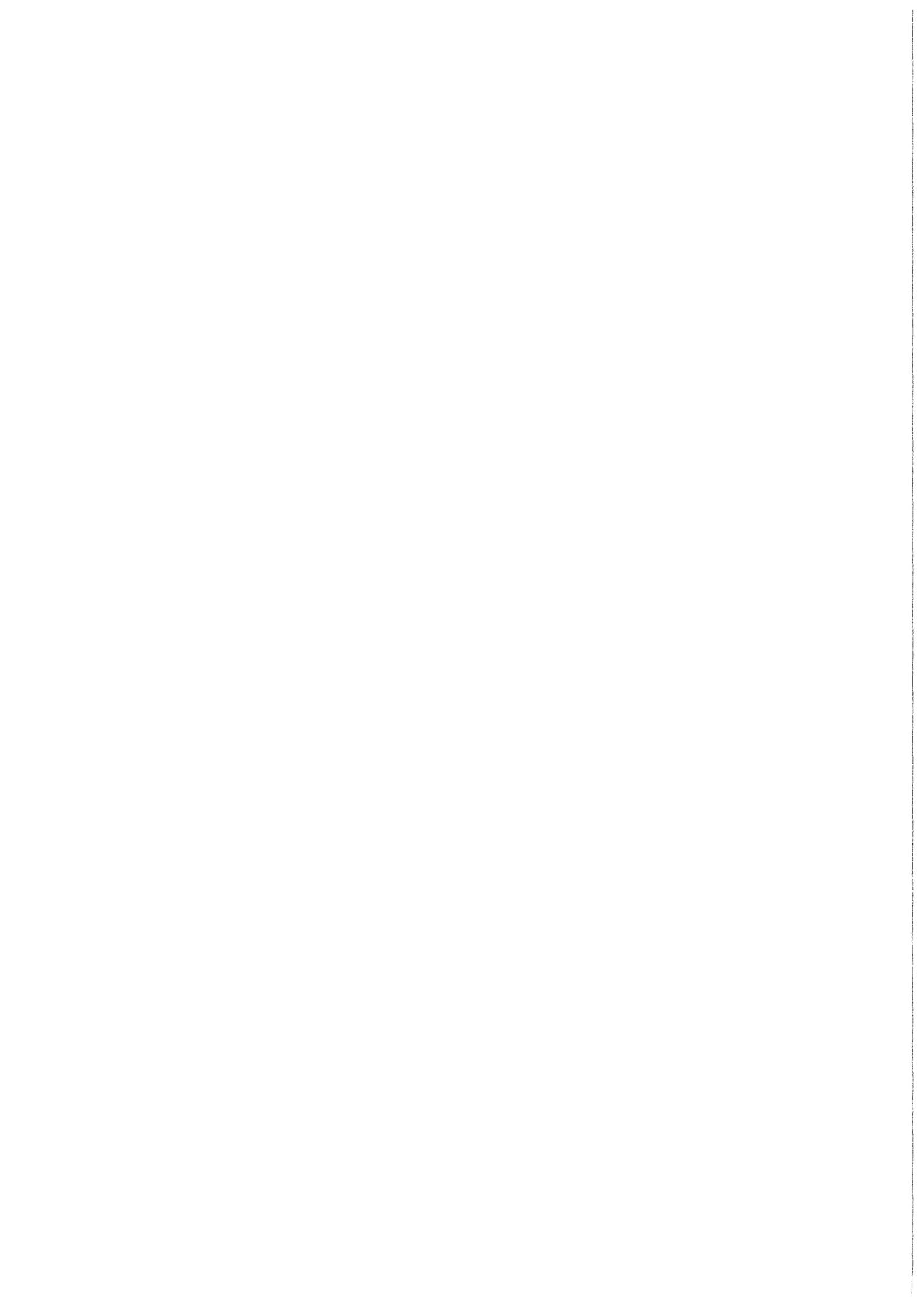


KfK 4215
April 1987

**Isolierung eines
intermediär UV-sensitiven
Xeroderma Pigmentosum
(Komplementationsgruppe A)
Zellklons nach Transfektion
genomischer Maus-DNA
— Partielle Reklonierung und
Charakterisierung der
transfizierten Sequenzen**

M. Blum
Institut für Genetik und für Toxikologie von Spaltstoffen

Kernforschungszentrum Karlsruhe



KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Institut für Genetik und für Toxikologie
von Spaltstoffen

KfK 4215

Isolierung eines intermediär UV-sensitiven Xeroderma
Pigmentosum (Komplementationsgruppe A) Zellklons nach
Transfektion genomischer Maus-DNA. Partielle Reklonierung
und Charakterisierung der transfizierten Sequenzen.

Martin Blum

Dissertation, genehmigt von der Fakultät Bio- und Geowissen-
schaften der Universität Karlsruhe.

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH 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

Xeroderma Pigmentosum (XP) ist eine autosomal rezessive Erbkrankheit. Die Zellen von XP-Patienten sind hypersensitiv gegen die letalen Effekte ultravioletter Strahlung. Die Ursache dieser Sensitivität ist ein Defekt in der Excisionsreparatur UV-induzierter DNA-Schäden. Die Existenz von 9 XP-Komplementationsgruppen deutet auf ein komplexes Reparatursystem, dessen Komponenten und Mechanismus noch unbekannt sind. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den Reparaturdefekt von XP-Zellen der Komplementationsgruppe A, die die größte UV-Sensitivität aufweisen, durch Gentransfer aufzuheben.

In Vorexperimenten wurden die für die verwendete Zelllinie (XP12ROtk-1) optimalen Transfektionsbedingungen etabliert; mit den dominanten Selektionsmarkergenen pSV2-neo und pSV3gptH wurden Transfektionsfrequenzen von $1-7 \times 10^{-4}$ erzielt. Zur Selektion des reparaturkompetenten Phänotyps wurde ein Verfahren ausgearbeitet, das durch 3malige UV-Bestrahlung mit je 1.7 J/m^2 (in 48 stündigem Abstand) 10^6 Mutantenzellen quantitativ abtötete, 150 in eine Population von 10^6 XP-Zellen eingesäte Wildtypzellen zu $>90\%$ überleben ließ.

Die Cotransfektion von 1.6×10^8 XPA-Zellen mit normaler genomischer menschlicher DNA (in Form von Cosmidgenbibliotheken und hochmolekularer Placenta-DNA) und einem dominanten Markergen resultierte in ca. 25 000 markerpositiven XP-Zellklonen. Davon überstand keiner die Strahlenselektion mit UV. Nach Transfektion von 5×10^7 XP12ROtk-1-Zellen mit genomischer Maus-DNA entstanden über 10 000 Klone, die das cotransfizierte Markergen

exprimierten, von denen einer (nMII5) die UV-Selektion überlebte.

Dieser Klon zeigte nach UV-Bestrahlung in Dosiseffektkurven und in der außerplanmäßigen DNA-Reparatursynthese (UDS) einen intermediären Phänotyp. Die molekulare Analyse ergab 3 integrierte Kopien des pSV2-neo Plasmids sowie repetitive Mausequenzen (>60kb); diese waren ca. 100-fach amplifiziert.

Sekundärtransfektionen mit der DNA des Intermediärklons scheiterten aufgrund der in mehreren Experimenten festgestellten schlechten DNA-Aufnahmecharakteristik der verwendeten XPA-Zelllinie (<50kb pro Transfektionsereignis). Daher wurden die transfizierten Sequenzen direkt aus der Primärtransfektante rekloniert. Hierfür wurde eine Genbibliothek im Phagenvektor λ EMBL3 konstruiert. Durch Hybridisierung mit dem neo-Gen wurden 2 rekombinante Phagenklone isoliert (n3lc und n5la), die weitgehend überlappten und außer den Markersequenzen singuläre DNA sowie in einem Fall (n3lc) ca. 0.6 kb repetitive Maus-DNA enthielten. Nach Plauehybridisierung mit genomischer Maus-DNA konnten ebenfalls 2 rekombinante Klone isoliert werden (L1la und L7la), die nicht überlappten und neben repetitiver Maus-DNA singuläre Sequenzen enthielten.

Die Klone L1la und L7la wurden mit pSV2-neo in XPA-Zellen transfiziert, die markerpositiven Massenkulturen der UV-Selektion unterworfen. Dabei überlebten in den mit L7la transfizierten Kulturen Klone, die erneut einen intermediären Phänotyp aufwiesen. Dieses Resultat spricht für die Anwesenheit eines den XPA-Reparaturdefekt partiell komplementierenden Reparaturgens auf dem λ -Klon L7la.

ABSTRACT

Isolation of a XP-A cell clone with intermediate UV sensitivity following transfection with genomic mouse DNA. Isolation and characterization of transfected sequences.

Xeroderma Pigmentosum (XP) is an autosomal recessive disease. Cells cultured from XP patients are hypersensitive to the lethal effects of UV radiation. The reason for this sensitivity is a defect in excision repair of UV induced DNA lesions. The existence of 9 complementation groups points to a complex repair system with so far unknown components and mechanisms. The work presented here describes an attempt to restore repair proficiency in xp cells of the most UV sensitive complementation group A by DNA mediated gene transfer.

The transfection conditions employed for the cell line used here (XP12Rotk⁻¹) have been optimized to yield transfection frequencies of $1-7 \times 10^{-4}$, following transfection of selectable dominant marker plasmids (pSV2neo, pSV3gptH). In order to select for UV resistant XP cells generated by gene transfer, a protocol has been developed, that quantitatively killed 10^6 XP recipient cells. This was achieved by irradiating the cells 3 times with UV doses of 1.7 J/m^2 at 48 h intervals. In contrast virtually all of 100-150 repair proficient cells mixed into a population of 10^6 XP cells survived.

After co-transfection of human genomic DNA with a dominant marker gene, 2.5×10^4 marker positive clones were obtained. None of these survived the UV selection protocol. Similar experiments with genomic mouse DNA as a donor yielded approximately 1×10^4 independent transfectants. One of these survived the UV selection and showed both intermediate survival and intermediate levels of unscheduled DNA synthesis after UV irradiation.

The molecular analysis by Southern DNA transfer hybridization revealed 3 copies of the transfected marker gene and approximately 60 kb of mouse sequences (using mouse genomic DNA as hybridization probe). These sequences were amplified about 100 fold. Attempts to transfer sequences relevant for UV survival in secondary transfections failed, most likely due to the very poor uptake of DNA by the recipient human cell line, on average less than 50 kb per transfection event.

Therefore parts of the stably integrated DNA has been reisolated directly from a genomic lambda library prepared from the primary transfectant. Using the neo marker gene as a probe, 2 recombinant clones (n31c, n51a) have been isolated, which overlapped almost completely. These contained, in addition to the neo sequence, both single copy mouse DNA and repetitive mouse sequences. The hybridization of genomic mouse DNA yielded 2 additional clones (L11a, L71a), which contained single copy and repetitive mouse DNA. These two clones did not overlap.

The clones L11a and L71a have been cotransfected (together with pSV2neo) into XPA cells, and the marker positive mass cultures subjected to the standard UV selection. In case of L71a a few clones survived, which again showed an intermediate phenotype. This result raises the possibility that clone L71a contains a gene which partly complements the repair defect of XPA cells.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AT	Ataxia telangiectasia
bp	Basenpaare
CHO	Chinese Hamster Ovary
cpm	counts per minute
dATP	Deoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Deoxycytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DEK	Dosiseffektkurve
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
FKS	Fötales Kälberserum
gpt-Gen	Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen
HAT-Medium	Hypoxanthin-, Aminopterin- und Thymidin-haltiges Medium
HeBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N'-Ethansulfonsäure
hmB	Hygromycin B
hph-Gen	Hygromycin B-Phosphotransferase-Gen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphotransferase-Gen
Kb	Kilobase
KD	Kilodalton
neo-Gen	Aminoglycosyl-Phosphoribosyltransferase-Gen
PE	Plating Efficiency
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TK	Thymidinkinase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDS	Unscheduled DNA Synthesis
UV	Ultraviolett

XP	Xeroderma Pigmentosum
XPA	XP Komplementationsgruppe A
xrs	x-ray sensitive

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	
<u>1. Einleitung</u>	1
<u>2. Materialien und Methoden</u>	7
2.1 Chemikalien, Radioisotope und Zellkulturartikel	7
2.2 Puffer und Lösungen	8
2.3 Zellkulturtechniken	12
2.3.1 Zellen und Zelllinien	12
2.3.2 Zellkulturmedien	13
2.3.3 Subkultivierung	14
2.3.4 Isolierung von Einzelklonen	14
2.3.5 Einfrieren von Zellen	15
2.3.6 Überprüfen von Zellkulturen auf Mycoplasma-Kontamination	15
2.3.7 Färben von Zellen	16
2.4 Methoden zur Bestimmung der DNA-Reparatur nach UV-Bestrahlung	16
2.4.1 Bestrahlung von Zellkulturen mit ultraviolettem Licht	16
2.4.2 Dosis-Effekt-Kurven (DEK) nach UV-Bestrahlung	17
2.4.3 Bestimmung der außerplanmäßigen DNA-Synthese nach UV-Bestrahlung (unscheduled DNA-synthesis, UDS)	18
2.5. Transfektion	20
2.5.1 Methoden	20
2.5.1.1 Calciumphosphat-Präzipitation	20
2.5.1.2 Polybrene-Methode	21
2.5.1.3 Transfektion von λ -Phagenpartikeln	22
2.5.2 Selektionssysteme	22
2.5.2.1 Das bakterielle Aminoglycosylphosphotransferase-Gen (neo-Gen)	22
2.5.2.2 Das Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen von Escherichia coli (gpt-Gen)	23
2.5.2.3 Das Thymidinkinase-Gen (TK-Gen) des Herpes-Simplex-Virus (HSV)	23
2.5.2.4 Das Hygromycin B-Phosphotransferase-Gen (hph-Gen) von Escherichia coli	24

	Seite
2.6 DNA-Manipulationen	24
2.6.1 Restriktionsverdau	24
2.6.2 Gel-Elektrophorese	24
2.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit DEAE-Cellulose-Papier	25
2.6.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	25
2.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten	26
2.6.6 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	26
2.6.6.1 Nick-Translation	26
2.6.6.2 Endmarkierung von DNA-Fragmenten	27
2.7 Präparation von Plasmid-DNA	27
2.7.1 In kleinem Maßstab	27
2.7.2 In großem Maßstab	27
2.7.3 Präparation von Cosmid-DNA aus Cosmid- Genbibliotheken	28
2.8 Transformation von Escherichia coli mit Plasmid-DNA	29
2.9 Präparation von λ -Phagenpartikeln und λ -DNA	30
2.9.1 Präparation von λ -Phagenpartikeln für Transfektionen	30
2.9.2 Präparation von λ -Phagen-DNA in kleinem Maßstab	31
2.9.3 Präparation von λ -Phagen-DNA in großem Maßstab	32
2.10 Präparation von Nukleinsäuren aus eukaryotischen Zellkulturen	33
2.10.1 Präparation von hochmolekularer genomischer DNA	33
2.10.2 Präparation von poly(A) ⁺ -RNA	34
2.11 Nachweis spezifischer DNA- und RNA-Sequenzen durch Nukleinsäurehybridisierung	35
2.11.1 Transfer von DNA auf Nitrocellulosefilter: Southern-Blot	35
2.11.2 DNA-Dot-Blot	36
2.11.3 Transfer von RNA auf Nitrocellulosefilter: Northern-Blot	37
2.11.4 Hybridisierung von Nukleinsäuren auf Nitro- cellulosefiltern mit radioaktiv markierten DNA-Proben	37

	Seite
2.12 Konstruktion einer genomischen Genbank im λ-Phagenvektor λ EMBL3	38
2.12.1 Präparation der Vektor-DNA	38
2.12.2 Präparation der genomischen Insert-DNA	39
2.12.3 Ligation und in-vitro Verpackung der rekombinanten Phagen-DNA's	41
2.12.4 Amplifikation der Genbank	41
2.13 Identifizierung rekombinanter Phagenklone	42
2.13.1 Plattieren der Genbank	42
2.13.2 Transfer der Phagen-DNA auf Nitrocellulose- filter: Filterabzüge	42
2.13.3 Denaturierung und Fixierung der DNA auf Nitrocellulosefiltern	43
2.13.4 Plaquehybridisierung und Identifizierung positiver Klone	43
2.13.5 Rehybridisierung und Isolierung singulärer Plaques	44
2.14 Restriktionskartierung von rekombinanten λ-Klonen	45
2.14.1 Partieller Restriktionsverdau	45
2.14.2 Hybridisierung mit ON-L und ON-R	45
2.14.3 Gelelektrophorese und Autoradiographie	46
2.14.4 Erstellung von Restriktionskarten	47
<u>3. Ergebnisse</u>	48
3.1 Optimierung der Transfektionsfrequenz	50
3.1.1 Vergleich verschiedener selektionierbarer dominanter Markergene	50
3.1.2 Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden	54
3.1.3 Bestimmung der optimalen Transfektionszeit	55
3.1.4 Einfluß von osmotischen Schocks auf die Transfektionsfrequenz	55
3.2 UV-Selektionsverfahren	57
3.2.1 UV-Sensitivität der XP-Rezipientenzellen	57
3.2.2 Selektionsverfahren	58
3.3 Genomische Transfektionen	60
3.3.1 Verwendung von Cosmid-Genbanken	60
3.3.2 Placenta-DNA	62
3.3.3 Maus-DNA	63

	Seite
3.4 Charakterisierung der Klone nMII5a-k	63
3.4.1 Dosiseffektkurven	63
3.4.2 UDS	65
3.4.3 Molekulare Charakterisierung	69
3.4.4 Fortgesetzte Bestrahlung des Intermediärklons nMII5	77
3.5 Sekundärtransfektionen	81
3.6 DNA-Aufnahme	83
3.7 Klonierung der transfizierten Sequenzen	89
3.7.1 Klonierung in den Plasmid-Vektor pUC8	90
3.7.2 Klonierung in den λ -Phagenvektor λ EMBL3	90
3.7.3 Reisolierung der transfizierten Sequenzen	92
3.8 Kartierung von Restriktionsschnittstellen auf den isolierten λ -Klonen	95
3.9 Strukturelle Charakterisierung der isolierten λ -Klone	101
3.10 Isolierung größerer Bereiche der transfizierten Sequenzen	104
3.11 Funktionelle Charakterisierung der isolierten λ -Klone	108
<u>4. Diskussion</u>	112
<u>Literaturverzeichnis</u>	120

1. EINLEITUNG

Neben fehlerhaften Replikations- und Rekombinationsprozessen verursachen eine Vielzahl chemischer Agenzien, natürlich auftretende und künstlich erzeugte ionisierende Strahlungen und das ultraviolette Licht der Sonne mannigfache Schädigungen der DNA. Effiziente DNA-Überwachungs- und Reparatursysteme sind daher für alle Lebewesen von fundamentaler Bedeutung.

Unser Wissen über DNA-Reparaturprozesse beruht heute noch überwiegend auf Erkenntnissen, die durch Untersuchungen an bakteriellen Systemen gewonnen wurden (Hanawalt et al. 1979). Neben hochspezifischen Reparaturenzymen wie DNA-Glycosylasen, Endonukleasen, Photolyasen und Transmethylasen, die definiert geschädigte Basen aus der DNA entfernen oder reparieren (Lindahl 1982), besitzen Bakterien ein universelleres Reparatursystem, das so verschiedenartige Läsionen wie Pyrimidin-Dimere und verschiedene voluminöse DNA-Addukte aus der DNA ausschneidet. Dieses Excisionsreparatursystem, dessen einzelne Komponenten auf der Ebene von DNA und Protein isoliert und charakterisiert sind (Friedberg 1984), schneidet die DNA auf beiden Seiten der Läsion ein (Sancar und Rupp 1983), das geschädigte Stück wird entfernt und neu synthetisiert, der Ausgangszustand fehlerfrei rekonstituiert. Die Excisionsreparaturgene von *Escherichia coli* sind Bestandteil des u.a. durch vielerei DNA-Schädigungen induzierbaren sogenannten SOS-Systems, an dem viele weitere Gene beteiligt sind, die nicht für DNA-Reparaturfunktionen codieren, sondern z.B. in Rekombinationsprozesse und Mutagenese involviert sind.

Auch in Säugerzellen wurden SOS-ähnliche Reaktionen festgestellt

(Radman 1980). Auf einer mehr phänomenologischen Ebene wurden z.B. Stress-induzierte Veränderungen im Genexpressionsmuster gemessen (Herrlich et al. 1984, 1986).

Reparaturprozesse im eigentlichen Sinn, die direkt an der geschädigten DNA ablaufen, sind indes noch weithin unbekannt. Beim Menschen ist DNA-Reparatur in erster Linie durch eine Reihe von Erbkrankheiten definiert, die mit defekten Reparaturmechanismen in Verbindung gebracht werden (Cleaver et al. 1975, Arlett und Lehmann 1978, Setlow 1978, Friedberg et al. 1984).

Am besten charakterisiert ist Xeroderma Pigmentosum (XP), der einzige Fall, bei dem ein solcher Zusammenhang gesichert ist (Robbins et al 1974, Bootsma 1978, Cleaver 1984, Friedberg 1984). Bereits bei der Erstbeschreibung dieser Krankheit durch Hebra und Kaposi(1874) wurde das Sonnenlicht als ätiologisches Agens erkannt. Das klinische Syndrom ist durch extreme Photosensitivität der Augen und der Haut, Hypopigmentierungen und eine nahezu hundertprozentige Hautkrebsinzidenz charakterisiert (Robbins et al. 1974). Die meisten Patienten entwickeln eine Vielzahl von Hauttumoren, oft mehr als 50, wobei die ersten schon im Kindesalter (5-15 Jahre) auftreten (Robbins et al. 1974). Mehr als die Hälfte der XP-Patienten erkranken zudem am malignen Melanom, im Vergleich zu nur wenigen Fällen pro 100.000 Menschen in der Normalpopulation (Robbins et al. 1974). In vielen Fällen ist die Krankheit von neurologischen Defekten begleitet, deren schwerste Ausprägung mit mentaler Retardation, Mikrocephalie und sexuellen Funktionsstörungen das de Sanctis-Cacchione-Syndrom darstellt (de Sanctis und Cacchione 1932).

Xeroderma Pigmentosum ist quer durch alle Rassen weltweit verbreitet (Robbins et al. 1974, Takebe et al. 1977, Hashem et al. 1980, Fischer et al. 1982). Die Häufigkeit der Erkrankung schwankt allerdings von einem Fall unter 200.000 Einwohnern in Nordamerika und Europa bis zu einem unter 40.000 in Japan (Friedberg 1984). In allen Fällen wurde eine autosomal rezessive Vererbung nachgewiesen. Die heterozygoten Träger der Krankheit - die Allelfrequenz wird auf ca. 10^{-2} geschätzt (Setlow 1979) - zeigen keine klinischen Symptome.

Untersuchungen an Zellkulturen erbrachten den Nachweis, daß XP-Zellen defekt sind in der Reparatur UV-induzierter DNA-Läsionen (Cleaver 1968). Die Fähigkeit von Zellen zur Reparatur dieser Schäden wurde dabei quantitativ durch die Messung der nach UV-Bestrahlung außerhalb der normalen Replikation stattfindenden DNA-Reparatursynthese bestimmt (Cleaver 1969, Setlow et al. 1969). XP-Zellen zeigten allerdings, je nach Patient, eine große Variabilität, die von 5 bis 50 Prozent des Normalwerts reichte (Bootsma et al. 1970), und auf eine genetische Heterogenität der Krankheit hindeutete. Durch systematische Komplementationsanalysen mit Hilfe von Zellfusionen konnten bis heute 9 Komplementationsgruppen (XPA-XPI) identifiziert werden (de Weerd-Kastelein et al. 1972, Kraemer et al. 1975, Arase et al. 1979, Keijzer et al. 1979, Moshell et al. 1983, Fischer et al. 1985). Die meisten Fälle lassen sich den Komplementationsgruppen A und C zuordnen (Cleaver 1983), wobei die Patienten der Gruppe A die schwersten Symptome einschließlich der neurologischen Defekte aufweisen. Eine weitere Komplementationsgruppe zeigt dieselben klinischen Symptome, jedoch normale Reparatursynthese und fast normale

UV-Sensitivität, weist aber einen Defekt in der Postreplikationsreparatur auf (Lehmann et al. 1975) und wird, zur Unterscheidung von den 'klassischen' XP-Fällen, als XP-Variant bezeichnet (Cleaver 1972).

Alle heute verfügbaren Daten sprechen für einen Defekt der XPA-I Zellen bereits im ersten Schritt der Excisionsreparatur, der Incision des geschädigten DNA-Strangs (Tanaka et al. 1975, Fornace et al. 1976, Zelle und Lohmann 1979, Friedberg et al. 1979). Die Existenz von mindestens 9 Komplementationsgruppen signalisiert eine erheblich kompliziertere Situation als bei *Escherichia coli*, wo die Incisionsnuklease aus drei Genprodukten besteht (Sancar und Rupp 1983). Die komplexe nucleosomale Organisation der DNA höherer Organismen (Reeves 1984) erfordert unter Umständen signifikante strukturelle Chromatinmodifikationen vor der eigentlichen Incision, um die Läsion für das Reparatursystem zugänglich zu machen. Gestützt wird diese Annahme durch den Befund, daß Extrakte von XPA-, XPC- und XPG-Zellen zwar keine UV-induzierten Pyrimidin-Dimere aus nativem Chromatin entfernen können, jedoch durchaus Incisionsaktivität für DNA-Läsionen an deproteiniertem Chromatin und an nackter DNA besitzen (Mortelmans et al. 1976, Kano und Fujiwara 1983).

Alle XP-Zellen der klassischen Komplementationsgruppen überleben UV-Bestrahlungen mindestens 5-10mal schlechter als reparaturprofiziente Kontrollzellen (Robbins et al. 1974, Andrews et al. 1978) und zeigen bei gegebener Dosis mehr UV-induzierte Chromosomenaberrationen (Sasaki 1973) und UV-Mutagenese als Normalzellen (Maher et al. 1979, Glover et al. 1979). Die Menge an spontan auftretenden Schwesterchromatidaustauschen ist normal, jedoch bewirken DNA-Schädigungen einen signifikanten Anstieg

(Wolff et al. 1977, De Weerd-Kastelein et al. 1977). Die Reaktivierung UV-inaktivierter Viren (Defais et al. 1983) oder viraler DNA (Abrahams und van der Eb 1976) durch XP-Wirtszellen ist im Vergleich zu Normalzellen stark reduziert. Bereits ein Pyrimidin-Dimer pro Molekül reicht aus, die Expression eines in XP-Zellen transfizierten Gens zu verhindern (Protic-Sabljić und Kraemer 1985). Weiter zeichnen sich XP-Zellen durch erhöhte Sensitivität und reduziertes Reparaturvermögen gegen DNA-Schädigungen durch eine ganze Reihe chemischer Agentien aus. Voluminöse DNA-Addukte, z.B. durch Acetylaminofluoren-Derivate (Setlow und Regan 1972, Stich et al. 1972) oder 4-Nitroquinolin-1-oxid (Stich und San 1971, Howell et al. 1984), die ähnlich wie Pyrimidin-Dimere zu Störungen der Doppelhelix führen, können genausowenig repariert werden wie Schädigungen der DNA durch reaktive Derivate mutagener und carcinogener polyzyklischer Kohlenwasserstoffe wie Benzpyren, Dimethylbenzanthrazen oder Dibenzanthrazen (Maher et al. 1977). Während Röntgen- und Gammastrahlen keinen anderen Einfluß ausüben als auf normale Zellen auch (Cleaver 1969, Kleijer et al. 1970), lassen sich Zellen von XP-Patienten sehr viel leichter als Kontrollzellen durch UV-Bestrahlungen neoplastisch transformieren (Maher et al. 1982); die hierfür wichtige DNA-Läsion scheint das UV-induzierte Pyrimidin-Dimer zu sein (Hart et al. 1977, Doniger et al. 1981, Keyse et al. 1983).

Durch die an Zellkulturen gewonnene Erkenntnis über die Sensitivität von XP-Zellen gegenüber UV-Strahlung ist die extreme Sonnensensitivität der Patienten hinreichend erklärt. Die hohe Hautkrebsinzidenz bedeutet einen wichtigen indirekten Hinweis für die Richtigkeit des vermuteten Zusammenhangs von DNA-Schäden,

Mutationen und neoplastischen Transformationen menschlicher Zellen. Die Aufklärung des Mechanismus der UV-induzierten Krebsentstehung jedoch setzt die Klonierung der in XP-Zellen defekten Gene voraus. Erst die Isolierung menschlicher DNA-Reparaturgene wird aus dem augenblicklichen Stillstand herausführen und Aufschluß darüber bringen, wie menschliche DNA überwacht und repariert wird und wie diese Prozesse mit Tumorentstehung und normaler Differenzierung zusammenhängen.

Die vorliegende Arbeit verfolgt diese Zielsetzung. Es wird versucht, ein den Reparaturdefekt von XPA-Zellen komplementierendes Gen zu isolieren. Dazu wird DNA aus Zellen, die Wildtypreparaturverhalten zeigen, durch Transfektion in Zellen eines XPA-Patienten eingebracht. Notwendige Vorarbeiten betreffen die Aufnahme von Fremd-DNA in XPA-Zellen und die Etablierung eines Selektionsverfahrens für UV-resistente Transfektanten. Den erwünschten Abschluß bildet die Reisolierung von Sequenzen, die den XPA-Defekt aufheben.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Chemikalien, Radioisotope und Zellkulturartikel

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma, München
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Aminopterin	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Sigma, München
Äthanol	Roth, Karlsruhe
DEAE-Cellulose Filterpapier	Schleicher und Schüll, Dassel
Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu Ulm
DNase I	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Fötales Kälberserum	Gibco Europe, Karlsruhe
G418	Gibco Europe, Karlsruhe
Gentamycin	Gibco Europe, Karlsruhe
Gigapack	Vector Cloning Systems, San Diego
HEPES	Serva, Heidelberg
Hygromycin B	Boehringer, Mannheim
Kanamycin	Gibco Europe, Karlsruhe
Lachsspermien-DNA	Sigma, München
Lambda-DNA	Boehringer, Mannheim
Nick-Translation Kit	Amersham Buchler, Braunschweig
Nitrocellulose Filter	Schleicher und Schüll, Dassel
N,N'-Methylen bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Oligo-dT Sepharose	Deutsche Pharmacia, Freiburg
ON-L, ON-R	Biolabs, Beverly M.A.
Penicillin/Streptomycin	Gibco Europe, Karlsruhe
Polybrene	Sigma, München

Polyethylenglycol	Serva, Heidelberg	
Polyvinylpyrrolidon	Sigma, München	
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim	
RNase A	Boehringer, Mannheim	
Sephadex G-50	Deutsche Pharmacia, Freiburg	
Spectinomycin	Gibco Europe, Karlsruhe	
T4 Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim	
TEMED	Bio-Rad, München	
Trisma base	Sigma, München	
Trypsin	Gibco Europe, Karlsruhe	
Tylocine	Gibco Europe, Karlsruhe	
α - ³² P dCTP	410 Ci/mmol	Amersham Buchler, Braunschweig
γ - ³² P dATP	>5000Ci/mmol	" " "
³ H-Cytidin	62 Ci/mmol	" " "
³ H-Thymidin	51 Ci/mmol	" " "

Alle anderen Chemikalien wurden p.a. von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Alle Plastik-Zellkulturartikel wurden von der Firma Nunc über Gibco Europe, Karlsruhe, bezogen.

2.2 Puffer und Lösungen

Zellkultur

-PBS: 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 0.7 mM CaCl₂, 0.6 mM MgCl₂,

6.5 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄

-Trypsin: 0.5% Lösung in PBS

Mycoplasma-Test

- PC: 22 mM Citronensäure, 220 mM Na₂HPO₄, pH 5.5-5.8.
- Hoechst 33258 (=2-(4-Hydroxy-phenyl)-5'-(4-methylpiperazino)-2'-5-bisbenzimidazolyl Trihydrochlorid Pentahydrat):
Stammlösung 0.1 mg/ml in dest. Wasser; lichtgeschützt bei 4°C aufbewahren.

UDS

- Bouins Fixierlösung: 15 Teile gesättigte Pikrinsäure, 5 Teile Formaldehyd (37%), 1 Teil Eisessig; immer frisch ansetzen.
- Entwickler: Kodak D-19, nach Vorschrift des Herstellers.
- Fixierer: 250 g/l Na₂S₂O₃, 25 g/l K₂S₂O₅; nach Lösen filtrieren und bei 4°C aufbewahren; vor Gebrauch 1:3 verdünnen.

Transfektion

- 10xHeBS: 80g NaCl, 3.7g KCl, 1.25g Na₂HPO₄x2H₂O, 10g Glucose, 50g HEPES, auf 1 l mit dest.Wasser auffüllen; bei -20°C aufbewahren.
- 1xHeBS: aus 10xHeBS verdünnen, pH mit 1N NaOH auf 7.05 einstellen, steril filtrieren, bei 4°C aufbewahren (nicht länger als 3 Tage).
- CaCl₂: 2.5 M Stammlösung in dest.Wasser, steril filtrieren, in sterilen Polypropylengefäßen bei 4°C aufbewahren.

Restriktionsverdau und Elektrophorese von DNA

- 10xPuffer: Niedrigsalz: 100 mM Tris.Cl(pH 7.5), 100 mM MgCl₂,
10 mM DTT;
Mittelsalz: 500 mM NaCl, 100 mM Tris.Cl(pH 7.5),
100 mM MgCl₂, 10 mM DTT;

Hochsalz: 1 M NaCl, 500 mM Tris.Cl (pH 7.5),
100 mM MgCl₂, 10 mM DTT;

steril filtrieren, bei -20°C aufbewahren.

-Spermidin: 100mM Stammlösung in dest.Wasser, steril filtrieren,
bei 4°C aufbewahren.

-10xProbenpuffer: 0.25% Bromphenolblau, 25% Ficoll (Typ 400) in
dest.Wasser, bei RT aufbewahren.

-TE: 10 mM Tris.Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA

-TNE: 10 mM Tris.Cl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)
10x konzentriert in dest.Wasser ansetzen, autoklavieren.

-20xTAE: 96.8g Tris base, 22.8 ml Eisessig, 40 ml 0.5 M EDTA
(pH 8.0), auf 1 l mit dest.Wasser auffüllen.

-10xLoening-Laufpuffer: 360 mM Tris.Cl (pH 7.7), 300 mM NaH₂PO₄,
10 mM EDTA (pH 7.7).

-Loening-Probenpuffer: 36 mM Tris.Cl (pH 7.7), 30 mM NaH₂PO₄,
60 mM EDTA, 50% Glycerin, 0.1% Bromphenolblau.

Nährmedien und Agarplatten

-LB: 10g Bacto-Tryptone, 5g Bacto-Hefeextrakt, 10g NaCl, mit
dest.Wasser auf 1 l auffüllen, mit 1N NaOH pH auf 7.5
einstellen, sterilisieren durch Autoklavieren.

-TB: 10g Bacto-Tryptone, 5g NaCl, mit dest.Wasser auf 1 l auf-
füllen, mit 1N NaOH auf pH 7.5 einstellen, autoklavieren.

-NZCYM: 10g Nz-Amin, 5g NaCl, 5g Hefeextrakt, 1g Casaminosäuren,
2g MgSO₄ x 7 H₂O, mit dest.Wasser auf 1 l auffüllen, mit NaOH
auf pH 7.5 einstellen, autoklavieren.

-SOB: 2% Bactotrypton, 0.5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl,
pH auf 7.5 einstellen, autoklavieren. Nach dem Autoklavieren
auf 10 mM MgCl, 10 mM MgSO₄ einstellen;

Stammlösung: 1 M MgCl₂, 1M MgSO₄, steril filtriert.

- SOC: SOB auf 20 mM Glucose einstellen; Stammlösung: 1M Glucose, steril filtriert.
- Agar-enthaltende Medien: für Platten: 1.5% Agar zugeben, autoklavieren, auf 50°C abkühlen, gießen; für Topagar: 0.7% Agar zugeben, autoklavieren, in sterile Glasröhrchen aliquotieren, im 47°C Heizblock aufbewahren.

Transformation von Bakterien

- TFB: 10mM K-MES (pH 6.3), 100mM RbCl, 45mM MnCl₂, 10mM CaCl₂, 3mM HACOCl₃; steril filtrieren, bei 4°C aufbewahren.
- DMSO: in 550µl Eppendorfgefäße aliquotieren, bei -20°C aufbewahren, stets frisches Aliquot verwenden.
- DTT: 2.25 M in 40 mM Kaliumacetat (pH 6.0); steril filtrieren, bei -20°C aufbewahren.
- Ampicillin: 25mg/ml in dest.Wasser, steril filtrieren, in 1ml-Aliquots bei -20°C aufbewahren.

Lösungen für das Arbeiten mit dem Phagen λ

- SM: 5.8g NaCl, 2g MgSO₄ x 7 H₂O, 50ml 1M Tris.Cl (pH 7.5), 5 ml 2% Gelatine, sterilisieren durch Autoklavieren.
- Maltose: 20% Stammlösung in dest.Wasser, steril filtrieren.
- MTE: 10mM MgSO₄, 10mM Tris (pH 8.0), 0.1mM EDTA (pH 8.0)

Isolierung von genomischer DNA

- Kernpuffer: 0.3M Sucrose, 10mM NaCl, 1.5mM Mg-Acetat, 10mM Tris.Cl (pH 8.0), 0.1% NP-40, 1mM DTT bei -20°C aufbewahren.
- Proteinase K: 10mg/ml in dest.Wasser, bei -20°C aufbewahren.

RNA-Präparation

- STE: 100mM NaCl, 20mM Tris.Cl (pH 7.4), 10mM EDTA.
- HSB: 0.3M NaCl, 10mM Tris.Cl (pH 7.5), 5mM EDTA, 0.1% SDS

Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrocellulosefilter,

Hybridisierungen

- 20xSSC: 175.3g NaCl, 88.2g Na-Citrat, auf 1l mit dest.Wasser auffüllen, mit 10N NaOH pH auf 7.0 einstellen, autoklavieren.
- 50xDenhardt's-Lösung: 5g Ficoll, 5g Polyvinylpyrrolidon, 5g Rinderserumalbumin, in 500 ml (Endvolumen) dest. Wasser lösen, steril filtrieren, in 50ml Aliquots bei -20°C aufbewahren.
- Denaturierte Lachsspermien-DNA: 10mg/ml in dest.Wasser lösen, 3-5 mal durch Nr.18-Kanülen passieren, 10 Minuten kochen; bei -20°C aufbewahren.
- PiPpi: 0.2M NaH₂PO₄, 0.3M Na₂HPO₄, 1.5% Na₄P₂O₇.
- Vorhybridisierungslösung: 4xSSC, 5xDenhardt's, 100µg/ml Lachsspermien-DNA, 3.3% PiPpi, 1% SDS; Träger-DNA und dest.Wasser 5 Minuten im 100°C Wasserbad kochen, 5 Minuten auf Eis stellen, SSC, Denhardt's und PiPpi zugeben, auf 65°C erwärmen.
- 20xSSPE: 3.6M NaCl, 200mM NaH₂PO₄ (pH 7.4), 20mM EDTA (pH 7.4).

2.3 Zellkulturtechniken

2.3.1 Zellen und Zelllinien

Xeroderma Pigmentosum (XP)

XP12RO (SV40): eine SV40-transformierte Hautfibroblastenzelllinie der Komplementationsgruppe A (de Weerd-Kastelein et

al. 1972); erhalten von D.Bootsma (Rotterdam).

XP12RO (SV40) tk⁻¹: eine davon abgeleitete Linie ohne funktionelle Thymidin Kinase (tk); isoliert in unserem Labor von M.Litfin und H.J.Rahmsdorf.

XP-München: primäre Hautfibroblasten eines Patienten der Komplementationsgruppe A.

Ataxia telangiectasia (AT):

AT5BIVA: eine SV40-transformierte Hautfibroblastenzelllinie; erhalten von C.F.Arlett (Brighton).

Menschliche Wildtyp-Zellen:

GM0637 (SV40): eine SV40-transformierte Hautfibroblastenzelllinie eines normalen Individuums; bezogen von Human Genetics Mutant Cell Repository, Camden, N.J.

Röntgensensitive Hamsterzellen:

Bcl2: ein von H.Lohrer in unserem Labor isolierter Subklon der vom Ovar des chinesischen Hamsters abgeleiteten röntgensensitiven Zelllinie xrs-2 (Jeggo und Kemp 1983).

Maus-Zelllinien: GR: eine von der GR -Maus (Ringold et al. 1975) abgeleitete Maus-Mammatumor-Zelllinie; erhalten von N.Hynes (Bern).

Ltk⁻: eine Mauszelllinie ohne funktionelles Thymidinkinasegen (Wigler et al. 1979a); erhalten von N.Hynes (Bern).

NIH3T3: erhalten von P.Gruss (Heidelberg)

2.3.2 Zellkulturmedien

Alle menschlichen Zellen wurden in Earle's Medium, d.h. Eagle's Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen gezüchtet, unter Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin (100 Einheiten/ml) und Streptomycin (100µg/ml).

Für die Kultur von Hamsterzellen wurde α -MEM verwendet, ebenfalls

mit 10% FKS, Penicillin und Streptomycin.

Zellen in Earle's und α -Medium wurden bei 37°C mit einem Gemisch aus 95% Luft und 5% CO₂ begast.

Die Mauszelllinien erhielten Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% FKS, Penicillin und Streptomycin; die Begasung erfolgte mit einer Mischung von 94% Luft und 6% CO₂ bei 37°C.

2.3.3 Subkultivierung

Die Zelllinien wurden, abhängig von der Generationszeit, 1-2 mal pro Woche subkultiviert. Dazu wurde der Monolayer zur Entfernung der die Trypsin-Reaktion inhibierenden bivalenten Kationen mit 37°C warmem PBS gewaschen. Anschließend wurde mit 0.25% Trypsin-Lösung gespült, 0.5ml davon in den Kulturgefäßen belassen und bis zur Ablösung der Zellen 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann in 9.5ml Medium resuspendiert, eine 10⁻²-Verdünnung zur Bestimmung der Zellzahl im Coulter-Counter (Coulter) gezählt, und die Zellen bei einer Dichte von 2-5x10³ Zellen/cm² in neue Kulturgefäße mit frischem Medium überimpft.

2.3.4 Isolierung von Einzelklonen

Zur Isolierung von Einzelklonen wurden Stahlzylinder verwendet (Außendurchmesser: 10mm, Innendurchmesser: 6mm, Höhe: 7mm). Diese wurden auf einer Seite mit Siliconfett eingefettet, und durch 30-minütige Bestrahlung in einer ⁶⁰Co-Gammaquelle (Atomic Energy of Canada, Gammacell 220; Dosisleistung 1.5Gy/min) sterilisiert. Die Klonierzylinder wurden um die zu isolierenden Kolonien gelegt und festgedrückt, 100µl 0.25% Trypsinlösung eingefüllt und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 100µl Medium resuspendiert und in kleine Kulturgefäße (Multischalen mit 24 Vertiefungen oder Kulturflaschen mit 25cm²

Fläche) überimpft.

