das Cysteamin seine Wirkung durch den positiven Einfluß auf enzymatische Reparaturprozesse entfaltet.

Meine Ergebnisse sind auch über die Beziehung zum Stoffwechsel zu interpretieren. Die Thioneine haben die Fähigkeit cytotoxische Schwermetalle zu chelatisieren und außerdem vermögen sie, durch adäquate Metalldonation, metallabhängige Enzyme zu aktivieren. Wenn eine Aktivierung durch Metalldonation möglich ist, dann ist eine Hemmung durch Verarmung der Zellen an Metallkationen ebenso möglich. Die erhöhte Expression der MT-Gene erhöht die Menge an Genprodukt in der Zelle und, durch Chelatisierung von zweiwertigen Metallkationen, verarmt die Zelle an solchen Kationen. Aus diesem Grund ist auch der Zusatz von Zn^{2+} -Ionen zum Selektionsmedium nach dem MT-Genstransfer erklärbar. Das Überangebot an Thionein-Proteinen stört die Gleichgewichte bei der Metalldonation und verschlechtert dadurch die Überlebenschancen gegenüber cytotoxischen Behandlungen (außer Schwermetallen). Meine Ergebnisse zeigen, daß die Anreicherung der Zellen mit MT-Protein nicht deren Strahlentoleranz erhöht. Die in unserem Labor beobachtete erhöhte Strahlenresistenz von SV40-transformierten menschlichen Fibroblasten gegenüber den primären Ausgangslinien, wird somit nicht durch den gleichzeitig beobachteten Anstieg der MT-mRNA Menge (und damit MT-Protein-Konzentration) in den Zellen verursacht.

Das MT-Protein ist in eukaryotischen Zellen nicht als Strahlenprotektor wirksam. Zum einen könnte dies daran liegen, daß es in seiner Funktion als Radikalfänger, nicht in unmittelbarer Nähe der DNA, dem Ort des Schadens vorkommt. Andererseits könnte die Anreicherung des Thionein-Proteins in den Zellen die Metalldonation auf metallabhängige Enzyme beeinträchtigen und damit die Zellen anfällig gegen cytotoxische Agentien (außer Schwermetallen) machen.

KAPITEL F: Literaturverzeichnis

- 1) Alper T.: The modification of damage caused by primary ionization of biological targets. *Radiat.Res.* (1956)5:573 - 586.
- 2) Angel P., Pötting A., Mallick U., Rahmsdorf H.J., Schorpp M., Herrlich P.: Induction of metallothionein and other RNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol.Cell.Biol.* in press.
- 3) Angel P., Rahmsdorf H.J., Pötting A., Lücke-Huhle C., Herrlich P.: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced gene sequences in human primary diploid fibroblasts and their expression in SV40 transformed fibroblasts. *J.Cell.Biochem.* (1985)29:351 - 360.
- 4) Arlett C.F., Harcourt S.A.: Survey of radiosensitivity in an variety of human cell strains. *Cancer Res.* (1980)40:926 - 932.
- 5) Bakka A., Johnsen A., Endresen L., Rugstad H.: Radioresistance in cells with high content of metallothionein. *Experienta* (1982)38:381 - 383.
- 6) Barbieri M.C., Bertanza C., Ferrero E., Colombo G., Baldini V., Besana C.: Abnormal OKT4/OKT8 ratio and deranged capping in Ataxia telangiectasia. *Boll.Ist.Sieroter.Milan.* (1985)64:232-235.
- 7) Bellard F., Sassone-Corsi A., Chambon P.: A reliable method for the recovery of DNA - fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal.Biochem.* (1981)112:295 - 298.
- 8) Berg P., Davies J., Allet B., Rochaix J.D.: Transposition of R-factor genes to bacteriophage lambda. *PNAS* (1975)72:3628-3632.
- 9) Blochinger K., Diggelmann H.: Hygromycin B Phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments in higher eukaryotic cells. *Mol.Cell.Biol.* (1984)4:2929 - 2932.
- 10) Boder E., Sedgewick R.P.: Ataxia telangiectasia: a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* (1957)21:526 - 554.
- 11) Brady F.O.: The physiological function of metallothionein. *TIBS* (1982) 143 - 144.