2.3.5 Einfrieren von Zellen

Exponentiell wachsende Zellen (ca. 80% konfluent) wurden mit 5ml 0.25% Trypsinlösung von den Kulturgefäßen abgelöst, die Reaktion mit 5ml eiskaltem Medium abgestoppt. Von einem 0.5ml Aliquot wurde nach 10^{-2} -Verdünnung im Coulter Counter die Zellzahl bestimmt, die restlichen Zellen 5 Minuten bei 350g (4°C) zentrifugiert, mit einer Konzentration von ca. 5×10^6 Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium (Medium mit 10% FKS und 10% DMSO) aufgenommen und 1ml Aliquots in sterile 2ml-Polypropylengefäße (Wheaton Scientific, Millville N.J. USA) überführt. Diese wurden 20 Minuten auf Eis, über Nacht bei -80°C und danach in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Ampullen direkt aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37°C -Wasserbad überführt, die Zellen in 10ml Medium resuspendiert, zur Entfernung des DMSO pelletiert (5 Minuten, 350g, RT) und mit frischem Medium in neue Kulturgefäße eingesät.

2.3.6 Überprüfen von Zellkulturen auf Mycoplasma-Kontamination

(nach einem Protokoll von J. Hoeijmakers, Rotterdam)

Die zu überprüfenden Zellen wurden in 2.5cm Petrischalen mit einer Dichte von $2-4 \times 10^3$ Zellen/cm² ausgesät und bis zur Erreichung von ca. 80% Konfluenz, mindestens jedoch 4 Tage ohne Antibiotika kultiviert. Danach wurden die Zellen mit Methanol-Eisessig (3:1) für 15 Minuten bei RT fixiert, mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 (Hilwig und Gropp 1972) in PC-Puffer (100ng/ml) für 15 Minuten bei RT gefärbt, zweimal mit PC-Puffer gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet (Zeiss Auflicht-Fluoreszenzmikroskop mit Quecksilber -

Höchstdrucklampe HBO 50W/AC, BG-12 Erregerfilter, Filterkombination: Farbteiler FT/420/FT/460, Sperrfilter LP418 / LP500). Jegliche Fluoreszenz im Cytoplasma der Zellen war indikativ für Mycoplasma-Kontamination.

Zur Behandlung wurden kontaminierte Zellen mindestens 5 Tage lang in Medium mit folgenden Antibiotika kultiviert: Gentamycin (40µg/ml), Kanamycin (50µg/ml), Spectinomycin (50µg/ml) und Tylocine (50µg/ml). Danach wurde erneut auf Kontamination überprüft. Als weitere Maßnahme wurden betroffene Kulturen zur Verhinderung bzw. Inhibition des Mycoplasma-Wachstums alle 2 Tage trypsiniert und durch Zentrifugation pelletiert, um soviel Mycoplasmen wie möglich zu entfernen.

2.3.7 Färben von Zellen

Nach dem Abgießen des Mediums wurden die Kulturgefäße mit den Zellen dreimal mit PBS gewaschen, anschließend bei 37°C getrocknet. Danach wurden sie für eine Stunde mit Methanol bei RT fixiert, mit Äthanol gespült und erneut getrocknet. Die Färbung erfolgte mit 0.5% Kristallviolettlösung für 2 Minuten bei RT. Die Färbelösung wurde abgegossen, die Gefäße mehrfach mit Wasser gewaschen und getrocknet.

2.4 Methoden zur Bestimmung der DNA-Reparatur nach UV-

Bestrahlung

2.4.1 Bestrahlung von Zellkulturen mit ultraviolettem Licht

Zur Bestrahlung von Zellen wurde unter der Sterilbank eine UV-Lampe installiert (Quecksilber Niederdruckbrenner der Fa.Quarzlampen GmbH, Hamm, Typ NK 6/20; Wellenlänge 2537 Å (zu 95%); Dosisleistung im Abstand von 22.5cm: 0.24J/m²/s). Die

Zellen wurden in Petrischalen kultiviert; vor der Bestrahlung wurde das Medium abgesaugt, Mediumreste durch Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden trocken bei geöffnetem Deckel mit der gewünschten Dosis bestrahlt. Anschließend wurde mit frischem Medium weiterkultiviert.

2.4.2 Dosis-Effekt-Kurven (DEK) nach UV-Bestrahlung

Bei der Aufnahme von DEK wurde die Fähigkeit von Einzelzellen bestimmt, nach Bestrahlung mit UV innerhalb 2-3 Wochen Kolonien von mindestens 50 Zellen zu bilden (Puck et al. 1956).

Einen Tag vor dem Experiment wurden die Zellen mit einer Dichte von 2.5×10^3 Zellen/cm² in 5cm-Petrischalen eingesät. Die Zellen wurden, wie unter 2.4.1 beschrieben, mit der jeweiligen Dosis bestrahlt, anschließend trypsiniert und die genaue Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Eine definierte Zellzahl wurde sodann in 50ml-Kulturflaschen (25cm² Fläche) überimpft und bis zur Entstehung von Kolonien im Brutschrank inkubiert. Abhängig von der Dosis waren dies zwischen 150 und 10000 Zellen, zur bequemen Auswertung ca. 100 koloniebildungsfähige Zellen. Die nach 2-3 Wochen entstandenen Kolonien wurden gefärbt und gezählt. Eine typische DEK bestand aus 5 Punkten, wobei jeder Punkt das Mittel aus drei Parallelbestimmungen darstellte. Der erste Punkt, eine unbestrahlte Kontrolle, diente zur Bestimmung der sog. plating efficiency (PE), d.h. des Anteils der unter Versuchsbedingungen koloniebildungsfähigen Zellen in der Ausgangskultur. Dieser Wert ging bei der Berechnung der Überlebensrate (N/N₀) der bestrahlten Zellen nach folgender Gleichung ein:

$$N/N_0 = \frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{\text{Zahl der überimpften Zellen} \times (\text{PE}/100)}$$

DEK von XP-Zellen wurden aufgrund deren schlechter PE (ca.30%) mit Feeder Zellen durchgeführt (Puck et al. 1956). Dazu wurden primäre XP-Fibroblasten durch Bestrahlung in einer ^{60}Co -Gammaquelle mit 1.5 Gy abgetötet, und mit einer Dichte von 2×10^3 Zellen/cm² in 50ml-Kulturflaschen eingesät. Die Zellen der DEK wurden auf diesem Zellrasen aus toten Zellen platiert, wodurch die PE auf ca. 70% anstieg.

2.4.3 Bestimmung der außerplanmäßigen DNA-Synthese nach UV-Bestrahlung (unscheduled DNA-synthesis, UDS)

(nach einem Protokoll von K.Jaspers, Rotterdam)

a) Zellkultur, UV-Bestrahlung und radioaktive Markierung

Zur Bestimmung der UDS wurden die Zellen mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen pro cm² auf sterile, 24x24mm große Deckgläser in 5cm-Petrischalen plattiert und zwei Tage in Normalmedium kultiviert. Dann wurden die Zellen, wie unter 2.4.1 beschrieben, mit der sättigenden UV-Dosis von 15 J/m² bestrahlt (Jaspers und Bootsma, 1982), anschließend für zwei Stunden mit Medium inkubiert, das 10µCi/ml (Methyl-³H) Cytidin enthielt (spezifische Aktivität 62Ci/mmol). Die Sensitivität des Tests wurde erhöht durch die Verwendung von dialysiertem fötalem Kälberserum im Markierungsmedium, das keine nicht radioaktive Nukleotide enthielt (de Jonge et al. 1985).

b) Fixierung der Zellen und Autoradiographie

(Zelle und Bootsma 1980)

Nach der zweistündigen Markierungsperiode wurden die Zellen mit PBS gespült und 5 Minuten in Bouin's Fixierlösung fixiert. Die Präparate wurden dann bis zur vollständigen Entfernung der durch die Pikrinsäure in der Fixierlösung verursachten gelben Färbung

mit Äthanol gewaschen (je einmal mit 70%, 80% und 90%, dreimal mit 100% Äthanol) und anschließend an der Luft getrocknet. Mit Hilfe des Einschlußmittels Depex (auf Xylolbasis) wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach oben auf Objektträgern montiert, das Depex über Nacht getrocknet. Die Objektträger wurden zuvor, um eine gute Haftung des später aufgebrachten Films zu gewährleisten, mit Gelatine beschichtet. Dazu wurden sie für 30 Minuten bei 60°C in eine 1% Gelatine-0.1% Chromalaun $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ -Lösung eingebracht, abgekühlt und in vertikaler Lage getrocknet.

Zur Autoradiographie wurde der AR-10 Stripping Film von Kodak verwendet. In der Dunkelkammer wurden mit einem Skalpell 3x4cm große Filmstückchen ausgeschnitten, die mit einer Pinzette langsam von der Glasträgerplatte abgezogen und mit der Oberseite nach unten auf eine Wasseroberfläche aufgebracht wurden, wo sie zum Quellen für ca. 2 Minuten verblieben. Alsdann wurden sie vorsichtig auf die Präparate aufgezogen und in vertikaler Stellung über Nacht (8-16 Stunden) ohne Wärmezufuhr in der Dunkelkammer getrocknet. Danach wurden sie in ein lichtdichtes Gefäß eingebracht und bei 4°C für 3-5 Tage exponiert.

c) Entwicklung, Fixierung, Färbung und Auswertung der Präparate

Die auf RT gebrachten Präparate wurden für 5 Minuten in Kodak D19-Entwickler entwickelt, kurz gewässert und 10 Minuten fixiert. Zur Entfernung der Fixierlösung wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser vorsichtig 10 Minuten lang gewässert, anschließend kurz in 60mM Natriumphosphatpuffer (pH6.8) gespült. Die Färbung erfolgte für 2 Minuten in filtrierter 10%

Giemsa-Lösung (in 60mM Natriumphosphatpuffer pH6.8); nach 1-2 minütigem Wässern wurden die Präparate getrocknet und mit einem Deckglas versehen. Bei 630-facher Vergrößerung wurden von jedem Präparat die Silberkörner von 30-50 Kernen ausgezählt.

2.5 Transfektion

2.5.1 Methoden

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von 6×10^3 Zellen/cm² (Nagerzellen) bzw. 10^4 Zellen/cm² (menschliche Zellen) in 10cm-Petrischalen ausgesät. 3 bis 5 Stunden vor der Transfektion wurde das Medium erneuert.

Für den Gentransfer in eukaryotische Zellen wurden folgende Methoden verwendet:

2.5.1.1 Calciumphosphat-Präzipitation

(Graham und van der Eb 1973; Wigler et al. 1977, 1978, 1979a+b; Gorman 1985)

Bei diesem Verfahren wurde die in sterilem Wasser gelöste DNA mit Calciumphosphat copräzipitiert. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit steriler 2.5M CaCl₂-Lösung (Endkonzentration 125mM) in einem Volumen von 250µl gut durchmischt, diese Lösung tropfenweise zu 250µl sterilem 2xHeBS-Puffer (pH7.05) pipettiert und durch vorsichtiges Schütteln gemischt. Nach 15-30 Minuten bei RT bildete sich ein feines, in der Regel gut sichtbares Präzipitat. Der pH-Wert des HeBS-Puffers war dabei kritisch: war er zu sauer (<7.0), so entstand kein Präzipitat, bei zu alkalischen Werten (>7.2) wurde der Niederschlag sehr grobkörnig. Sehr hochmolekulare DNA (>50kb) resultierte ebenfalls, auch bei richtig eingestelltem pH-Wert, in relativ grobkörnigen Präzipitaten.

Pro Ansatz wurden maximal 2ml, d.h. das Präzipitat für 4 Petrischalen präpariert. Das Medium wurde von den Zellen abgezogen, 500µl des Präzipitats gleichmäßig darauf verteilt und 9.5 ml frisches Medium aufgefüllt. Sodann wurde für den jeweils optimalen Zeitraum (8-16 Stunden, abhängig von der Zelllinie) im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen solange mit lxHeBS-Puffer (pH7.05) gewaschen, bis sie frei von Präzipitat waren (maximal 5-mal). An diesem Punkt wurde in einigen Fällen ein osmotischer Schock durchgeführt (Parker und Stark 1979). Hierzu wurden die Zellen für 2.5-30 Minuten mit 10% DMSO in lxHeBS behandelt, 3-mal mit lxHeBS gewaschen und frisches Medium zugegeben.

Ca. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, und von einer auf drei Petrischalen verteilt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen im jeweiligen Selektionsmedium kultiviert, das Medium bis zum Entstehen von Kolonien alle 3-4 Tage erneuert.

2.5.1.2 Polybrene-Methode

(Kawai und Nishizawa 1984)

Zur Transfektion wurde das Medium abgesaugt, die DNA - mit 3ml frischem Medium gut durchmischt - auf die Zellen pipettiert und pro 10cm Petrischale 75µg Polybrene (Stammlösung: 1mg/ml in sterilem Wasser) zugegeben. Nach 8-stündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium abgezogen, die Zellen mit 10-30% DMSO in lxHeBS für 10-30 Minuten behandelt, anschließend 3-mal mit lxHeBS gewaschen und frisches Medium aufgefüllt. Ab dem 3. Tag wurde, wie unter 2.5.1.1 beschrieben, weiter verfahren.

2.5.1.3 Transfektion von λ -Phagenpartikeln

(Ishiura et al., 1982; Okayama und Berg 1985)

Pro Ansatz wurden 5×10^{10} Phagen in einem Volumen von 500 μ l mit 250mM CaCl_2 - 0.9mM Tris.Cl-Lösung (pH 6.9) vermischt und tropfenweise zu 500 μ l sterilem 50mM HEPES (pH 6.9) - 280mM NaCl - 1.5mM Na_2HPO_4 pipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT bildete sich ein deutlich sichtbares Phagen - Calciumphosphat - Copräzipitat aus, das ins Kulturmedium der zu transfizierenden Zellen pipettiert wurde und dort für 24 Stunden verblieb. Danach wurden die Zellen, wie unter 2.5.1.1 beschrieben, gewaschen, trypsiniert und im Selektionsmedium weiter kultiviert.

2.5.2 Selektionssysteme

2.5.2.1 Das bakterielle Aminoglycosylphosphotransferase - Gen (neo-Gen)

Die Expression des bakteriellen, auf dem Transposon Tn5 codierten Phosphotransferasegens APH(3')II (hier als neo-Gen bezeichnet) in eukaryotischen Zellen vermittelte Resistenz gegen das Aminoglycosid-Antibiotikum G418 (Davies und Jiminez 1980, Jiminez und Davies 1980), ein in seiner Struktur zu Gentamycin, Neomycin und Kanamycin verwandtes 2-Deoxystreptamin (Daniels et al. 1973), das die Elongation an 80S-Ribosomen inhibiert (Bar-Nun et al. 1983). Die Selektionsmedien enthielten, je nach Zelllinie, 300-500 μ g/ml G418. Transfiziert wurde das neo-Gen auf dem Plasmid pSV2-neo (Southern und Berg 1982), unter der Kontrolle des Promotors der frühen Region von SV40.

2.5.2.2 Das Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen von Escherichia coli (gpt-Gen)

Eukaryotische Zellen, die das gpt-Gen exprimierten, wurden in einem Medium selektioniert, das Mycophenolsäure (25µg/ml), Xanthin (250µg/ml), Hypoxanthin (15µg/ml), L-Glutamin (150µg/ml), Thymidin (10µg/ml) und Aminopterin (2µg/ml) enthielt (Mulligan und Berg 1981a). Selektionsmedien für Tk⁻-Zelllinien enthielten kein Aminopterin.

Transfiziert wurde das gpt-Gen auf dem Plasmid pSV2-gpt (Mulligan und Berg 1981a) unter der Kontrolle des SV40-Promotors der frühen Region; auf dem Plasmid pSV3-gptH (Westerveld et al., 1984), bei dem, abgeleitet von pSV3-gpt (Mulligan und Berg 1981a), ein 120bp HindIII-BglII-Fragment vor der codierenden Sequenz des gpt-Gens entfernt wurde, auf dem sich falsche Start-Codonen befanden (Mulligan und Berg 1981b); und auf dem Plasmid pRSVgpt (Gorman et al., 1983) unter der Kontrolle des Long Terminal Repeats (LTR) des Rous Sarcoma Virus (RSV).

2.5.2.3 Das Thymidinkinasegen (Tk-Gen) des Herpes-Simplex Virus (HSV)

Das HSV-Tk-Gen auf dem Plasmid pBR322 (Wilkie et al., 1979, McKnight 1980) wurde zur Transfektion von Zelllinien verwendet, die keine funktionelle Thymidinkinase produzierten. Das Selektionsmedium enthielt Aminopterin (1µg/ml), Hypoxanthin (15µg/ml) und Thymidin (5µg/ml) (HAT-Medium; Szybalska und Szybalski 1962, Wigler et al. 1977, Maitland und McDougall 1977).

2.5.2.4 Das Hygromycin B-Phosphotransferase-Gen (hph-Gen) von Escherichia coli

Die Expression des hph-Gens in eukaryotischen Zellen vermittelte Resistenz gegen das von Streptomyces hygroscopicus produzierte Aminocyclitol-Antibiotikum Hygromycin B (hmB; Gritz und Davies 1983). Zur Transfektion wurde das Plasmid pY3 verwendet, bei dem sich das hph-Gen unter der Kontrolle des LTR von Moloney Sarcoma Virus (MoSV) befand (Blochinger und Diggelmann, 1984). Die Selektionsmedien enthielten 50-400 µg/ml hmB, abhängig von der transfizierten Zelllinie.

2.6 DNA-Manipulationen

2.6.1 Restriktionsverdau

Genomische DNA's wurden mit 2-3-fachem Enzymüberschuß für 5-20 Stunden, klonierte DNA's mit 1-2-fachem Überschuß für 1-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Reaktionspuffer wurden drei Universalpuffer mit niederer, mittlerer und hoher Salzkonzentration verwendet (entsprechend Tabelle 4.1 in Maniatis et al., 1982). Abweichend hiervon wurden Verdau's mit dem Enzym BamHI in hohem Salz durchgeführt. Für die Enzyme SallI und EcoRI wurden die vom Hersteller angegebenen Puffer verwendet. Zur Erhöhung der Schneidegenauigkeit der Enzyme wurde bei allen Reaktionen in hohem Salz und bei EcoRI-Verdau's Spermidin zugesetzt (Endkonzentration 2mM).

2.6.2 Gel-Elektrophorese

DNA-Fragmente wurden im Normalfall auf 0.8% horizontalen Agarosegelen (TypII Agarose) in 1xTAE-Puffer elektrophoretisch

aufgetrennt. Für sehr hochmolekulare DNA's (>50kb) wurden 0.4-0.5% Gele verwendet. Die DNA-Lösungen wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Genomische DNA's für Southern-Blot-Experimente wurden bei niedrigen Spannungen (40-50 Volt) über Nacht elektrophoretisiert. Für analytische Zwecke erfolgte die Auftrennung bei hohen Spannungen (150 Volt) für 1-2 Stunden. Als Größenmarker wurde mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaute λ -Phagen-DNA verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 10-20 Minuten mit Ethidiumbromid (1 μ g/ml in dest. Wasser) gefärbt, und im UV-Licht mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

2.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit

DEAE-Cellulose-Papier (Bellard et al., 1981)

Nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung der Fragmente wurde das Gel in Laufrichtung vor der zu isolierenden Bande mit einem Skalpell eingeschnitten, in diesen Schnitt ein DEAE-Cellulosepapierstreifen eingebracht. Danach wurde die Elektrophorese fortgesetzt, wobei das DNA-Fragment von dem DEAE-Cellulosepapier gebunden wurde. Durch 20-60-minütige Inkubation in 1.5M NaCl bei 65°C wurde die DNA von der DEAE-Cellulose eluiert, das Papier durch Zentrifugation durch Glaswolle entfernt. Nach Extraktion des Ethidiumbromids mit wassergesättigtem 2-Butanol wurde die DNA mit Äthanol ausgefällt, mit 80% Äthanol gewaschen und in TE-Puffer aufgenommen.

2.6.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

(Maniatis et al., 1982)

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten erfolgte in 50mM Tris.Cl (pH9.5) 1mM Spermidin, 0.1mM ZnCl und 1mM MgCl₂ in einem

Volumen von 50 μ l mit 4 Einheiten des Enzyms Alkalische Phosphatase aus Kälbermagen für 30 Minuten bei 37°C. Danach wurden erneut 4 Einheiten des Enzyms zugegeben und nochmals 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde nach Zugabe von 40 μ l dest. Wasser, 10 μ l 10xTNE und 5 μ l 10% SDS durch 15-minütige Inkubation bei 68°C inaktiviert, die DNA Phenol-Chloroform extrahiert und mit Äthanol ausgefällt.

2.6.5. Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in 50mM Tris.Cl (pH7.4), 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM Spermidin, 10mg/ml BSA und 1mM ATP in einem Volumen von 10-20 μ l mit einer Enzymeinheit T4-Ligase über Nacht bei 15°C ligiert.

2.6.6 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

2.6.6.1 Nick-Translation (Rigby et al., 1977)

Für Nick-Translationen wurde der 'Nick-Translation-Kit' von Amersham verwendet. 200-500ng DNA wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l mit 10 μ l Lösung I (Puffer und Nukleotide), 65 μ Ci α -³²P-dCTP (spezifische Aktivität > 4000 Ci/mmol) und 5 μ l Lösung II (DNase I und DNA-Polymerase I) 2-3 Stunden bei 15°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μ l 0.5M EDTA (pH8.0) abgestoppt. Nicht in die DNA eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration an Sephadex G-100 abgetrennt (Säulenvolumen 1ml; äquilibriert mit TE pH 8.9; Fraktionsgröße 100 μ l). Die Radioaktivität (Cerenkov Counts) der einzelnen Fraktionen wurde im Betamatic Liquid Scintillation Counter (Kontron) gemessen, die Fraktionen, die die radioaktiv-markierte DNA enthielten, vereinigt. Es wurden spezifische Aktivitäten von 1-4x10⁸ cpm/ μ g DNA erzielt.

2.6.6.2 Endmarkierung von DNA-Fragmenten (Maniatis et al.1982)

Zur Endmarkierung wurden die dephosphorylierten DNA-Fragmente in 50mM Tris.Cl (pH7.6), 10mM MgCl₂, 5mM DTT, 0.1mM Spermidin und 0.1mM EDTA mit 20µCi $\gamma^{32}P$ -dATP (spezifische Aktivität >5000 Ci/mmol) und 10 Enzymeinheiten T4-Polynukleotidkinase in einem Volumen von 10µl 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl 1M EDTA (pH8.0) und 89µl TE (pH8.0) abgestoppt. Nicht inkorporiertes ATP wurde durch Zentrifugation (2 Minuten, 1000g, RT) durch 1ml-Sephadex G-50 Säulen in 1ml-Einwegspritzen abgetrennt.

2.7 Präparation von Plasmid-DNA

2.7.1 In kleinem Maßstab

Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde nach der von Ish-Horowicz modifizierten Methode von Birnboim und Doly (1981) präpariert (vgl. Maniatis et al., 1982, S.368 und 369). Die Aufarbeitung erfolgte aus 1.5ml einer 5ml-Übernachtskultur, ausgehend von einer Einzelkolonie der das jeweilige Plasmid enthaltenden Bakterien. Die Bakterien wurden mit Lysozym (4mg/ml), SDS (0.67%) und NaOH (0.13N) aufgeschlossen, die chromosomale DNA und bakterielle Trümmer nach Neutralisation mit 5M Kaliumacetat (pH4.8) abzentrifugiert und die Plasmid-DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt.

2.7.2 In großem Maßstab

Die Präparation erfolgte aus 200ml Bakterienkulturen, die über Nacht mit dem jeweiligen auf die Anwesenheit des Plasmids selektionierenden Antibiotikums (in der Regel Ampicillin, 50-100µg/ml) bis zur stationären Phase kultiviert worden waren.

Durch 5-minütige Zentrifugation mit 3600g (4°C) wurden die Bakterien pelletiert, mit 10ml LysozymbLösung (5mg/ml Lysozym in 250mM Tris.Cl (pH8.0) 50mM Glucose, 10mM EDTA; Inkubation: 30 Minuten auf Eis) und mit 20ml alkalischer SDS-Lösung (1% SDS, 0.2N NaOH; Inkubation: 5 Minuten auf Eis) lysiert. Zur Neutralisierung wurden 15ml 5M Kaliumacetatlösung (pH4.8) zugegeben (Inkubation: 1 Stunde auf Eis). Die chromosomale DNA und bakterielle Trümmer wurden abzentrifugiert (10000g, 20 Minuten, 4°C), die Plasmid-DNA Äthanol-präzipitiert, in 10ml 100mM Natriumacetat- 50mM Tris.Cl (pH8.0) gelöst und erneut mit Äthanol ausgefällt, und schließlich in 5ml 50mM Tris.Cl (pH8.0) - 1mM EDTA aufgenommen. Die weitere Reinigung erfolgte durch Gleichgewichtszentrifugation in Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid - Dichtegradienten. Hierzu wurde die Plasmidlösung mit festem Cäsiumchlorid (Endkonzentration 1.55g/ml) und Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 600µg/ml, Stammlösung 10mg/ml in dest.Wasser) versetzt, und im Beckmann Vertikalrotor Typ 65 für 16 Stunden bei 55000rpm (20°C) zentrifugiert. Die Plasmid-Bande wurde mit einer 1ml-Spritze abgezogen (ca.0.5ml) und nach Auffüllen mit Cäsiumchlorid (1.55g/ml) - Ethidiumbromid (0.6mg/ml)-Lösung nochmals für 6 Stunden im Vertikalrotor zentrifugiert (55000rpm, 20°C). Die Plasmidbande wurde wiederum mit einer Spritze isoliert, die DNA, nach 4-6-maliger Extraktion der Lösung mit wassergesättigtem 2-Butanol zur Entfernung des Ethidiumbromids, mit Äthanol präzipitiert und in TE (pH8.0) aufgenommen.

2.7.3 Präparation von Cosmid-DNA aus Cosmid-Genbibliotheken

Ca. 150000 rekombinante Bakterien wurden in 1ml LB auf 22x22cm große LB-Agarplatten mit dem jeweiligen selektiven Antibiotikum

plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Präparation der Cosmid-DNA wurden die Bakterienkolonien mit einem sterilen Gummispatel abgeschabt, in Zentrifugenbecher überführt und mit 10ml Lysozymlösung resuspendiert, anschließend wie unter 2.7.2 beschrieben, weiterverarbeitet. Die Amplifikation von Cosmid-Genbänken auf Agarplatten minimierte, im Vergleich zur Amplifikation der Bakterien in Flüssigkultur, die Gefahr, langsamer wachsende Cosmidklone zu verlieren (Maniatis et al., 1982).

2.8 Transformation von Escherichia coli mit Plasmid-DNA

(Hanahan 1983)

Von einer 10ml-Übernachtskultur des E.coli-Stammes RR1 M15 wurden 0.2ml in 50ml SOB-Medium überimpft und bis zu einer Dichte von 4×10^8 Zellen/ml bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert (ca. 2 Stunden). Je 10ml dieser Kultur wurden sodann in 50ml-Plastikröhrchen (Falcon) überführt, die Zellen für 10 Minuten bei 4000g (4°C) pelletiert und vorsichtig in 3.3ml eiskaltem TFB-Puffer resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in diesmal 0.8ml eiskaltem TFB aufgenommen. Nacheinander wurden nun 28µl steriles DMSO (Inkubation: 5 Minuten auf Eis), 28µl 2.25M DTT in 40mM Kaliumacetat (pH 6.0) (5 Minuten auf Eis) und nochmals 28µl steriles DMSO (5 Minuten auf Eis) zugegeben. Je 210µl der so für die Transformation kompetent gemachten Zellen wurden mit maximal 5µl Plasmid-Lösung versetzt, 30 Minuten auf Eis, 30 Sekunden in einem 42°C-Wasserbad und danach mindestens 1 Minute auf Eis inkubiert. Dann wurde mit 0.8ml SOC-Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Nach Zugabe von weiteren 2ml SOC wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation mit 4000g

(RT) pelletiert, in 200µl SOB-Medium resuspendiert und auf Selektiv-Agarplatten (50µg/ml Ampicillin) plattiert. Die Transformationseffizienz, bestimmt mit dem Plasmid pUC18, lag in der Regel bei $4-6 \times 10^7$ Transformanten pro µg DNA.

2.9 Präparation von λ-Phagenpartikeln und λ-DNA

2.9.1. Präparation von λ-Phagenpartikeln für Transfektionen

(Davis et al., 1980; Okayama und Berg 1985)

Eine 24ml-Übernachtskultur des Wirtsbakterienstamms IC8679 (Gillen et al., 1981) in LB-Medium mit 0.2% Maltose wurde 10 Minuten bei RT (4000g) zentrifugiert, die Zellen in 12ml 10mM Tris Cl (pH 7.5) - 10mM MgSO₄ resuspendiert und mit 5×10^7 rekombinanten Phagen der λ-cDNA-Bibliothek λ-NMT-pcD (Okayama und Berg 1985) infiziert. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurden je 100µl der infizierten Zellsuspension mit 3ml LB-Topagar auf insgesamt 120 LB-Agarplatten (mit 0.2% Glucose) plattiert. Die Platten wurden umgedreht für 6-7 Stunden bei 37°C inkubiert, bis die Plaques gerade im Begriff waren, zu fusionieren. Pro Petrischale wurden sodann 5ml eiskalter SM-Puffer überschichtet und die Platten über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurden die Überstände aller Platten vereinigt, Agar- und Bakterienverunreinigungen pelletiert (10 Minuten, 11000g, 4°C), und die Phagensuspension für 2 Stunden im SW27-Rotor (Beckmann) bei 24000rpm (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Phagenpellet vorsichtig in 1ml SM resuspendiert. Die weitere Reinigung erfolgte durch Zentrifugation über zwei Cäsiumchlorid - Stufengradienten. Im ersten Schritt wurde 1ml der Phagensuspension auf 1ml 5M CsCl in MTE und 3ml 3M CsCl in MTE in SW50.1 Zentrifugenröhrchen überschichtet und die Phagen zur Entfernung von Protein-Verunreinigungen 1 Stunde bei 30000rpm

(20°C) im SW50.1 Rotor zentrifugiert. Die deutlich sichtbare bläuliche Phagenbande, die sich zwischen der 3M- und 5M-CsCl-Lösung befand, wurde mit einer Spritze abgezogen, mit einem gleichen Volumen 7.2M CsCl in MTE vermischt, je 1ml davon in SW50.1 Röhrchen gegeben und mit 3ml 5M CsCl in MTE und 1ml 3M CsCl in MTE überschichtet. Nach 1-stündiger Zentrifugation bei 30000rpm (20°C) im SW50.1 Rotor befand sich die Phagenbande wiederum zwischen den 3M- und 5M-CsCl Lösungen, DNA- und RNA-Verunreinigungen am Boden des Röhrchen. Die Phagenbande wurde mit einer Spritze isoliert und zur Entfernung des Cäsiumchlorids 3-mal gegen ein 1000-faches Volumen sterilen SM-Puffers bei 4°C dialysiert, die gereinigten Phagen bis zur Transfektion in sterilen Polypropylenröhrchen bei 4°C aufbewahrt.

2.9.2 Präparation von λ -Phagen-DNA in kleinem Maßstab

(nach einem Protokoll von B.Herrmann, Heidelberg)

Eine Kolonie der jeweiligen Wirtsbakterien wurde in 200-400ml auf 37°C vorgewärmtes NZCYM-Medium überimpft und bis zur Erreichung einer Zelldichte von 1.6×10^8 /ml im 37°C-Schüttelwasserbad inkubiert. Je 40ml dieser Bakterien, d.h. ca. 6.5×10^9 Zellen, wurden mit 6.5×10^7 Phagen (alternativ mit 50 μ l des Plattenlysats einer konfluenten Platte oder mit den Phagen von 3 Plaques) infiziert und bis zur Bakterienlyse nach ungefähr 4 Stunden bei 37°C weitergeschüttelt. Dann wurde jeweils 1ml Chloroform zugegeben, für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert und die bakteriellen Nukleinsäuren anschließend für 30 Minuten mit DNaseI (1 μ g/ml) und RNaseA (1 μ g/ml) bei RT verdaut. Bakterienreste wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 10000g (4°C) pelletiert, die Phagen im SW27.1-Rotor (2 Stunden, 4°C, 24000rpm) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Phagen in

500µl 10mM Tris Cl (pH8.0), 10mM EDTA, 100µg/ml Proteinase K aufgenommen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Phagen-DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Äthanol ausgefällt. Pro 40ml Lysat wurden 20-100µg DNA erhalten.

2.9.3 Präparation von λ-Phagen-DNA in großem Maßstab

(Yamamoto et al., 1970; Maniatis et al., 1978, 1982)

250µl einer stationären Übernachtskultur der jeweiligen Wirtsbakterien wurden in 25ml auf 37°C vorgewärmtes NZCYM-Medium überimpft und bis zu einer Dichte von 4×10^8 Zellen/ml bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Diese 10^{10} Zellen wurden sodann mit 10^8 Phagen infiziert, mit 500ml vorgewärmtem NZCYM-Medium versetzt und bis zur Bakterienlyse (8-12 Stunden) unter heftigem Schütteln (300rpm) bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 10ml Chloroform wurde für 15 Minuten weitergeschüttelt, die bakteriellen Nukleinsäuren anschließend bei RT für 30 Minuten mit DNaseI und RNaseA (je 1µg/ml) degradiert. Danach wurde die Lösung mit festem Natriumchlorid versetzt (Endkonzentration 1M) und 1 Stunde auf Eis belassen. Bakterielle Reste wurden durch Zentrifugation bei 11000g für 10 Minuten (4°C) entfernt, die Phagen durch Zugabe von Polyethylenglykol (PEG6000) auf 10% Endkonzentration ausgefällt. Hierzu wurde die Lösung nach vollständigem Auflösen des PEG für mindestens 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die ausgefallten Phagen wurden 10 Minuten bei 4°C mit 11000g abzentrifugiert, in 8ml SM resuspendiert und zur Entfernung des PEG mit demselben Volumen Chlorofom extrahiert. Das Volumen der die Phagen enthaltenden wässrigen Phase wurde bestimmt, und pro ml 1.15g festes Cäsiumchlorid zugegeben und vorsichtig gelöst. Diese Suspension wurde vorsichtig auf in SW41-Röhrchen vorbereitete CsCl-Stufengradienten überschichtet (3

Stufen mit 1.7g/ml, 1.5g/ml und 1.45g/ml in SM) und 2 Stunden im SW41-Rotor bei 22000rpm (4°C) zentrifugiert. Die danach deutlich sichtbare bläuliche Phagenbande zwischen den Stufen mit 1.5 und 1.45g/ml wurde mit einer Spitze isoliert, in ein SW50.1-Zentrifugenröhrchen überführt und dieses mit CsCl-Lösung (1.5g/ml in SM) aufgefüllt. Nach 24-stündiger Gleichgewichtszentrifugation im SW50.1-Rotor (35000rpm, 4°C) wurden die gereinigten Phagen mit einer Spritze abgezogen, zur Entfernung des Cäsiumchlorids zweimal 1 Stunde gegen 1000-fache Volumina 10mM NaCl, 50mM Tris Cl (pH8.0), 10mM MgCl₂ bei RT dialysiert. Zum Aufschluß der Phagenpartikel wurde mit EDTA (Endkonzentration 20mM), SDS (Endkonzentration 0.5%) und Proteinase K (Endkonzentration 50µg/ml) versetzt und 1 Stunde bei 65°C inkubiert. Die Phagen-DNA wurde durch Phenol-Chlorofom-Extraktion und anschließende ausgiebige Dialyse gegen TE (pH8.0) bei 4°C gereinigt.

2.10 Präparation von Nukleinsäuren aus eukaryotischen Zellkulturen

2.10.1 Präparation von hochmolekularer genomischer DNA

Das Kulturmedium von 5-10 nahezu konfluenten Petrischalen wurde abgegossen und die Monolayer mit je 5ml eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einem sterilen Gummispatel in insgesamt 10ml eiskaltem PBS abgeschabt, in ein 30ml Corexröhrchen überführt und 5 Minuten bei 4000g (4°C) pelletiert. In 10ml Kernpuffer resuspendiert, wurden die Zellen im Dounce-Homogenisator durch 5 Stöße mit dem losen Pistill aufgeschlossen, die Zellkerne bei 4000g abzentrifugiert, (5 Minuten, 4°C) noch zweimal mit 10ml Kernpuffer gewaschen und in 10ml TNE bei RT resuspendiert. Zur Freisetzung der DNA wurde mit

SDS (Endkonzentration 0.5%) und Proteinase K (Endkonzentration 100µg/ml) versetzt und unter vorsichtigem Schütteln für mindestens 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigte DNA wurde mit Äthanol ausgefällt, mit 80% Äthanol gewaschen und, nach Trocknen im Wasserstrahlvakuum, langsam in 1mM EDTA (pH8.0) gelöst.

Die so präparierte DNA wies eine durchschnittliche Fragmentlänge von 50kb auf. Höhermolekulare DNA (>100kb) wurde durch extrem langsame und vorsichtige Phenol-Chloroform-Extraktion erhalten. Sie wurde zur Erzielung einer großen Oberfläche in einem 2l-Erlenmeyerkolben durch sehr langsames Schütteln auf einem Rundschüttler (30-50rpm) durchgeführt, also ohne Durchmischung der Phasen, pro Extraktionsschritt ca.24 Stunden, solange, bis kein Protein mehr vorhanden war (3-6 Zyklen). Die DNA wurde abschließend gegen 3-mal 2l TE (pH8.0) dialysiert und bei 4°C aufbewahrt. Niedermolekulare, ca.400bp lange DNA-Fragmente als Substrat für Nick-Translationen, wurden aus der 50kb großen DNA durch Ultraschallbehandlung gewonnen (Branson Sonifier Cell Disruptor B15, 100 Impulse, output control in Stellung 7).

2.10.2 Präparation von poly(A)⁺-RNA

(nach einem Protokoll von E.Wagner, Heidelberg)

Pro Aufarbeitung wurden 5-10 subkonfluente Petrischalen nach Abgießen des Mediums zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, die Zellen mit einem sterilen Gummispatel in insgesamt 10ml eiskaltem STE-Puffer abgeschabt. Diese Zellsuspension wurde mit Proteinase K (Endkonzentration 300µg/ml) und SDS (Endkonzentration 0.5%) versetzt, zur Zerkleinerung der hochmolekularen DNA 30 Sekunden im Ultra-Turrax Messerhomogenisator (Janke und Kunkel KG) homogenisiert und danach 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die

Nukleinsäurelösung wurde nach Phenol-Chloroform-Extraktion auf 0.5M NaCl eingestellt, die poly(A)⁺-RNA über Nacht bei RT an 100mg mit HSB äquilibrierte Oligo-dT-Sepharose adsorbiert. Zur Elution der poly(A)⁺-RNA wurde die bei 2000g (3 Minuten, RT) pelletierte und dreimal mit je 10ml HSB gewaschene Sepharose dreimal mit je 1ml dest. Wasser extrahiert. Ein 300µl Aliquot des Eluats wurde zur Bestimmung der RNA-Konzentration verwendet, der Rest mit Hefe-tRNA (Endkonzentration 10µg/ml) und Natriumacetat (Endkonzentration 0.2M) versetzt und die RNA mit zwei Volumen Äthanol ausgefällt. Durch 30-minütige Zentrifugation bei 11000g (4°C) wurde die gefällte RNA pelletiert, mit 80% Äthanol gewaschen, mit einer Konzentration von 1 µg/ml poly(A)⁺-RNA in sterilem Wasser gelöst und bis zur Gelelektrophorese bei -20°C aufbewahrt.

2.11 Nachweis spezifischer DNA- und RNA-Sequenzen durch Nukleinsäurehybridisierung

2.11.1 Transfer von DNA auf Nitrocellulosefilter:

Southern-Blot (Southern 1975)

Auf einem 0.8% Agarosegel (13x14cm) wurde die mit dem jeweiligen Restriktionsenzym verdaute DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Bei genomischen DNA's wurden pro Tasche 5-10µg, bei klonierten DNA's 0.1-1µg aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die DNA's mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Um den Transfer der DNA auf Nitrocellulose zu erleichtern, wurde das Gel zunächst für 15 Minuten (RT) mit 250ml 0.25N HCl behandelt (partielles Depurinieren der DNA). Durch 40-minütige Inkubation in 250ml IN NaOH wurde die DNA denaturiert, danach durch Zugabe von 250ml IM Tris-IM HCl für 1 Stunde neutralisiert. Anschließend wurde das Gel für 20-30 Minuten in 250ml 20xSSC überführt. Der Transfer der

DNA aus dem Agarosegel auf ein gleichgroßes, mit dest. Wasser (5 Minuten, RT) und 20xSSC (5 Minuten, RT) vorbehandeltes Nitrocellulosefilter erfolgte, indem 20xSSC durch eine Anordnung, bestehend aus (von unten nach oben) 2 Blatt Whatman 3MM-Papier, dem Gel, dem Nitrocellulosefilter und erneut 2 Blatt 3MM-Papier mit Hilfe eines Stapels entfalteter Papierhandtücher durchgesaugt wurde. Dazu hingen die Enden der beiden zuunterst liegenden 3MM-Papiere in ein Reservoir aus 2l 20xSSC, die zuoberst angeordneten Papierhandtücher wurden mit einem 1kg-Gewicht beschwert. Nach 3-4 Stunden war der Transfer komplett, was durch erneutes Anfärben des Gels kontrolliert wurde. Die Positionen der Geltaschen wurden auf dem Nitrocellulose-Filter markiert, dieses kurz an der Luft getrocknet und 20 Minuten bis 2 Stunden bei 80°C im Vakuum gebacken.

2.11.2 DNA-Dot-Blot (Kafatos et al. 1979)

Je 4µg DNA wurden in 50µl TE (pH8.0) mit 12.5µl IM Natriumacetat (pH4.0) für 15 Minuten bei 55°C inkubiert, durch Zugabe von 31.2µl IN NaOH (Endkonzentration 0.3N) 20 Minuten bei RT denaturiert und anschließend mit 21.2µl INHCl neutralisiert. Nach Zugabe von 60µl 20xSSC, 25µl TE (pH8.0) and 0.3µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) lagen die 4µg DNA in einem Volumen von 200µl vor.

Auf ein mit dest. Wasser (5 Minuten, RT) und 20xSSC (5 Minuten, RT) vorbehandeltes Nitrocellulosefilter, das in eine Hybri-Dot-Blot-Apparatur (BRL) eingespannt wurde, wurden jeweils 0.5µg, 1µg und 2µg der DNA aufgetragen und mit je 200µl 6xSSC nachgewaschen, wobei die Flüssigkeit mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurde. Die Filter wurden kurz an der Luft getrocknet und 20 Minuten bis 2 Stunden bei 80°C im Vakuum gebacken.

2.11.3 Transfer von RNA auf Nitrocellulosefilter:

Northern-Blot

5-10µg poly(A)⁺-RNA (Konzentration 1µg/ml in dest. Wasser) wurden mit Denaturierungspuffer (Endkonzentration 50% DMSO, 20% deionisiertes Glyoxal in PB) für 5 Minuten bei 50°C denaturiert, 2-5 Minuten auf Eis gestellt und mit Gelladepuffer versetzt (Endkonzentration 10% Glycerol, 2mM Natriumphosphat pH7.0, 0.08% Bromphenolblau). Die Elektrophorese wurde für 3 Stunden mit 100V bei 4°C in vertikalen 1% Agarosegelen durchgeführt (Laufpuffer PB=10mM Natriumphosphat pH7.0), die mit einem 10% Acrylamid-Kissen abgedichtet wurden. Zur Anfärbung der RNA wurde das Gel nach dem Elektrophoreselauf für 15 Minuten in einer lichtdichten Wanne mit Acridinorangelösung (130µg/ml in PB) bei RT inkubiert, anschließend 3-mal 15 Minuten mit PB entfärbt und die RNA im langwelligen UV-Licht fotografiert. Der Transfer auf Nitrocellulosefilter erfolgte wie unter 2.11.1 beschrieben.

2.11.4 Hybridisierung von Nukleinsäuren auf Nitrocellulosefiltern mit radioaktiv markierten DNA-Proben

(Maniatis et al., 1982)

Die gebackenen Filter wurden in Plastikfolie eingeschweißt und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit je 10ml vorgewärmter Vorhybridisierungslösung 30-60 Minuten bei 65°C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte in 5ml derselben Lösung durch Zugabe der radioaktiven DNA-Probe, die zuvor 2-5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert wurde. Pro Standard-Filter (13x14cm) wurden in der Regel 1-5x10⁶ Cerenkov-Counts eingesetzt (50-100ng DNA).

Die erforderliche Hybridisierungszeit wurde nach folgender

Gleichung grob kalkuliert (Maniatis et al., 1982):

$$\frac{1}{x} \times \frac{y}{5} \times \frac{z}{10} \times 2 = \text{Zeit (in Stunden), um } C_0t \text{ 1/2 zu erreichen,}$$

wobei x das Gewicht der Probe (in μg), y die Komplexität der Probe (in kb) und z das Volumen der Reaktion (in ml) waren. Hybridisiert wurde auf Werte von 1-3mal C_0t 1/2, in der Regel (x 0.1, y 5, $z=5$) für ca. 20 Stunden bei 65°C .

Zur Entfernung von nicht hybridisierter Probe und unspezifischen Hybridisierungen wurden die Filter nach der Hybridisierung 3-mal für 20-30 Minuten mit je 200ml $1\times\text{SSC} - 0.1\%$ SDS bei 65°C gewaschen, bei Hybridisierungen mit homologen Sequenzen abschließend 1-mal mit 200ml $0.1\times\text{SSC}-0.2\%$ SDS bei 65°C (30 Minuten). Die Filter wurden feucht in Plastikfolie eingeschweißt und mit Kodak X-AR Röntgenfilm unter Verwendung von Verstärkerfolien bei -80°C autoradiographiert.

Die Entfernung der hybridisierten radioaktiven DNA zur Rehybridisierung der Filter mit einer zweiten (oder weiteren) Probe erfolgte in 200ml $2\text{mM EDTA}-0.1\%$ SDS für 30 Minuten bei 80°C (Church und Gilbert 1984). Die Rehybridisierung erfolgte mit erneuter Vorhybridisierung wie oben beschrieben.

2.12 Konstruktion einer genomischen Genbank im λ -Phagenvektor

λ EMBL3 (Frischauf et al., 1983)

2.12.1 Präparation der Vektor-DNA (Frischauf et al., 1983)

$20\mu\text{g}$ λEMBL3 -Vektor-DNA (Abb.1) wurden nacheinander mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Eco RI verdaut und durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt.

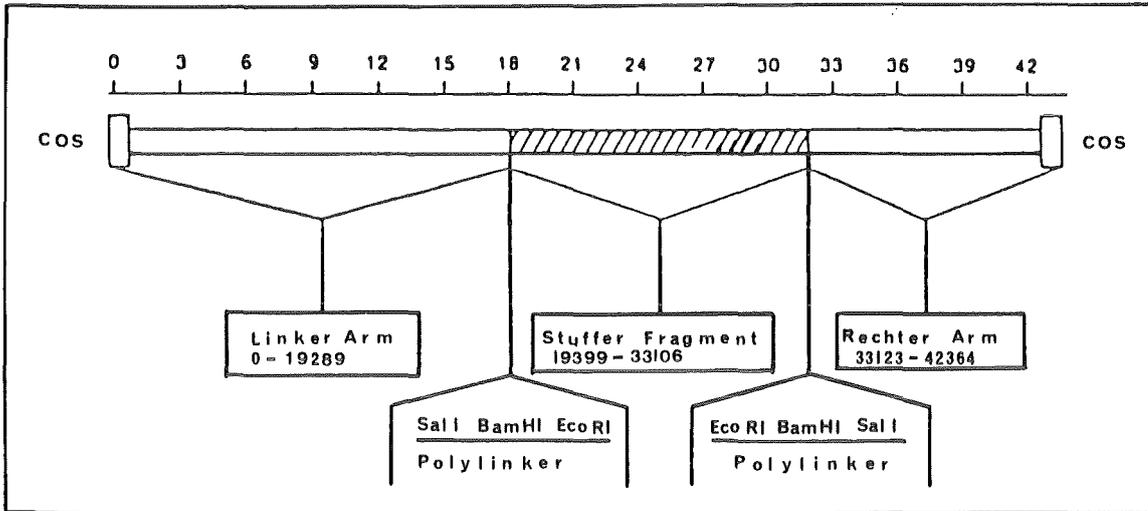


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Phagenvektors λ EMBL3.

Bei der anschließenden Präzipitation mit 0.6 Volumen Isopropanol (15 Minuten auf Eis) fielen die aus den Polylinkern stammenden kleinen Eco RI-Bam HI-Fragmente nicht aus. Die Vektorarme und das Stuffer-Fragment wurden abzentrifugiert und mit einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ in TE (pH 8.0) aufgenommen.

2.12.2 Präparation der genomischen Insert-DNA

(Maniatis et al., 1982)

Zur Präparation von 15-23 kb großen Fragmenten der genomischen DNA wurde eine hochmolekulare Präparation (100kb) partiell mit dem Restriktionsenzym Sau3A verdaut. In einem Pilotexperiment wurden zunächst die Bedingungen etabliert: 8 Aliquots a $2\mu\text{g}$ wurden mit unterschiedlichen Enzymmengen (2-fache Verdünnungen von 2 Einheiten/ μg bis 0.015 Einheiten/ μg) für 1 Stunde bei 37°C verdaut, die Reaktionen mit EDTA (Endkonzentration 20mM) abgestoppt und auf einem 0.4% Agarosegel analysiert. Nach Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid wurden die drei Reaktionen bestimmt, die die meiste Fluoreszenz im Größenbereich von 30-50kb

aufwiesen. Diese enthielten die meisten Moleküle im Bereich von 15-25kb (vgl. Seed et al., 1982).

In einem präparativen Verdau wurden sodann je 50µg DNA mit den so festgestellten optimalen drei Enzymkonzentrationen für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, danach EDTA (Endkonzentration 20mM) zugegeben und der Erfolg der Reaktion durch Elektrophorese von 0.5µg Aliquots auf 0.4% Agarosegelen kontrolliert. Die partiell verdauten DNA's wurden nach Phenol-Chloroform-Extraktion mit Äthanol ausgefällt, in je 500µl TE (pH8.0) aufgenommen, zum Öffnen der cohäsiven λ-Enden (cos-Enden) 10 Minuten bei 68°C inkubiert und anschließend vorsichtig auf in SW40-Röhrchen vorgeformte lineare 10-40% Sucrose-Dichtegradienten (in 1M NaCl, 20mM Tris Cl (pH 8.0) 5mM EDTA) überschichtet. Nach 24-stündiger Zentrifugation im SW40-Rotor (26.000rpm, 20°C) wurden die Gradienten fraktioniert (0.5ml-Fraktionen), 20µl Aliquots jeder zweiten Fraktion durch Elektrophorese auf 0.4% Agarosegelen analysiert. Die Fraktionen, die nach Ethidiumbromid-Färbung der DNA die meiste Fluoreszenz im Größenbereich von 30-50kb aufwiesen, wurden vereinigt und nach Dialyse gegen 3mal 1000-fache Volumina TE (pH8.0) über Elutip-d Säulen (Schleicher und Schüll, Verwendung nach Vorschrift des Herstellers) gereinigt und konzentriert.

Das Säuleneluat wurde mit Äthanol präzipitiert, die DNA in 50µl sterilem TE (pH8.0) aufgenommen. Mit einem 5µl Aliquot wurde die DNA-Konzentration bestimmt, die Größe der Fragmente erneut durch Elektrophorese eines 0.5µg-Aliquots auf 0.4% Agarosegelen überprüft. Die 5'-Enden der Fragmente wurden sodann, wie unter 2.6.4 beschrieben, dephosphoryliert, die DNA mit einer Konzentration von 0.5µg/µl in sterilem TE (pH8.0) gelöst.

2.12.3 Ligation und in-vitro Verpackung der rekombinanten Phagen-DNA's

Das optimale Verhältnis von Vektor zu Insert wurde in einer Reihe von Test-Ligationen bestimmt (theoretisch 2:1). Dabei wurde die Vektor-DNA mit 2µg pro 12 µl-Ligationsansatz konstant gehalten, die Menge der Insert-DNA variiert. Je 4 µl dieser Reaktionen wurden in vitro mit einem Zweikomponenten in-vitro-packing extract (Gigapack, Vector Cloning Systems, San Diego) in Phagenhüllen verpackt, die Phagentiter auf dem E.coli Wirtsstamm NM539 bestimmt. Die Ligation, die nach Verpackung die meisten Phagen erzielte, wurde in größerem Maßstab wiederholt (fünf 12µl Ligationsansätze), die Phagen mit Hilfe von 15 Packaging-Extrakten in vitro verpackt.

2.12.4 Amplifikation der Genbank (Maniatis et al., 1982)

Jeweils 4×10^9 NM539-Wirtsbakterien wurden mit je 250.000 rekombinanten Phagen infiziert und mit 50ml Topagar auf 23x23cm große LB-Agarplatten plattiert. Nach 8-9 stündiger Inkubation bei 37°C, kurz vor konfluenter Lyse, wurden die Platten mit je 100ml eiskaltem SM-Puffer überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Überstände aller Platten wurden gesammelt, mit Chloroform sterilisiert, Agar- und Bakterienreste abzentrifugiert und die Phagentiter bestimmt. 50ml-Aliquots der Genbankfraktionen wurden mit 7% DMSO bei -80°C eingefroren, der Rest in Glasflaschen über wenigen Tropfen Chloroform bei 4°C aufbewahrt.

2.13 Identifizierung rekombinanter Phagenklone

(Benton und Davis 1977, Maniatis et al., 1982)

2.13.1 Plattieren der Genbank

Jeweils 150.000 rekombinante Phagen wurden mit 4.8×10^8 NM539-Wirtsbakterien (in 10mM $MgSO_4$) gemischt, 20 Minuten bei $37^\circ C$ inkubiert und mit 25 ml TB-Topagar auf 23x23cm große TB-Agarplatten plattiert.

Die hierzu verwendeten Agarplatten waren mindestens eine Woche alt und gut getrocknet. Waren die Platten zu feucht, so bestand die Gefahr, daß beim späteren Filterlift (s.u.) Teile des Topagars auf dem Nitrocellulosefilter haften blieben.

Die Platten wurden im $37^\circ C$ -Inkubator bebrütet bis die Plaques gerade sichtbar wurden (6-7 Stunden). Konfluente Lyse wurde vermieden, um Doppelinfektionen und dadurch mögliche Rekombinationen zwischen repetitiven Sequenzen verschiedener Phagenklone zu verhindern.

2.13.2 Transfer der Phagen-DNA auf Nitrocellulosefilter:

Filterabzüge

Von jeder Platte wurden zwei Filterabzüge hergestellt. Dazu wurden trockene 20x20cm große Nitrocellulosefilter von der Mitte her langsam auf die Platten aufgelegt, das erste Filter 30-60 Sekunden, das zweite 120-150 Sekunden nach dem vollständigen Benetzen auf der Platte belassen. Während dieser Zeit wurden asymmetrische Markierungen angebracht, indem eine tuschegetränkte Kanüle durch das Nitrocellulosefilter auf den Boden der Agarplatte gedrückt wurde. Auf beiden Filterabzügen wurden jeweils die identischen Markierungen angebracht.

2.13.3 Denaturierung und Fixierung der DNA auf Nitrocellulosefiltern

Mit stumpfen Pinzetten (Millipore) wurde das Filter von der Agarplatte abgezogen und mit der DNA-Seite nach oben auf ein mit Denaturierungslösung (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) benetztes Whatman 3MM Filterpapier transferiert. Nach 30-60 Sekunden wurde es auf ein weiteres, mit Neutralisierungslösung (0.5M Tris Cl (pH8.0), 1.5M NaCl) befeuchtetes 3MM-Papier überführt, wo es 5 Minuten verblieb, bevor es für weitere 5 Minuten auf ein drittes, mit 2xSSPE getränktes Filterpapier aufgebracht wurde. Danach wurde das Filter kurz an der Luft getrocknet und für 20 Minuten bis 2 Stunden bei 80°C im Vakuum gebacken. Die Agarplatten wurden mit Parafilm versiegelt und bei 4°C aufbewahrt.

2.13.4 Plauehybridisierung und Identifizierung positiver Klone

Die gebackenen Filter wurden in Plastikfolie eingeschweißt und, wie unter 2.11.4 beschrieben, vorhybridisiert (pro Filter 20ml Lösung) und hybridisiert (10ml/Filter). Nach 20-stündiger Exposition wurden die auf die Filter aufgelegten Röntgenfilme entwickelt und ausgewertet. Dazu wurden die asymmetrischen Markierungen von den Filtern auf die Röntgenfilme übertragen, die jeweils korrespondierenden Filme deckungsgleich übereinandergelegt. Hybridisierungs-Signale, die auf beiden Filmen an identischen Positionen auftraten, wurden auf den Filmen markiert und, wiederum mit Hilfe der asymmetrischen Markierungen, auf die Agarplatte übertragen. Ein Bereich von 1cm Durchmesser um ein solches Signal wurde mit Hilfe eines sterilen 5ml-Polypropylenröhrchens (Greiner) aus der Agarplatte

ausgestanzt und in 1ml SM-Puffer mit 20µl Chloroform überführt. Durch Inkubation über Nacht bei 4°C diffundierten die Phagen aus dem Topagar in den Puffer.

2.13.5 Rehybridisierung und Isolierung singulärer Plaques

Zur Isolierung singulärer Plaques wurden die Phagen der primären Signale zwei weiteren Hybridisierungsrunden unterworfen. In der ersten Runde wurden 200µl, 50µl und 10µl einer 10⁻²-Verdünnung der aus dem Agar diffundierten Phagen mit 1.6x10⁸ NM539-Wirtszellen gemischt, 20 Minuten bei 37°C inkubiert, mit 3ml Topagar auf 10cm TB-Agarplatten plattiert und über Nacht im 37°C-Inkubator bebrütet. Platten mit 1-5x10³ Plaques wurden für die Rehybridisierung verwendet. Wie oben beschrieben, wurden jeweils zwei Filterabzüge präpariert und diese nach Denaturierung und Fixierung der DNA mit der radioaktiven Probe hybridisiert. Positive Signale wurden wiederum auf den Agarplatten mit Hilfe asymmetrischer Markierungen lokalisiert, Bereiche von 0.5cm Durchmesser mit dem stumpfen Ende einer Pasteurpipette ausgestanzt und in 1ml SM-Puffer überführt.

Für die zweite Rehybridisierungsrunde wurden wiederum verschiedene Phagenverdünnungen plattiert, Platten mit ca. 100 Plaques für Filterabzüge und Hybridisierung verwendet. Nach dieser zweiten Runde war es in jedem Fall möglich, einzelne, gut voneinander getrennte Plaques mit dem spitzen Ende einer Pasteurpipette zu isolieren. Von diesen Phagen wurden Plattenlysate präparierte, interessante Klone mit 7% DMSO bei -80°C eingefroren.

2.14 Restriktionskartierung von rekombinanten λ -Klonen

(Rackwitz et al., 1984, Zehetner et al., 1986)

Die rasche Kartierung von λ -Klonen wurde nach der von Rackwitz et al. (1984) beschriebenen Methode durchgeführt. Rekombinante λ -DNA's (meist aus Präparationen in kleinem Maßstab) wurden mit den gewünschten Restriktionsenzymen partiell verdaut, die Reaktionsprodukte selektiv am linken respektive rechten cos-Ende mit zu diesen komplementären, radioaktiv markierten Dodekanukleotiden (ON-L bzw. ON-R) markiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Autoradiographie konnten die Restriktionskarten direkt aus der "Leiter" der Produkte der partiellen Verdau abgelesen werden.

2.14.1 Partieller Restriktionsverdau

In einem Volumen von 30 μ l wurde auf Eis ein Restriktionsverdau von 0.9 μ g DNA mit 2 Einheiten des jeweiligen Enzyms angesetzt, die Reaktion durch Transfer in ein 37°C-Wasserbad gestartet. Nach 5, 10, 20, 30 und 45 Minuten wurden jeweils 6 μ l-Aliquots entnommen und auf Eis in einem Eppendorfröhrchen gesammelt, in das 1.5 μ l IM EDTA vorgelegt waren. Der Erfolg der Reaktion wurde durch Elektrophorese eines 10 μ l-Aliquots (300ng) auf einem 0.4% Agarosegel analysiert; parallel wurde ein vollständiger Verdau mit dem jeweiligen Enzym aufgetragen. Bei unvollständigem bzw. Überverdau wurden die Reaktionen mit veränderten Enzymkonzentrationen wiederholt.

2.14.2 Hybridisierung mit ON-L und ON-R (Biolabs)

Je 30ng der Dodekamere ON-L und ON-R wurden mit γ -³²P-dATP endmarkiert (vgl. 2.6.6.2). Ein Fünftel (20 μ l) jeder Reaktion

wurde mit 10 μ l 5M NaCl und 220 μ l Gelladepuffer nach Loening (Loening 1967) versetzt. 5 μ l des so präparierten Oligo-Mix wurde getrennt mit je 5 μ l der partiellen Verdauung (das entspricht 150ng DNA) gemischt, zum Aufschmelzen der cos-Enden 2 Minuten in ein 75°C-Wasserbad überführt, danach sofort in ein 42°C-Wasserbad transferiert und zur Hybridisierung 30 Minuten inkubiert.

2.14.3 Gelelektrophorese und Autoradiographie

Die Hybridisierungsreaktionen wurden direkt auf 25cm lange 0.5% Agarosegele aufgetragen und 24 Stunden mit 50 Volt elektro-phoretisiert. Dazu wurde das Loening-Gelsystem verwendet (Loening 1967). Zur Vermeidung von pH-Gradienten wurde der Laufpuffer während der Elektrophorese mit einer Schlauchpumpe ständig zwischen Anoden- und Kathodenreservoir umgepumpt. Als Größenmarker diente ein Gemisch aus nativer und mit den Restriktionsenzymen BamHI, EcoRI, HindIII, HpaI, PstI und Sall vollständig verdauter λ CI857 Sam7-DNA (Boehringer), die gleichzeitig mit radioaktiven ON-L und ON-R hybridisiert wurde. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf einem Geltrockner im Wasserstrahlvakuum auf DEAE-Cellulosepapier für 1 Stunde getrocknet, die letzten 30 Minuten bei zugeschalteter Heizung. Die getrockneten Gele wurden für 2-12 Stunden mit Kodak X-AR Röntgenfilm und Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

2.14.4 Erstellung von Restriktionskarten

Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte teilweise automatisiert am EMBL Heidelberg nach dem Verfahren von Zehetner et al., 1986. Ansonsten wurden die Fragmentlängen anhand einer mit Hilfe der Größenmarker erstellten Eichkurve bestimmt, wobei jede Restriktionsschnittstelle vom rechten und vom linken Ende bestimmt werden konnte, was eine Aussage über die Genauigkeit der Zuordnung erlaubte. Die aus den erstellten Restriktionskarten prognostizierten Fragmentmuster wurden durch vollständige Verdau verifiziert.

3. ERGEBNISSE

Zur Klonierung eines Gens, das den DNA-Reparaturdefekt von XPA-Zellen aufhebt, wurde die in Abbildung 2 dargestellte Strategie ausgearbeitet (in Anlehnung an das Verfahren zur Isolierung menschlicher Onkogene (Goldfarb et al. 1982, Shih et al. 1982) und die Klonierung des bisher einzigen menschlichen Reparaturgens (Westerveld et al. 1984)). In Transfektionsexperimenten wird die DNA von Wildtypzellen in XPA-Zellen eingebracht. Durch UV-Bestrahlung wird ein Zellklon selektioniert, der ein komplementierendes Gen aufgenommen hat. Vor der Klonierung des Reparaturgens wird die Menge der transfizierten Sequenzen reduziert, indem die DNA dieses Klons in einer zweiten Runde erneut in XPA-Zellen transfiziert und durch UV-Selektion wiederum ein resistenter Klon isoliert wird. Aus dessen DNA werden die komplementierenden Sequenzen nach Anlegen einer geeigneten Genbibliothek auskloniert.

Um dieses Experiment erfolgreich durchführen zu können, muß eine große Zahl von XPA-Zellen transfiziert werden. Zum einen ist nur ein kleiner Teil der transfizierten Zellen in der Lage, Fremd-DNA stabil ins eigene Genom zu integrieren. Diese kompetenten Zellen nehmen außerdem nur beschränkt DNA auf, nach übereinstimmenden Literaturwerten in der Größenordnung von 1000Kb (Wigler et al. 1979b, Pellicer et al. 1980, Robins et al. 1981, Scangos und Ruddle 1981). Zur Isolierung eines singulären Gens muß aber das gesamte Genom in den Rezipientenzellen repräsentiert sein. Das erfordert bei einer Genomgröße von 3×10^6 Kb (Säugerzellen) mindestens 3000 Transfektionsereignisse.

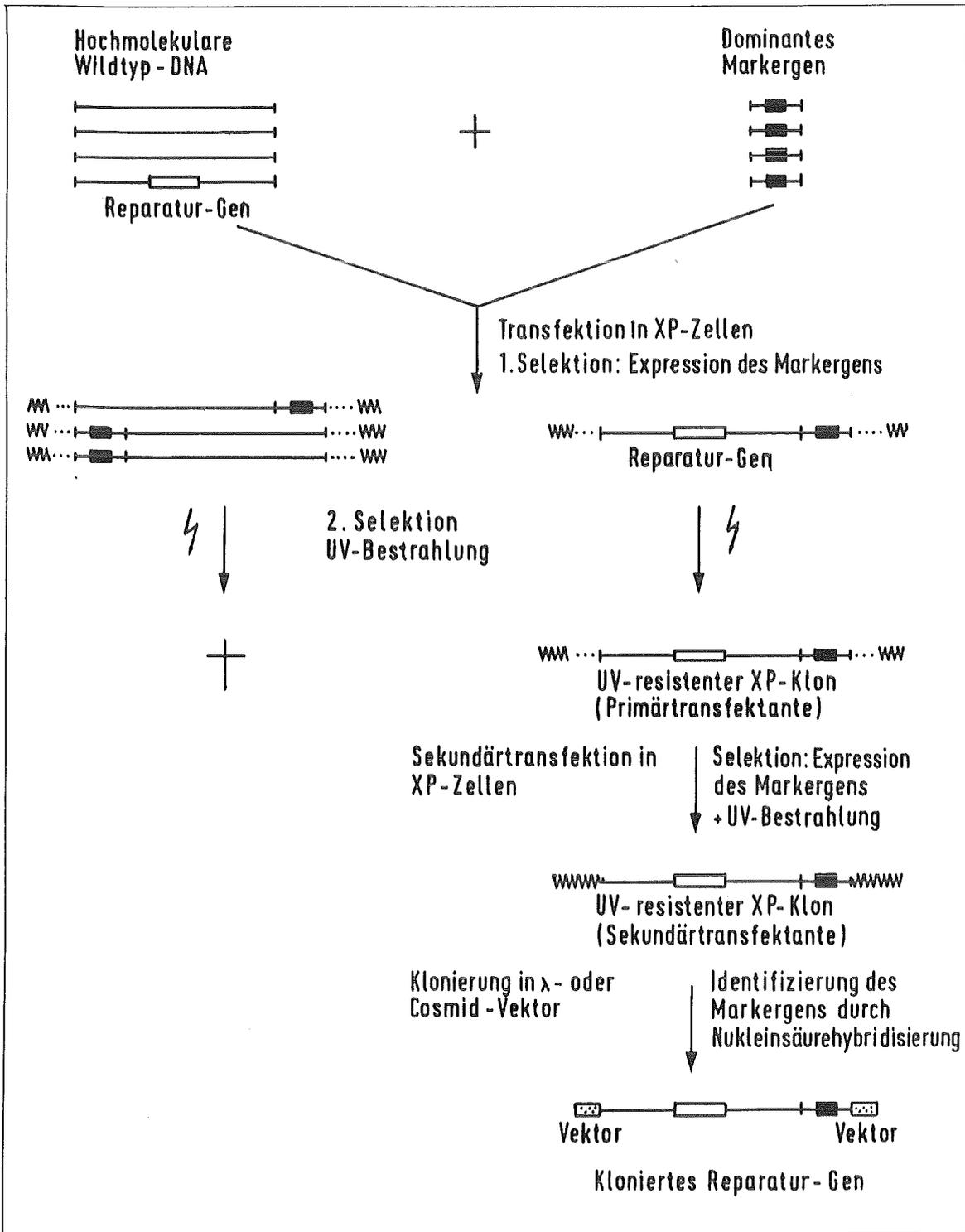


Abbildung 2: Klonierungs-Strategie.

Aufgrund der niedrigen Transfektionsfrequenz ist es nicht sinnvoll, direkt nach der Transfektion für Zellen zu selektionieren, die das gesuchte Reparaturgen aufgenommen haben. Stattdessen wird zunächst die Subpopulation von Zellen isoliert, die irgendeine Fremd-DNA integriert hat. Das wird durch Mittransfizieren eines kleinen selektionierbaren Markergens erreicht; in einer ersten Selektion überleben nur Zellen, die dieses Markergen exprimieren, also Fremd-DNA aufgenommen haben. Erst diese werden der UV-Selektion unterworfen.

3.1 Optimierung der Transfektionsfrequenz

In einer Reihe von Vorexperimenten wurden die für die verwendeten XP-Zellen optimalen Transfektionsbedingungen ermittelt. Dazu wurden verschiedene Markergene und Transfektionsmethoden getestet, die optimale Transfektionszeit bestimmt und der Einfluß einer transienten Permeabilisierung der Zellen durch einen osmotischen Schock nach der Transfektion untersucht. Die zur Transfektion verwendeten Zelllinien wurden außerdem regelmäßig auf Mycoplasma-Kontamination untersucht, da diese die Transfizierbarkeit drastisch reduzieren (Jan Hoeijmakers, pers. Mitteilung).

3.1.1 Vergleich verschiedener selektionierbarer dominanter Markergene

In einer Reihe von Experimenten wurde die Transfizierbarkeit der SV40 transformierten XPA-Zelllinie XP12ROtk-1 mit verschiedenen Markergenen bestimmt. Zur Transfektion wurde die Calciumphosphat-Methode benutzt. Die Ergebnisse dieser Versuche sowie weiterer Transfektionen, in denen die Frequenz bestimmt

wurde, sind in den Tabellen 1a und 1b zusammengestellt. Das bakterielle neo-Gen erwies sich dabei als am geeignetsten. Die schlechteste damit erzielte Frequenz (2.1×10^{-4} Transfektanten/transfizierte Zelle) war noch gleichgut wie die beste mit dem gpt-Gen, codiert auf dem Plasmid pSV3-gptH, das nach dem neo-Gen die höchsten Frequenzen aufwies. Das gpt-Gen unter der Kontrolle des RSV-LTR (Plasmid pRSVgpt) erreichte in diesen Experimenten nur sehr schlechte Frequenzen (1.5×10^{-5}), die nicht entfernt an die publizierte (Gorman et al., 1983) 8-10-fache Steigerung im Vergleich zu pSV2-gpt heranreichte.

Tabelle 1: Transfektionsfrequenzen

a) Vergleich verschiedener Markerplasmide

<u>I. pSV2-neo</u>	Zahl der transfizierten Zellen	Kolonien	Transfektionsfrequenz	<u>II.a pSV2-gpt</u>	Zahl der transfizierten Zellen	Kolonien	Transfektionsfrequenz
Experiment 1	1.6×10^6	640	4×10^{-4}	Experiment 1	1.6×10^6	320	2×10^{-4}
" 2	3.2×10^6	960	3×10^{-4}	" 2	9×10^5	88	9.8×10^{-5}
" 3	4.5×10^6	1125	2.5×10^{-4}	" 3	1.6×10^6	145	9.1×10^{-5}
" 4	2.4×10^6	1250	5.2×10^{-4}	Summe 1-3 ^a	4.1×10^6	553	1.35×10^{-4}
" 5	1×10^6	387	3.9×10^{-4}	<u>II.b pSV3-gptH</u>			
" 6	1×10^6	667	6.7×10^{-4}	Experiment 1	2.4×10^6	312	1.3×10^{-4}
" 7	4×10^6	840	2.1×10^{-4}	" 2	6.4×10^6	1350	2.1×10^{-4}
Summe 1-7 ^a	1.77×10^6	5869	3.32×10^{-4}	Summe 1+2 ^a	8.8×10^6	1662	1.88×10^{-4}
-----				<u>II.c pRSV-gpt</u>			
Experiment 1	8×10^6	3624	4.5×10^{-4}	Experiment 1	4×10^6	24	6×10^{-6}
" 2	1.6×10^6	416	2.6×10^{-4}	" 2	2.4×10^6	72	3×10^{-5}
" 3	7.2×10^6	1893	2.63×10^{-4}	Summe 1+2 ^a	6.4×10^6	96	1.5×10^{-5}
" 4	2.4×10^6	1845	7.69×10^{-4}	<u>IV. pY3</u>			
Summe 1-4 ^b	1.92×10^6	7778	4.05×10^{-4}	Experiment 1	2.4×10^6	72	3×10^{-5}
<u>III. tk</u>				" 2	3.2×10^6	144	4.5×10^{-5}
Experiment 1	1.6×10^6	11	6.9×10^{-6}	" 3	4×10^6	131	3.3×10^{-5}
" 2	4×10^6	28	7×10^{-6}	Summe 1-3 ^a	9.6×10^6	347	3.6×10^{-5}
" 3	3.2×10^6	37	1.15×10^{-5}				
Summe 1-3 ^a	8.8×10^6	74	8.4×10^{-6}				

Alle Transfektionen wurden mit der Calciumphosphatmethode durchgeführt.

Pro 8×10^5 Zellen wurden 5 µg des jeweiligen Markerplasmids und 20 µg Lachsspermien-Träger-DNA cotransfiziert.

^a Rezipientenzelllinie XP12R0 tk⁻¹

^b Rezipientenzelllinie XP12R0

Das TK-Gen erwies sich mit einer Frequenz von unter 10^{-5} als gänzlich ungeeignet für Gentransferexperimente. In Co-Transfektionen von pSV2-neo und dem TK-Plasmid, bei denen eine erste Selektion mit G418 durchgeführt wurde, zeigte sich jedoch, daß 7 von 9 untersuchten G418-resistenten Klonen auch in HAT-Medium wuchsen. Die Frequenz, bezogen auf den TK-Gentransfer, war somit weit höher (ca. 10^{-4}) als bei direkter HAT-Selektion (8.4×10^{-6}).

Tabelle 1: Transfektionsfrequenzen

b) Vergleich der Transfektionsfrequenzen nach Transfektion verschiedener Markerplasmide in die Rezipientenzelle XP12RO tk⁻¹

Markerplasmid	Transfektionsfrequenz	Relative Frequenz bezogen auf pSV2-neo
pSV2-neo	3.32×10^{-4}	1.0
pSV3-gpt-H	1.88×10^{-4}	0.566
pSV2-gpt	1.35×10^{-4}	0.407
pY3	3.6×10^{-5}	0.108
pRSV-gpt	1.5×10^{-5}	0.045
tk	8.4×10^{-6}	0.025

c) Vergleich von Transfektionsfrequenzen nach Transfektion verschiedener Zelllinien mit pSV2-neo und Lachsspermienträger-DNA

Zelllinie	Transfektionsfrequenz	Relative Frequenz bezogen auf Ltk ⁻
Ltk ⁻ ^a	1.16×10^{-3}	1.0
GM0637 ^b	7.14×10^{-4}	0.616
NIH3T3 ^c	6.39×10^{-4}	0.551
CHO-xrs2 ^d	4.79×10^{-4}	0.413
XP12RO	4.05×10^{-4}	0.349
XP12RO tk ⁻¹	3.32×10^{-4}	0.286
AT5BIVA ^e	3.30×10^{-4}	0.284

^a 9.6×10^6 Zellen, transfiziert in 2 Exp.,

^b 9.6×10^6 Zellen, transfiziert in 2 Exp.,

^c 4.8×10^6 Zellen, transfiziert in 2 Exp.,

^d 5.6×10^6 Zellen, transfiziert in 2 Exp.,

^e 2×10^6 Zellen, transfiziert in 1 Exp.

d) Vergleich der erzielten Transfektionsfrequenzen mit Werten aus der Literatur

Zelllinie	Transfektionsfrequenz	Literaturstelle
XP12RO	4×10^{-4}	diese Arbeit
XP12RO	$< 10^{-4}$	Westerveld, in Lehmann 1985
XP12RO	$< 10^{-4}$	Arlett und Lehmann, in Lehmann 1985
XP12RO	1.8×10^{-4}	Schultz et al. 1985
XP12RO	4×10^{-5}	Ganesan et al. 1982
XP20S	1×10^{-4}	Gorman et al. 1983
XP20S	$< 10^{-4}$	Westerveld, in Lehmann 1985
XP20S	1.5×10^{-5}	Ganesan et al. 1983
GM4312A ^a	2.4×10^{-4}	Schultz et al. 1985
GM2009 ^b	$< 3.8 \times 10^{-7}$	"
GM1295 ^b	$< 5 \times 10^{-7}$	"

AT5BIVA	3.4×10^{-4}	diese Arbeit
AT5BIVA	4×10^{-6}	Green, in Lehmann 1985

Ltk ⁻	1.2×10^{-3}	diese Arbeit
Ltk ⁻	3×10^{-4}	Southern und Berg 1982
Ltk ⁻	2×10^{-3}	Gorman et al. 1983

CHO-xrs2	4.8×10^{-4}	diese Arbeit
CHO-UV20	1×10^{-4}	Rubin et al. 1983
CHO-UV135	3×10^{-4}	Mac Innes et al. 1984
CHO43-3B	10^{-3}	Westerveld et al. 1984

NIH3T3	6.4×10^{-4}	diese Arbeit
NIH3T3	2×10^{-4}	Gorman et al. 1983

^a SV40 transformierte XP-Linie, Komplementationsgruppe A

^b Primäre XP-Zelllinien, Komplementationsgruppe A

Dieses Ergebnis stimmt mit Resultaten von Okayama und Berg (1985) überein, die zeigen konnten, daß bei Transfektion einer cDNA für das Gen Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (HPRT) in HPRT⁻-Zellen diese Sequenzen einen Anteil von mindestens 0.1% der transfizierten DNA ausmachen müssen, um eine direkte Selektion in HAT-Medium zu gestatten, während nach vorangegangener Selektion für das auf dem cDNA-Vektor codierte neo-Gen noch ein Anteil von 0.001% HPRT-cDNA in der Gesamtpopulation der transfizierten Sequenzen HPRT⁺-Transformanten lieferte. Die Autoren folgerten aus diesem Befund, daß die Selektion auf bestimmte Phänotypen eine vorhergehende Phase der Expression dieser Gene bzw. der Akkumulation der für die Selektion benötigten Genprodukte erforderte. Aus Experimenten von Fromm und Berg (1982) war schon bekannt, daß die Promotoraktivität (und damit die Expression des Gens) eine entscheidende Rolle bei der Selektionierbarkeit transfizierter Gene spielt.

Versuche, die Selektion in der frühen Phase durch Reduktion des Aminopteringehalts im HAT-Medium auf 1/10 bzw. 1/100 (100ng bzw. 10ng/ml) abzumildern, führten zu keiner Erhöhung der Transfektionsfrequenz, so daß die TK⁻-Eigenschaft dieser XP-Zelllinie in den späteren Gentransferexperimenten nicht verwendet werden konnte.

Das Hygromycin-Phosphotransferasegen konnte ebenfalls nicht mit dem neo- oder dem gpt-Gen konkurrieren. Bereits die Etablierung der Selektionsbedingungen erwies sich als schwierig. Während bei 80µg Hygromycin/ml Medium noch viele Kolonien in nichttransfizierten Kontrollkulturen aufwuchsen, starben bei 130µg/ml bereits die Transformanten. Doch selbst die für XP12RO tk-1-Zellen optimalen Selektionsbedingungen von 110µg

Hygromycin pro ml Medium resultierten in Transfektionsfrequenzen von unter 10^{-4} , und lagen damit weit unter dem für Gentransferexperimente akzeptablen Limit.

Aus den genannten Gründen kamen für die späteren genomischen Transfektionen nur die bakteriellen neo- und gpt-Gene als Markergene in Betracht. Aufgrund der höheren Effizienz erhielt das neo-Gen in den meisten Experimenten den Vorzug.

Ein Vergleich von Transfektionsfrequenzen nach Transfektion verschiedener Zelllinien mit dem Plasmid pSV2-neo zeigte, daß XP12RO tk-1 Zellen mit anderen menschlichen SV40-transformierten Zelllinien vergleichbar waren, Nagerzelllinien jedoch bessere Frequenzen aufwiesen (vgl. Tabelle 1c). Diese Unterschiede und auch die bestimmten absoluten Werte passen gut zu den in der Literatur publizierten Daten (Tabelle 1d).

3.1.2 Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden

Eine Reihe verschiedener Transfektionsmethoden wurde ausgearbeitet. Im Vergleich zur Calciumphosphatmethode bedeutete die Transfektion von XP12ROtk-1-Zellen mit pSV2-neo nach anderen Methoden keine Verbesserung der Frequenz. Die Polybrene-DMSO-Methode nach Kawai und Nishizawa (1984), bei der die DNA mit Hilfe des Polykations Polybrene an der Zelloberfläche gebunden und durch anschließenden DMSO-Schock in die Zellen eingebracht wurde, resultierte in zwei Experimenten (je 4×10^6 Zellen) in Transfektionsfrequenzen von 7×10^{-5} . Auch die Copräzipitation von Calciumphosphat und rekombinanten λ -Phagenpartikeln (Ishiura et al. 1982) erzielte Frequenzen von nur 10^{-5} . Die Werte von mit der Elektropuls-Methode transfizierten Zellen (Neumann et al. 1982, Wong und Neumann 1982), die in unserem Labor von K.F. Weibezahn getestet wurde, lagen noch weit darunter.

3.1.3 Bestimmung der optimalen Transfektionszeit

Ein wichtiger Parameter für Transfektionen nach der Calciumphosphat-Methode stellt die Zeitspanne dar, für die das Präzipitat auf den Zellen verbleibt. Zur Bestimmung des optimalen Intervalls wurde eine Kinetik aufgenommen, die in Abbildung 3a gezeigt ist. In einem Parallelexperiment wurde zum Vergleich die Kinetik für AT5BIVA bestimmt, eine SV40 transformierte Fibroblastenzelllinie eines Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia Telangiectasia (diese Zellen sind hypersensitiv gegen ionisierende Strahlung). Bis zum Erreichen des Optimums nach 8-10 Stunden unterscheiden sich die Kurven nur wenig. Auffällig ist jedoch der sofortige starke Abfall der Transfektionsfrequenz der XP-Zellen nach dem Erreichen des Maximums, während die Frequenzen der AT-Zellen auch nach 24 Stunden kaum unter den optimalen Wert absanken. Das Präzipitat wurde daher in allen Experimenten nicht länger als 8-12 Stunden auf den XP-Zellen belassen.

3.1.4 Einfluß von osmotischen Schocks auf die Transfektionsfrequenz

Viele in der Literatur beschriebene Transfektionsprotokolle (Lowy et al. 1978, Parker und Stark 1979, Scahill et al 1983, Lopata et al. 1984) sehen zur Erhöhung der Transfektionsfrequenz eine kurzfristige Permeabilisierung der Zellmembran direkt im Anschluß an die Transfektionsperiode vor, die mit Hilfe von 10% DMSO oder 20-30% Glycerin durchgeführt wird. Der Einfluß einer solchen Behandlung auf die Transfizierbarkeit von XP-Zellen wurde ebenfalls bestimmt. Er ist, zusammen mit den parallel bestimmten Effekten auf AT5BIVA- und xrs-2-Zellen (gegen ionisierende

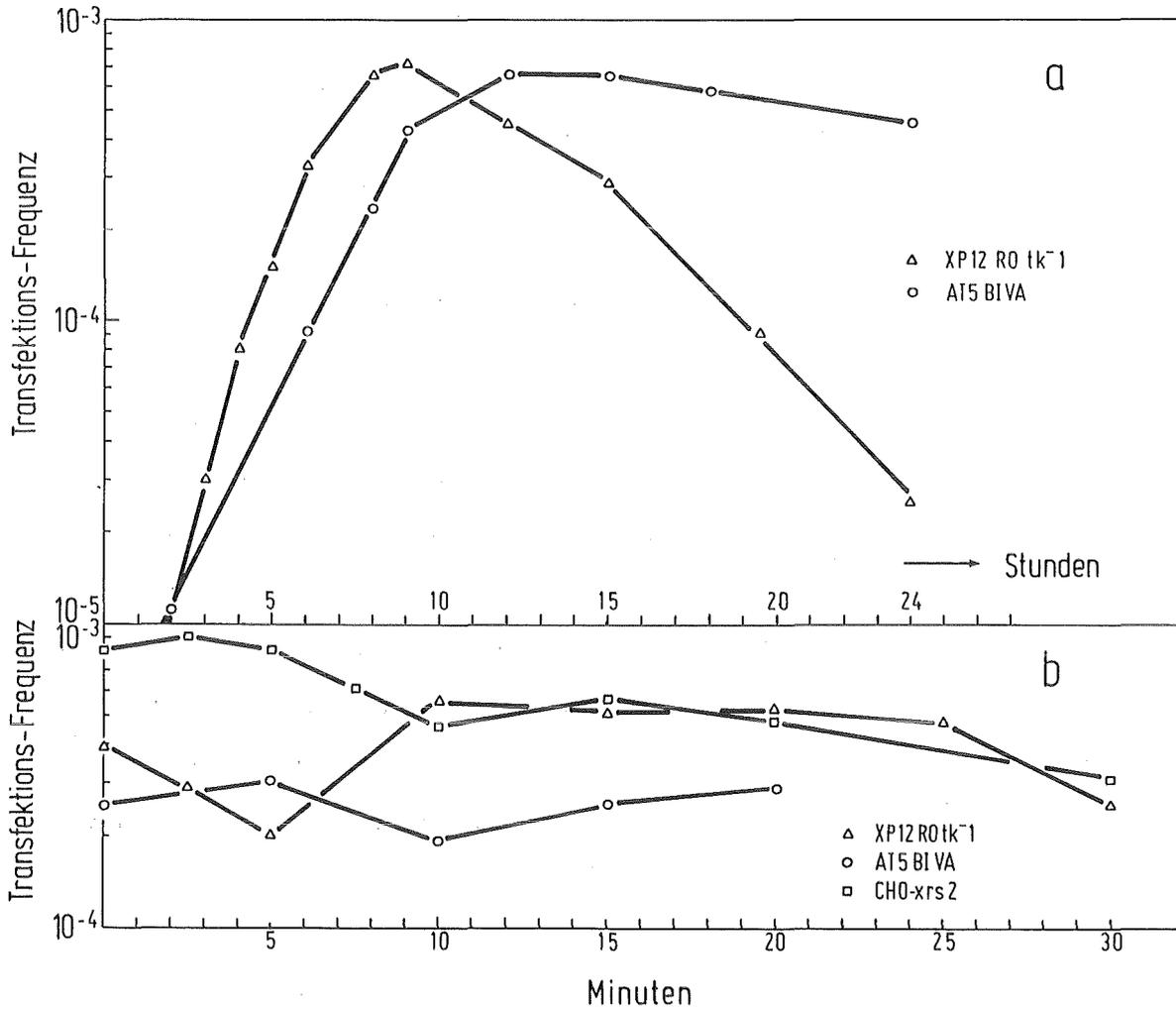


Abbildung 3: Einfluß verschiedener Parameter auf die Transfektionsfrequenz.