- 12) Cleaver J.E.: Defective repair replication of DNA in Xeroderma pigmentosum. *Nature*, (1968)218:652 - 654.
- 13) Colbere-Garapin F., Horodniceanu F., Kourilsky Ph., Garapin A.C.: A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J.Mol.Biol.*, (1981)150:1 - 14.
- 14) Cornforth, M.N., Bedford J.S.: On the nature of a defect in cell from individuals with Ataxia - telangiectasia. *Science*, (1985)227:158 - 1591.
- 15) Cunliffe P.N., Mann J.R., Cameron A.H., Roberts K.D., Ward H.W.C.: Radiosensitivity in Ataxia telangiectasia. *Br.J.Radiol.*, (1975)48:374 - 379.
- 16) Debieu D., Deschavanne S.J., Midander J., Larson A., Malaise E.P.: Survival curves of glutathione synthetase deficient human fibroblasts: correlation between radiosensitivity in hypoxia and glutathione synthetase activity. *Int.J.Radiat.Biol.* (1985)48:525 -543.
- 17) Deeble D.J., Schulz D., von Sonntag C.: Reactions of OH-radicals

- with poly(U) in deoxygenated solutions: sites of OH-radicals attack and the kinetics of base release. *Int.J.Radiat.Biol.* (1986)49:915 - 926.
- 18) Deschavanne P.J., Midander J., Debieu D., Malaise E.P., Revesz L.: Radioprotective effect of cysteamine in glutathione synthetase deficient cells. *Int.J.Radiat.Biol.* (1986)49:85-101.
 - 19) Duncan B.K., Miller J.H.: Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* (1980)287:560 - 561.
 - 20) Enger M., Rall L., Hildebrand C.: Thionein gene expression in Cd²⁺-variants of the CHO cell: correlation of thionein synthesis with translatable mRNA levels during induction, deinduction and superinduction. *NAR* (1979)7:271 - 288.
 - 21) Fiorilli M., Businco L., Pandolfi F., Pagnelli R., Russo G., Aiuti F.: Heterogeneity of immunological abnormalities in Ataxia telangiectasia. *J.Clin.Immunol.*, (1983)3:135 - 141.
 - 22) Ford M.D., Martin L., Lavin M.F.: The effects of ionizing radiation on cell cycle progression in Ataxia telangiectasia. *Mut.Res.* (1984)125:115 - 122.
 - 23) Friedman R., Manly B., McMahon N., Kerr I., Stark G.: Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell* (1984)38:745 - 755.
 - 24) Geller B.L., Winge D.R.: Metal binding sites of rat liver Cu-Thionein. *Arch.Biochem.Biophys.* (1982)213:109 - 117.
 - 25) Glanville N., Durnham D.M., Palmiter R.D.: Structure of mouse metallothionein-I gene and its mRNA. *Nature* (1981)292:267 - 269.
 - 26) Graham F.L., van der Eb A.J.: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* (1973)52:456-467.
 - 27) Gritz L., Davies J.: Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *E.coli* and *S.cervisiae*. *Gene* (1983)25:179 - 188.
 - 28) Hamer D.H., Thiele D.J., Lemott J.E.: Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* (1985)228:685 - 689.
 - 29) Hariharan P.V., Elolzko S., Smith B.P., Paterson M.C.: Normal rejoining of DNA strand breaks in Ataxia telangiectasia fibroblast lines after low X-ray exposure. *Rad.res.* (1981)86:589 -597.
 - 30) Hecht F., Kaiser-McCaw B.: Ataxia telangiectasia: Genetics and heterogeneity. in: *Ataxia telangiectasia - a cellular and molecular link between cancer, neuropathology and immune deficiency.* Eds: Bridges B.A. et al, (1982), John Wiley and Sons Ltd.
 - 31) Heguy A., West A., Richards RI, Karin M.: Structure and tissue-specific expression of human metallothionein I_B gene. *Mol.Cell.Biol.* (1986) in press.
 - 32) Herrlich P., Mallick U., Ponta H., Rahmsdorf H.J.: Genetic changes in mammalian cells reminiscent of an SOS response. *Human Genet.* (1984)67:360 - 368.
 - 33) Hicks M.R.: Pathological and biochemical aspects of tumor promotion. *Carcinogenesis* (1983)4:1209 - 1214.