Für jeden Punkt wurden 3 Petrischalen mit 8×10^5 (XP12RO tk⁻¹ und AT5BIVA) bzw. 5×10^5 Zellen (CHO-xrs2) mit $5 \mu\text{g}$ pSV2-neo und $20 \mu\text{g}$ Lachsspermien-DNA nach der Calciumphosphatmethode cotransfiziert.

a. Kinetik: nach dem jeweiligen Zeitintervall wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 3mal mit 1xHeBS gewaschen. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen von einer auf drei Petrischalen verteilt und anschließend für 20 Tage mit G418-Medium selektioniert. Die entstandenen Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt.

b. DMSO-Schock: nach 9 Stunden (XP12RO tk⁻¹) bzw. 12 Stunden (ATeBIVA und CHO-xrs2) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 3mal mit 1xHeBS gewaschen. Anschließend wurde für das jeweilige Intervall 10% DMSO in 1xHeBS zugegeben, danach 3mal mit 1xHeBS gewaschen und frisches Medium aufgefüllt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen 1:3 verteilt und für 20 Tage in G418-Medium selektioniert. Die entstandenen Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt.

Alle Punkte in a. und b. stellen das Mittel aus 2 unabhängigen Experimenten dar.

Strahlung sensitive Hamsterzellen), in Abbildung 3b gezeigt. In allen Fällen waren die gemessenen Effekte marginal. Die Methode des osmotischen Schocks wurde daher in genomischen Transfektionsexperimenten nicht angewandt.

3.2 UV-Selektionsverfahren

In weiteren Vorexperimenten wurde eine Methode erarbeitet, um aus einer großen Zahl von Zellklonen, die durch Transfektion Fremd-DNA aufgenommen hatten, diejenigen herauszufinden, die eine Reversion des XP-Phänotyps aufwiesen. Grundlage hierfür war die unterschiedliche UV-Sensitivität von XP- und Wildtypzellen.

3.2.1 UV-Sensitivität der XP-Rezipientenzellen

In Abbildung 4 sind die Dosiseffektkurven der XP12RO-Zelllinie, der daraus abgeleiteten Tk⁻-Mutante und der SV40-transformierten menschlichen Wildtyp-Fibroblastenzelllinie GM0637 dargestellt. Die Tk⁻-Mutante zeigt die höchste UV-Sensitivität, deutlich unter der der Ausgangszelllinie XP12RO. Sie wurde daher, auch wenn ihre Tk⁻-Eigenschaft nicht zu Selektionszwecken verwendet werden konnte (vgl. 3.1.2), in allen genomischen Transfektionsexperimenten als Rezipientenzelle eingesetzt.

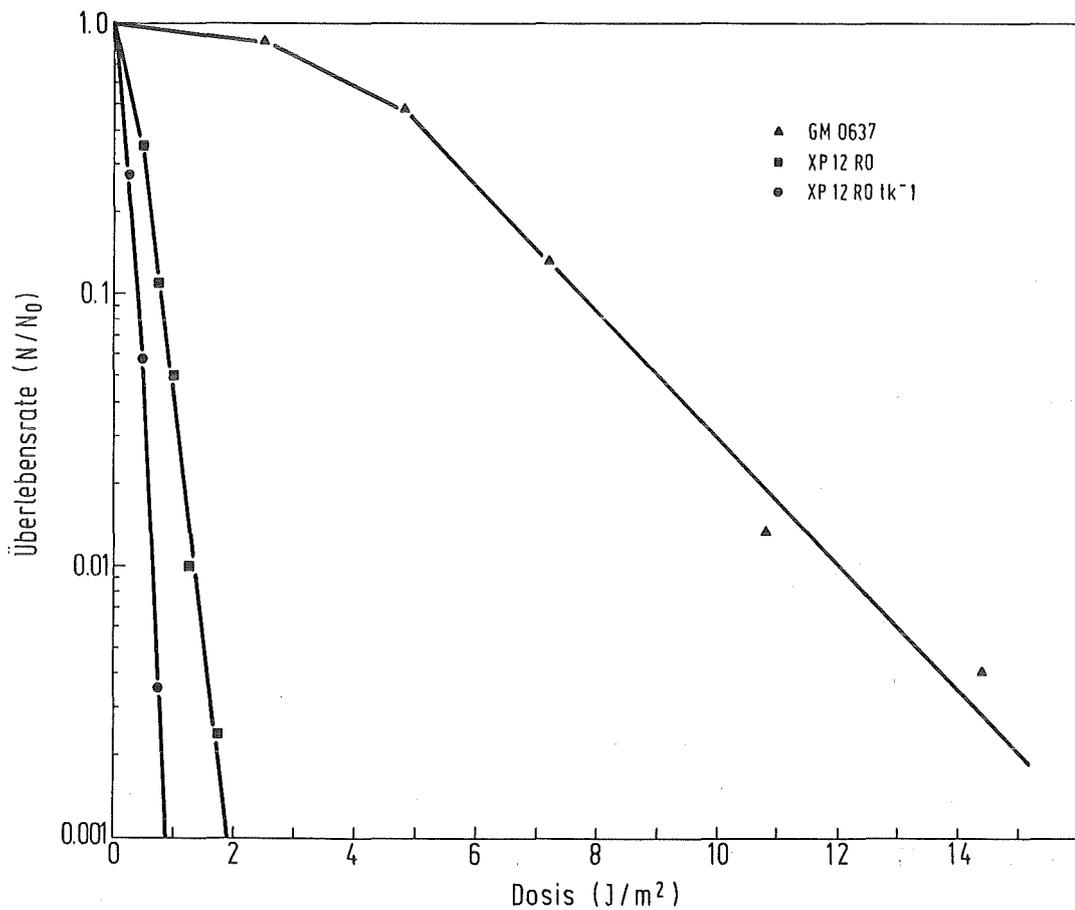


Abbildung 4: UV-Sensitivität der Zelllinie XP12RO, XP12RO tk⁻¹ und GM0637.

Pro Punkt wurden 4×10^5 Zellen in 60 mm Petrischalen für 2 Tage in Normalmedium kultiviert, mit der jeweiligen UV-Dosis bestrahlt, trypsiniert und gezählt. Eine definierte Zellzahl, abhängig von der Dosis zwischen 150 und 10.000 Zellen, wurde in jeweils 3 Kulturflaschen überimpft (Fläche 25 cm^2), in die ein Feederlayer aus 5×10^4 XP-München Zellen vorgelegt war, die durch Bestrahlung in einer ⁶⁰Co-Gammaquelle zuvor abgetötet worden waren. Nach 8 Tagen wurde das Medium gewechselt, die nach 14 - 16 Tagen entstandenen Kolonien fixiert, gefärbt und ausgezählt.

3.2.2 Selektionsverfahren

Das Bestrahlungs-Protokoll mußte so angelegt sein, daß alle Mutantenzellen quantitativ abgetötet wurden, die Bestrahlung selbst jedoch keine Reversion zum Wildtyp produzierte (UV-Bestrahlung ist selbst mutagen; vgl. Friedberg 1984).

Vor der UV-Bestrahlung wurden die in genomischen Transfektionen erzeugten Zellklone trypsiniert, die Zellen mit einer Dichte von

$3-4 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 replatiert. Dadurch wurde verhindert, daß einzelne Zellklone, bei denen die Zellen teilweise übereinander wuchsen, nur deshalb die UV-Selektion überlebten, weil die Strahlung nicht alle Zellen gleichmäßig erreichte.

Für das Selektionsverfahren selbst fanden zwei Protokolle Verwendung. Das zunächst angewandte Verfahren sah tägliche Bestrahlungen mit der niederen Dosis von 0.96 J/m^2 über einen Zeitraum von 10 Tagen vor (Royer-Pokora et al. 1984a, Royer-Pokora und Haseltine 1984b). Die Mutantenzellen wurden dadurch quantitativ abgetötet, 150 in eine Population von 8×10^5 XP-Zellen eingesäte GM0637-Wildtypzellen überlebten zu 28%. Beim zweiten Verfahren, das kürzer und dadurch weniger kontaminationsanfällig war, wurden die Zellen nur 3mal im Abstand von jeweils 48 Stunden bestrahlt, mit allerdings höheren Dosen (2 J/m^2). Auch diese Behandlung eliminierte die Mutantenzellen quantitativ, Wildtypzellen überlebten sogar besser, zu über 90%. Hundertprozentiges Überleben aller Wildtypzellen war nicht erforderlich, da zum Zeitpunkt der UV-Selektion die durch Transfektion erzeugten Klone aus mindestens 100 Zellen bestanden. Durch die Replatierung dieser Zellen vor der Strahlenselektion sollte ein UV-resistenter Zellklon nach der UV-Bestrahlung viele Kolonien ergeben.

In einem wichtigen Kontrollexperiment wurde gezeigt, daß das Transfektionsereignis selbst keinen Einfluß auf die UV-Sensitivität der XP-Zellen ausübt. Dazu wurden 1.5×10^7 XP12ROtk-1 Zellen mit XP-DNA und pSV2-neo cotransfiziert, die nach G418-Selektion entstandenen >5000 Kolonien an zehn aufeinanderfolgenden Tagen mit 0.96 J/m^2 bestrahlt. Dabei entstand kein einziger UV-resistenter Zellklon.

3.3 Genomische Transfektionen

Unter optimierten Bedingungen wurden in einer Serie von 18 Experimenten mehr als 2×10^8 Zellen transfiziert, die dabei entstandenen fast 35000 Transfektanten mit UV-Licht bestrahlt. Die verwendeten Wildtyp-Donor-DNA's entstammten verschiedenen Quellen.

3.3.1 Verwendung von Cosmid-Genbanken

Die Verwendung von Cosmid-Bänken in genomischen Transfektionen bietet den Vorteil, daß im Erfolgsfall die transfizierten Sequenzen relativ einfach identifiziert und nach Anlegen einer entsprechenden Genbank mit Hilfe der Vektorsequenzen als Hybridisierungsprobe wieder auskloniert werden können. Zwei verschiedene Cosmid-Bibliotheken wurden verwendet.

a) pOPF-Bank (Grosveld et al. 1982)

Der Cosmidvektor pOPF enthielt als direkt in eukaryotischen Tk-Zellen selektionierbares Markergen das Tk-Gen von Herpes Simplex Virus. Da dieses Selektionssystem aus den oben beschriebenen Gründen nicht verwendet werden konnte, wurde die Genbank mit anderen dominanten Markergenen cotransfiziert, und zwar pro Petrischale (8×10^5 Zellen) 25 µg der Genbank und 5 µg des Markerplasmids. In 5 Experimenten entstanden knapp 7000 Transfektanten, von denen keine die UV-Selektion überlebte (s. Tabelle 2).

b) pcos2 EMBL-Bank (Poustka et al. 1984)

Diese Genbank war aus menschlicher Lymphozyten-DNA präpariert. Da auf dem pcos2 EMBL-Vektor kein Markergen vorhanden war, wurde sie

Tabelle 2: Transfektion von Cosmid-Genbanken in XP12RO tk⁻¹^a

I. pOPF-Bank

Experiment	Markerplasmid	Zahl der transfizierten Zellen	Transfektionsfrequenz	Zahl der Transfektanten	Überlebende der UV-Selektion
npOPFI	pSV2-neo	2×10^6	3×10^{-4}	600	-
npOPFII	pSV2-neo	1.5×10^7	5×10^{-5}	750	-
npOPFIII	pSV2-neo	9×10^6	2×10^{-4}	1760	-
npOPFIV	pSV2-neo	1.8×10^7	1.5×10^{-4}	2700	-

Summe npOPF	pSV2-neo	4.4×10^7	1.3×10^{-4}	5810	-

gpOPFI	pSV2-gpt	1.5×10^7	4.8×10^{-5}	720	-
gpOPFII	pSV2-gpt	1.8×10^7	1.8×10^{-5}	320	-

Summe gpOPF	pSV2-gpt	3.3×10^7	3.2×10^{-5}	1040	-

Summe pOPF		7.7×10^7	8.9×10^{-5}	6850	-

II. pcos2 EMBL-Bank

Experiment	Markerplasmid	Zahl der transfizierten Zellen	Transfektionsfrequenz	Zahl der Transfektanten	Überlebende der UV-Selektion
nEI	pSV2-neo	1.6×10^7	1.3×10^{-4}	2050	-
nEII	pSV2-neo	1.12×10^7	1.9×10^{-4}	2080	-
nEIII	pSV2-neo	1.28×10^7	2.1×10^{-4}	2690	-

Summe nE	pSV2-neo	4×10^7	1.7×10^{-4}	6820	-

^a pro 8×10^5 Zellen wurden 20µg der Cosmidbank-DNA und 5µg des jeweiligen Markerplasmids cotransfiziert

mit dem neo-Markergen cotransfiziert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind ebenfalls der Tabelle 2 zu entnehmen. Die in drei Experimenten durch Transfektion von 4×10^7 Zellen entstandenen fast 7000 G418-resistenten Klone überlebten wiederum das UV-Selektionsverfahren nicht.

Ein Grund für das Scheitern dieser Cosmid-Transfektionen könnte darin liegen, daß das gesuchte Gen nicht oder nicht funktionell in den verwendeten Bibliotheken vorhanden war. In der Literatur wird das Phänomen von Diskrepanzen zwischen genomischen und in Cosmiden klonierten Sequenzen, resultierend aus Deletionen und Rearrangements, mehrfach berichtet (Nikaido et al. 1981, Taub et al. 1983, Leach und Stahl 1983, Wyman et al. 1985). Da diese Möglichkeit weder überprüft noch ausgeschlossen werden konnte, wurde von der Verwendung von Cosmid-Bibliotheken in den weiteren Transfektionsexperimenten abgesehen.

3.3.2 Placenta-DNA

In drei Experimenten wurde hochmolekulare menschliche Placenta-DNA in die XP12ROtk-1-Rezipientenzellen eingebracht (Tabelle 3). Um die transfizierten Sequenzen im Erfolgsfall identifizieren und reklonieren zu können, mußten diese zuvor markiert werden. Dies erfolgte durch Kopplung mit dem Neo-Markergen. Hierzu wurde die genomische DNA partiell mit dem Restriktionsenzym Sau3A verdaut, so daß durchschnittliche Fragmentlängen von 50kb entstanden. Die Fragmente wurden dephosphoryliert und mit dem Plasmid pSV2-neo ligiert, das zuvor in der BamHI-Restriktionsschnittstelle geöffnet worden war. Diese ligierten DNA's wurden für Transfektionen verwendet, wobei pro Petrischale (8×10^5 Zellen) 25µg eingesetzt wurden. Wie der Tabelle 3 zu entnehmen ist, entstanden in diesen Experimenten insgesamt 8900 Klone, von denen keiner die UV-Selektion überlebte.

Tabelle 3: Transfektion von hochmolekularer genomischer DNA in XP12RO tk⁻¹

I. Menschliche Placenta-DNA, kovalent mit pSV2-neo ligiert^a

Experiment	Zahl der transfizierten Zellen	Transfektionsfrequenz	Zahl der Transfektanten	Überlebende der UV-Selektion
nPI	1.6×10^7	1.56×10^{-4}	2500	-
nPII	2.72×10^7	2.35×10^{-4}	6400	-
Summe nP	4.32×10^7	2.1×10^{-4}	8900	-

II. Maus-DNA^b

Experiment	Markerplasmid	Zahl der transfizierten Zellen	Transfektionsfrequenz	Zahl der Transfektanten	Überlebende der UV-Selektion
gMI	pSV2-gpt	3.2×10^6	3×10^{-4}	960	-
RSVgMI	pRSV-gpt	3.2×10^6	3.1×10^{-5}	100	-
nMI	pSV2-neo	1.8×10^7	2.7×10^{-4}	4860	-
nMII	pSV2-neo	1.4×10^7	1.5×10^{-4}	2100	nMII5a-5k
nMIII	pSV2-neo	9.6×10^6	1.3×10^{-4}	1250	-
nMIV	pSV2-neo	3.2×10^6	3×10^{-4}	960	-
Summe		5.12×10^7	2×10^{-4}	10230	nMII5a-5k
Summe aller genomischer Transfektionen:		2.19×10^8	1.6×10^{-4}	34470	nMII5a-5k

^a pro 8×10^5 Zellen wurden 25µg DNA transfiziert.

^b pro 8×10^5 Zellen wurden 20µg Maus-DNA und 5µg Markerplasmid cotransfiziert

3.3.3 Maus-DNA

In einer Serie von 6 Transfektionen wurde hochmolekulare (>50kb) genomische Maus-DNA, isoliert aus der Maus-Mammatumor-Zelllinie GR, als Wildtyp-Donor-DNA verwendet. Eine Markierung wie oben beschrieben erübrigte sich, da sich die hochrepetitiven DNA-Elemente von Mensch und Maus unterscheiden (Jelinek und Schmid 1982), ein Nachweis der transfizierten Sequenzen unter Verwendung der repetitiven Mausequenzen als Hybridisierungsprobe somit möglich war. Bei diesen in Tabelle 3 zusammengefaßten Experimenten wurde eine Gesamtzahl von mehr als 5×10^7 Zellen transfiziert, woraus gut 10.000 unabhängige Transfektanten resultierten.

In dem Experiment nMII, bei dem das pSV2-neo Plasmid als Resistenzmarker cotransfiziert wurde, überlebten auf Petrischale Nr. 5 einige Klone die 10-tägige UV-Selektion. Davon wurden zehn mit Klonierzylindern isoliert (nMII 5a-5k), der Rest der Zellen zusammen abtrypsiniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese waren bei einer Gesamtzahl von 2.19×10^8 transfizierten Zellen, die in 34470 Transfektanten resultierten, die einzigen, die das UV-Selektionsverfahren überlebten.

3.4 Charakterisierung der Klone nMII5a-k

3.4.1 Dosiseffektkurven

Der Klon nMII5e überlebte UV-Bestrahlung tatsächlich besser als die XPA-Zelllinie XP12ROtk-1 (Abb.5). Im selben Experiment wurde die Überlebenskurve für die Wildtyp-Zelllinie GM0637 aufgenommen. Die Kurve für nMII5e verläuft eindeutig intermediär. Sie läßt sich weder dem Wildtyp noch der Mutante zuordnen.

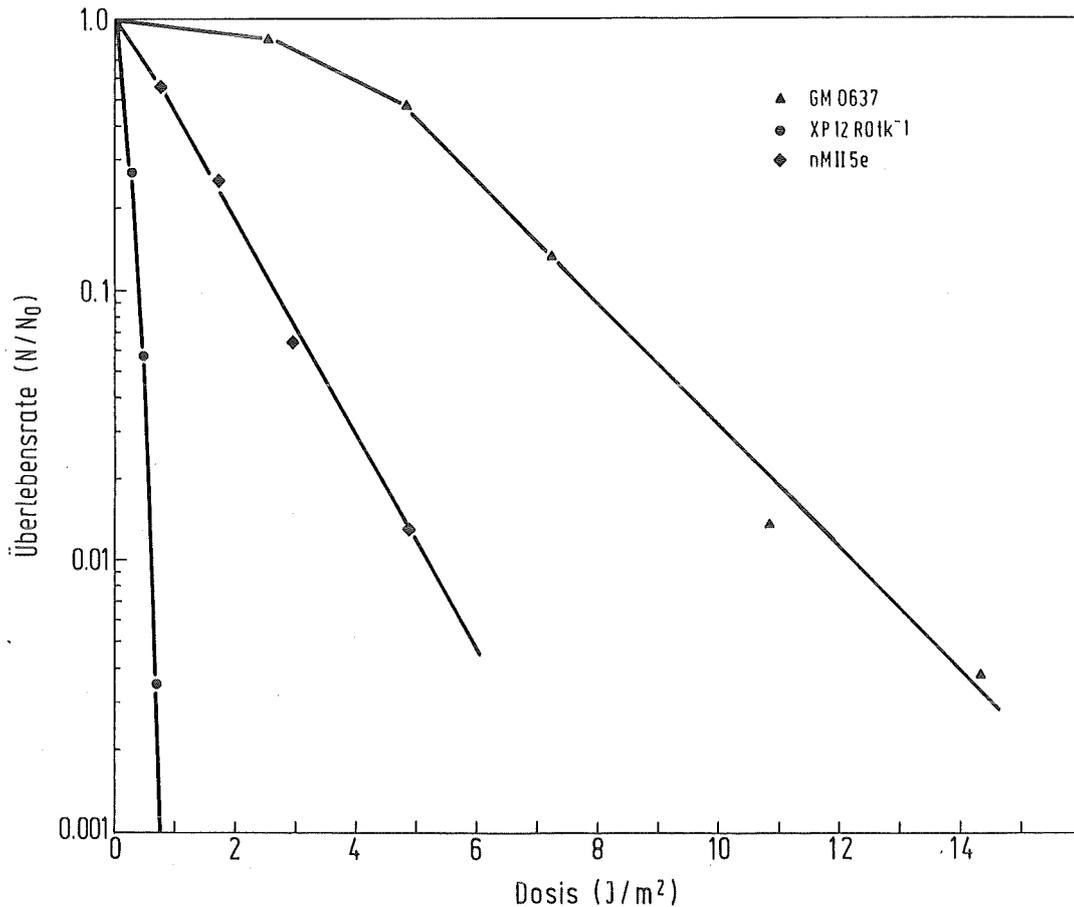


Abbildung 5: Dosiseffektcurven nach UV-Bestrahlung für nMII5e, XP12RO tk⁻¹ und GM0637.

Pro Punkt wurden 4×10^5 Zellen nach 2-tägiger Kultivierung in Normalmedium mit der jeweiligen Dosis bestrahlt, trypsinisiert und gezählt. Definierte Zellzahlen wurden in jeweils drei Kulturflaschen (Fläche 25 cm^2) überimpft auf einen Feederlayer aus 5×10^4 XP-München Zellen. Die nach 14 - 16 Tagen entstandenen Kolonien wurden fixiert, gefärbt und ausgezählt.

Für die übrigen nMII5-Klone wurden keine vollständigen Dosiseffektcurven aufgenommen, sondern nur die Überlebensrate bei der UV-Dosis von 1.7 J/m^2 bestimmt. Wie der Tabelle 4 zu entnehmen ist, lag sie für alle nMII5-Klone zwischen 20 und 30%, d.h. alle Klone zeigten den intermediären Phänotyp.

nMII-Klon	5a	5b	5c	5d	5e	5f	5g	5h	5i	5k
Überlebensrate N/N_0	0.268	0.304	0.259	0.274	0.249	0.199	0.194	0.277	0.302	0.237

Tabelle 4: Überlebensrate der nMII5-Klone bei einer UV-Dosis von 1.7 J/m^2 .

Dieses Ergebnis bestätigte die Vermutung, daß alle Klone von derselben Ausgangszelle abstammten. Die Entstehung mehrerer Klone erklärte sich aus der Replizierung der Zellen vor der UV-Bestrahlung. Die nur partielle Reversion zum Wildtyp konnte, wie oben angedeutet, in der heterologen Natur der Donor-DNA begründet sein. Westerveld et al. (1984) beschrieben ebenfalls die Isolierung eines intermediär UV-sensitiven CHO-Klons nach Transfektion einer UV-sensitiven CHO-Zelle mit heterologer menschlicher DNA.

3.4.2 UDS

XP-Zellen zeigen den oben erwähnten Ausfall der Fähigkeit zu außerplanmäßiger, d.h. auch außerhalb der S-Phase stattfindender DNA-Synthese (unscheduled DNA-Synthesis, UDS; Rasmussen und Painter 1966, Painter und Cleaver 1969). Am deutlichsten ausgeprägt ist dieser Effekt bei Zellen der XP-Komplementationsgruppe A, die eine Rest-UDS-Aktivität von nur 3% des Wildtyps aufweisen (de Jonge et al. 1983, 1985, Vermeulen et al. 1986, Zwetsloot et al. 1986).

Die Bestimmung der UDS-Aktivität der intermediären Klone nMII5a-k war daher ein wichtiges Kriterium bei der Beurteilung der phänotypischen Komplementation. In mehreren Experimenten wurde die UDS für die Klone nMII5b und 5e sowie die Rezipientenzelle XP12ROtk-1 und die Wildtyp-Kontroll-Zelllinie GM0637 bestimmt (vgl. Abb.6). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Zellen	Silberkörner pro Zellkern ^a			UDS-Rate ^b
	unbestrahlt	bestrahlt	UDS	
GMO637 ^c	5.9	>>100	>>100	1.0
GMO637 ^d	7.1	60.9	53.8	1.0
XP12ROtk ^{-1d}	6.2	11.5	5.3	0.03
nMII5b ^d	8.4	68.2	59.8	0.34
nMII5e ^d	14.7	67.4	52.4	0.30

Tabelle 5: Bestimmung der UDS-Aktivität der Intermediärklone nMII5b und 5e.

^a Die angegebenen Werte sind das Mittel aus 50-100 ausgezählten Zellkernen, die sich nicht in der S-Phase befanden.

^b Da die UDS-Rate der Wildtypzellen nicht exakt quantifiziert werden konnte, ist der Wert für XP12RO der Literatur entnommen (de Jonge et al. 1983); die Intermediärklone darauf bezogen.

^c Die Markierung der Zellen erfolgte mit ³H-Thymidin.

^d Die Markierung der Zellen erfolgte mit ³H-Cytidin.

Zur Auswertung der UDS-Versuche wurden nur Zellen herangezogen, die nicht in der S-Phase waren (S-Phase-Kerne waren naturgemäß sehr stark markiert, vgl. Abb.6). Schwierigkeiten ergaben sich, wenn sich Zellen während der zweistündigen Markierungsphase in der beginnenden oder zu Ende gehenden S-Phase befanden und dadurch UDS-ähnlich markiert wurden. Um diese Schwierigkeit statistisch auszuschalten, wurden in jedem Präparat mindestens 100 Nicht-S-Phase-Kerne ausgezählt. Wichtig für die Beurteilung der Intermediärklone war weiter, daß es in keinem bestrahlten Präparat unmarkierte Zellkerne gab (vgl. Abb.6), d.h. alle nMII5-Zellen qualitativ UDS-positiv waren.

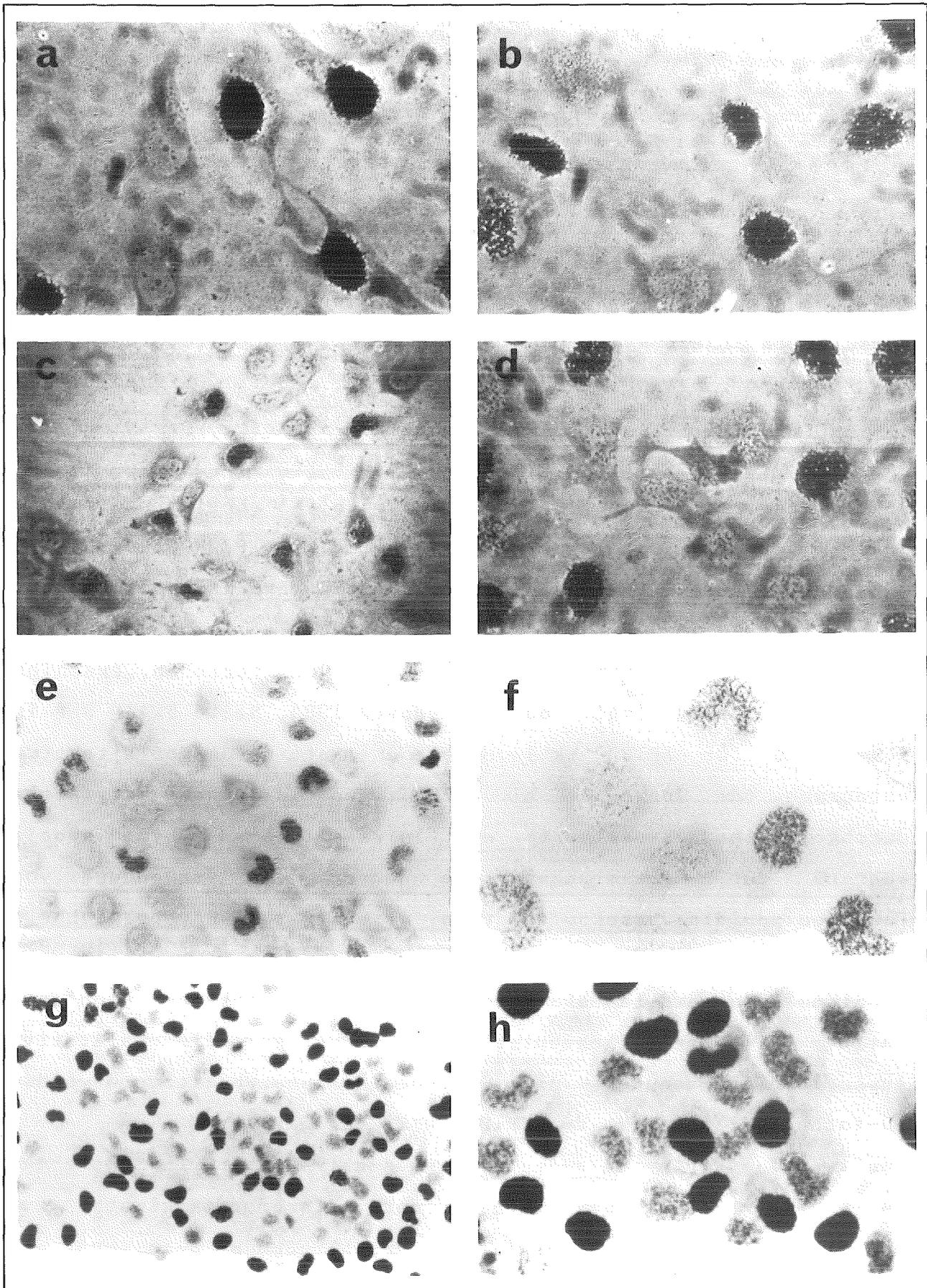


Abbildung 6: Bestimmung der außerplanmäßigen DNA-Synthese (UDS).

Zur Bestimmung der UDS wurden die Zellen für 2 Tage auf sterilen Deckgläschen kultiviert, mit UV bestrahlt (Dosis 15 J/m^2) und für 2 Stunden mit radioaktiv markierten Nukleotiden inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit Kodak XAR10-stripping film für 3 - 10 Tage bei 4°C autoradiographiert. Nach Entwickeln und Fixieren wurden die Präparate mit Giemsa gefärbt.

a. nMII5e unbestrahlt (400x), b. nMII5e bestrahlt (400x), c. XP12RO tk⁻¹ bestrahlt (160x), d. nMII5b bestrahlt (400x), e. GM0637 bestrahlt (160x), f. GM0637 bestrahlt (400x), g. GM0637 bestrahlt (160x), h. GM0637 bestrahlt (400x).
a-f: radioaktive Markierung mit (³H)-Cytidin, g+h: radioaktive Markierung mit (³H)-Thymidin.

Die quantitative Bestimmung der UDS-Rate gestaltete sich schwieriger. Wie Tabelle 4 und Abbildung 6 zu entnehmen ist, zeigten die Wildtyp-Kontrollzellen GM0637, je nach Art des verwendeten radioaktiven Nukleotids, ganz unterschiedlich starke Markierungen nach UV-Bestrahlung. Der Einbau von Tritium-markiertem Thymidin war wesentlich stärker als der von ^3H -Cytidin, obwohl die Versuchsbedingungen identisch waren. Dieses Resultat spricht für stark unterschiedliche intrazelluläre Nukleotid-Pools. Die gemessenen UDS-Werte der XP12RO tk⁻¹-Zellen und der Intermediärklone, die aufgrund ihrer tk⁻-Eigenschaft nicht mit ^3H -Thymidin markiert werden konnten, einfach auf die mit ^3H -Cytidin bestimmten GM0637-Werte zu beziehen, erschien daher unzulässig (vgl. auch Friedberg 1984, Seite 514). Der in Tabelle 5 für XP12RO tk⁻¹ angegebene Wert wurde der Literatur entnommen (de Jonge et al. 1981), wo in einem sorgfältig durchgeführten Experiment die intrazellulären Thymidinpools während der Markierungsperiode durch die Verwendung von Fluorodeoxyuridin erschöpft wurden, um einigermaßen vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten. Da aufgrund der geschilderten Probleme die exakte UDS-Rate der Intermediärklone nicht mit letzter Sicherheit behauptet werden kann, soll die qualitative Aussage hier genügen: die Intermediärklone besitzen etwa die 10-fache UDS-Aktivität der XP12ROtk⁻¹-Zelllinie.

Jan Hoeijmakers an der Erasmus-Universität in Rotterdam verwendete Proteinextrakte der Intermediärklone zur Mikroinjektion von XP-Zellen und anschließender Bestimmung der UDS. Dabei konnte ebenfalls UDS-Aktivität auf niedrigem, aber signifikantem Niveau gemessen werden (J.H., pers. Mitteilung). Dieses relativ niedrige UDS-Niveau kann verschiedene Ursachen

haben. In der Literatur wurden für Nagerzellen generell niedrigere UDS-Aktivitäten berichtet (Fox und Fox 1973, Peleg et al. 1976, Yagi 1982, Hori et al. 1983, Yagi et al. 1984, Westerveld et al. 1984, Vijg et al. 1984). Der Grund könnte auch in der heterologen Natur der zur Transfektion verwendeten Donor-DNA zu suchen sein (heterologe Enzyme arbeiten an menschlichem Chromatin u.U. weniger effizient).

3.4.3 Molekulare Charakterisierung

Die DNA der Intermediärklone wurde mittels Nukleinsäurehybridisierung analysiert. In Southern-Blot Experimenten wurden zunächst die transfizierten Markergene und die Mausequenzen nachgewiesen. Die Autoradiogramme dieser ersten Analysen, in denen alle DNA's mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut wurden, sind in Abbildung 7 dargestellt. Abb. 7a zeigt die Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten Markerplasmid pSV2-neo. Die DNA der Rezipientenzelle XP12RO tk-1 (Spur 4) reagierte nicht mit den Plasmidsequenzen, während die Klone nMII5b und 5g in den Spuren 5 und 6 jeweils dasselbe Hybridisierungsmuster ergaben. Die drei Hauptbanden, die in der Signalintensität jeweils einer Kopie des neo-Gens entsprachen, wiesen Fragmentlängen von 6.4, 5.8 und 5.2 kb auf (als Standard waren in den Spuren 1-3 das mit dem Enzym EcoRI linearisierte neo-Plasmid aufgetragen, in Mengen, die 100, 10 bzw. 1 Kopie des Gens entsprachen, bezogen auf die in den übrigen Spuren aufgetragenen 10µg genomischer DNA). Bei längerer Exposition der Autoradiogramme traten außerdem zwei schwächere Banden mit Fragmentgrößen von 4.9 und 4.6 kb auf. Die schwächeren Signale dieser Banden konnten darin begründet sein, daß auf diesen Fragmenten nur kleine Teile der pSV2-neo Sequenzen vorhanden waren, die entsprechend schwächer hybridisierten. Da

von den Hauptbanden nur das 5.8kb-Fragment genau der Größe des linearisierten Plasmids entsprach, mußte es sich bei den 6.4 bzw. 5.2kb Banden um Rearrangements oder Deletionen handeln, vermutlich infolge der Integration in die chromosomale DNA der

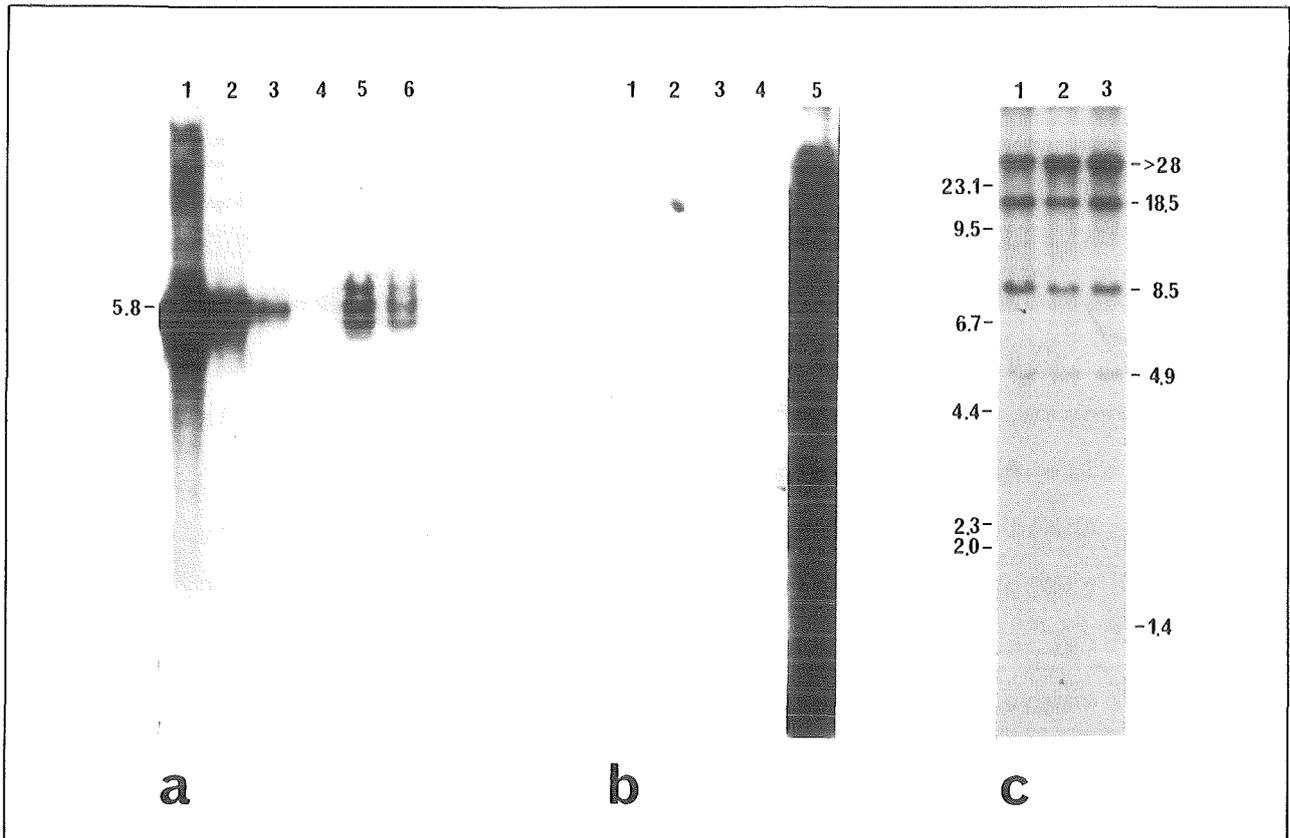


Abbildung 7: Southern-Blot Analyse der DNA der Intermediärklone.

Je 10µg der genomischen DNA's wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut, elektrophoretisch auf 0,8% Agarosegelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Filter transferiert und hybridisiert.

a. Hybridisierungsprobe: pSV2-neo; Spur 1-3: Standards des Plasmids pSV2-neo, die 100, 10 bzw. 1 Genkopie entsprechen, bezogen auf 10µg genomische DNA.

b. Hybridisierungsprobe: Maus B2-repeat; Spur 1: XP12RO tk⁻¹, Spur 2: nMII5b, Spur 3: nMII5e, Spur 4: nMII5h, Spur 5: Ltk⁻.

c. Hybridisierungsprobe: Ltk⁻; Spur 1: nMII5b, Spur 2: nMII5e, Spur 3: nMII5h.

Rezipientenzelle. Zum Nachweis der transfizierten Maus-Sequenzen wurde zunächst ein kloniertes hochrepetitives Maus-DNA-Element, das sog. B2-Repeat verwendet (Kramerov 1979, Krayev 1980, Singer 1982, Singer und Skowronski 1985), das über das gesamte Maus-Genom verstreut vorliegt und statistisch alle 12 kb vorkommt. In Abb.7b erkennt man, daß überhaupt keine Hybridisierung mit der DNA der Intermediärklone stattfand (Spur 2-4), während die Reaktion mit einer zur Kontrolle aufgetragenen Maus-DNA (Spur 5) positiv war.

Um sicherzustellen, daß die Klone in der Transfektion außer den Markersequenzen auch Maus-DNA aufgenommen hatten, wurde in einem weiteren Southern-Experiment (Abb.7c) mit radioaktiver genomischer Maus-DNA hybridisiert, die vor der Markierung durch Ultraschallbehandlung auf Fragmentlängen von durchschnittlich 400 bp geschert worden war. Jetzt reagierten die nMII5-Klone deutlich: alle drei hier untersuchten DNA's (Spur 1-3) zeigten dasselbe Bandenmuster, bestehend aus 5 Signalen, die Fragmentlängen von >28, 18.5, 8.5, 4.9 und 1.4 kb entsprachen. Die XP-Rezipientenzelle hybridisierte unter den gewählten Bedingungen nicht mit der Maus-Probe (nicht gezeigt), da die Reaktion nur auf Cot-Werte von 1-3 ($Mol \times s/l$) durchgeführt wurde, so daß nur hochrepetitive Sequenzen reassoziieren konnten; Kreuzreaktionen von homologen singulären Sequenzen von Mensch

und Maus treten erst bei Cot-Werten von ca. 10^3 (Mol x s/l) auf (Wetmur und Davidson 1968, Britten und Kohne 1968).

Da, wie schon in der neo-Hybridisierung, alle Intermediärklone wiederum das identische Bandenmuster erzeugten, bestätigte sich die Vermutung, daß sie alle von derselben Ausgangszelle abstammten. Sie werden daher fortan als ein Klon, nMII5, mit den Subklonen 5a-5k angesprochen.

Bei dem 4.9kb-Fragment, das in beiden Hybridisierungen reagierte, handelte es sich vielleicht um die Nahtstelle zwischen Marker- und Maus-Sequenzen. Die Gesamtmenge der transfizierten Maus-DNA war mit etwas über 60 kb allerdings erheblich niedriger als die erwarteten 1000kb (die genaue Quantifizierung war aufgrund der Bande im hochmolekularen Bereich nicht möglich).

In einem weiteren Southern-Blot-Experiment wurde die DNA des Intermediärklons mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und erneut mit genomischer Maus-DNA hybridisiert (Abb.8). Erstaunlicherweise wurde, neben verschiedenen kleinen Fragmenten, in allen Fällen wiederum eine sehr hochmolekulare Bande erhalten, deren Größe über 23kb lag. Diese trat selbst bei Verwendung von Enzymen wie Sau3A, HaeIII und HinfI auf, deren Erkennungssequenzen aus nur 4 (Sau3A, HaeIII) bzw. 5 (HinfI) Basenpaaren besteht, und die daher statistisch sehr viel häufiger

schneiden als die Enzyme mit 6er-Sequenzen wie EcoRI, BglII, HindIII und PvuII (zum Vergleich die Zahl der Schnittstellen in

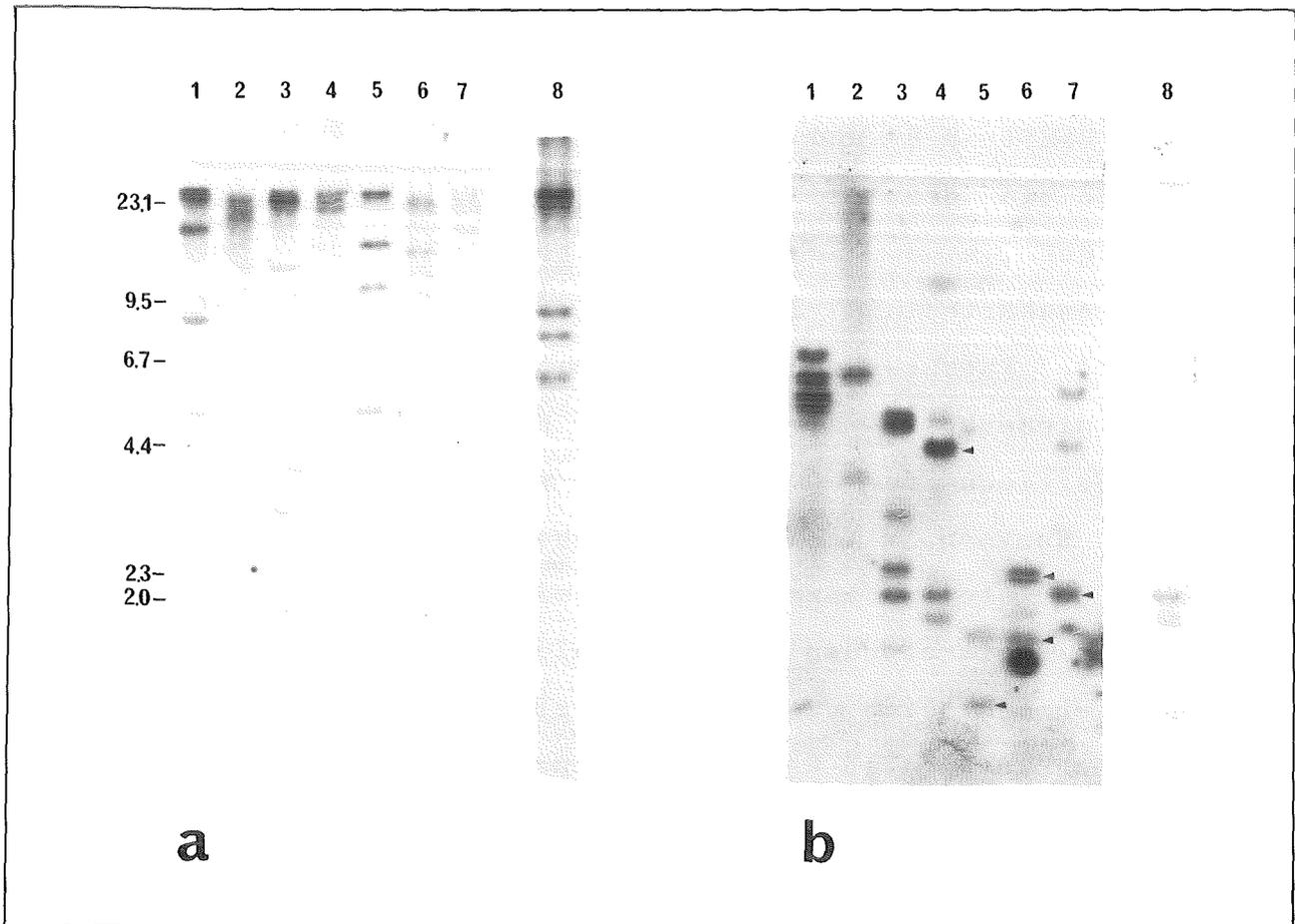


Abbildung 8: Southern-Blot Analyse des Intermediärklons nMII5b.

Je 10µg DNA wurden mit den unten genannten Restriktionsenzymen verdaut, auf 0,6% Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter transferiert und hybridisiert.

Verwendete Enzyme: 1 EcoRI, 2 BglII, 3 HindIII, 4 PvuII, 5 HaeIII, 6 HinfI, 7 HpaII, 8 Sau3A.

a. Hybridisierungsprobe Ltk⁻-DNA; b. Rehybridisierung des Filters mit pSV2-neo: die Pfeile in den Spuren 4-7 markieren die für pSV2-neo indikativen Fragmente (PvuII 4.1 kb, HaeIII 1.13 kb, HinfI 2.8 und 1.62 kb, HpaII 2.0 kb).

der 48.5 kb großen λ -DNA: EcoRI 5, HindIII 6, BglII 6, PvuII 15, Sau3A 116, HinfI 148, HaeIII 149). Diese Beobachtung ist nicht auf eine unvollständige Enzymreaktion zurückzuführen, da bei Rehybridisierung des Filters mit dem pSV2-neo Plasmid die jeweils indikativen Fragmente erhalten wurden (PvuII 4.1kb, HaeIII 1.13kb, HinfI 2.8 und 1.62kb, HpaII 2.0kb; keine indikativen Fragmente in den EcoRI, BglII und HindIII Verdau's, da diese Enzyme nur eine Schnittstelle im Plasmid haben; vgl. Restriktionskarten in Jorgensen et al. 1979, Colbere-Garapin et al. 1981). Entsprechende Experimente wurden später mit anderen Enzymen wiederholt, die z.B. nur AT-Sequenzen erkennen (DraI) oder spezifisch für GC-Sequenzen sind (z.B. HhaI), und mit weiteren Enzymen mit 4er-Erkennungssequenz (z.B. AluI). Dabei ergab sich stets dasselbe Bild einer zusätzlich zu kleineren Fragmenten auftretenden hochmolekularen Bande. Als Erklärung bietet sich lediglich das Vorliegen einer repetitiven Sequenz an, die von den getesteten Restriktionsenzymen nicht erkannt wird.

In allen Hybridisierungsexperimenten mit genomischer Maus-DNA wurden relativ starke Signale erhalten, die in ihrer Intensität mit denen der neo-Hybridisierungen vergleichbar waren. Diese Beobachtung legte den Verdacht nahe, daß die Maus-Sequenzen im Intermediärklon nicht singulärer Natur waren, sondern amplifiziert vorlagen. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde ein Southern-Blot Experiment durchgeführt, bei dem neben der DNA des nMII5-Klons in mehreren Spuren die XP-Rezipienten-DNA allein und mit Zumischung verschiedener Anteile Maus-DNA (1%, 0.1%, 0.01%) aufgetragen wurde (Abb.9). Da die Maus-Fragmente in der

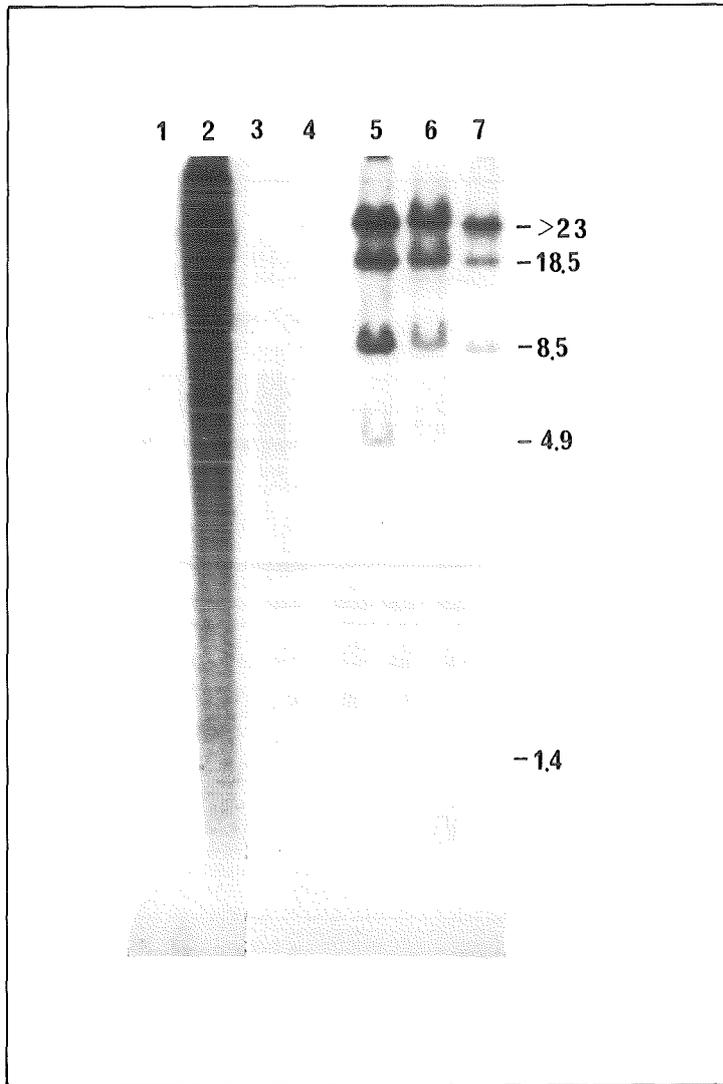


Abbildung 9: Southern-Blot Experiment zur Quantifizierung der Maussequenzen in der DNA des Intermediärklons.

Die DNA's wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit radioaktiv markierter Maus-Ltk⁻DNA hybridisiert.

Spur 1: 7.5µg XP12RO tk⁻1, Spur 2: 7.5µg XPRRO tk⁻1 + 75 ng Ltk⁻.

Spur 3: 7.5µg XP12RO tk⁻1 + 7.5ng Ltk⁻, Spur 4: 7.5µg XP12RO tk⁻ + 0.75ng Ltk⁻

Spur 5: 7.5µg nMII5a, Spur 6: 7.5µg nMII5b, Spur 7: 7.5µg nMII5h.

Summe 60-80kb betragen, sollte sie nur ca. 0.001% der Gesamt-DNA ausmachen. Die in diesem Experiment beobachtete Stärke der jeweiligen Reaktionen signalisierte tatsächlich eine Amplifikation der Mausequenzen.

Zur Quantifizierung dieses Effekts wurde eine DNA-Dot-Blot Analyse durchgeführt. In Abbildung 10 ist deutlich zu erkennen, daß in 0.5µg genomischer nMII5-DNA mehr als 2 ng Maus-DNA enthalten waren, d.h. mehr als 0.1%, die ursprünglich 60-80kb

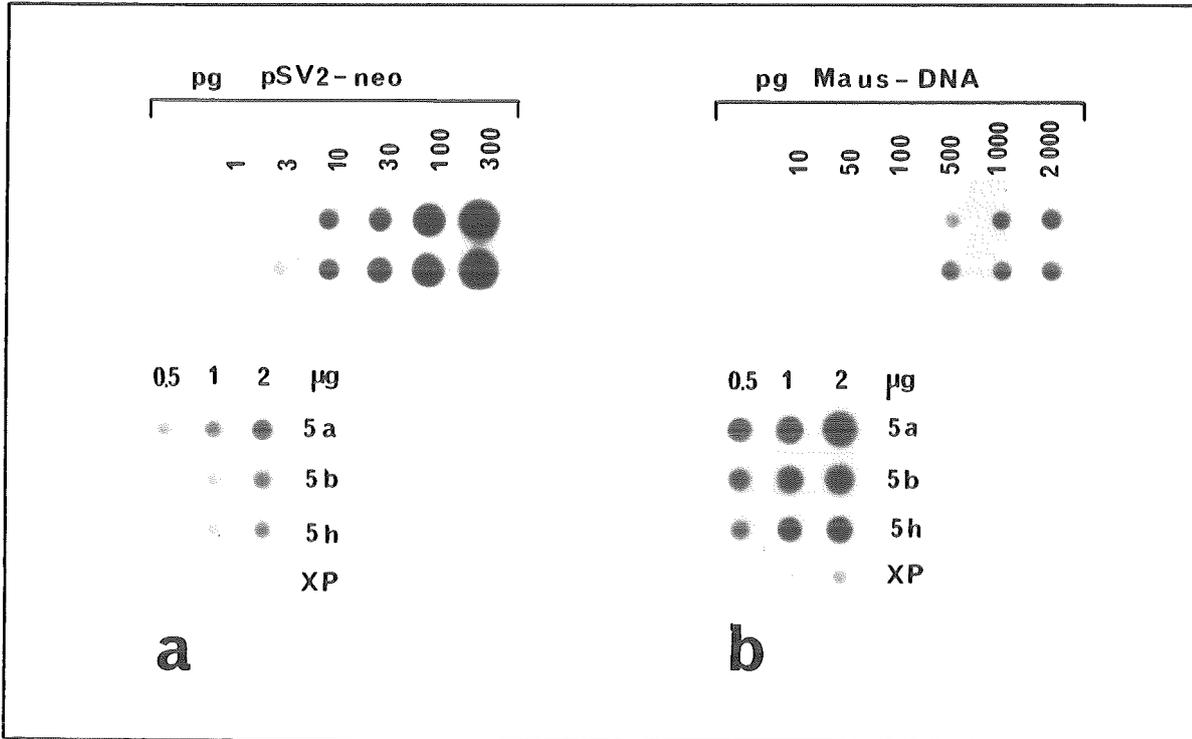


Abbildung 10: DNA-Dot Blot zur Quantifizierung der Mausequenzen im Intermediärklon nMII5.

Die jeweiligen DNA-Mengen wurden nach Denaturierung und Neutralisierung mit Hilfe einer Dot-Blot Apparatur auf ein Nitrocellulosefilter aufgebracht, dieses nach Trocknen und Backen bei 80°C im Vakuum hybridisiert.

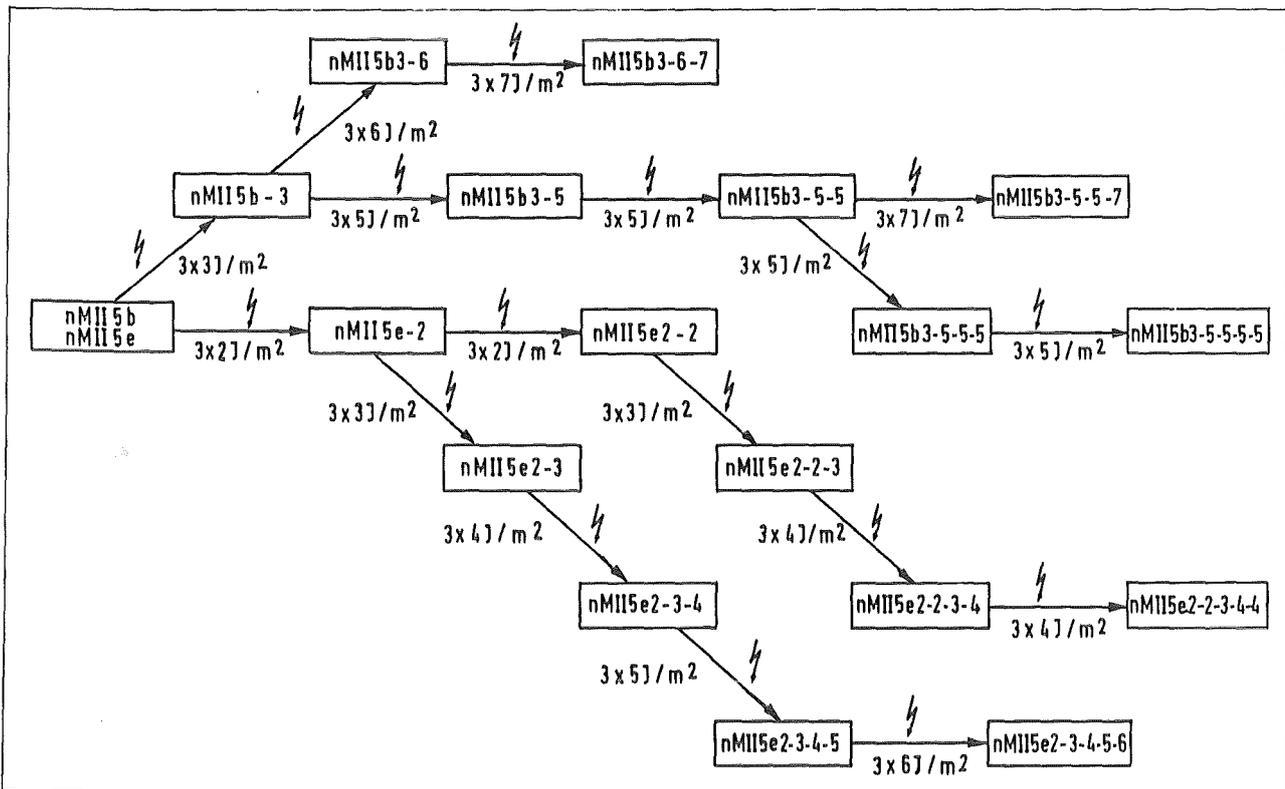
a. Hybridisierungsprobe pSV2-neo. b. Hybridisierungsprobe Maus Ltk⁻-DNA. Im oberen Teil sind die doppelt aufgetragenen Eichkurven dargestellt.

also mehr als 100-fach amplifiziert waren. Die Quantifizierung der neo-Kopien im selben Experiment bestätigte das im Southern-Blot erhaltene Ergebnis von 3-4 Kopien pro Genom. (Zur genauen Auswertung dieser Analysen wurden die Dots ausgeschnitten und im Scintillationszähler gemessen).

3.4.4 Fortgesetzte UV-Bestrahlung des Intermediärklons nMII5

Die Amplifikation der transfizierten Sequenzen, oder zumindest Teile derselben, konnte dadurch verursacht sein, daß die nMII5-Klone durch UV-Bestrahlung selektioniert worden waren. Da UV selbst Genamplifikationsprozesse induziert (Lavi und Etkin 1981, Tlsty et al. 1984, Lücke et al. 1986), bestand die Möglichkeit, daß der intermediäre Phänotyp und der Amplifikationsgrad der Maussequenzen in einem Zusammenhang standen.

In einer Reihe von Experimenten wurde deshalb versucht, durch fortgesetzte UV-Bestrahlung des Intermediärklons den



Amplifikationsgrad der Mausequenzen zu steigern und zu klären, ob ein kausaler Zusammenhang zum Grad der Reversion der UV-Sensitivität bestand.

Die Subklone 5b und 5e wurden nach dem Schema in Abbildung 11 weiteren Bestrahlungszyklen unterzogen, wobei die Zellen je dreimal in 48-stündigen Intervallen mit den angegebenen Dosen bestrahlt, die Überlebenden anschließend in Massenkultur gezüchtet, replatiert und der nächsten Runde von Bestrahlungen unterworfen wurden. Aliquots der Massenkulturen wurden zur Isolierung von DNA verwendet, andere in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Wie Abb.11 zeigt, wurden die UV-Dosen von Zyklus zu Zyklus verändert. Von nMII5e bis nMII5e2-3-4-5-6 wurde die Dosis pro Runde um 1J/m^2 erhöht, von 5e2-2-3-4-4 nach einem moderateren Protokoll; der Subklon 5b wurde gleich mit hohen Dosen bestrahlt, diese über einen langen Zeitraum beibehalten (nMII5b3-5-5-5-5) oder noch mehr gesteigert (nMII5b3-6-7 und nMII5b3-5-5-7). Jede Massenkultur von überlebenden Zellen wurde zur Bestimmung der Überlebensrate nach UV-Bestrahlung mit 4.8J/m^2 verwendet (Tab.6).

Zellpopulation	Überlebensrate (N/N_0)	Zellpopulation	Überlebensrate (N/N_0)
5e	0.0372	5b	0.0218
5e2	0.0582	5b3	0.0324
5e2-3	0.0940	5b3-6	0.1017
5e2-3-4	0.1307	5b3-5	0.0308
5e2-3-4-5	0.1886	5b3-5-5	0.0874
5e2-3-4-5-6	0.0987	5b3-5-5-5	0.0797
5e2-2-3-4-4	0.1128	5b3-5-5-5-5	0.1782

Tabelle 6: Überlebensraten nach UV-Bestrahlung mit 4.8 J/m^2 .

Die Subklone b und e des Intermediärklons nMII5 wurden nach dem in Abb.11 gezeigten Protokoll weiteren Bestrahlungszyklen ausgesetzt, die überlebenden Zellen in Massenkultur gezüchtet und deren Überlebensrate nach einer UV-Dosis von 4.8 J/m^2 bestimmt.

Sie war in allen Fällen besser als die der Ausgangsklone, mit wenigen Ausnahmen von Zyklus zu Zyklus ansteigend, jedoch ohne den Wildtyp (GM0637) zu erreichen. Dasselbe Verhalten zeigten auch die für einige Kulturen aufgenommenen Dosiseffektkurven (Abb.12). Die Analyse des Amplifikationsgrads in Dot-Blot Experimenten (Abb.13) jedoch erbrachte keine Korrelation mit dem Grad der UV-Resistenz. Eine zunächst für beide Subklone beobachtbare Zunahme der Maus-DNA (5b-5b2; 5e-5e2) erwies sich im weiteren Verlauf der Experimente als instabil (vgl. 5e2, 5e2-3, 5e2-3-4). Southern-Blots (nicht gezeigt) derselben

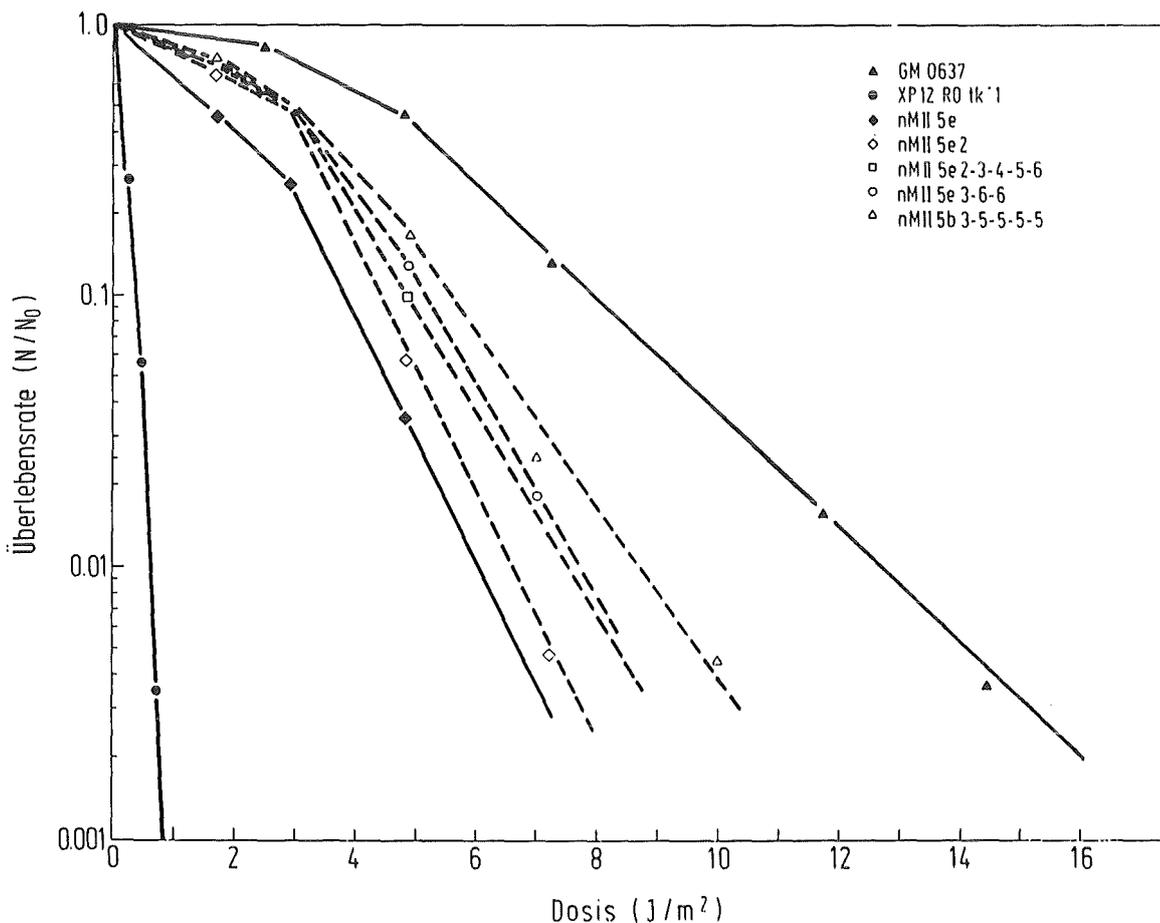


Abbildung 12: Dosiseffektkurven nach UV-Bestrahlung.

Nach 2-tägigem Wachstum wurden die Zellen mit UV bestrahlt, trypsiert, gezählt und mit definierter Zellzahl auf XP-München Feederzellen plattiert. Die nach 14-16 Tagen gewachsenen Kolonien wurden fixiert, gefärbt und gezählt.

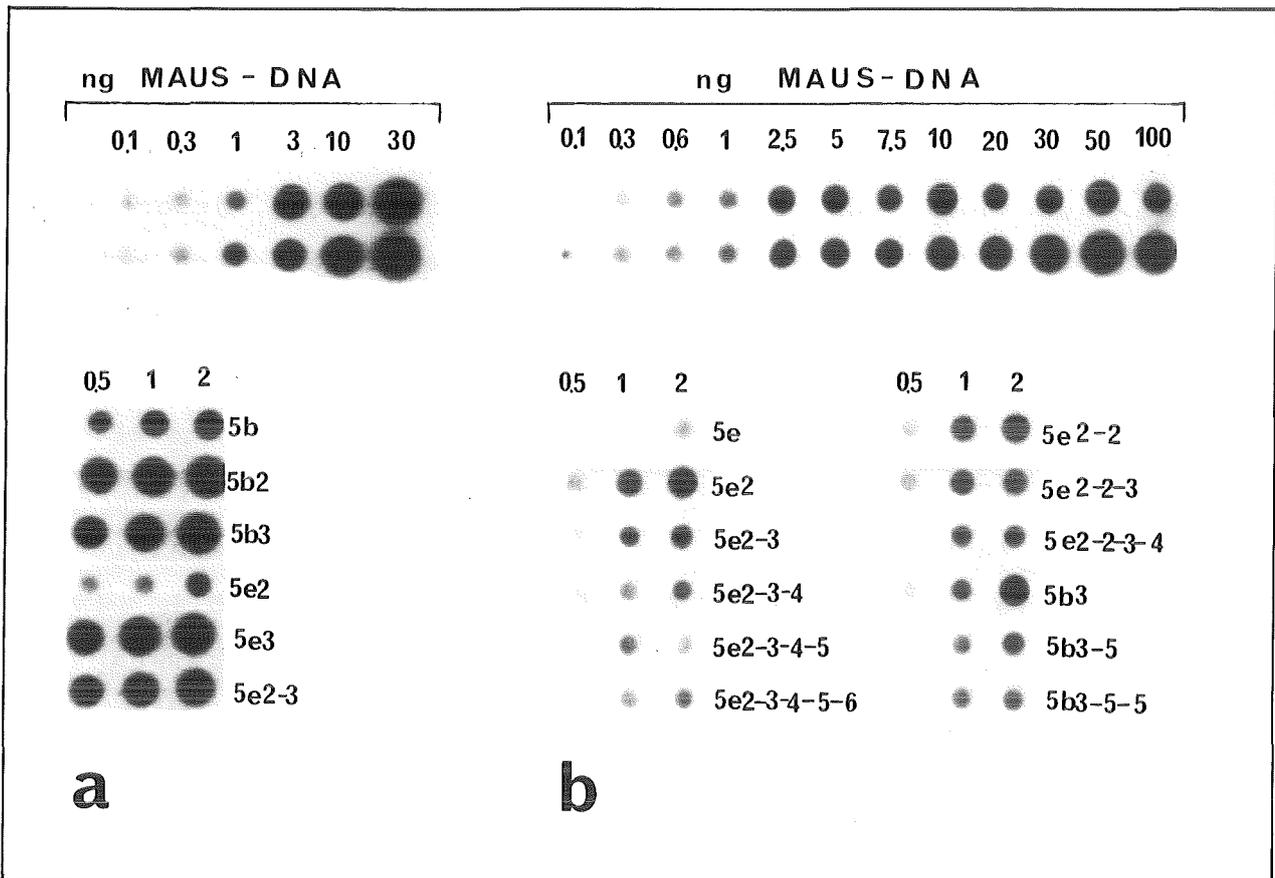


Abbildung 13: DNA Dot-Blot Analyse zur quantitativen Bestimmung der Maussequenzen in den DNA's der fortgesetzten UV-Bestrahlungen ausgesetzten Subklone nMII5b und 5e.

0.5, 1 und 2 μ g der genomischen DNA's wurden nach Denaturierung und Neutralisierung auf Nitrocellulosefilter aufgebracht und mit radioaktiv markierter genomischer Maus-DNA hybridisiert. a und b repräsentieren zwei Experimente. Im oberen Teil der Abbildung sind die mit Maus-DNA aufgenommenen Eichkurven dargestellt.

DNA's ergaben, daß auch in diesen Kulturen dasselbe Bandenmuster nach Hybridisierung mit Maus- und neo-DNA auftrat wie in den Ausgangsklonen.

Obwohl der ursprünglich vermutete Zusammenhang zwischen Amplifikation und UV-Resistenz in diesen Experimenten keine Bestätigung fand, verdient die beobachtete Adaption der Zellen an immer höhere UV-Dosen doch besonderer Erwähnung. Sie könnte z.B. auf einer Amplifikation singulärer transfizierter Maussequenzen

beruhen, die mit der verwendeten genomischen Mausprobe in Southern- und Dot-Blot Experimenten nicht detektiert werden können. Falls das verantwortliche Reparaturgen nicht konstitutiv exprimiert, sondern durch UV induziert wird, könnte eine fortgesetzte Bestrahlung in andauernder Transkription und einer Akkumulation des Genprodukts resultieren, was den adaptiven Effekt ebenfalls erklären könnte.

3.5 Sekundärtransfektionen

Um die Menge an mitgeschleppter DNA zu verringern, wird in der Regel vor Klonierungsversuchen eine zweite Transfektionsrunde durchgeführt, bei der die DNA der Primärtransfektante erneut in die ursprüngliche Rezipientenzelle eingebracht wird (Abb.2). Im vorliegenden Fall war die Menge an transfizierter DNA im Klon nMII5 bereits relativ gering, ein solches Vorgehen also nicht unbedingt erforderlich. Trotzdem wurde der Versuch unternommen, um schnell nachzuweisen, daß der intermediäre Phänotyp nach UV-Bestrahlung durch die Aufnahme der Mausequenzen verursacht war. In 5 Experimenten wurde daher die hochmolekulare DNA des nMII-Klons in die XP12RO tk-1-Zelle transfiziert (Tab.7). Die

Experiment	Zahl der transfizierten Zellen	transfizierte DNA pro 8×10^5 Zellen	Transfektionsereignisse	Transfektionsfrequenz	G418-resistente Klone	UV-resistente Klone
1	3.2×10^7	20µg nMII5 5µg pSV2-neo	1920	0.6×10^{-4}	1920	-
2	4×10^7		19000	3×10^{-4}	19000	-
3	4×10^7	20µg nMII5	7200	1.8×10^{-4a}	-	-
4	4.8×10^7		12000	2.5×10^{-4a}	(1) ^b	-
5	4×10^7		11600	2.9×10^{-4a}	-	-
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>						
Summe 1-5	2×10^8		51820	2.6×10^{-4}		

Tabelle 7: Sekundärtransfektionen

Pro Petrischale wurden jeweils 8×10^5 XP12RO tk-1 Zellen mit den angegebenen DNA's nach der Calciumphosphatmethode transfiziert. Die Selektion erfolgte zunächst für 16 Tage mit G418. Die resistenten Zellen wurden replatiert und in 48-stündigen Intervallen dreimal mit je 2 J/m^2 bestrahlt.

^a Die Transfektionsfrequenz in den Experimenten 3-5 wurde aus parallel mit pSV2-neo und Lachsspermienträger-DNA transfizierten Kulturen berechnet.

^b In diesem Experiment wurde nach 11 Tagen G418-Selektion eine Kolonie aus ca. 20 Zellen beobachtet, die nach weiteren drei Tagen in G418-haltigem Medium abstarb.

ersten beiden Experimente wurden, wie die Primärtransfektion, als Cotransfektionen mit dem neo-Markergen durchgeführt. In der G418-Selektion entstanden 13920 Kolonien, von denen keine die anschließende UV-Selektion überstand. In den weiteren drei Experimenten dieser Serie wurde direkt auf die Expression der drei ins Genom der nMII5-Donor-DNA integrierten neo-Gene selektioniert. Auch hier konnte kein Klon isoliert werden, der das neo-Gen stabil integriert hatte. In Experiment 4 wurde nach 11-tägiger G418-Selektion eine Kolonie, bestehend aus 20 Zellen, beobachtet, die jedoch nach 3 weiteren Tagen abgestorben war, das neo-Gen demnach allenfalls transient exprimiert hatte.

Vor allem die Experimente 3-5 widersprachen völlig den Erwartungen. Da die parallel durch Transfektion mit pSV2-neo ermittelte Transfektionsfrequenz zwischen 1.8 und 2.9×10^{-4} lag, wäre bei einer angenommenen durchschnittlichen DNA-Aufnahme von 1000kb pro Transfektionsereignis, der Größe des menschlichen Genoms ($6.4 \times 10^6\text{kb}$) und der Zahl von 3 neo-Kopien pro Donor-Genom, eine G418-resistente Kolonie pro 2150 Transfektionsereignisse, d.h. pro ca. 9×10^6 transfizierter Zellen zu erwarten gewesen, in den Experimenten 3-5 eine Gesamtzahl von ca. 15. Die einzig denkbare Erklärung für das Scheitern dieser sekundären Transfektionen war eine sehr viel (mindestens um den Faktor 10) schlechtere DNA-Aufnahme pro Transfektionsereignis als die mehrfach in der Literatur reklamierten 1000kb (Wigler et al. 1979b, Pellicer et al. 1980, Robins et al. 1981, Scangos und Ruddle 1981), wofür auch die nur 60kb Maus-DNA und 3 Kopien des neo-Plasmids in der Primärtransfektante sprachen.

3.6 DNA-Aufnahme

Aufgrund der prinzipiellen Bedeutung für alle Gentransferexperimente wurde in einer umfangreichen Versuchsreihe analysiert, wieviel DNA durch Transfektion stabil in das Genom verschiedener transformierter menschlicher und Nagerzelllinien integriert werden kann.

Zunächst wurde in zwei Dot-Blot-Experimenten die Anzahl der neo-Kopien in einer Reihe G418-resistenter Klone verschiedener Zelllinien analysiert (Abb.14). Diese stammten aus verschiedenen Transfektionen, in denen pSV2-neo in 2-3fachem molarem Überschuß

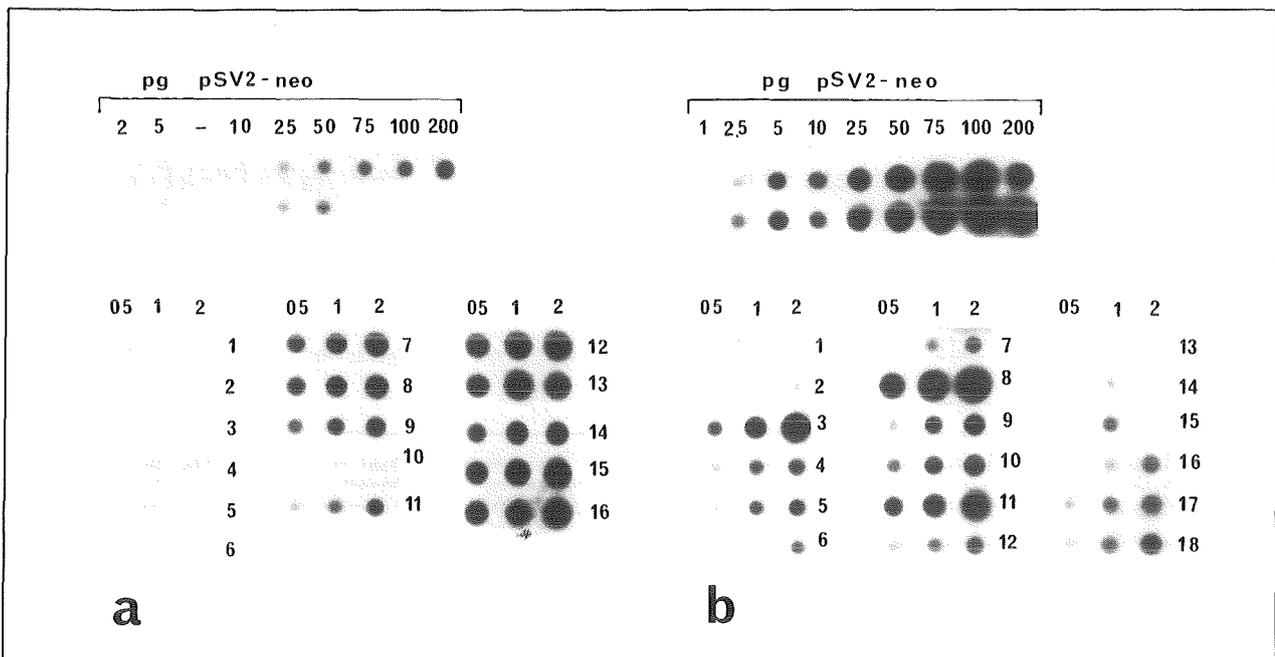


Abbildung 14: DNA Dot-Blot Analyse zur quantitativen Bestimmung der neo-Kopienzahl in G418-resistenten Klonen verschiedener Zelllinien.

Die DNA's wurden denaturiert und neutralisiert und, auf Nitrocellulosefilter aufgetragen, mit radioaktiv markiertem pSV2-neo hybridisiert.

- a. 1-5: XP12RO tk⁻¹-neo-Klone, 6: XP12RO tk⁻¹-Rezipientenzelle;
 7-9+11: CHO-xrs2 neo-Klone, 10: CHO-xrs2 Rezipientenzelle;
 12-16: AT5BIVA neo-Klone
- b. 1: XP12RO tk⁻¹ Rezipientenzelle, 2-6: XP12RO tk⁻¹ neo-Klone;
 7: GM0637 Rezipientenzelle, 8-12: GM0637 neo-Klone;
 13: MCF-7 Rezipientenzelle, 14-18: MCF-7 neo-Klone.

mit Lachsspermien-Träger-DNA cotransfiziert worden war. Zur Quantifizierung der neo-Kopien wurde die Radioaktivität der einzelnen Hybridisierungssignale gemessen und aus den Eichgeraden die Zahl der integrierten neo-Kopien ermittelt. Dabei ergaben sich deutliche Hinweise auf eine nicht unerhebliche Varianz von Klon zu Klon und von Zelllinie zu Zelllinie. CHO-xrs 2 Zellen hatten demnach 15-60, AT5BIVA sogar 50 bis über 100 Kopien pro diploidem Genom aufgenommen; demgegenüber wiesen GM0637 nur 1-5, MCF-7- und XP12RO-Zellen durchschnittlich lediglich eine Genkopie auf.

Da in erster Linie die DNA-Aufnahme von XP-Zellen interessierte und hier insbesondere das Schicksal von hochmolekularer DNA, für deren Präsenz in den ersten 2-3 Wochen nach der Transfektion kein Selektionsdruck ausgeübt wird, wurden die für die genomischen Transfektionen verwendeten Bedingungen durch den Cotransfer von λ -Wildtyp DNA (Größe 48.5kb) und pSV2-neo simuliert (vgl.Tab.8).

Transfizierte DNA pro 8×10^5 Zellen	Selektion	Zelllinie	Zahl der transfizierten Zellen	Transfektionsfrequenz	Zahl der analysierten Massenkulturen	Einzelklone	Wachstum von Klonen im zunächst nicht verwendeten Selektionsmedium
I 20 μ g λ -DNA 5 μ g pSV2-neo	G418	XP12RO	2.4×10^6	2.6×10^{-4}	3	6	
		GM0637	2.4×10^6	7.1×10^{-4}	3	5	
		NIH3T3	1.5×10^6	1.2×10^{-3}	1	3	
II 20 μ g λ -DNA 250ng pSV2-neo 5 μ g pSV3-gptH	G418	XP12RO	2.4×10^6	1.3×10^{-6}	-	4	0/4
		GM0637	2.4×10^6	2.1×10^{-6}	1	4	3/4
		NIH3T3	1.5×10^6	1.7×10^{-4}	1	5	4/5
	MAX	XP12RO	8×10^5	7×10^{-5}	-	5	0/5
		GM0637	8×10^5	1.9×10^{-4}	1	1	0/1
	G418+MAX	XP12RO	8×10^5	$<1.2 \times 10^{-6}$	-	-	
GM0637		8×10^5	3.7×10^{-6}	-	2		
III 20 μ g Kalbsthymus-Träger-DNA 5 μ g pSV2-neo	G418	XP12RO	8×10^5	7×10^{-4}	1	5	
		GM0637	8×10^5	1×10^{-3}	1	5	

Tabelle 8: Transfektionsexperimente zur Bestimmung der DNA-Aufnahme.

Die Verwendung von λ -DNA ermöglichte eine exakte Quantifizierung der aufgenommenen DNA-Menge, da für Southern-Blot Analysen die homologe Hybridisierungsprobe verwendet werden konnte. Nach Transfektion von genomischer Maus-DNA war, aus den oben genannten Gründen, stets nur der Nachweis von repetitiven DNA-Elementen möglich.

Teil I des Experiments war genauso angelegt wie die genomischen Transfektionen; pro 8×10^5 Zellen wurden $20 \mu\text{g}$ λ -DNA und $5 \mu\text{g}$ pSV2-neo cotransfiziert. Im zweiten Teil (II) wurden nur 250ng pSV2-neo eingesetzt, dafür zusätzlich $5 \mu\text{g}$ pSV3gptH; selektioniert wurde mit G418, mit Mycophenolsäure und Aminopterin oder mit beiden Systemen gleichzeitig. Dadurch sollte geklärt werden, ob das zweite selektionierbare Gen auch ohne Selektionsdruck intakt transferiert wurde bzw. welchen Einfluß die unterschiedlichen molaren Verhältnisse der transfizierten DNA's auf die Integration der verschiedenen Komponenten (hochmolekulare DNA, Markerplasmide) ausübten. In Teil III des Versuches wurde als Träger Kalbsthymus-DNA eingesetzt, die eine durchschnittliche Fragmentlänge von ca. 15kb aufwies. Sie erzielte ein weit feineres und homogeneres Calciumphosphat-Copräzipitat als die hochmolekulare λ -DNA und die Donor-DNA's in den genomischen Transfektionen. Dieser Ansatz sollte zeigen, ob die Morphologie des Präzipitats Auswirkungen auf die Transfektionsfrequenz oder die DNA-Aufnahme hatte.

Um einen möglichen Zusammenhang von DNA-Aufnahme-Charakteristik und Reparaturdefekt der XP-Zellen zu klären, wurde parallel die Wildtypzelle GM0637 untersucht. Die in einem Teil der Experimente mittransfizierten NIH3T3-Zellen dienten als Kontrolle, da sie als gute Rezipienten für DNA-Transferexperimente gelten. Insgesamt

wurden 45 Einzelklone isoliert und analysiert, außerdem 12 Massenkulturen, die aus jeweils 30-300 Einzelklonen bestanden. Betrachtet man zunächst die Transfektionsfrequenzen, so stimmen diese weitgehend mit den in anderen Experimenten erzielten Werten und den Angaben in der Literatur überein (vgl. Tab.1). Auffallend sind die durchweg höheren Frequenzen bei Verwendung der Kalbsthymus-Träger-DNA; die Signifikanz dieser Beobachtung kann jedoch aufgrund der Schwankungsbreite von Experiment zu Experiment nicht reklamiert werden.

Die funktionelle Intaktheit des in Teil II mittransfizierten zweiten Markergens wurde überprüft, indem die resistenten Klone nach der ersten Selektion dem jeweils anderen System unterworfen wurden (vgl. letzte Spalte in Tab.8). Keiner der zunächst auf die Expression des gpt-Gens selektierten Klone, die mit einem 20-fachen molaren Unterschub pSV2-neo cotransfiziert waren, wuchsen dabei in G418-haltigem Medium. Im umgekehrten Fall der mit 20-fachem gpt-Überschub ausgestatteten, zunächst mit G418 selektierten Klone schafften dies 3 von 4 GM- und 4 von 5 NIH3T3-Klonen, jedoch keiner der untersuchten 4 XP-Klone. Bei gleichzeitiger Selektion auf die Expression beider Markergene wuchsen nur im Fall von GM0637 zwei Klone.