 - 34) Hieber L., Mallick U., Lücke-Huhle C., Herrlich P.: Alpha irradi-

- ation induces mammalian genes. Broerse J.J.(Ed), Rad.Res.: Proc. 7th.Intern.Congress, Amsterdam, (1983) Nijhoff, B4/22 - B4/23.
- 35) Hirt B.: Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cells cultures. *J.Mol.Biol.* (1967)26:365 - 369.
 - 36) Houck C.M., Rinehart F.P., Schmid C.W.: A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *J.Mol.Biol.* (1979)32:289 - 306.
 - 37) Houldsworth J., Lavin M.F.: Effect of ionizing radiation on DNA synthesis in AT cells. *Nucleic Acid Research* (1980)8:3709-3720.
 - 38) Howard-Flanders P.: Effect of oxygen on the radiosensitivity of bacteriophage in the presence of Sulphydryl compounds. *Nature* (1960)186:485 - 487.
 - 39) Hülsewede J.W., Schulte-Frohlinde D.: How does cysteamine protect cells against ionizing irradiation in presence of oxygen? 2. Symposium: Molekulare und Zelluläre Mechanismen bei der Wirkung von Strahlen. (1986), Jülich, pp 59.
 - 40) Imroy P.F., Kidson C.: Responses of Huntington's disease and Ataxia telangiectasia lymphoblastoid cells to bleomycin. *Chem.Biol.Interactions* (1983)47:917 - 921.
 - 41) Ishiura M, Hirose S., Uchida T., Hamada Y., Suzuki Y, Okada Y.: Phage particle-mediated gene transfer to cultured mammalian cells. *Mol.Cell.Biol.* (1982)2:607 - 616.
 - 42) Ishizaki K., Shima A., Sekiguchi T., Takebe H.: Microcell-mediated transfer of human DNA repair gene(s) into XP cells. *Jpn.J.Genet.* (1981)56:105 - 115.
 - 43) Jaspers N.G.T., De Witt J., Regulski M.R., Bootsma D.: Abnormal regulation of DNA replication and increased lethality in Ataxia-telangiectasia cells exposed to carcinogenic agents. *Cancer Res.* (1982)42:335 - 341.
 - 44) Jaspers N.G.J., De Witt J., Bootsma D.: The inhibition of DNA replication in Ataxia telangiectasia cells after exposure to a variety of clastogenic agents. *Progress in Mutation Research*, Eds: Natarajan A.T., Elsevier Biochemical Press (1982)4:193-202.
 - 45) Jaspers N.G.T., Wit De J., Bootsma D.: Genetic heterogeneity in Ataxia telangiectasia studied by cell fusion. *PNAS* (1982)79:2641 - 2644.
 - 46) Jeggo P.A., Holliday R.: Azacytidine-induced reactivation of a DNA repair gene in Chinese Hamster Ovary Cells. *Mol.Cell.Biol* (1986)6:2944 - 2949.
 - 47) Jeggo P.A.: X-ray sensitive mutants of CHO cell line: Radio-sensitivity of DNA synthesis. *Mut.Res.* (1985)145: 171-176.
 - 48) Jeggo P.A., Kemp L.M.: X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell line. Isolation and cross-sensitivity to other DNA damaging agents. *Mut.Res.* (1983)112:313 - 327.
 - 49) Jeggo P.A., Kemp L.M., Hooliday R.: The application of the microbial 'tooth-pick' technique to somatic cell genetics, and its use in the isolation of X-ray sensitive mutants of the Chinese hamster ovary cells. *Biochimie* (1982)64:713 - 715.
 - 50) Jelinek W.R., Toomey T.P., Leinwandt L., Duncan C.H., Houck C.M., Deininger P.L., Schmid C.W.: Ubiquitous, interspersed repeated

- sequences in mammalian genomes. PNAS (1980)77:1398 - 1402.
- 51) Jonge de A.J.R., Bootsma D.: Chromosome and DNA-mediated gene transfer in cultured mammalian cells. *Int.Rev.Cytology* (1984)92:133 - 157.
 - 52) Kägi J., Vasak M., Lerch K., Gilg D., Hunziker P., Bernhard W., Good M.: Structure of mammalian metallothioneins. *Env. Health Perspectives* (1984)54:93 - 103.