Alle 57 isolierten DNAs (vgl. Tab.8) wurden in Southern-Blot Experimenten auf die Präsenz von λ - und Markersequenzen analysiert. Repräsentative Beispiele sind in Abbildung 15 gezeigt. Mit ca. 10 Kopien pSV2-neo und 5 Kopien des λ -Genoms hatten die NIH3T3-Zellen die meiste DNA aufgenommen, ungefähr 300kb pro Transfektionsereignis (Abb.15, r+s). XP- und GM-Zellen unterschieden sich in bezug auf die integrierten neo-Gene nur wenig (Abb.15a); beide hatten durchschnittlich nur 1 Kopie aufgenommen. Für XP waren die einzigen Ausnahmen die Klone Id und

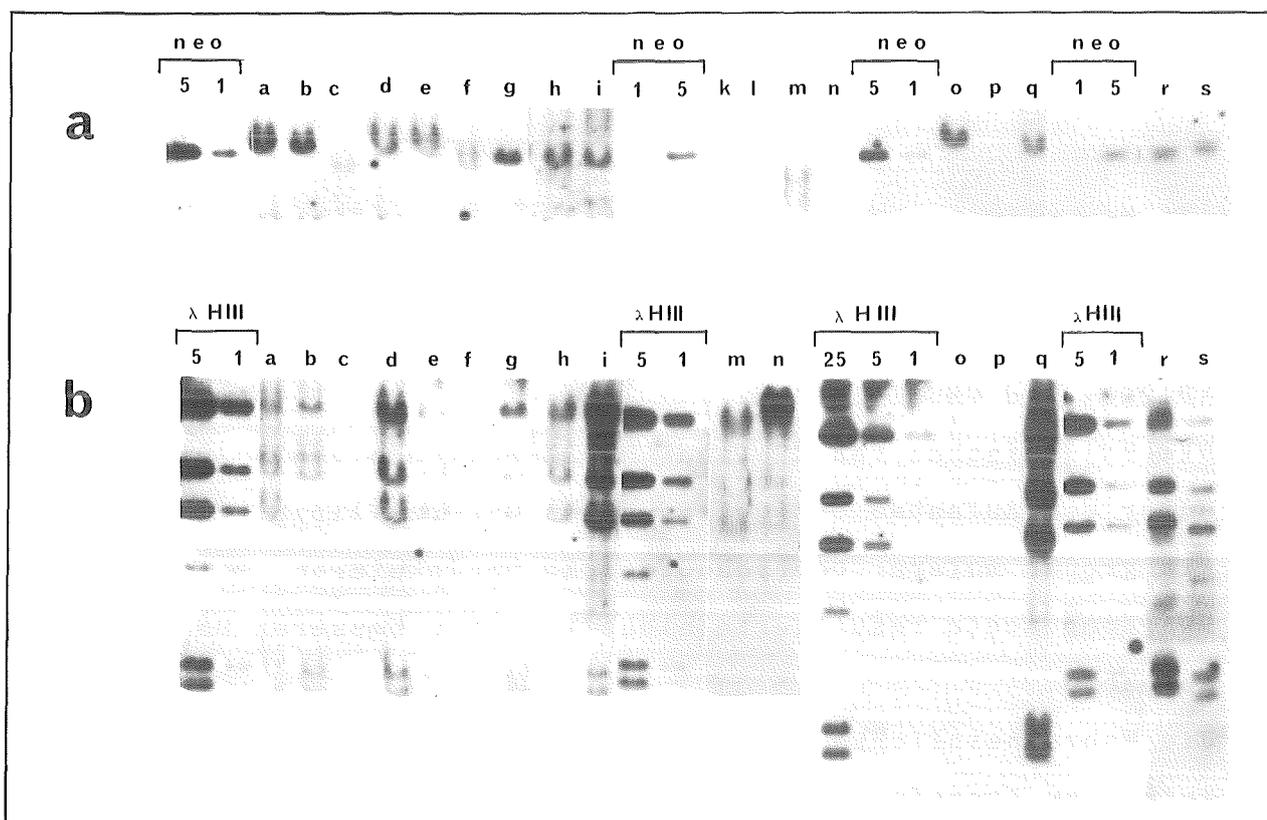


Abbildung 15: Southern-Blot Experimente zur Bestimmung der DNA-Aufnahme nach Transfektion in XP12RO-Zellen.

Je 10µg der genomischen DNA's wurden mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut, elektrophoretisch auf 0.8% Agarosegelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosefilter transferiert.

a. Hybridisierungsprobe pSP65-neo; Standards: mit HindIII verdautes pSV2-neo

b. Hybridisierungsprobe λ-DNA; Standards: mit HindIII verdaute λ-DNA

Die Abbildung zeigt die Resultate von 8 Experimenten; die jeweils zugehörigen Standards sind links von den genomischen DNA's zu finden.

a: XP-I₂, b: XP-I_c, c: XP-I_f, d: GM-I₃, e: GM-I_a, f: GM-I_c, g: GM-I_d,

h: XP-I₁, i: GM-I₁, k: XP-III, l: GM-III, m: XP-I₃, n: GM-I₃, o: XP-I_d,

p: XP-I_a, q: XP-I_g, r: NIH3T3-Massenkultur, s: NIH3T3-Einzelklon

Buchstaben-Indices bezeichnen Einzelklone, Zahlen bezeichnen Massenkulturen, römische Zahlen verweisen auf den Ursprung der DNA's (vgl. Tab. 8).

Ig mit 5 bzw. 3 Genkopien (Abb.15, o+q). Klon Id hatte allerdings, wie viele andere XP-Klone auch, keine nachweisbaren λ-Sequenzen (Abb.15b). Nur der Klon XPIg hob sich mit ca. 25 aufgenommenen λ-Kopien hiervon deutlich ab. Bei GM0637 fielen die beiden Massenkulturen I₁ und I₃ auf, die jeweils ca. 5 λ-Genome integriert hatten (Abb.15, i+d). Die GM-Einzelklone (Abb.15, e,f,g) enthielten in ihrer Mehrzahl allerdings nur eine nachweisbare λ-Kopie und unterschieden sich deshalb kaum von den XP-Klonen (Abb.15, b,c,o,p,q).

Die Ergebnisse dieser Versuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Es gab keine signifikanten Unterschiede in der DNA-Aufnahme von XP12RO- und GM637-Zellen.
- Die DNA-Aufnahme von XP- und GM0637-Zellen blieb 5-10fach unter der Aufnahme der untersuchten Nagerzelllinie.
- Ein großer molarer Überschuß der hochmolekularen DNA-Komponente resultierte nicht in einer besseren DNA-Aufnahme.
- Die Wahrscheinlichkeit, ein zweites selektionierbares Gen intakt zu transferieren, stieg mit dessen Konzentration im Transfektionsansatz.
- GM0637-Zellen nahmen zunächst mehr hochmolekulare DNA auf (5 λ -Kopien in den zu einem frühen Zeitpunkt nach der Transfektion isolierten DNA's der Massenkulturen), die jedoch zu einem Großteil ohne Selektionsdruck verloren ging (1 λ -Kopie in den Einzelklonen, deren DNA's erst 3-4 Wochen später isoliert werden konnten).

Abschließend wurde in einem weiteren Experiment untersucht, ob sich die DNA-Aufnahme durch die Transfektion von in Phagenpartikeln verpackte DNA verbessern ließ. Der Hintergrund hierfür war die Idee, daß die DNA normalerweise nach der Aufnahme in die Zellen sofort dem Angriff von DNasen ausgesetzt ist, während die Verpackung in Phagenköpfe einen gewissen Schutz bieten könnte. Für diese Experimente wurde eine λ -cDNA-Bibliothek verwendet, die außerdem die neo-Transkriptionseinheit im Phagen-Genom integriert hatte (Okayama und Berg 1983, 1985). In den Versuchen von Okayama und Berg (1985) hatten Maus L-Zellen

durchschnittlich 10 rekombinante λ -Genome integriert.

Bei den hier durchgeführten drei Transfektionen dienten als Rezipienten XP12RO- und AT5BIVA-Zellen. Die Analyse der DNA von G418-resistenten Klonen, die mit einer Frequenz von nur ca. 10^{-5} auftraten, ergab in den meisten Fällen keine nachweisbare λ -DNA, trotz der kovalenten Verknüpfung von λ - und neo-Sequenzen.

3.7 Klonierung der transfizierten Sequenzen

Die im vorigen Abschnitt dargestellte DNA-Aufnahmecharakteristik von XP12RO-Zellen erklärte das Scheitern sekundärer Transfektionen mit der DNA des Intermediärklons hinreichend. Die ermittelte durchschnittliche Integration von höchstens 50kb erforderte zum erfolgreichen Transfer des menschlichen Genoms (Größe 6.4×10^8 kb) ein Minimum von 128.000 Transfektionsereignissen. Die fünf durchgeführten Experimente (Tab.7) erzielten lediglich etwas mehr als 50.000 Transfektanten. Dennoch erschien es nicht angeraten, weitere sekundäre Transfektionen durchzuführen; die dazu notwendigen Versuchs- Dimensionen waren nicht mehr handhabbar (Transfektion von mehr als 1000 Petrischalen, Steigerung auf die 3-fache Zahl durch Trypsinieren 2 Tage nach der Transfektion).

Der direkte Beweis, daß der Intermediärklon durch die Integration eines Mausgens entstanden war, konnte somit nicht, wie ursprünglich geplant (vgl. Abb.1), durch eine zweite Transfektionsrunde erbracht werden. Die einzige andere Möglichkeit lag in der direkten Reisolierung der transfizierten Sequenzen aus der Primärtransfektante.

3.7.1 Klonierung in den Plasmid-Vektor pUC8

In einem ersten Klonierungsversuch sollte zunächst nur ein kleiner Teil der transfizierten Mausequenzen, nämlich das amplifizierte 4.9 kb große EcoRI-Fragment (vgl. Abb. 7c) rekloniert werden, mit diesem als Hybridisierungsprobe der gesamte transfizierte Bereich. Dazu wurde die nMII5-DNA mit EcoRI verdaut, die 4-6 kb großen Fragmente isoliert und in den Plasmidvektor pUC8 kloniert (Vieira und Messing 1982). Die Transformation von Bakterien resultierte in ca. 10^4 rekombinanten Klonen. Nach Koloniehybridisierung mit radioaktiv markierter genomischer Maus-DNA wurden zwei Klone isoliert, deren DNA's auch in Southern-Experimenten mit der Maus-Probe reagierten. Im reversen Experiment hybridisierten die radioaktiv markierten Klone allerdings nicht mit Maus-DNA, dafür mit XP-DNA. Es handelte sich also um menschliche Sequenzen; die positive Reaktion mit der Maus-Probe in den Koloniehybridisierungen mußte auf unspezifischen Kreuzhomologien beruhen.

3.7.2 Klonierung in den λ -Phagenvektor λ EMBL3

Die oben geschilderten Experimente deuteten auf erhebliche Schwierigkeiten bei der Identifizierung von Maus-DNA vor dem Hintergrund des XP-Rezipientengenoms. Die Klonierung konnte, mit allerdings größerem Aufwand, auch bei der Reisolierung der Markergene ansetzen, da hierfür mit dem Plasmid pSV2-neo eine homologe Probe zur Verfügung stand. Da transfizierte Sequenzen intrazellulär zu sogenannten 'Transgenomen' ligiert (Ruddle 1979, 1980, Perucho et al. 1980, Scangos et al. 1981, Scangos und Ruddle 1981) und erst diese in die chromosomale DNA integriert werden (Robins et al. 1981), sollte - ausgehend von den

reklonierten Markergenen - durch Isolierung überlappender Klone (Chromosome-Walk) die Klonierung des gesamten transfizierten Bereichs möglich sein. Im zweiten Anlauf wurde deshalb eine Genbibliothek aus der Gesamt-DNA des Intermediärklons konstruiert.

Für die Konstruktion der Genbank wurde der Phagen-Vektor λ EMBL3 verwendet (Frischauf et al. 1983) (Abb.1). Er konnte Insertionen von 9-23kb aufnehmen und bot den Vorteil einer zweifachen Selektion gegen nichtrekombinante Phagen. Während der Präparation der Vektorarme blieben nach dem Doppelverdau mit EcoRI und BamHI (vgl. Abb.1) bei der anschließenden Isopropanolfällung die zwei kleinen Fragmente aus den Polylinkern im Überstand, so daß es bei der Ligation der Arme mit der Insert-DNA zu keiner Rekonstituierung der Ausgangsphagen kommen konnte. Das zweite, genetische Selektionsverfahren bedient sich des spi-Phänotyps (Murray und Murray 1975, Loenen und Brammer 1980, Karn et al. 1980). λ Wildtyp-Phagen sind spi⁺ (susceptibel to P2 inhibition), und wachsen nicht auf Bakterienwirten, die den Phagen P2 lysogen tragen. Rekombinante λ EMBL3-Phagen hingegen sind durch den Verlust des sogenannten 'stuffer'-Fragments, auf dem die Gene gam und red lokalisiert sind und das keine für den Phagen unabdingbare Funktionen trägt, spi⁻, und wachsen auf P2-Lysogenen wie dem E.coli Stamm NM539.

Die Genbank aus der partiell mit dem Restriktionsenzym Sau3A verdauten DNA des Intermediärklones wurde wie unter 2.12 beschrieben hergestellt. Sie bestand aus 5 Fraktionen, die aus verschiedenen Ligationen herrührten. Insgesamt waren 3.5×10^6 rekombinante Phagen entstanden, was bei einer angenommenen durchschnittlichen Insertionsgröße von 15kb einer klonierten

DNA-Menge von 5.25×10^7 kb und damit der 9-fachen Größe des diploiden menschlichen Genoms (6.4×10^6 kb) entsprach. Die Zahl der rekombinanten Klone 'N', die notwendig ist, um ein bestimmtes Gen mit der Wahrscheinlichkeit 'P' in einer Genbank zu repräsentieren, ergibt sich nach der Formel von Clarke und Carbon (1975) zu

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$$
, wobei f der Quotient aus der durchschnittlichen Insertionsgröße und der Genomgröße ist. Für die Bank des Intermediärklons errechnete sich N bei einer gewünschten Wahrscheinlichkeit von 99% zu 1.96×10^6 , womit das Genom ca. 2-fach repräsentiert war.

3.7.3 Reisolierung der transfizierten Sequenzen

In einer ersten Hybridisierungsrunde wurde die λ EMBL3 Genbank mit einer radioaktiv markierten neo-Probe hybridisiert. Das pSV2-neo Plasmid konnte aufgrund der darauf befindlichen SV40-Sequenzen nicht verwendet werden; es bestand die Gefahr von Kreuzhybridisierungen mit den SV40-Sequenzen der XP12ROtk-1-Zelllinie. Stattdessen wurde das Plasmid pSP65-neo eingesetzt, das Ludger Klein-Hitpaß in unserem Labor konstruiert hat, und bei dem das 320 bp HindIII-BglIII-Fragment aus dem neo-Gen (vgl. Jorgensen et al. 1979) in den pSP65-Vektor (Melton et al. 1984, Schenborn und Mierendorf 1985) kloniert ist. Die Hybridisierung von ca. 1.2×10^6 rekombinanten Phagen mit dieser Probe ergab 9 Signale (n1-n9), von denen nach zweimaliger Rehybridisierung drei (n24, n31, n51) als Einzelplaques isoliert werden konnten (vgl. Abb.16).

Dieselben Filter wurden anschließend mit einer radioaktiv markierten genomischen Mausprobe hybridisiert. Obwohl aufgrund der unspezifischen Probe erheblich stärkere Hintergrundhybridisierungen auftraten (Abb.16), konnten 7 Signale

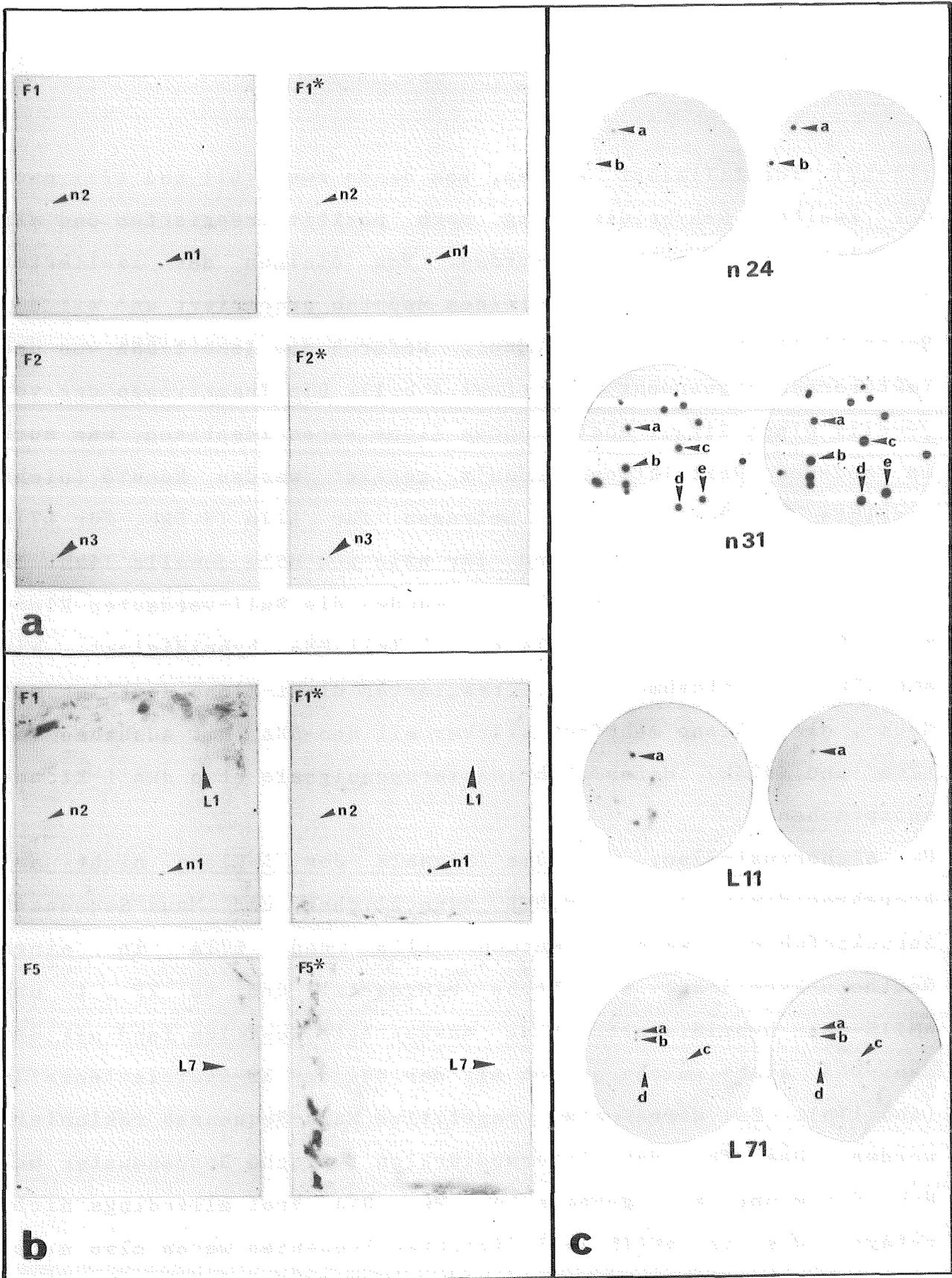


Abbildung 16: Plaquehybridisierung der λEMBL3 Genbank.

Auf 22 x 22 cm große TB-Agarplatten wurden jeweils 150.000 rekombinante Phagen platiert, von jeder Platte zwei Nitrocellulose-Filterabzüge präpariert. Diese wurden zunächst mit dem radioaktiv markierten pSP65-neo Plasmid hybridisiert (a), in einem zweiten Ansatz mit genomischer Maus-DNA (b). Gezeigt sind die Autoradiogramme der jeweils korrespondierenden Filter. Hybridisierungssignale, die auf beiden Filtern an identischen Positionen auftraten, sind durch Pfeile markiert. Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe der asymmetrischen Markierungen in den Ecken der Filter. Die Phagen der positiven Signale wurden isoliert und zwei Rehybridisierungsrounds unterworfen. In (c) sind die Autoradiogramme der zweiten Rescreens gezeigt. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Signale wurden als Einzelklone isoliert.

(L1-L7) identifiziert werden, von denen zwei (L11 und L71) nach der zweiten Rehybridisierung noch positiv reagierten und als Einzelplaques isoliert wurden. Von einigen der isolierten Phagen-Klone wurde DNA in kleinem Maßstab präpariert und mit dem Restriktionsenzym SallI verdaut, wodurch die Insert-DNA von den Vektorarmen abgetrennt wurde (vgl. Abb. 1). Die Insertionen der von jeweils einem Signal abstammenden Klone waren identisch, was auch in anderen Restriktionsverdau's gezeigt werden konnte (nicht gezeigte Ergebnisse). Sie betragen für L11a 16.5kb, für L71a 17.5kb, für n24a 15kb und für n31c und n51a jeweils 14kb. In einem Southern-Blot Experiment wurden die SallI-verdauten Klone mit pSP65-neo bzw. genomischer L-Zell DNA hybridisiert. Wie Abb. 17a zu entnehmen ist, reagierten die L-Klone deutlich mit Maus-, die n-Klone mehrfach stärker mit neo-DNA, mit Ausnahme von n24a und n24b, deren Hybridisierungssignale etwa den L-Klonen entsprachen.

Um sicherzustellen, daß die Signale der L-Klone nicht auf Kreuzhybridisierung zwischen menschlichen und Maus-Sequenzen zurückzuführen waren, wurden L11a und L71a in einem Southern-Experiment als Probe eingesetzt und an XP-, L- und nMII5-DNA hybridisiert. Eine ausgeprägte Reaktion fand mit der Maus-DNA statt, nicht jedoch mit der DNA der XP-Rezipientenzelle (Abb. 17b). Es waren also repetitive Maus-Sequenzen rekloniert worden. Das für den Intermediärklon typische Bandenmuster bei Hybridisierung mit genomischer Maus-DNA trat allerdings nicht zutage; die in nMII5 amplifizierten Sequenzen waren also nicht auf den Klone L11a und L71a repräsentiert.

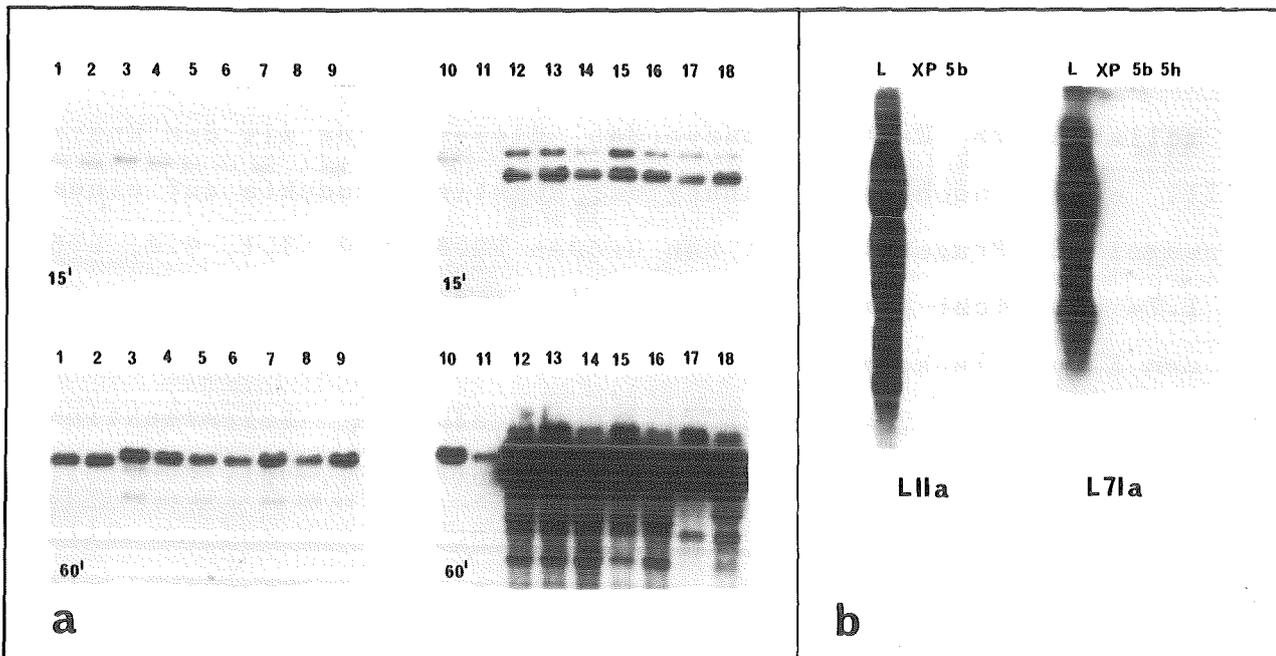


Abbildung 17: Southern-Blot Analyse der isolierten λ -Klone.

a. Ca. 250ng DNA (aus Präparation in kleinem Maßstab) wurde mit dem Restriktionsenzym SalI verdaut und auf 0.5% Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrocellulosefilter wurden sie mit genomischer Maus-DNA (1-9) bzw. pSP65-neo (10-18) hybridisiert. Gezeigt sind zwei verschiedene Expositionen der Filter, im oberen Teil für 15 Minuten, im unteren Teil für 1 Stunde. 1: L11a, 2: L12a, 3: L74a, 4: L74b, 5: L72c, 6: L72d, 7: L71a, 8: L71b, 9: L71c; 10: n24a, 11: n24b, 12: n31a, 13: n31b, 14: n31c, 15: n32d, 16: n51a, 17: n51b, 18: n51c.

b. Je 10 μ g genomischer DNA von Maus L-, XP12RO- und nMII5-Zellen wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut, auf 0.8% Agarosegelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosefilter transferiert. Die Filter wurden mit radioaktiv markierter DNA des λ -Klons L11a (links) bzw. L71a (rechts) hybridisiert.

3.8 Kartierung von Restriktionsschnittstellen auf den isolierten λ -Klonen

Um mögliche Überlappungen der isolierten λ -Klone zu untersuchen und eine Zuordnung der pSV2-neo bzw. der repetitiven Mausequenzen auf den λ -Klonen zu ermöglichen, mußten diese zunächst kartiert, d.h. die Schnittstellen in den Insertionssequenzen für eine Reihe von Restriktionsendonukleasen lokalisiert werden. Diese Analysen wurden durch sogenanntes 'partial mapping' durchgeführt (Rackwitz et al. 1984), einem rasch durchführbaren und recht genauen Verfahren, dessen Prinzip am Beispiel der HindIII-Schnittstellen des λ -Klons L71a dargestellt werden soll.

Der vollständige Restriktionsverdau dieses Klons mit dem Enzym HindIII ergab nach Auftrennung der Reaktionsprodukte auf einem Agarosegel 6 Fragmente mit den Größen 20.6, 9.4, 7.1, 4.4, 2.6 und 1.7 kb (nicht gezeigte Daten); die Abfolge dieser Fragmente auf dem Klon L71a konnte so jedoch nicht festgelegt werden. Eine absichtlich nur unvollständig durchgeführte Enzymreaktion resultierte in einer Vielzahl von Fragmenten (21, vgl. Abb.18), die nach Analyse auf Agarosegelen ein noch verwirrenderes Bild ergaben. Dennoch erlaubte die Methode des 'partial mapping' mit Hilfe dieser Reaktionsprodukte eine genaue Festlegung der Restriktionsschnittstellen. Sie machte sich die Eigenschaft aller

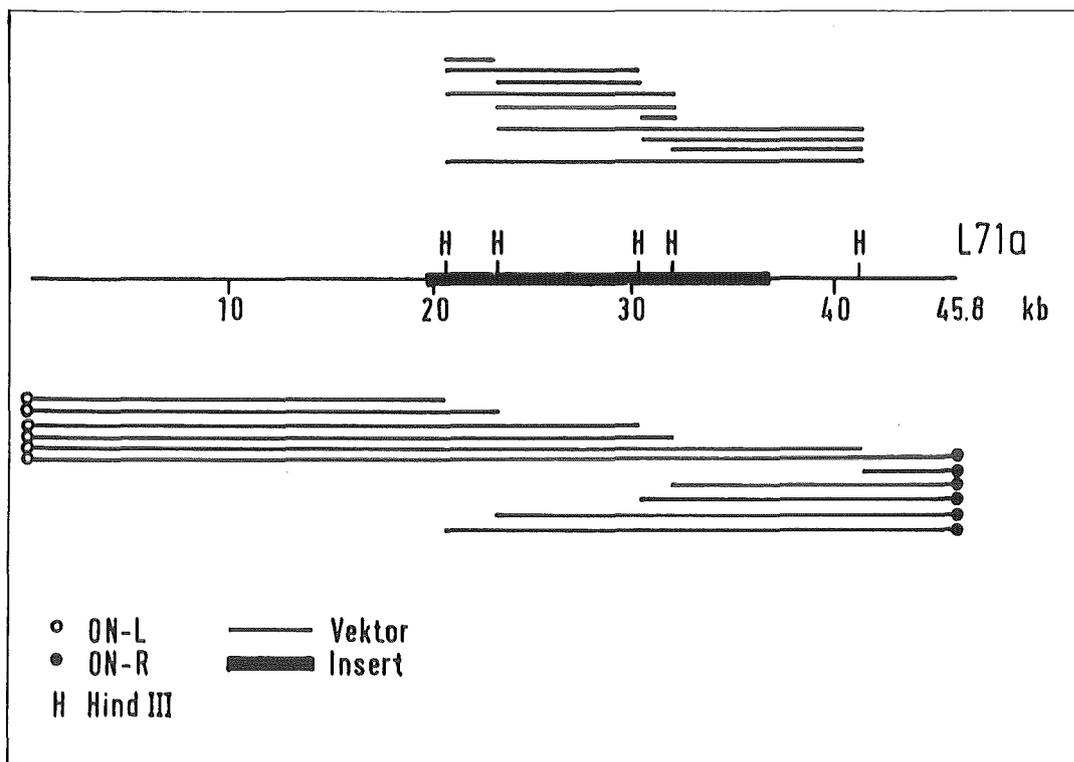


Abbildung 18: Prinzip der Kartierung von Restriktionsschnittstellen auf λ-Klonen durch 'partial mapping'

Ein unvollständiger Enzymverdau der DNA des λ-Klons L71a resultiert in den gezeigten 21 Fragmenten unterschiedlicher Länge. Durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten, zu den einzelsträngigen kohäsiven λ-Enden komplementären Dodekanukleotiden (ON-L und ON-R) werden selektiv nur die 6 Fragmente markiert, die das jeweilige cos-Ende aufweisen. Nach elektrophoretischer Auftrennung auf 0.5% Agarosegelen können die Restriktionsschnittstellen aus den Autoradiogrammen der Gele doppelt, d.h. vom rechten und vom linken cos-Ende bestimmt werden (vgl. Abb.19), was die Erstellung recht genauer (± 0.5 kb) Restriktionskarten erlaubt.

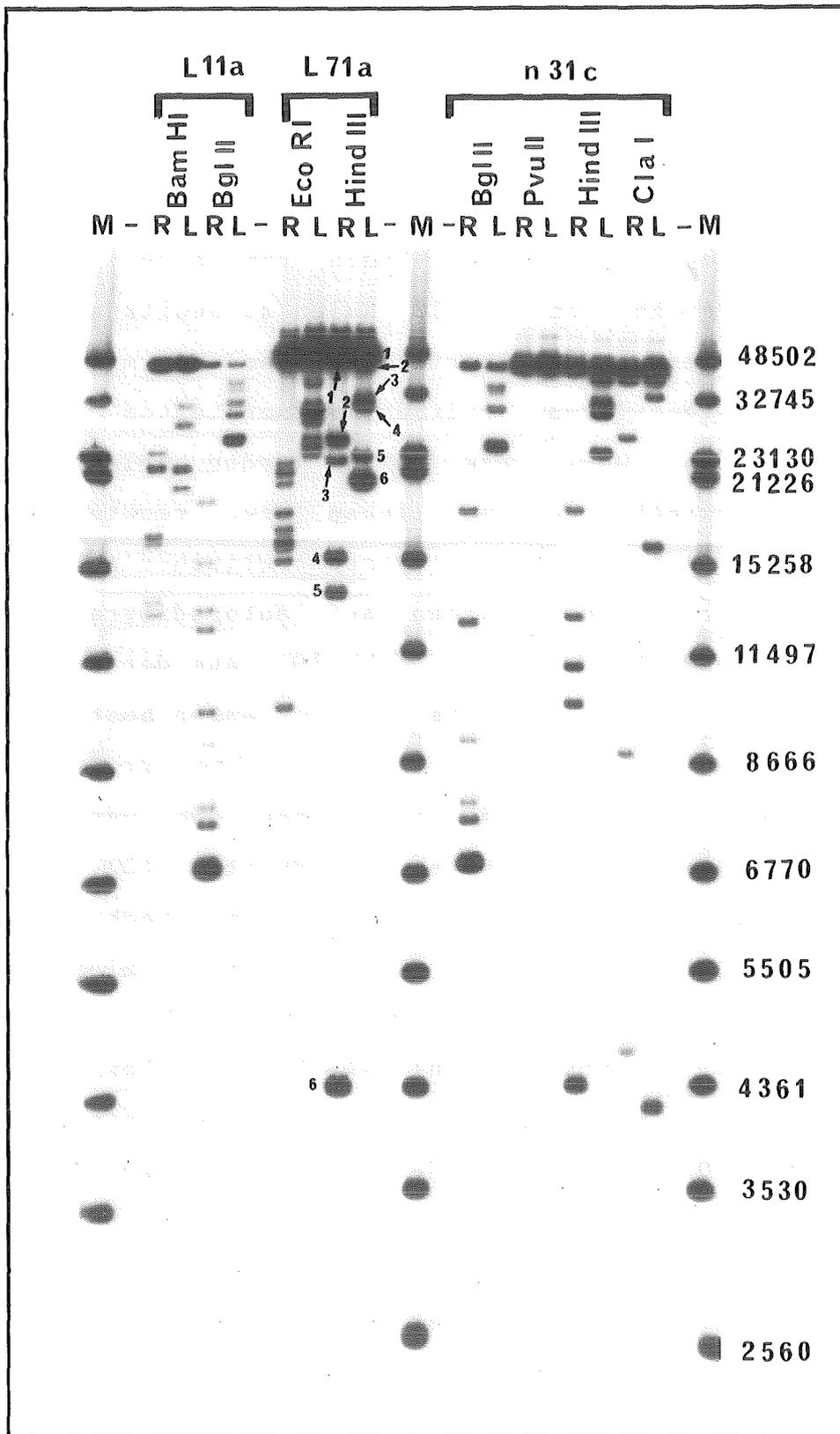


Abbildung 19: Autoradiogramm eines 'partial mapping'-Gels

Die DNAs der λ -Klone L11a, L71a und n31c wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen partiell verdaut, 150 ng-Aliquots dieser Reaktion mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden ON-R (R) bzw. ON-L (L) 30 Minuten bei 42°C hybridisiert und auf einen 0,5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker (M) diente ein Gemisch aus unverdauter und mit den Restriktionsenzymen Bam HI, Eco RI, Hind III, Hpa I, Pst I und Sal I vollständig verdauter λ CI 857 Sam 7-DNA, die mit beiden Oligonukleotiden gleichzeitig hybridisiert wurde. (Einzelheiten zur Erstellung der Restriktionskarten vgl. das in Abb. 18 und im Text diskutierte Beispiel der Hind III-Schnittstellen des Klons L71a).

λ -DNA's zunutze, an beiden Enden zueinander komplementäre Einzelstrangbereiche von je 12 Basen zu besitzen (cos-Enden). Durch Hybridisierung der partiellen Verdauung mit den zu den cos-Enden komplementären, radioaktiv markierten synthetischen Dodekanukleotiden ON-L bzw. ON-R wurden selektiv nur die Fragmente markiert, die am linken bzw. rechten Vektorende begannen (vgl. Abb.18). Nach elektrophoretischer Auftrennung der Hybridisierungsreaktionen wurden auf Autoradiogrammen der Gele nur diese Fragmente sichtbar (Abb.19). Aus der Eichgerade der Markerfragmente ließen sich die Fragmentlängen bestimmen und die Restriktionsschnittstellen lokalisieren. Die größten Fragmente (1) waren gleich lang und entsprachen dem unverdauten Klon (45.8kb). Das zweitgrößte Fragment (2) aus der Hybridisierungsreaktion mit dem zum rechten cos-Ende komplementären Oligonukleotid ON-R(R) besaß eine Länge von 25.2kb, markierte also eine vom rechten Vektorende (Position 45.8kb) 25.2kb entfernte Schnittstelle bei Position 20.6kb. Dieselbe Schnittstelle wurde auch in der Hybridisierungsreaktion mit dem linken Oligonukleotid ON-L bestimmt: Fragment 6 wies eine Länge von 20.6kb auf. Entsprechend korrespondierten die Fragmente 3(R) und 5(L), 4(R) und 4(L), 5(R) und 3(R) und 6(R) und 2(L) (vgl. Abb.18+19). Die Restriktionsschnittstellen für das Enzym HindIII konnten auf die Positionen 20.6, 23.2, 30.3, 31.95 und 41.3 festgelegt werden; die Fehlergrenzen betragen unter 1kb. Diese Karte wurde durch das Ergebnis des vollständigen Restriktionsverdauung bestätigt, der exakt die zu erwartenden Fragmentlängen produzierte.

Auf allen 5 isolierten λ -Klonen wurden mit dieser Methode die Restriktionsschnittstellen für insgesamt 7 Enzyme lokalisiert.

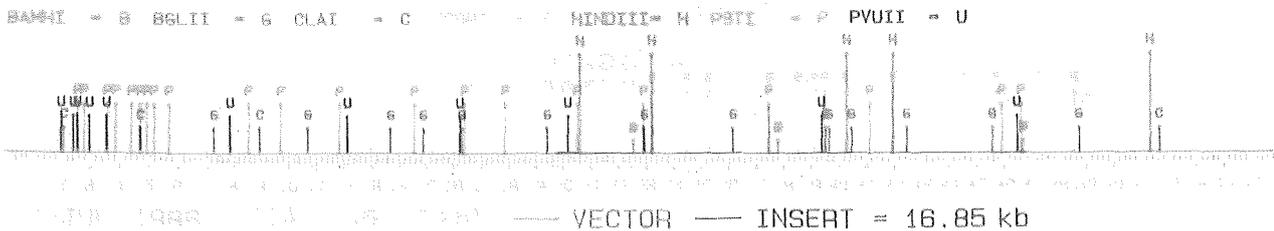
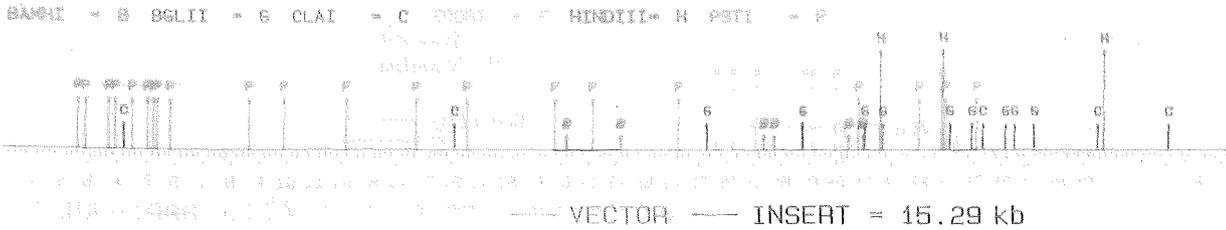
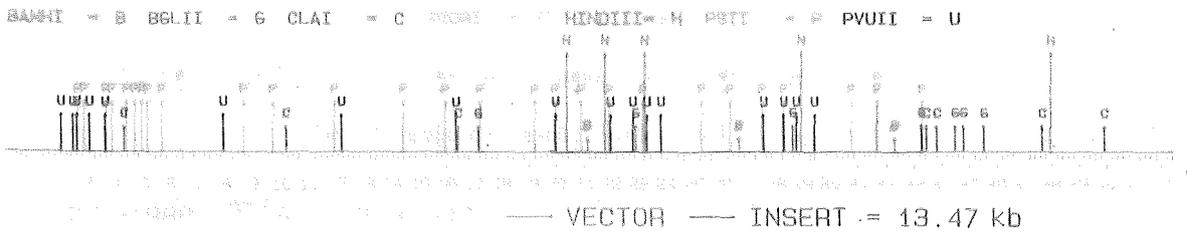
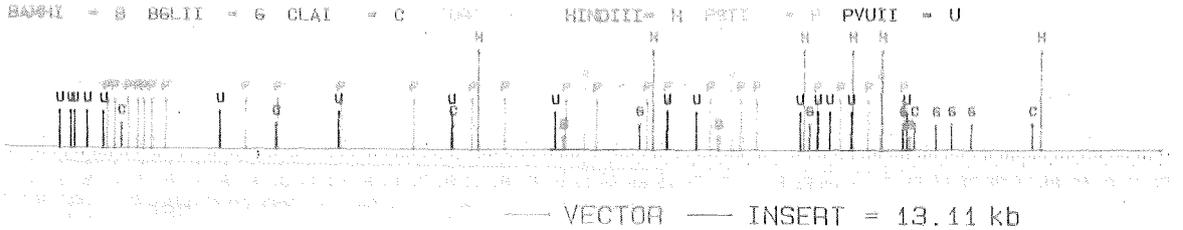
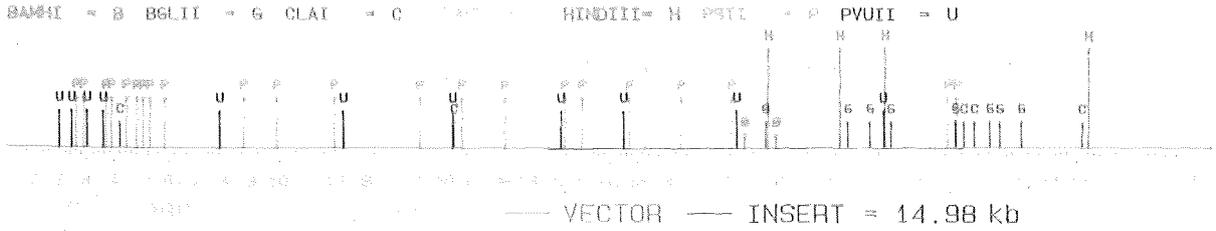


Abbildung 20: Restriktionskarten der isolierten λ -Klone

Die DNAs der Klone n24a, n31c, n51a, L11a und L71a wurden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen partiell verdaut, die Fragmente nach Hybridisierung mit den Oligonukleotiden ON-L bzw. ON-R elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte am EMBL Heidelberg nach der Methode von Zehetner et al. (1986).

Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte nach dem Verfahren von Zehetner et al. (1986) am EMBL in Heidelberg. Die so ermittelten Restriktionskarten der 5 Klone sind in Abbildung 20 dargestellt. Die beiden Klone L71a und n31c zeigten an den Nahtstellen von Insertion und rechtem Vektorarm eine BamHI-Schnittstelle. Diese mußten nicht notwendigerweise auch in der genomischen DNA vorhanden sein, sondern konnten ebensogut erst durch die Klonierung entstanden sein. Abbildung 21 verdeutlicht diesen Sachverhalt. Auf jeden Fall befinden sich jedoch an diesen Positionen, wie an allen Vektor-Insert-Übergängen, Schnittstellen für das Enzym Sau3A.

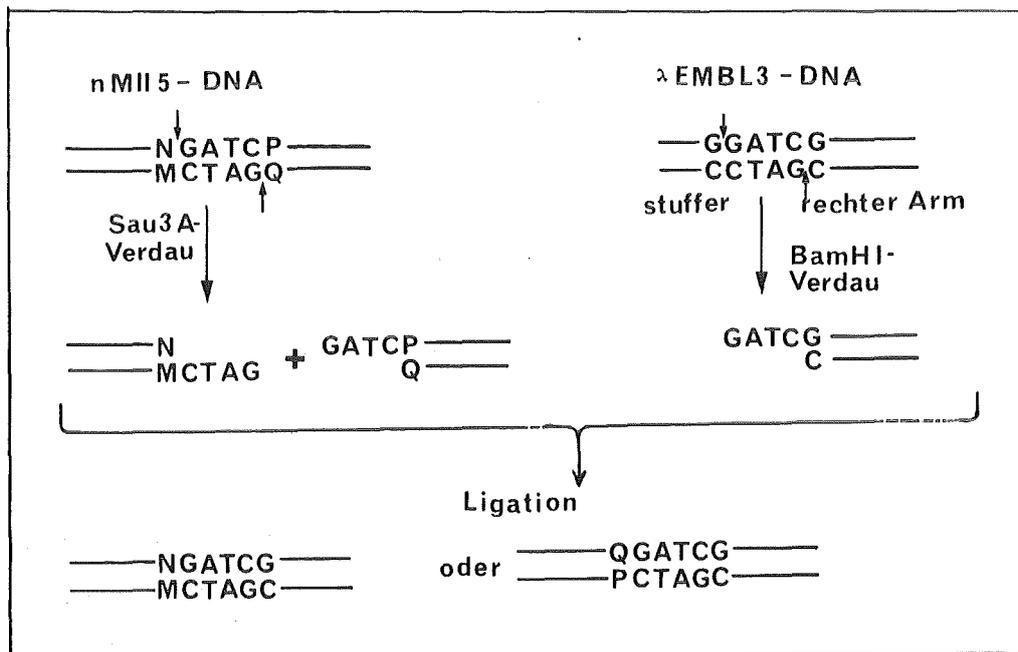


Abbildung 21: Ligation von Sau 3A-verdauter nMII-5-DNA mit dem nach Bam HI-Verdau von λ EMBL 3 entstandenen rechten Vektorarm

In der genomischen DNA liegt nur dann eine Bam HI-Schnittstelle vor, wenn N und P Guanine (G) sind. Nach der Ligation mit dem rechten λ EMBL 3 Vektorarm entsteht eine Bam HI-Schnittstelle bereits dann, wenn N oder P ein Guanin-Rest ist. G = Guanin; A = Adenin; C = Cytosin; T = Thymin; N, M, P und Q = unbekannte Basen.

3.9 Strukturelle Charakterisierung der isolierten λ -Klone

In einer Reihe von Hybridisierungsexperimenten wurden die DNA's der 5 λ -Klone nach vollständigem Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen, elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf Nitrocellulosefilter nacheinander mit radioaktiv markierter pSV2-neo DNA, genomischer Maus L-Zell-DNA und genomischer XP-DNA hybridisiert (nicht gezeigte Daten). Die Auswertungen dieser Analysen ermöglichten eine Zuordnung der jeweiligen Sequenzen auf den λ -Klonen.

Abbildung 22 faßt die Resultate für die Klone n3lc und n5la zusammen. Beide überlappten weitgehend, doch waren die Sequenzen in unterschiedlicher Orientierung in den λ EMBL3 Vektor inseriert. Beide enthielten eine vollständige Kopie pSV2-neo, sowie rechts und links davon weitere Sequenzen aus diesem Plasmid. Das Fragment auf der linken Seite brach nach ca. 1.6kb an einer Sau3A-Schnittstelle an der Vektor-Insert-Grenze ab. Die rechte unvollständige Kopie brach nach 3.1kb an einer PstI-Schnittstelle ab und ging in singuläre Sequenzen über. Der Klon n3lc enthielt an der Grenze von Insert und rechten Vektorarm ein 0.6kb PstI-Fragment, auf dem repetitive Mausequenzen lokalisiert wurden. Es handelte sich hierbei also um die Nahtstellen von neo- und Mausequenzen. Repetitive menschliche Sequenzen konnten auf diesen Klonen keine nachgewiesen werden.

Daß der Klon n3lc tatsächlich repetitive Mausequenzen enthielt, wurde in einem Southern-Blot Experiment nachgewiesen, in dem die radioaktiv markierte n3lc-DNA eine schwache Hybridisierung mit Maus L-DNA ergab, jedoch keine Reaktion mit XP-DNA (nicht gezeigte Daten).

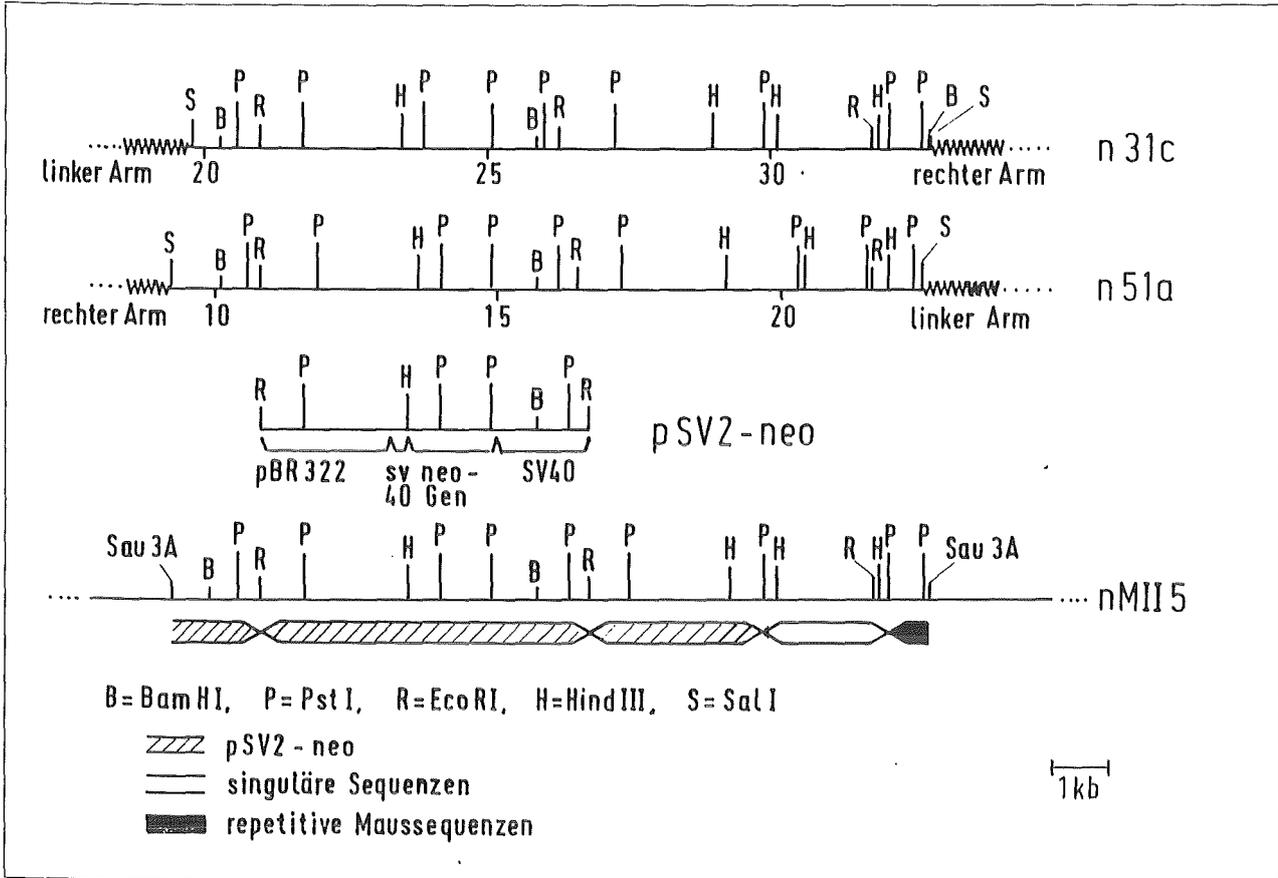


Abbildung 22: Überlappung der Klone n31c und n51a und Zuordnung der pSV2-neo Sequenzen bzw. singulärer und repetitiver Maussequenzen (Einzelheiten s. Text)

Um festzustellen, welche neo-Fragmente der nMII5-DNA auf den Klonen n31c und n51a vertreten waren, wurden in einem weiteren Southern-Blot Experiment die mit EcoRI verdaute DNA des Intermediärklons und die DNA's von n31c und n51a nebeneinander aufgetragen und mit radioaktiv markiertem pSV2-neo hybridisiert. Abbildung 23 zeigt das Autoradiogramm dieses Versuchs.

Die 5.8kb und 5.2kb EcoRI-Fragmente waren demnach rekloniert. Unklar blieb, welchem Fragment in der DNA des Intermediärklons die zweite unvollständige neo-Kopie (links von der vollständigen Kopie, vgl. Abb.22) zuzuordnen war, die in diesem Experiment als 20.6kb großes Fragment in Verbindung mit dem linken Vektorarm auftrat.

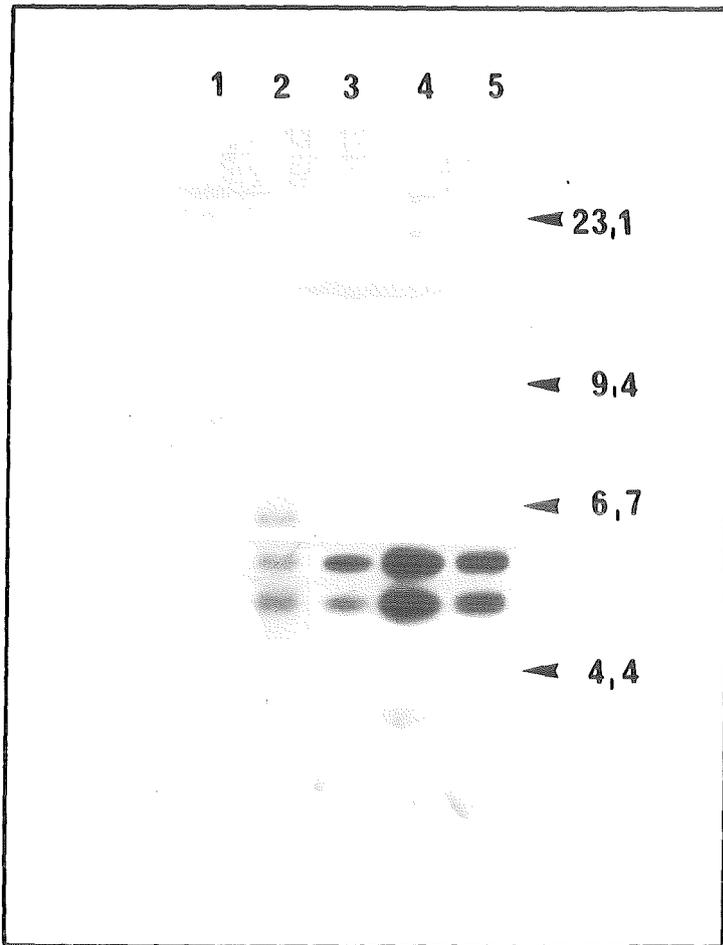


Abbildung 23: Southern-Blot Experiment zur Zuordnung der reklonierten pSV2-neo Sequenzen zur DNA des Intermediärklons nMI15

Die DNAs wurden mit dem Restriktionsenzym Eco RI verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrocellulosepapier mit radioaktiv markierter pSV2-neo DNA hybridisiert. 1: 10µg XP12RO tk⁻¹, 2: 10µg nMI15h, 3: 10µg XP12RO tk⁻¹ + der einer Kopie entsprechenden Menge n31c-DNA, 4: 10µg XP12RO tk⁻¹ + 5 Kopien n31c, 5: 10µg XP12RO tk⁻¹ + 2 Kopien n51a.

Die Restriktionskarte des ebenfalls mit der neo-Hybridisierungsprobe isolierten Klons n24a enthielt keine für pSV2-neo indikativen Schnittstellen. Das legte den Schluß nahe, daß dieser Klon aufgrund von unspezifischen Kreuzhybridisierungen isoliert worden war und, da auch keine Hybridisierung mit genomischer Maus-DNA erfolgte, keine transfizierten Sequenzen enthielt.

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der analog durchgeführten Analysen für die Klone L11a und L71a zusammengefaßt. Die beiden Klone hatten demnach keine Überlappungsbereiche. Beide enthielten neben singulären Sequenzen Fragmente, auf denen repetitive

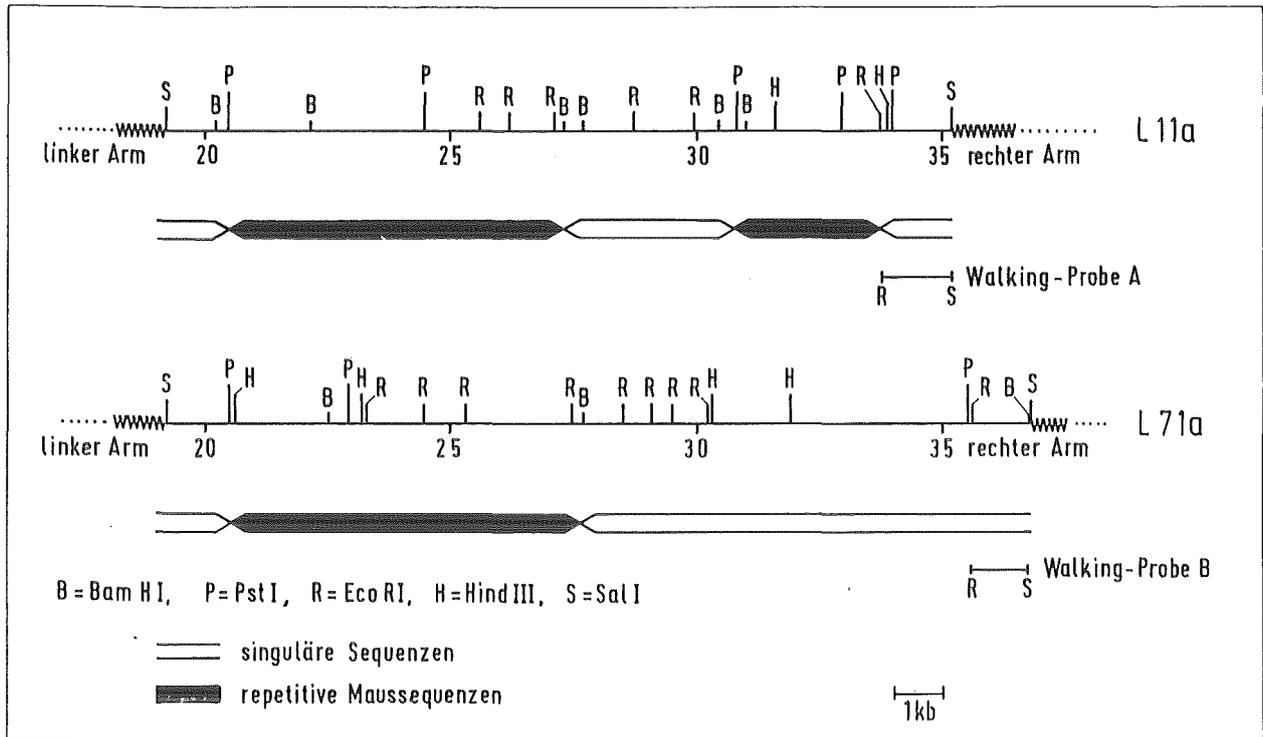


Abbildung 24: Zuordnung von singulären und repetitiven Mausequenzen auf den λ -Klonen L11a und L71a (Einzelheiten s. Text)

Mauselemente lokalisiert wurden. Für L11a sind dies zwei Bereiche von 6.9kb (Position 20.4–27.3) und 3.1kb (Position 30.8–33.9), auf L71a ein Fragment von 7.1kb Länge (Position 20.6–27.7). Beide reagierten weder mit pSV2-neo noch mit genomischer menschlicher DNA.

3.10 Isolierung größerer Bereiche der transfizierten Sequenzen (Chromosome-Walk)

Parallel zu der in Kapitel 3.11 beschriebenen funktionellen Charakterisierung der isolierten λ -Klone wurde versucht, durch Isolierung überlappender λ -Klone (Chromosome Walk) weitere Bereiche der transfizierten Sequenzen zu reklonieren. Da die Mausequenzen hierbei von besonderem Interesse waren, wurden als Hybridisierungsproben für dieses Experiment zwei Fragmente auf den Klonen L11a und L71a ausgewählt, die an den Vektor-Insert

Grenzen lokalisiert waren und keine repetitiven Mauselemente enthielten (Fragmente A und B, vgl. Abb. 24). Diese wurden in den Plasmidvektor pSP64 subkloniert und für den anschließenden Chromosome-Walk eingesetzt (Abb.25).

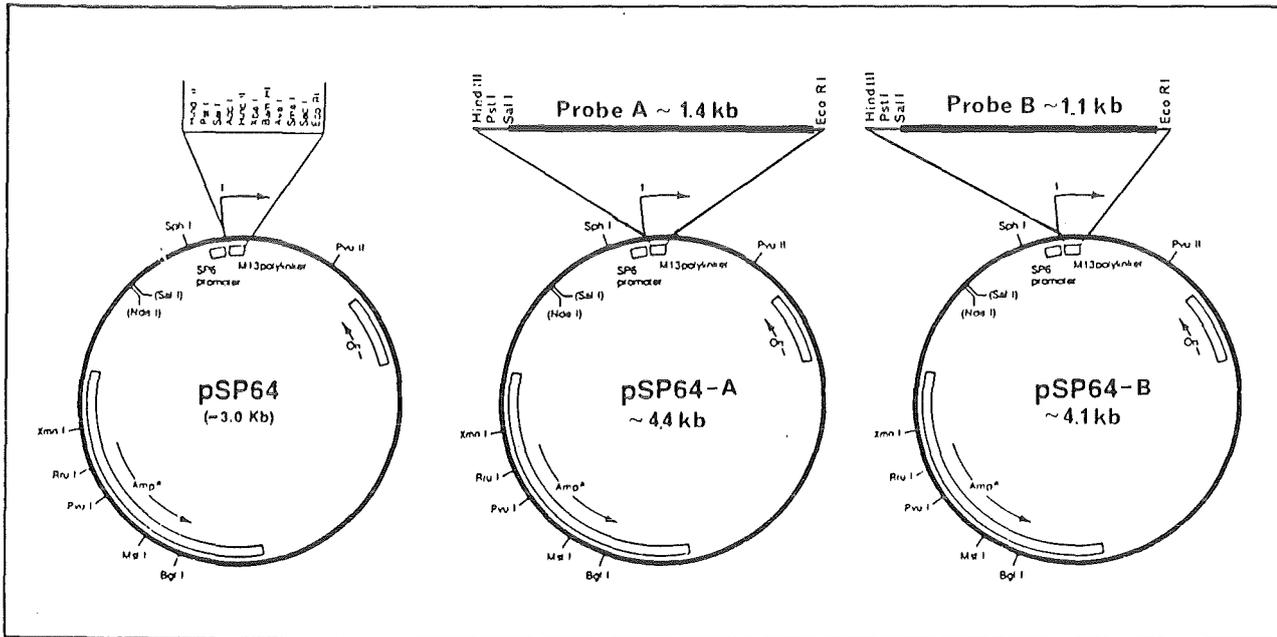


Abbildung 25: Subklonierung der Fragmente A und B in den Plasmid-
Vektor pSP64
(Einzelheiten s. Text)

Da der Vektor pSP64 das β -Lactamase-Gen (Ampicillin-Resistenzgen amp) enthielt, das auch auf dem Plasmid pSV2-neo und somit in der λ -Genbank vorhanden war, mußten die Insertionen A bzw. B zunächst von den Vektorsequenzen abgetrennt werden. Dies erfolgte durch Verdau der Plasmid-DNA's mit den Enzymen SalI und EcoRI und zweimaliger Reinigung der Insertionen durch Gelelektrophorese. In Plauehybridisierungsexperimenten wurden diese beiden Proben mit jeweils 6×10^5 rekombinanten Phagen hybridisiert. Mit der Probe A wurden insgesamt 4 Hybridisierungssignale identifiziert, mit Probe B 2, die isoliert und zwei Rehybridisierungsrunden unterworfen wurden. Danach reagierten noch 3 Klone mit der Probe

A, ein Klon mit Probe B. Von diesen wurden singuläre Plaques isoliert und zur Präparation von DNA in kleinem Maßstab verwendet. Von allen isolierten Phagenklonen wurden durch partial mapping Restriktionskarten erstellt und in einer Reihe von Hybridisierungsexperimenten, analog zur Vorgehensweise bei der Analyse der ursprünglich isolierten λ -Klone (vgl. 3.9), neo-, repetitive Maus und repetitive menschliche Sequenzen sowie singuläre Bereiche zugeordnet.

Abbildung 26 faßt die Ergebnisse des Chromosome-Walks mit der Probe A zusammen. Die isolierten Klone A111, A211 und A412 überlappten alle weitgehend mit dem Klon L11a, von dem die Probe A herstammte. Auffällig war, daß es lediglich gelang, 3.4kb

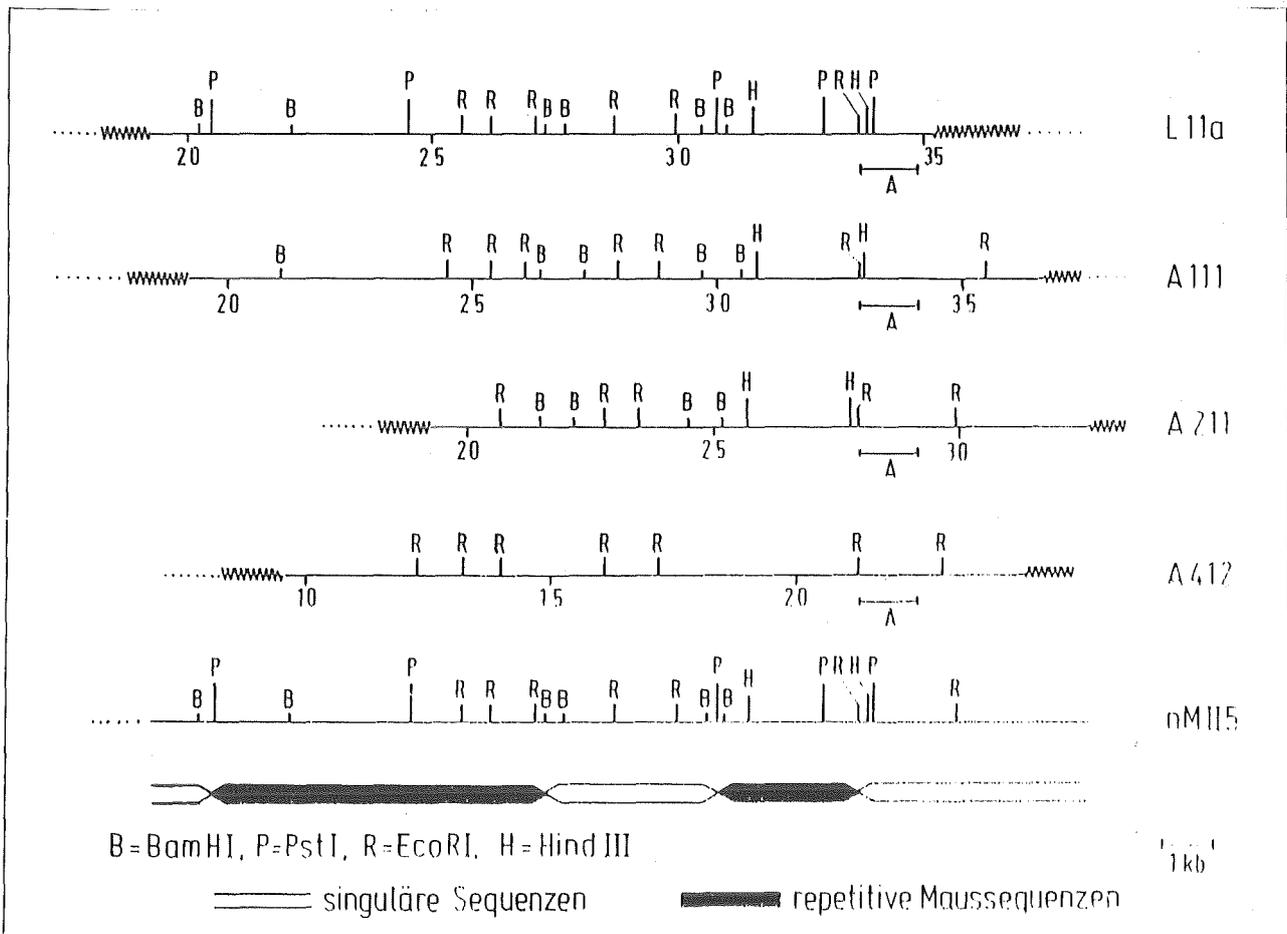


Abbildung 26: Chromosome-Walk mit der Hybridisierungsprobe A

Überlappung des Klons L11a und der mit der Probe A isolierten λ -Klone A111, A211 und A412. (Einzelheiten s. Text).

zusätzliche Sequenzen (Klon A211) zu isolieren, bei denen es sich um singuläre Sequenzen handelte.

Mit der Probe B war nach der zweiten Rehybridisierungsrunde nur ein Signal positiv. Die DNA dieses Klons reagierte mit pSV2-neo. Die Restriktionskartierung machte deutlich, daß er fast vollständig mit den Klonen n31c und n51a überlappte. Dieses Resultat erklärt sich durch nicht ausreichende Abtrennung der Vektorsequenzen von der Probe B und dadurch bedingte Kreuzhybridisierung mit dem β -Lactamasegen auf pSV2-neo. Dennoch offenbarte dieses Experiment ein interessantes Resultat. Nach der zweiten Rehybridisierungsrunde waren zwei verschiedene Einzelklone des positiven Signals isoliert worden (B211a und B211b). Diese waren nicht absolut identisch. In verschiedenen Restriktionsverdau zeigte sich, daß B211b stets, zusätzlich zu den mit B211a gemeinsamen Fragmenten, weitere Fragmente enthielt, einer groben Abschätzung zufolge ca. 5kb. Diese waren jedoch nicht im selben molaren Verhältnis vorhanden, sondern deutlich unterrepräsentiert. Eine konsistente Restriktionskarte ließ sich für B211b nicht erstellen. Es muß sich also hier um partielle Deletionen von Fragmenten handeln, die auf B211a sogar vollständig fehlen. Solche Deletionen können bei λ EMBL3-Klonen stets dann vorkommen, wenn es infolge repetitiver Elemente auf den DNA's bei der Verpackung in Phagenköpfe, die recA-abhängig ist, zu Rekombinationen zwischen solchen Elementen kommt. Interessanterweise reagierten die auf Klon B211b zusätzlich vorhandenen Fragmente mit repetitiver menschlicher DNA, so daß es sich hier vermutlich um die Nahtstelle von XP- und neo-Sequenzen handelt.

3.11 Funktionelle Charakterisierung der isolierten λ -Klone

Um sicherzustellen, daß die isolierten neo-Sequenzen das neo-Gen auch funktionell enthielten, wurden die λ -Klone n31c und n51a in XP12RO- und NIH3T3-Rezipientenzellen transfiziert, pro Petrischale 20 μ g der λ -DNAs. Beide Klone erzielten G418-resistente Kolonien mit annähernd derselben Frequenz wie 5 μ g des pSV2-neo-Plasmids, das mit 20 μ g Kalbsthymus-Träger-DNA kotransfiziert wurde. Transfektion des λ -Klons n24a resultierte nicht in G418-resistenten Klonen, wodurch nochmals bestätigt wurde, daß auf dieser DNA keine neo-Sequenzen vorhanden waren.

Die Maus-Klone L11a und L71a wurden zusammen mit pSV2-neo ebenfalls in XP12RO-Rezipientenzellen transfiziert, pro Petrischale (8x10⁵ Zellen) 20 μ g der jeweiligen λ -Klon DNA und 5 μ g des Markerplasmids. Nach 12-17tägiger Kultur in Selektionsmedium wurden die G418-resistenten Zellklone geerntet und für 2-3 Tage in Massenkultur gezüchtet. Aliquots dieser Kulturen wurden mit definierter Dichte (5x10³ Zellen/cm²) auf 10cm Petrischalen plattiert und der UV-Selektion unterzogen (3mal 1.7 J/m²). Die mit dem Klon L11a cotransfizierten Kulturen überlebten dieses Protokoll nicht. In den Petrischalen mit den L71a-Massenkulturen allerdings überlebten jeweils ca. 50 Klone die Strahlenselektion. Diese wurden wiederum gemeinsam geerntet, in Massenkultur weitergezüchtet und einer zweiten UV-Selektionsrunde unterzogen. Diese überlebten ca. 50% der eingesäten Zellen.

Von diesen drei Massenkulturen, vor der UV-Bestrahlung, nach der ersten bzw. zweiten Selektionsrunde, wurden Dosiswirkungskurven aufgenommen, die in Abbildung 27 dargestellt sind. Während sich die unbestrahlte Massenkultur von der XP12RO-Rezipientenzelle nur unwesentlich abhob, zeigten die Zellen nach der ersten

Bestrahlung deutlich besseres Überleben. Die Kurve der zweimal UV-selektionierten Zellen ($6 \times 1.7 \text{ J/m}^2$) erreichte annähernd die des Intermediärklons nMII5e.

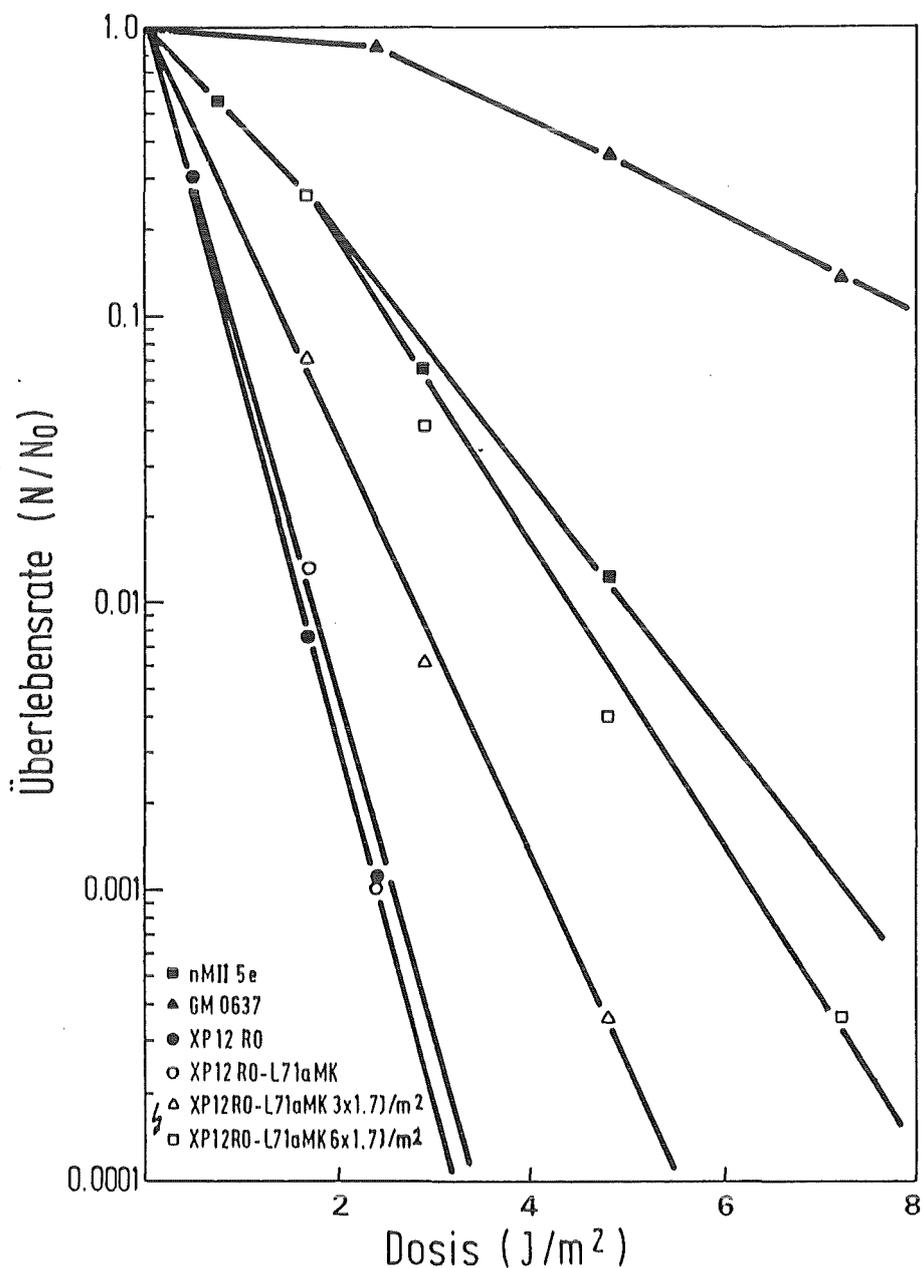


Abbildung 27: UV-Dosiseffektkurven der mit pSV2-neo und L71a kotransfizierten G418-resistenten XP-Massenkultur (XP12RO-L71a Mk) sowie der nach 3maliger (XP12RO-L71a MK 3 x 1.7 J/m^2) und 6maliger (XP12RO-L71a MK 6 x 1.7 J/m^2) Bestrahlung mit jeweils 1.7 J/m^2 überlebenden Zellen. Pro Punkt wurden 4×10^5 Zellen - nach 2-tägiger Kultivierung in Normalmedium - mit der jeweiligen UV-Dosis bestrahlt, trypsiniert, gezählt und mit definierter Zellzahl in je drei Kulturflaschen (25 cm^2 Fläche) auf 5×10^4 primäre XP-Feederzellen plattiert. Die nach 12 Tagen entstandenen Kolonien wurden fixiert, gefärbt und gezählt.

Die DNA's dieser drei Kulturen wurden in einem Southern-Blot Experiment analysiert, das in Abbildung 28 gezeigt ist. Alle drei DNA's enthielten Fragmente, die mit L71a-DNA hybridisierten. Deutlich erkennbar unterschieden sich die L71a-Fragmente der bestrahlten, partiell UV-resistenten Kulturen von denen der sensitiven Ausgangskultur. Da es sich hier um Massenkulturen handelte, die Integrationsorte der L71a-DNA im Genom der Rezipientenzellen daher verschieden waren, ließ sich keine Zuordnung dieser Fragmente zu denen der ursprünglich transfizierten DNA vornehmen.

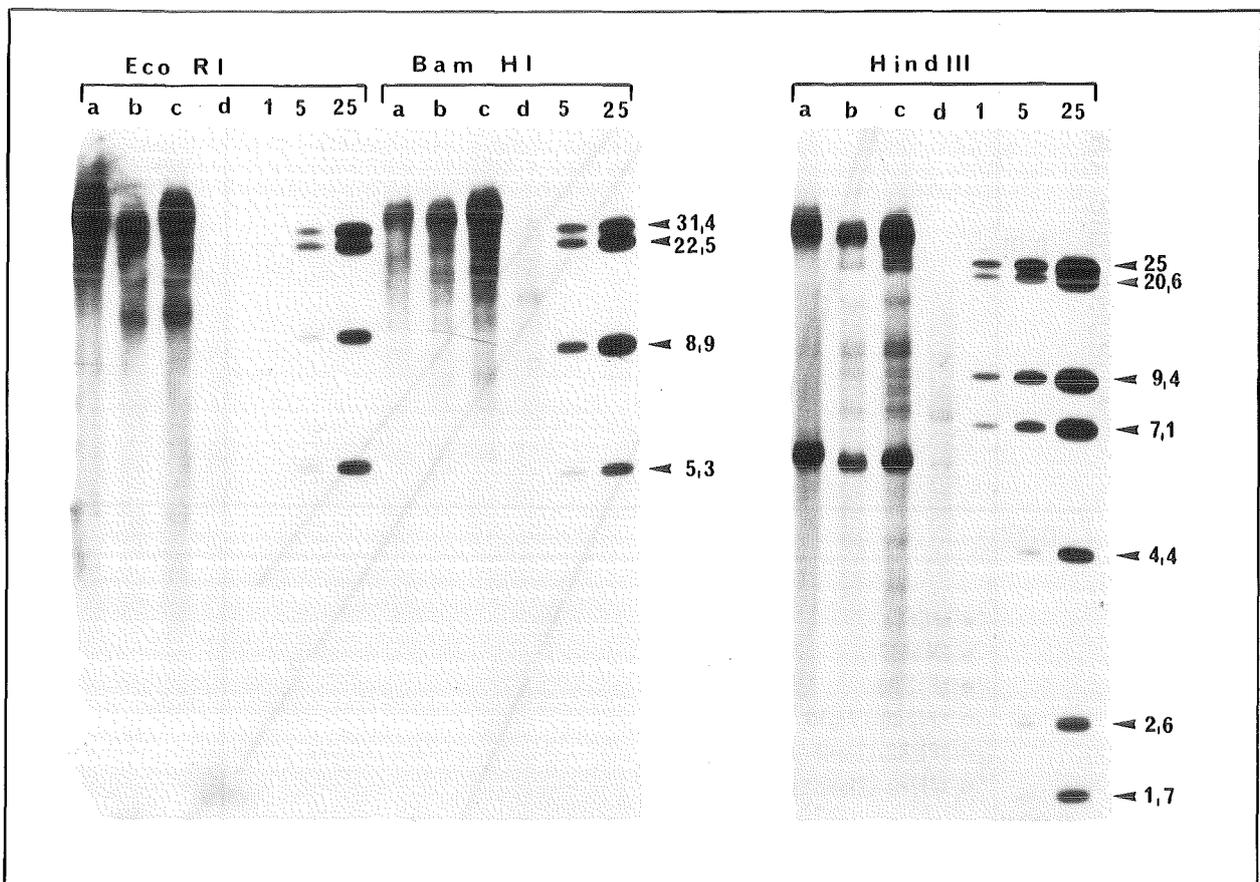


Abbildung 28: Southern-Blot Analyse der XP-L71a-Massenkultur vor und nach UV-Bestrahlung

Jeweils 10 μ g genomische DNA wurden mit den Restriktionsenzymen Eco RI, Bam HI bzw. Hind III verdaut und auf 0,8% Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Standards wurden die 1, 5 bzw. 25 Kopien entsprechenden DNA-Mengen der ebenfalls mit dem jeweiligen Enzym geschnittenen L71a-DNA aufgetragen. Nach Transfer auf Nitrocellulosefilter wurden die DNAs mit radioaktiv markierter L71a-DNA hybridisiert. a: XP12RO-L71a MK, B. XP12RO-L71a MK 3 x 1.7 J/m², c: XP12RO-L71a MK 6 x 1.7 J/m², d: nMII5b.

In weiteren Experimenten wurde dieser Effekt reproduziert. Stets konnten aus XP12RO-Massenkulturen, die mit L71a-DNA transfiziert waren, durch UV-Bestrahlung Zellpopulationen isoliert werden, die signifikant UV-resistenter waren als die Rezipientenzelllinie. Auch nach Verdau der L71a-DNA mit dem Restriktionsenzym SallI, der Vektor- und Insertionssequenzen voneinander trennte (vgl. Abb.24), wurden durch Transfektion und UV-Selektion XP-Kulturen erhalten, die intermediäre UV-Sensitivität aufwiesen.

XP12RO-Massenkulturen, die mit dem λ -Klon n31c, mit λ -Wildtyp-DNA oder mit pSV2-neo und Kalbsthymus-DNA transfiziert waren und parallel der UV-Selektion unterworfen wurden, starben stets quantitativ ab. Von einigen der isolierten Massenkulturen wurden die Überlebensraten nach UV-Bestrahlung mit 2.9 J/m² bestimmt (s.Tab.9). Die XP-Populationen, die mit n31c, λ -Wildtyp-DNA und pSV2-neo transfiziert waren, wiesen dieselbe UV-Sensitivität auf wie die Rezipientenzelllinie XP12RO. Die Präsenz von pSV2-neo bzw. λ -Sequenzen hatte also keinen Einfluß auf den XP-Phänotyp. Nur die mit L71a-DNA transfizierten Kulturen waren signifikant UV-resistenter. Dieser Effekt ist also allein auf die Maussequenzen des λ -Klons L71a zurückzuführen.

Massenkultur	XP12RO ^a	X012RO ^b pSV2-neo	X012RO ^c λ	XP12RO ^d n31c	XP12RO ^e L71a 6x1.7 J/m ²	XP12RO ^f L71a-SallI 6x1.7 J/m ²
Überlebensrate	0.0010	0.0012	0.0010	0.0011	0.042	0.033

Tabelle 9: Überlebensraten verschieden transfizierter XP12RO-Massenkulturen nach UV-Bestrahlung mit einer Dosis von 2.9 J/m².

Jeweils 8x10⁵ XP12RO-Zellen wurden transfiziert mit: a keiner DNA, b 5µg pSV2-neo + 20µg Kalbsthymus-DNA, c 5µg pSV2-neo + 20µg λ Wildtyp-DNA, d 20 µg n31c, e 20µg L71a + 5µg pSV2-neo, f 20µg mit SallI verdauter L71a-DNA + 5µg pSV2-neo. Nach 12-17tägiger G418-Selektion wurden die Marker-positiven Zellklone 2-3 Tage in Massenkultur gezüchtet, danach direkt (a-d) oder nach UV-Selektion (e+f) zur Bestimmung der Überlebensrate bei 2.9 J/m² verwendet.

4. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Isolierung und Charakterisierung eines intermediär UV-sensitiven Zellklons der Xeroderma Pigmentosum Komplementationsgruppe A durch Transfer hochmolekularer genomischer Maus Donor-DNA in die Rezipientenzelllinie XP12RO tk⁻¹. Die partielle Reklonierung der transfizierten Sequenzen aus einer λ -Genbibliothek der DNA des Intermediärklons nMII5 resultierte in 4 rekombinanten λ -Klonen, von denen zwei (n31c und n51a) vorwiegend Sequenzen des verwendeten dominanten Selektionsmarkergens sowie sehr wenig singuläre und repetitive Maus-DNA enthielten. Die übrigen λ -Klone (L11a und L71a) trugen längere singuläre Sequenzen und repetitive Maus-DNA. Einer dieser Klone (L71a) führte nach Transfektion in XPA-Zellen und anschließender UV-Selektion zur Isolierung von Zellpopulationen, die UV-Bestrahlungen signifikant besser überlebten als die Rezipienten-Zellen. Die Zellen dieser Populationen enthielten die L71a-DNA stabil integriert.

Eine spezifische Korrektur des XPA-Reparaturdefekts konnte bisher nur durch Fusionierung von XPA-Zellen mit isolierten Cytoplasten (Keijzer et al. 1982), durch Mikroinjektion grober Zellproteinextrakte (de Jonge et al. 1983, Vermeulen et al. 1986) bzw. vorgereinigter Proteinfractionen (Yamaizumi et al. 1986) und durch Mikroinjektion von mRNA (Legerski et al. 1984) erreicht werden. Aus solchen Experimenten ließ sich die Größe des komplementierenden Proteinfaktors abschätzen. Die Länge der mRNA wurde auf 690 Nukleotide geschätzt, was einer codierenden Kapazität von ca. 30 KD entspricht, während durch Proteininjektion zwei komplementierende Fraktionen von 90 und 160 KD bestimmt

wurden. Dieser scheinbare Widerspruch könnte durch eine polymere Struktur des XPA-Faktors bedingt sein (Giannelli et al. 1982).