 - 53) Kägi J.H.R., Nordberg M. (Eds.): *Metallothionein*. Birkhäuser Verlag Basel (1979).
 - 54) Karin M., Imbra R., Heguy A., Wong G.: Interleukin 1 regulates human metallothionein gene expression. *Mol.Cell. Biol.* (1985)5:2866 - 2869.
 - 55) Karin M., Haslinger A., Holtgreve H., Cathala G., Slater E., Baxter J.D.: Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature* (1984)308:513 - 519.
 - 56) Karin M., Cathala G., Nouyen-Hun M.C.: Expression and regulation of a human metallothionein gene carried on an autonomously replicating shuttle vector. PNAS (1983)80: 4040 - 4044.
 - 57) Karin M., Slater E., Herschman H.R.: Regulation of metallothionein synthesis in HeLa cells by heavy metals and glucocorticoid. *J.Cell.Physiol.* (1981)106:63 - 74.
 - 58) Karin M., Herschman H.R.: Characterization of the metallothioneins induced in HeLa cells by dexamethasone and zinc. *Eur.J.Biochem.* (1980)107:395 - 401.
 - 59) Kemp L.M., Sedgwick S.G., Jeggo P.A.: X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells defective in double-strand break rejoining. *Mut.Res.* (1984)132:189 - 196.
 - 60) Kinsella T., Mitchell J., McPherson S., Russo A., Tietze F.: In vitro X-ray sensitivity in Ataxia telangiectasia homozygote and heterozygote skin fibroblasts under oxic and hypoxic conditions. *Cancer Res.* (1982)42:3950 - 3956.
 - 61) Kraemer K.H.: Progressive degenerative diseases associated with defective DNA repair: Xeroderma pigmentosum and Ataxia telangiectasia. In: *DNA repair processes*; Eds: Nichols W.W., Murphy D.G.: Miami: Symposia Specialists (1977) pp 37.
 - 62) Legerski R.J., Brown D.B., Peterson C.A., Robberson D.L.: Transient complementation of XP cells by microinjection of poly(A)⁺RNA. PNAS (1984)81:5676 - 5679.
 - 63) Lehmann A.R., Arlett C.F., Burke J.F., Green M.H.L., James M.R., Lowe J.E.: A derivative of AT cell line with normal radiosensitivity but AT like inhibition of DNA synthesis. *Int.J.Radiat.Biol.* (1986)49:639 - 643.
 - 64) Lehmann A.R.: Use of recombinant DNA techniques in cloning DNA repair genes and in the study of mutagenesis in mammalian cells. *Mut.Res.* (1985)150:61 - 67.
 - 65) Li T.Y., Kraker A.J., Shaw III C.F., Petering D.H.: Ligand substitution reactions of metallothioneins with EDTA and apo-carbonic anhydrase. PNAS (1980)77:6334 - 6338.
 - 66) Lieberman M.W., Beach L.R., Palmiter R.D.: Ultraviolet

- radiation-induced metallothionein-I gene activation is associated with extensive DNA demethylation. *Cell* (1983)35: 207 - 214.
- 67) Littbrand B.: Survival characteristics of mammalian cell lines after single or multiple exposures to roentgen radiation under oxic or anoxic conditions. *Acta Radiologica Therapy, Physics and Biology* (1970)9:257 - 289.
 - 68) Littbrand B., Revese L.: The effect of oxygen on cellular survival and recovery after radiation. *British J. of Radiology* (1969)42:914 - 924.
 - 69) Loeb L.A., Kunkel T.A.: Fidelity of DNA synthesis. *Ann.Rev. Biochem.* (1982)51:429 - 457.
 - 70) Lücke-Huhle C., Comper W., Hieber L., Pech M.: Comparative study of G2 delay and survival after ²⁴¹Americium- α and ⁶⁰Cobalt- γ irradiation. *Radiat. Environm. Biophys.* (1982) 20:171 - 185.
 - 71) Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.: *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
 - 72) Mayo K.E., Palmiter R.: Altered regulation of the mouse Metallothionein-I gene following gene amplification or transfection, aus: Schimke R.T. (Ed.): *Gene Amplification*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
 - 73) Meinkoth J., Wahl G.: Hybridization of Nucleic Acids Immobilized on solid supports. *Analytical Biochemistry* (1984)138:267 - 284.
 - 74) Millar B.C., Jinks S.: Studies on the relationship between the radiation resistance and glutathione content of human and rodent cells after treatment with dexamethasone in vitro. *Int.J.Radiat.Biol.* (1985)47:539 - 552.
 - 75) Mitchell J., Russo A., Biaglow J., McPherson S.: Cellular glutathione depletion by diethyl-malat or butionine-sulfoximine: No effect of glutathione depletion on the oxygen enhancement ratio. *Rad.Res.* (1983)96:422 - 428.
 - 76) Moore W.J., Hummel D.D.: *Physikalische Chemie*. Walter de Gruyter, Berlin (1976) pp 937 - 939.
 - 77) Morgan J.L., Holcomb T.M., Morrissey R.W.: Radiation reactions in Ataxia telangiectasia. *Am.J.Diss.Child* (1968) 116:557.
 - 78) Muller H.J., Mott-Smith L.M.: Evidence that natural radio-activity is inadequate to explain the frequency of "natural" mutations. *PNAS* (1930)16:277 - 285.
 - 79) Murnane J.P., Painter R.B.: Complementation of the defects in DNA synthesis in irradiated and unirradiated AT cells. *PNAS* (1982)79:1960 - 1963.
 - 80) Nairn R., Adair G., Humphrey R.: DNA-mediated gene transfer in Chinese hamster ovary cells: Clonal variation in transfer efficiency. *Mol.Gen.Genet.* (1982)187:384 - 390.
 - 81) Okayama H., Berg P.: Bacteriophage lambda vector for transducing a cDNA clone library into mammalian cells. *Mol. Cell.Biol.* (1985)5:1136 - 1142.
 - 82) Painter R.B.: Inhibition of mammalian cell DNA synthesis by ionizing radiation. *Int.J.Radiat.Biol.* (1986)49:771 - 781.
 - 83) Painter R.B., Young B.R.: Radiosensitivity in Ataxia-telangiectasia: A new explanation. *PNAS* (1980)77:7315 - 7317.

- 84) Paterson M.C., Smith P.J.: Ataxia telangiectasia: an inherited human disorders involving hypersensitivity to ionizing radiation and related damaging chemicals. *Ann.Rev. Genet.* (1979)13:291.
- 85) Paterson M.C.: Ataxia telangiectasia: A model inherited disease linking deficient DNA repair with radiosensitivity and cancer processes. In: *DNA repair mechanisms*, Eds.: Hanawalt P.C., Friedberg E.C., Fox C.F., New York (1978), Academic Press, pp 637.
- 86) Paterson M.C., Smith B.P., Lohman P.H., Anderson A.K., Fishman L.: Defective excision repair of X-ray damaged DNA in human (AT) fibroblasts. *Nature* (1976)260:444.
- 87) Revesz L.: The role of endogenous thiols in intrinsic radioprotection *Int.J.Radiat.Biol.* (1985)47:361 - 368.
- 88) Rigby P.W.J., Dieckmann M., Rhodes D., Berg P.: Labeling Deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA Polymerase I. *J.Mol.Biol.* (1977)113:237 - 251.
- 89) Russo A., Mitchell J., Finkelstein E., de Graf W., Spiro I., Gamson J.: The effects of cellular glutathione elevation on the oxygen enhancement ratio. *Rad.Res.* (1985)103:232 - 239.
- 90) Sarver N., Gruss P., Law M-F., Khoury G., Howley P.: Bovine papilloma virus deoxyribonucleic acid: a novel eucaryotic cloning vector. *Mol.Cell.Biol.* (1981)1:486 - 496.
- 91) Scangos G., Huttner K., Juricek D., Ruddle F.: Deoxyribo-nucleic acid-mediated gene transfer in mammalian cells: Molecular analysis of unstable transformants and their progression to stability. *Mol.Cell.Biol.* (1981)1:111 - 120.
- 92) Schmidt C., Jubier M.F., Hamer D.: Structure and expression of two human metallothionein-I isoform genes and a related pseudogen. *J.Biol.Chem.* (1985)260:7731 - 7737.
- 93) Schorpp M., Mallick U., Rahmsdorf H.J., Herrlich P.: UV-induced extracellular factor from human fibroblasts communicates the UV-response to nonirradiated cells. *Cell* (1984)37:861 - 868.
- 94) Sheridan R.B., Huang P.C.: Superoxid dismutase and catalase activities in Ataxia-telangiectasia and normal fibroblast cell extracts. *Mut.Res.* (1979)61:381 - 386.
- 95) Shiloh Y., Tabor E., Becker Y.: Cells from patients with Ataxia-telangiectasia are abnormally sensitive to the cyto-toxic effect of a tumor promoter phorbol-12-myristate-13- acetate. *Mut.Res.* (1985)149:283 - 286.
- 96) Shiloh J., Tabor E., Becker Y.: Abnormal response of Ataxia telangiectasia cells to agents that break the deoxyribose moiety of DNA via a targeted free radical mechanism. *Carcinogenesis* (1983)4:1317 - 1322.
- 97) Shiloh Y., Tabor E., Becker Y.: The response of Ataxia-telangiectasia homozygous and heterozygous skin fibroblasts to neocarcinostatin. *Carcinogenesis* (1982)3:815 - 820.
- 98) Southern P., Berg P.: Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J.Mol.Appl. Genetics* (1982)1:327 - 341.
- 99) Southern E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.*

- (1975)98:503 - 517.
- 100) Tatsumi K., Takebe H.: Gamma-irradiation induces mutation in Ataxia telangiectasia lymphoblastoid cells. *Gann* (1984) 75:1040 - 1043.
 - 101) Thiele D.J., Walling M.J., Hamer D.H.: Mammalian metallothionein is functional in yeast. *Science* (1986)231: 854 - 856.
 - 102) Thierry D., Rigand O., Duranton I., Moustacci E., Magdelenat H.: Quantitative measurement of DNA strand breaks and repair in gamma-irradiated human leukocytes from normal and Ataxia telangiectasia donors. *Rad.Res.* (1985) 102:347 - 358.
 - 103) Thornalley P., Vasak M.: Possible role for MT in protection against radiation-induced oxidation stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *BBA* (1985)827:36 - 44.
 - 104) Tobias C.A., Blakeley E.A., Chang P.Y., Lommel L., Roots R.: Response of sensitive human Ataxia and resistant T-1 cell lines to accelerated heavy ions. *Br.J.Cancer* (1984)49:175 - 185.
 - 105) Udom A.O., Brady F.O.: Reactivation in vitro of zinc requiring apoenzymes by rat liver zinc thionein. *Biochem.J.* (1980)187:329 - 335.
 - 106) Vermeulen W., Osseweijer P., de Jonge A.H.J., Hoeijmakers J.H.J.: Transient correction of excision repair defects in fibroblasts of 9 XP complementation groups by microinjection of crude human cell extracts. *Mut.Res.* (1986)165:199 - 206.
 - 107) Watson J.D., Crick F.H.C.: The structure of DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* (1953)18:123 - 131.
 - 108) Webb M.: The chemistry, biochemistry and biology of Cadmium. Elsevier North-Holland, New York (1979).
 - 109) Weibezahn K.F., Lohrer H., Herrlich P.: Double-strand break repair and G2 block in Chinese Hamster Ovary cells and their radiosensitive mutants. *Mut.Res.* (1985)145:177 - 183.
 - 110) Westerveld A., Hoeijmakers J.H.J., van Duin M., de Wit J., Odijk H., Pastink A., Wood R.D., Bootsma D.: Molecular cloning of a human DNA repair gene. *Nature* (1984)310:425 - 429.
 - 111) Wigler M., Pellicer A., Silverstein S., Axel R., Urlaub G., Chasin L.: DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyl-transferase locus into mammalian cells. *PNAS* (1979)76:1373 - 1376.
 - 112) Wigler M., Pellicer A., Silverstein S., Axel R.: Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* (1978)14:725 - 731.
 - 113) Wit de J., Jaspers N.G.J., Bootsma D.: The rate of DNA synthesis in normal human and ataxia telangiectasia cells after exposure to X-irradiation. *Mut.Res.* (1981)80:221 - 226.