Alle Versuche, relativ gut charakterisierte pro- und eukaryotische DNA-Reparaturenzyme und -Gene zur spezifischen Korrektur des XPA-Defekts zu verwenden, blieben bisher ohne Erfolg. Mikroinjektion der Uvr Excinuclease (UvrA,B,C und D) von *Escherichia coli* in XPA- und XPC-Zellen führte zu keiner Erhöhung der UV-induzierten UDS (Zwetsloot et al. 1986). Transfektion von klonierten RAD-Genen (Wilcox und Prakash 1981, Reynolds und Friedberg 1981, Weiss und Friedberg 1985), die in der Excisionsreparatur UV-induzierter DNA-Läsionen von *Saccharomyces cerevisiae* involviert sind (Friedberg 1985), in XPA-Zellen führten zu demselben negativen Resultat (Friedberg et al. 1983). Auch der Transfer des bisher einzigen isolierten menschlichen Excisionsreparaturgens ERCC1 (Westerveld et al. 1984, van Duin et al. 1986) in XPA-Rezipientenzellen erbrachte keine Komplementation (J.Hoeijmakers, pers. Mitteilung).

Eine unspezifische, da in allen Komplementationsgruppen gleichermaßen beobachtete Korrektur des Reparaturdefekts wurde berichtet nach Einschleusen von Endonuclease V des Bakteriophagen T4 (Tanaka et al. 1975, 1977, Hagakawa et al. 1981) oder von UV-Endonuclease aus *Micrococcus luteus* (de Jonge et al. 1985). Beide Enzyme sind Pyrimidin-Dimer-spezifisch, bestehen aus einem Polypeptid und besitzen neben Glycosylase-eine Endonucleaseaktivität für apurine und apyrimidine DNA-Stellen (Nakabeppu und Sekiguchi 1981, Grafstrom et al. 1982).

Genomische Transfektionsexperimente, die weltweit in vielen Arbeitsgruppen durchgeführt wurden, verliefen bisher allesamt negativ (vgl. Cleaver 1983b, Lehmann 1985). In Tabelle 10 sind

diejenigen aufgeführt, von denen durch Notizen in der Literatur bzw. durch persönliche Mitteilungen solche Anstrengungen bekannt wurden. Als einzige berichteten Takano et al. (1982) die Isolierung UV-resistenter Zellen nach Transfektion von XPA-Zellen mit menschlicher normaler DNA. Es gelang allerdings nicht, den ursächlichen Zusammenhang zwischen DNA-Aufnahme und Reversion des Phänotyps zu beweisen, so daß man annehmen muß, daß es sich um eine Spontan-Revertante handelte (siehe auch Cleaver 1983b).

Arbeitsgruppe	verwendete Zelllinien	Literaturstelle
Erasmus Universität Rotterdam (Bootsma)	XP12RO XP20S	Lehmann 1985, J.Hoeijmakers, pers.Mitteilung
Harvard University (Haseltine)	XP12RO	Royer-Pokora et al. 1984, Royer-Pokora und Haseltine 1984
University of Sussex (Lehmann)	XP12RO	Lehmann 1985
National Cancer Institute Bethesda (Kraemer)	XP12RO XP20S	Protic-Sabljić et al. 1983, 1985
Stanford University (Hanawalt)	XP12RO XP20S	Ganeson et al. 1982
Stanford University (Friedberg)	XP12RO u.a.	Schultz et al. 1985, Barbis et al. 1986
University of California, San Francisco (Cleaver)		Cleaver 1984, Karentz und Cleaver 1986
Keio University Tokio (Tamura)	XP20S	Takano et al. 1982

Tabelle 10: Arbeitsgruppen, in denen genomische Transfektionen in XP-Zellen durchgeführt wurden.

In einigen Arbeitsgruppen wurden alternativ zu genomischen Donor-DNA's cDNA-Genbibliotheken zur Transfektion von XP-Zellen verwendet, die, in eukaryotische Expressionsvektoren kloniert, den Vorteil boten, nur die meist wesentlich kleineren codierenden Genbereiche zu enthalten. Bisher gibt es keine Berichte über einen Erfolg dieser Bemühungen.

Als mögliche Gründe für das durchweg berichtete Scheitern genomischer Transfektionsexperimente werden vor allem eine komplexe Organisation bzw. außergewöhnliche Größe des XPA-Gens diskutiert (Cleaver 1983). Ein Vergleich der Mutationsfrequenzen,

die durch die Behandlung heterozygoter XPA-Zellen mit dem alkylierenden Agens Ethylmethansulfonate (EMS) induziert wurden, zu 6-Thioguanin-Resistenz bzw. Reparaturdefizienz ergab für letztere höhere Werte. Aufgrund der bekannten Größe des für die Thioguaninresistenz verantwortlichen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gens (HPRT, 34kb) wurde die Größe des XPA-Gens auf 25-77kb geschätzt (Cleaver 1984). Solche Gengrößen sind für eukaryotische Organismen nicht ungewöhnlich. Aus *Drosophila* wurden mit Ultrabithorax (>70kb, Bender et al. 1983) und Antennapedia (>100kb, Garber et al. 1983, Scott et al. 1983) zwei Gene isoliert, die in diesem Bereich und noch darüber liegen. Die für Transfektionsexperimente erforderlichen Manipulationen der Donor-DNA (Präparation, Präzipitation) schränken den erfolgreichen intakten Transfer großer Gene jedoch ein.

Erfolgreiche Gentransferexperimente mit genomischen Donor-DNA's erfordern außerdem den intakten und funktionellen Transfer mindestens eines haploiden Genoms, im Fall menschlicher DNA 3.2×10^9 bp, in die jeweiligen Rezipientenzellen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten DNA-Aufnahmecharakteristika verschiedener transformierter Zelllinien weisen diesen Parameter als kritisch für alle Transfektionsexperimente aus. Die hier verwendeten XP-Zellen (XP12RO) exprimierten kleine, selektionierbare Markergene mit hoher Frequenz ($2-7 \times 10^{-4}$), doch die meisten der markerpositiven Zellklone enthielten nur sehr wenig (<50kb) hochmolekulare Träger-DNA. Nur eine kleine Subpopulation dieser Klone nahm signifikant mehr DNA auf (>100kb). Darüber hinaus kann die geforderte Intaktheit der transfizierten Sequenzen in vielen Fällen nicht gewährleistet werden. Verschiedene unabhängige Untersuchungen stellten bereits

nach dem Transfer von relativ kleinen Genen (1-5kb) in eukaryotische Rezipientenzellen Mutationsraten von einem bis mehreren Prozent fest (Ashman und Davidson 1984, Calos et al. 1983, Lebkowski et al. 1983, Razzaque et al. 1983, Sarkar et al. 1984). Außerdem kommt es zu Rekombinationsereignissen zwischen repetitiven DNA-Elementen (Roberts et al. 1983) und zu größeren Deletionen (Finberg et al. 1986).

Nagerzelllinien scheinen allgemein bessere Rezipienten für genomische Transfektionsexperimente zu sein als menschliche Zellen. Die meisten erfolgreichen Gentransferexperimente wurden mit Nagerrezipienten durchgeführt (Wigler et al. 1977, 1978, 1979a+b, Perucho et al. 1980). Alle bisher erfolgreichen Reparaturgentransfers fanden ebenfalls in Nagerzelllinien statt (Rubin et al. 1983, 1985, Mac Innes et al. 1984, Westerveld et al. 1984, Thompson et al. 1985a+b, Ding et al. 1985, Kaina et al. 1987). Dagegen verliefen alle Experimente mit reperaturdefizienten menschlichen Zelllinien negativ. Neben Xeroderma Pigmentosum (s.o.) trifft dies für Zelllinien von Patienten mit der autosomal rezessiven Erbkrankheit Ataxia Telangiectasia (AT) zu, die sensitiv sind für γ -Strahlung (Lehmann 1985, Lohrer 1986) und für Zelllinien von Patienten, die an Fanconi Anämie (FA) leiden und sensitiv sind gegenüber DNA-Schädigungen durch quervernetzende Agentien wie Mitomycin C (M.Buchwald, pers. Mitteilung).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene erfolgreiche Isolierung eines intermediär UV-sensitiven XPA-Klons durch DNA-Transfektion unterschied sich vor allem in zwei Punkten von den in anderen Laboratorien durchgeführten Experimenten. Die Verwendung der XP12RO tk⁻¹ Rezipientenzelllinie, die deutlich

UV-sensitiver war als die Parentalzelle, erlaubte die Verwendung eines sehr sanften UV-Selektionsprotokolls, das trotzdem alle Mutantenzellen quantitativ abtötete. Das beispielsweise in Rotterdam praktizierte Bestrahlungsprotokoll von 3mal $3.6\text{J}/\text{m}^2$ (in 24-stündigen Intervallen, J.Hoeijmakers, pers.Mitteilung) überlebten 150 in eine Population von 4×10^5 XP-Zellen eingesäte Zellen unseres Intermediärklons nMII5 nicht, während nach dem hier verwendeten Protokoll von 3mal $1.7\text{J}/\text{m}^2$ (in 48-stündigen Intervallen) mehr als 50 Prozent koloniebildungsfähige Zellen übrig blieben. Dennoch wurden nie, wie das nach Bestrahlungszyklen mit niederen Dosen für andere XP-Zellen beschrieben wurde (Royer-Pokora et al. 1984), Spontanrevertanten isoliert.

Wegen der in Nagerzellen nachgewiesenen niedrigeren Excisions-Reparaturrate (Painter und Cleaver 1969, Fox und Fox 1973, Takebe et al. 1974, Hart und Setlow 1974, Yagi 1982, Yagi et al. 1984) wurde Maus-DNA in anderen Arbeitsgruppen nicht als Donor in Transfektionsexperimenten eingesetzt. Nagerzellen überleben jedoch UV-Bestrahlung ebensogut wie menschliche Wildtypzellen (Ganesan et al. 1983) und sind in der Lage, DNA-Reparatursynthese durchzuführen (Peleg et al. 1976, Meek et al. 1980, Lin und Ruddle 1981), mit allerdings langsamerer Kinetik (Ganesan et al. 1983, Vijg et al. 1984).

Durch Fusion mit Mauszellen konnte gezeigt werden, daß das Maus-Chromosomen 4 den XPA-Defekt komplementiert (Lin und Ruddle 1981). Dennoch ist nicht gesichert, daß die Excisionsreparatur von Mensch und Nagern auf demselben Mechanismus beruht. Komplementationsanalysen durch Fusion von UV-sensitiven CHO-Zelllinien (5 Komplementationsgruppen, Thompson et al. 1981, Thompson und Carrano 1983) mit den 9 XP-Komplementationsgruppen

erbrachten das überraschende Ergebnis, daß sich keine der untersuchten Gruppen bei Mensch und Hamster entsprachen (Thompson et al. 1985c). Sollten beide dennoch demselben Mechanismus unterliegen, so müssen am Excisionsreparatursystem wesentlich mehr als 14 Gene beteiligt sein (Downes 1986). In jedem Fall könnte das den XPA-Defekt komplementierende Mausgen kleiner und/oder besser selektionierbar sein als das entsprechende menschliche Gen und den erfolgreichen Transfer in XPA-Zellen erklären.

Die Möglichkeit, daß es sich beim Intermediärklon nMII5 um eine Spontanrevertante handelt, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. In den zahlreichen mit XP12RO tk⁻¹-Zellen durchgeführten Experimenten wurden niemals nach UV-Bestrahlung spontan auftretende Reversionsereignisse beobachtet. Außerdem gelang die Isolierung eines intermediär UV-sensitiven XP-Klons nur nach Transfektion genomischer Maus-DNA. Spontanrevertanten, die in anderen Laboratorien von Fall zu Fall isoliert wurden, waren stets fast ebenso UV-resistent wie menschliche Wildtypzellen (Cleaver 1983). Schließlich spricht die Isolierung des λ -Klons L71a aus der nMII5-Genbibliothek, der Maus-DNA enthält und nach Transfektion in XPA-Zellen und UV-Selektion intermediär UV-sensitive Klone produzierte eindeutig für die Annahme, daß das intermediäre Verhalten der nMII5-Zellen durch die Aufnahme eines komplementierenden Mausgens verursacht wurde. Der nur intermediäre Phänotyp sowohl des nMII5-Klons als auch der UV-selektionierten L71a-Transfektanten kann mehrere Ursachen haben. Bei Verwendung heterologer Donor-DNA's kann a priori keine hundertprozentige Komplementation erwartet werden (Westerveld et al. 1984). Außerdem kann das komplementierende Gen durch den Transfektionsprozeß in Mitleidenschaft gezogen und gegenüber der

Situation in zellulärer Maus-Wildtyp DNA mutiert, rearrangiert oder auch partiell deletiert sein. Auch ein gänzlich anders organisiertes Excisionsreparatursystem von Nagerzellen könnte in einer nur unvollständigen Komplementation von XPA-Zellen resultieren.

Nach Transfektion des λ -Klons L71a in XPA-Rezipientenzellen und anschließender UV-Selektion überlebten Zellpopulationen, die die DNA des λ -Klons stabil integriert hatten und annähernd dieselbe intermediäre UV-Sensitivität aufwiesen wie Zellen des Intermediärklons nMII5. Transfektionen des ebenfalls Maus-DNA enthaltenden λ -Klons L11a erzielten diesen Effekt nicht. Parallel dem UV-Selektionsprotokoll unterworfenen XPA-Zellen, die nicht oder nur mit pSV2-neo und Kalbsthymus Träger-DNA transfiziert waren, starben quantitativ ab. Dieses Resultat spricht für die Anwesenheit eines den XPA-Reparaturdefekt partiell komplementierenden Mausgens auf dem λ -Klon L71a. Die weitere Untersuchung dieses Klons könnte daher zur Aufklärung der Excisionsreparaturprozesse bei Säugern und zum Verständnis der molekularen Grundlagen der Erbkrankheit Xeroderma Pigmentosum beitragen.

LITERATURVERZEICHNIS

Abrahams, P.J. und van der Eb, A.J. (1976)

Host-cell reactivation of ultraviolet-irradiated SV40 DNA in five complementation groups of Xeroderma Pigmentosum.

Mutat. Res. 35:13-22.

Andrews, A.D., Barrett, S.F. und Robbins, J.H. (1978)

Xeroderma pigmentosum neurological abnormalities correlate with colony-forming ability after ultraviolet radiation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1984-1988.

Arase, S., Kozuka, T., Tanaka, K., Ikenaga, M. und Takebe, H. (1979)

A sixth complementation group in Xeroderma pigmentosum.

Mutat. Res. 59:143-146.

Arlett, C.F. und Lehmann, A.R. (1978)

Human disorders showing increased sensitivity to the induction of genetic damage.

Ann. Rev. Genet. 12:95-115.

Ashman, C.R. und Davidson, R.L. (1984)

High spontaneous mutation frequency in shuttle vector sequences recovered from mammalian cellular DNA.

Mol. Cell. Biol. 4:2266-2272.

Barbis, D.P., Schultz, R.A. und Friedberg, E.C. (1986)

Isolation and partial characterization of virus-transformed cell lines representing the A, G and variant complementation groups of Xeroderma pigmentosum.

Mutat. Res. 165:175-184

Bar-Nun, S., Shneyour, Y. und Beckmann, J.S. (1983)

G418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes.

Biochim. Biophys. Acta 741:123-127.

Bellard, F., Sassone-Corsi, A. und Chambon, P. (1981)

A reliable method for the recovery of DNA-fragments from agarose and acrylamide gels.

Anal. Biochem. 112:295-298.

Bender, W., Akam, M., Karch, F., Beachy, P.A., Pfeifer, M., Spierer, P., Lewis, E.B. und Hogness, D.S. (1983)

Molecular genetics of the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*.

Science 221:23-29.

Benton, W.D. und Davis, R.W. (1977)

Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ.

Science 196:180+181.

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979)

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucl. Acids Res. 7:1513-1523.

Blochinger, K. und Diggelmann, H. (1984)

Hydromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments in higher eukaryotic cells.

Mol. Cell. Biol. 4:2929-2932.

Bootsma, D., Mulder, M.P., Pot, F. und Cohen, J.A. (1970)

Different inherited levels of DNA repair replication in Xeroderma pigmentosum cell strains after exposure to ultraviolet irradiation.

Mutat. Res. 9:507-516.

Bootsma, D. (1978)

Xeroderma Pigmentosum. In: DNA-repair mechanisms. Hanawalt, P.C., Friedberg, E.C. und Fox, C.F. (Hrg); Academic Press, New York; S.589-601.

Brennand, J. und Margison, G.P. (1986)

Reduction of the toxicity and mutagenicity of alkylating agents in mammalian cells harboring the Escherichia coli alkyltransferase gene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6292-6296.

Britten, R.J. und Kohne, D.E. (1968)

Repeated sequences in DNA.

Science 161:529-540.

Calos, M.P., Lebkowski, J.S. und Botchan, M.R. (1983)

High mutation frequency in DNA transfected into mammalian cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3015-3019.

Chu, G. und Berg, P. (1985)

Rapid assay for detection of E. coli xanthine-guanine-phosphoribosyltransferase activity in transduced cells.

Nucl. Acids Res. 13:2921-2930.

Church, G.M. und Gilbert, W. (1984)

Genomic sequencing.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995.

Clarke, L. und Carbon, J. (1976)

A colony bank containing synthetic Col EI Hybrid plasmid representative of the entire E. coli genome.

Cell 9:91-99.

Cleaver, J.E. (1968)
Defective Repair Replication of DNA in Xeroderma Pigmentosum.
Nature 218:652-656.

Cleaver, J.E. (1969)
Xeroderma Pigmentosum: a human disease in which an initial stage of
DNA repair is defective.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63:428-435.

Cleaver, J.E. (1972)
Xeroderma Pigmentosum: variants with normal DNA repair and normal
sensitivity to ultraviolet light.
J. Invest. Dermatol. 58:124-128.

Cleaver, J.E. und Bootsma, D. (1975)
Xeroderma pigmentosum: biochemical and genetic characteristics.
Ann. Rev. Genet. 9:19-38.

Cleaver, J.E., Bootsma, D. und Friedberg, F.C. (1975)
Human diseases with genetically altered DNA repair processes.
Genetics 79:215-225.

Cleaver, J.E. (1983a)
Xeroderma pigmentosum. In: The metabolic basis of inherited disease;
Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. und
Brown, M.S. (Hrg.); McGraw-Hill, New York; S.1227.

Cleaver, J.E. (1983b)
Workshop summary: DNA repair in normal and repair defective human
cells. In: Cellular responses to DNA damage, Friedberg, E.C. und
Bridges, B.A. (Hrg.); Alan R. Liss, New York, S.327-330.

Cleaver, J.E. (1984)
Defective DNA repair and cancerprone disorders of man.
In: Genes and Cancer, Bishop, J.M., Rowley, J.D. und Greaves, M. (Hrg.);
Alan R. Liss, New York; S.117-135.

Colbere-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P. und Garapin, A.-C.
(1981)
A new dominant hybrid selective marker gene for higher eukaryotic
cells.
J. Mol. Biol. 150:1-14.

Daniels, P.J.L., Yehaskel, A.S. und Morton, J.B. (1973)
The structure of antibiotic G418

- 13th interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy, Washington, 1973; Abs.137.
- Davies, J. und Jiminez, A. (1980)
A new selective agent for eukaryotic cloning vectors.
Am.J.Trop.Med.Hyg. 29(5):Suppl. 1089-1092.
- Davies, R.L., Fuhrer-Krusi, S. und Kucherlapati, R.S. (1982)
Modulation of transfected gene expression mediated by changes in chromatin structure.
Cell 31:521-529.
- Davies, R.W., Botstein, D. und Roth, J.R. (1980)
Advanced bacterial genetics, S. 70-116.
Cold Spring Harbor Laboratory.
- Debenham, P.G. und Webb, M.B.T. (1984)
The effect of X-rays and ultraviolet light on DNA-mediated gene transfer in mammalian cells.
Int.J.Radiat.Biol. 46:555-568.
- Defais, M.J., Hanawalt, P.C. und Sarasin, A.R. (1983)
Viral probes for DNA-repair.
Advances in Radiation Biology 10:1-37.
- de Jonge, A.J.R., Vermeulen, W., Klein, B. und Hoeijmakers, J.H.J. (1983)
Microinjection of human cell extracts corrects Xeroderma pigmentosum defect.
EMBO J. 2:637-641.
- de Jonge, A.J.R., Vermeulen, W., Keijzer, W., Hoeijmakers, J.H.J. und Bootsma, D. (1985)
Microinjection of *Micrococcus luteus* UV-endonuclease restores UV-induced unscheduled DNA synthesis in cells of 9 xeroderma pigmentosum complementation groups.
Mutat.Res. 150:99-105.
- de Sanctis, C. und Cacchione, A. (1932)
L'idiozia xerodermica.
Riv.Sper.Frentiatr. 56:269-292.
- de Weerd-Kastelein, E.A., Keijzer, W. und Bootsma, D. (1972)
Genetic heterogeneity of Xeroderma pigmentosum demonstrated by somatic cell hybridization.
Nature New Biol. 238:80-83.
- de Weerd-Kastelein, E.A., Keijzer, W., Rainaldi, G. und Bootsma, D.

- (1977)
Induction of sister chromatid exchanges in xeroderma pigmentosum cells after exposure to ultraviolet light.
Mutat. Res. 45:253-261.
- Ding, R., Ghosh, K., Eastman, A. und Bresnick, E. (1985)
DNA-mediated transfer and expression of a human DNA repair gene that demethylates O⁶-Methylguanine.
Mol. Cell. Biol. 5:3293-3296.
- Doniger, J., Jacobsen, E. D., Krell, K. und Di Paolo, J. A. (1981)
Ultraviolet light action spectra for neoplastic transformation and lethality of Syrian hamster embryo cells correlate with spectrum for pyrimidine dimer formation in cellular DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2378-2382.
- Downes, C. S. (1986)
Molecular biology of DNA repair. Report on a conference at Owens Park, Manchester, 16-18 April 1986.
Mutat. Res. 166:221-226.
- Finberg, F. C., Sunnerhagen, P. und Bjursell, G. (1986)
New, small circular DNA in transfected mammalian cells.
Mol. Cell. Biol. 6:653-662.
- Fischer, E., Thielmann, H. W., Neundörfer, B., Rentsch, F. J., Edler, L. und Jung, E. G. (1982)
Xeroderma Pigmentosum patients from Germany: clinical symptoms and DNA repair characteristics.
Arch. Dermatol. Res. 274:229-247.
- Fischer, E., Keijzer, W., Thielmann, H. W., Popanda, O., Bohnert, E., Edler, L., Jung, E. G. und Bootsma, D. (1985)
A ninth complementation group in Xeroderma pigmentosum, XPI
Mutat. Res. 145:217-225.
- Fornace, A. J., Kohn, K. W. und Kann, H. E. (1976)
DNA single-strand breaks during repair of UV damage in human fibroblasts and abnormalities in xeroderma pigmentosum.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:39-43.
- Fox, M. und Fox, B. W. (1973)
Repair replication after UV-irradiation in rodent cell-lines of different sensitivity.
Int. J. Radiat. Biol. 23:359-376.
- Friedberg, E. C., Ehmann, U. K. und Williams, J. I. (1979)

Human diseases associated with defective DNA repair.
Adv. Rad. Biol. 8:85-174.

Friedberg, E.C., Naumovski, L., Yang, E., Pure, G.A., Schultz, R.A., Weiss, W. und Love, J.D. (1983)
Approaching the biochemistry of excision repair in eukaryotic cells: the use of cloned genes from *Saccharomyces cerevisiae*. in: Cellular responses to DNA damage, Friedberg, E.C. und Bridges, B.A. (Hrg.), S.63-75, Alan R. Liss, N.Y.

Friedberg, E.C. (1985)
DNA repair.
Freeman and Compagny, San Fransisco. USA

Friedmann, T. (1983)
Gene therapy. Fact and Fiction. A Banbury public information report.
Cold Spring Harbor Laboratory.

Frischauf, A.-M., Lehrach, H., Poustka, A. und Murray, N. (1983)
Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences.
J. Mol. Biol. 170:827-842.

Fromm, M. und Berg, P. (1982)
Deletion mapping of DNA regions required for SV40 early region promotor function in vivo.
J. Mol. Appl. Genet. 1:457-481.

Ganesan, A., Spivak, G. und Hanawalt, P. (1982)
Expression of DNA repair genes in mammalian cells; in: Nagely, P., Linnane, A.W., Peacock, W.J. und Pateman, T.A. (Hrg.), Manipulation and expression of genes in eukaryotes, Academic Press, New York, S.45-54.

Garber, R.L., Kuroiwa, A. und Gehring, W.J. (1983)
Genomic and cDNA clones of the homeotic locus Antennapedia from *Drosophila*.
EMBO J. 2:2027-2036

Giannelli, F., Pawsay, S.A. und Avery, J.A. (1982)
Differences in patterns of complementation of the more common groups of xeroderma pigmentosum: possible implications.
Cell 29:451-458.

Gillen, J., Willis, D.K. und Clark, A.J. (1981)
Genetic analysis of the *recE* pathway of genetic recombination in *E. coli* K12.
J. Bacteriol. 145:521-531.

- Glover, T.W., Chang, C.-C., Trosko, J.E. und Li, S.S. (1979)
Ultraviolet light induction of diphteria toxin-resistant mutants in normal and xeroderma pigmentosum human fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3982-3986.
- Goldfarb, M., Shimizu, K. und Wigler, M. (1982)
Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells
Nature 296:404-409.
- Gorman, C., Padmanabhan, R. und Howard, B. (1983)
High efficiency DNA-mediated transformation of primate cells.
Science 221:551-553.
- Gorman, C. (1985)
High efficiency gene transfer into mammalian cells.
in Glover, D.M. (Ed), DNA cloning Vol. II, a practical approach. IRL Press, Oxford, 1985, S.143-190.
- Grafstrom, R.H., Park, L. und Grossman, L. (1982)
Enzymatic repair of pyrimidine dimer containing DNA.
J. Biol. Chem. 257:13465-13474.
- Graham, F.L. und van der Eb, A.J. (1973).
A new technique for the assay of infectivity of human Adenovirus 5 DNA.
Virology 52:456-467.
- Gritz, L. und Davies, J. (1983)
Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in E. coli and Saccharomyces cerevisiae.
Gene 25:179-188.
- Grosveld, G.G., Lund, T., Murray, E.J., Mellor, A.L., Dahl, H.H.M. und Flavell, R.A. (1982)
The construction of cosmid libraries which can be used to transform eukaryotic cells.
Nucl. Acids. Res. 10:6715-6732.
- Hilwig, I. und Gropp, A. (1972)
A DNA-binding fluorochrome useful for chromosome staining.
Exp. Cell Res. 75:122
- Hori, T.-A., Shiomi, T. und Sato, K. (1983)
Human chromosome 13 compensates a DNA repair defect in UV-sensitive mouse cells by mouse-human cell hybridization.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:5655-5659

Hanahan, D. (1983)

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.

J. Mol. Biol. 166:557-580.

Hanawalt, P.C., Cooper, P.K., Ganesan, A. und Smith, C.A. (1979)

DNA repair in bacteria and mammalian cells.

Ann. Rev. Biochem. 48:783-836.

Hart, R.W. und Setlow, R.B. (1974)

Correlation between DNA excision-repair and life-span in a number of mammalian species.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71:2169-2173.

Hart, R.W., Setlow, R.B. und Woodhead, A.D. (1977)

Evidence that pyrimidine dimers in DNA can give rise to tumors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5574-5578.

Hashem, N., Bootsma, D., Keijzer, W., Greene, A., Coriell, L., Thomas, F. und Cleaver, J.E. (1980)

Clinical characteristics, DNA repair, and Complementation groups in Xeroderma Pigmentosum patients from Egypt.

Cancer Res. 40:13-18.

Hayakawa, H., Ishizaki, K., Inoue, M., Yagi, T., Sekiguchi, M. und Takebe, H. (1981)

Repair of ultraviolet radiation damage in xeroderma pigmentosum cells belonging to complementation group F.

Mutat. Res. 80:381-388.

Hebra, F. und Kaposi, M. (1874)

On diseases of the skin including the exanthemata, 3:252-258.

Herrlich, P., Angel, P., Rahmsdorf, H.J., Mallick, U., Pötting, A., Hieber, L., Lücke-Huhle, C. und Schorpp, M. (1986)

Adv. Enzyme Reg. 25:485-504.

Herrlich, P., Mallick, U., Ponta, H. und Rahmsdorf, H.J. (1984)

Genetic changes in mammalian cells reminiscent of an SOS response.

Hum. Genet. 67:360-368.

Howell, J.N., Greene, M.H., Corner, R.C., Maher, V.M. und McCormick, J.J. (1984)

Fibroblasts from patients with hereditary cutaneous malignant melanoma are abnormally sensitive to the mutagenic effect of simulated sunlight and 4-nitroquinoline 1-oxide.

- Ishiura, M., Hirose, S., Uchida, T., Hamad, Y., Suzuki, G. und Okada, G. (1984).
Phage particle-mediated gene transfer to cultured mammalian cells.
Mol. Cell. Biol. 2(6):607-616
- Jaspers, N.G.J. und Bootsma, D. (1982)
Abnormal levels of UV-induced unscheduled DNA synthesis in ataxia telangiectasia cells after exposure to ionizing radiation.
Mutat. Res. 92:439-446.
- Jelinek, W.R. und Schmid, C.W. (1982)
Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression.
Ann. Rev. Biochem. 51:813-844.
- Jeggo, P.A. und Kemp, L.M. (1983)
X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell line; isolation and cross-sensitivity to other DNA-damaging agents.
Mutat. Res. 112:313-327.
- Jiminez, A. und Davies, J. (1980)
Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*.
Nature 287:869-871.
- Jorgensen, R.A., Rothstein, S.I. und Reznikoff, W.S. (1979)
A restriction enzyme cleavage map of Tn5 and location of a region encoding neomycin resistance.
Mol. Gen. Genet. 177:65-72
- Kafatos, F.C., Jones, C.W. und Efstratiadis, A. (1979)
Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure.
Nucl. Acid. Res. 7:1541-1552.
- Kaina, B., van Zeeland, A.A., Backendorf, C., Thielmann, H.W. und van de Putte, P. (1987)
Transfer of human genes conferring resistance to methylating mutagens but not to UV-irradiation and crosslinking agents into CHO cells.
Mol. Cell. Biol.: in Druck
- Kano, Y. und Fujiwara, Y. (1983)
Defective thymine dimer excision from xeroderma pigmentosum chromatin and its characteristic catalysis by cell-free extracts.
Carcinogen. 4:1419-1424
- Karentz, D. und Cleaver, J.E. (1986)

Repair-deficient xeroderma pigmentosum cells made UV light resistant by fusion with x-ray-inactivated chinese hamster cells.

Mol. Cell. Biol. 6:3428-3432

Karn, J., Brenner, S., Barnett, L. und Cesareni, G. (1980)

Novel bacteriophage λ cloning vector.

Proc, Natl. Acad. Sci. USA 77:5172-5176.

Kawai, S. und Nishizawa, M. (1984)

New procedure for DNA transfection with polycation and dimethylsulfoxide.

Mol. Cell. Biol. 4:1172-1174.

Keijzer, W., Jaspers, N.G., Abrahams, P.J., Taylor, A.M., Arlett, C.F., Zelle, B., Takebe, H., Kinmont, P.D. und Bootsma, D. (1979)

A seventh complementation group in excision-deficient xeroderma pigmentosum.

Mutat. Res. 62:183-190.

Keijzer, W., Verkerk, A. und Bootsma, D. (1982)

Phenotypic correction of the defect in xeroderma pigmentosum cells after fusion with isolated cytoplasts.

Exp. Cell Res. 140:119-125.

Kenyon, C.J. (1983)

The bacterial response to DNA damage

Trends Biochem. Sci. 8:84-87

Keyse, S.M., Moss, S.H. und Davies, D.J.G. (1983)

Action spectra for inactivation of normal and xeroderma pigmentosum human skin fibroblasts by ultraviolet radiations.

Photochem. Photobiol. 37:307-312

Kleijer, W.J., Lohman, P.H., Mulder, M.P. und Bootsma, D. (1970)

Repair of x-ray damage in DNA of cultivated cells from patients having Xeroderma Pigmentosum.

Mutat. Res. 9:517-523

Kreamer, K.H., DeWeerd-Kastelein, E.A., Robbins, J.H., Keijzer, W., Barrett, S.F., Petinga, R.A. und Bootsma, D. (1975)

Five complementation groups in Xeroderma Pigmentosum.

Mutat. Res. 33:327-340

Kramerov, D.A., Grigoryan, A.A. Ryskov, A.P. und Georgiev, G.P. (1979)

Long double-stranded sequences (dsRNA-B) of nuclear pre-mRNA consist of a few highly abundant classes of sequences: evidence from DNA cloning experiments.

Nucl. Acids Res. 6:697-713.

Krayev, A.S., Kramerov, D.A., Skryabin, K.G., Ryskov, A.P., Bayer, A.A. und Georgiev, G.P. (1980)

The nucleotide sequence of the ubiquitous repetitive DNA sequence B1 complementary to the most abundant class of mouse fold back RNA.

Nucl. Acids Res. 8:1201-1215.

Lavi, S. und Etkin, S. (1981)

Carcinogen-mediated induction of SV40 DNA synthesis in SV40 transformed Chinese hamster embryo cells.

Carcinogen. 2:417-423.

Leach, D.R.F. und Stahl, F.W. (1983)

Viability of λ -phages carrying a perfect palindrome in the absence of recombination nucleases.

Nature 305:448-451

Lebkowski, J., Botchan, M. und Calos, M. (1983)

Spontaneous mutation of DNA transfected into mammalian cells.

In: Cellular responses to DNA damage, Friedberg, E.C. und Bridges, B.A. (Hrg.) S.603-614. Alan R. Liss, New York.

Lebkowski, J.S., Du Bridge, R.B., Antell, E.A., Greisen, K.S. und Calos, M.P. (1984)

Transfected DNA is mutated in monkey, mouse and human cells.

Mol. Cell. Biol. 4:1951-1960.

Legerski, R.J., Brown, D.B., Peterson, C.A. und Robberson, D.L. (1984)

Transient complementation of Xeroderma pigmentosum cells by microinjection of poly(A)⁺RNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5676-5679.

Lehmann, A.R., Kirk-Bell, S., Arlett, C.F., Paterson, M.C., Lohmann, P.H., de Weerd-Kastelein, E.A. und Bootsma, D. (1975)

Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:219-233.

Lehmann, A.R. (1985)

Use of recombinant DNA techniques in cloning DNA repair genes and in the study of mutagenesis in mammalian cells.

Mutat. Res. 150:61-67.

Lin, P.-F. und Ruddle, F. (1981)

Murine DNA repair gene located on chromosome 4.

Nature 289:191-194.

Lindhahl, T. (1982)

DNA repair enzymes.

Ann. Rev. Biochem. 51:61-87.

Little, J.W. und Mount, D.W. (1982)

The SOS regulatory system of *Escherichia coli*.

Cell 29:11-22.

Loenen, W.A.M. und Brammar, W.J. (1980)

A bacteriophage lambda vector for cloning large DNA fragments made with several restriction enzymes.

Gene 10:249-259.

Loening, U.E. (1967)

The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis.

Biochem. J. 102:251-257.

Lohrer, H. (1986)

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

Dissertation, Universität Karlsruhe.

Lopata, M.A., Cleveland, D.W. und Sollner-Webb, B. (1984)

High level transient expression of a CAT-gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a DMSO or glycerol shock treatment.

Nucl. Acids Res. 12:5707-5717.

Lowy, D.R., Rands, E. und Scolnick, E.M. (1978).

Helper-independent transformation by unintegrated Harvey Sarcoma Virus DNA.

J. Virol. 26:291-298.

Lücke-Huhle, C., Pech, M. und Herrlich, P. (1986)

Selective gene amplification in mammalian cells after exposure to ^{60}Co - γ -rays, ^{241}Am α -particles, or UV light.

Radiat. Res. 106:345-355.

Mac Innes, M.A., Bingham, J.M., Thompson, L.H. und Strniste, G.F. (1984)

DNA-mediated co-transfer of excision repair capacity and drug resistance into CHO mutant cell line UV-135.

Mol. Cell. Biol. 4:1152-1158.

Maher, V.M., McCormick, J.J., Grover, P.L. und Sims, P. (1977)

Effect of DNA repair on the cytotoxicity and mutagenicity of polycyclic hydrocarbon derivatives in normal and Xeroderma pigmentosum

human fibroblasts.

Mutat. Res. 43:117-138.

Maher, V.M., Dorney, D.J., Mandrala, A.L., Konze-Thomas, B. und McCormick, J.J. (1979)

DNA excision repair processes in human cells can eliminate the cytotoxic and mutagenic consequences of ultraviolet irradiation. Mutat. Res. 62:311-323.

Maher, V.H., Rowan, L.A., Silinskas, K.C., Kateley, S.A. und McCormick, J.J. (1982)

Frequency of UV-induced neoplastic transformation of diploid human fibroblasts is higher in Xeroderma pigmentosum cells than in normal cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:2613-2617.

Maitland, H. und McDougall, J. (1977)

Biochemical transformation of mouse cells by fragments of Herpes simplex virus DNA.

Cell 11:233-241.

Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., Sim, D.K. und Efstratiadis, A. (1978)

The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. Cell 15:687-701.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982)

Molecular Cloning. A laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory.

Mc Knight, S.L. (1980)

The nucleotide sequence and transcript map of the herpes simplex virus thymidine kinase gene.

Nucl. Acids Res. 8:5949-5964.

Meek, R.L., Rebeiro, T. und Daniel, C.W. (1980)

Patterns of unscheduled DNA synthesis in mouse embryo cells associated with in vitro aging and with spontaneous transformation to a continuous cell line.

Exp. Cell Res. 129:265-271.

Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M.R. (1984),

Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter.

Nucl. Acids Res. 12:7035-7056.

Mortelmans, K., Friedberg, E.C., Slor, H., Thomas, G. und Cleaver, J.E. (1976)

Defective thymine dimer excision by cell free extracts of Xeroderma pigmentosum cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:2757-2761.

Moshell, A.N., Ganges, M.B., Lutzner, M.A., Coon, H.G., Barrett, S.F., Dupuy, J.-M. und Robbins, J.H. (1983)

A new patient with both xeroderma pigmentosum and cockayne syndrome established the new xeroderma pigmentosum complementation group H, in: Cellular responses to DNA damage. Friedberg, E.C. und Bridges, B.A. (Hrs.), Alan R. Liss, New York, S.209-213.

Mulligan, R.C. und Berg, P. (1981a)

Selection for animal cells that express the E.coli gene coding for Xanthine phosphoribosyltransferase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(4):2072-2076.

Mulligan, R.C. und Berg, P. (1981b)

Factors governing the expression of a bacterial gene in mammalian cells.

Mol. Cell. Biol. 1 (5):449-459.

Murray, K. und Murray, N.E. (1975)

Phage Lambda receptor chromosomes for DNA fragments made with Restriction Endonuclease III of Haemophilus influenzae and Restriction Endonuclease I of Escherichia coli.

J. Mol. Biol. 98:551-564

Murray, N.E. (1983)

Phage Lambda and molecular cloning; in R.Hendrix, J.Roberts, F.Stahl, R.Weisberg (Hrg), Lambda II, S.395-432. Cold Spring Harbor Laboratory.

Nakabeppu, Y. und Sekiguchi, M. (1981).

Physical association of pyrimidine DNA glycosylase and apurinic /apyrimidinic DNA endonuclease essential for repair of ultraviolet-damaged DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1742-1746.

Neumann, E. Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. und Hofschneider, P.H. (1982)

Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields.

EMBO J. 1:841-845.

Nikaido, T., Nakai, S. und Honjo, T. (1981)

Switch region of immunoglobulin C μ gene is composed of simple tandem repetitive sequences.

Nature 292:845-848

Okayama, H. und Berg, P. (1983)

A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells.

Mol. Cell. Biol. 3:280-289.

Okayama, H. und Berg, P. (1985)

Bacteriophage Lambda vector for transducing a cDNA clone library into mammalian cells.

Mol. Cell. Biol. 5(5):1136-1142.

Painter, R.B. und Cleaver, J.E. (1969)

Repair replication, unscheduled DNA synthesis, and the repair of mammalian DNA.

Radiation Res. 37:451-466.

Parker, B.A. und Stark, G.R. (1979)

Regulation of SV40 Transcription: sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA.

J. Virol. 31:360-369.

Peleg, L., Raz, E. und Ben-Ishai, R. (1976)

Changing capacity for DNA excision repair in mouse embryonic cells in vitro.

Exp. Cell Res. 104:301-307.

Pellicier, A., Robins, D., Wold, B., Sweet, R., Jackson, J., Lowy, I., Roberts, J.M., Sim, G.K., Silverstein, S. und Axel, R. (1980).

Altering genotype and phenotype by DNA-mediated gene transfer.

Science 209:1414-1422

Perucho, M., Hanahan, D. und Wigler, M. (1980)

Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells.

Cell 22:309-317.

Poustka, A., Rackwitz, H.-R., Frischauf, A.-M., Hohn, B. und Lehrach, H. (1984)

Selective isolation of cosmid clones by homologous recombination in E. coli.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4129-4133.

Protic-Sabljić, M., Whyte, D.B., Fagan, J. und Kraemer, K. (1983)

Transfection of xeroderma pigmentosum cells with cloned DNA In:

- Cellular responses to DNA damage, Friedberg, E.C. und Bridges, B.A. (Hrg), S.647-656, Alan R. Liss, New York.
- Protic-Sabljić, M. und Kraemer, K.H. (1985a)
One pyrimidine dimer inactivates expression of a transfected gene in xeroderma pigmentosum cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6622-6626
- Protic-Sabljić, M., Whyte, D., Fagan, J., Howard, B., Gorman, C., Padmanabhan, R. und Kraemer, K.H. (1985b)
Quantification of expression of linked cloned genes in a SV40-transformed Xeroderma Pigmentosum cell line.
Mol. Cell. Biol. 5:1685-1693.
- Puck, T.T., Marcus, P.J. und Cieciura, S.J. (1956)
Clonal growth of mammalian cells in vitro.
J. Exp. Med. 103:273.
- Rackwitz, H.-R., Zehetner, G., Frischauf, A.H. und Lehrach, H. (1984).
Rapid restriction mapping of DNA cloned in lambda phage vectors.
Gene 30:195-200.
- Radman, M. (1980)
Is there SOS induction in mammalian cells?
Photochem. Photobiol. 32:823-830
- Rasmussen, R.E. und Painter, R.B. (1966)
Radiation-stimulated DNA synthesis in cultured mammalian cells.
J. Cell. Biol. 29:11-19
- Razzaque, A., Mizusawa, H. und Seidman, M.M. (1983)
Rearrangement and mutagenesis of a shuttle vector plasmid after passage in mammalian cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3010-3014.
- Reeves, R. (1984)
Transcriptionally active chromatin.
Biochim. Biophys. Acta 782:343-393
- Reynolds, R.J. und Friedberg, E.C. (1981)
Molecular mechanism of pyrimidine dimer excision in *Saccharomyces cerevisiae*: incision of ultraviolet-irradiated DNA in vivo.
J. Bacteriol. 146:692-704.
- Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. und Berg, P. (1977)
Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase.

J. Mol. Biol. 113:237-251.

Ringold, G.M., Cardiff, R.D., Varmus, H.E. und Yamamoto, K.R. (1977)
Infection of cultured rat hepatoma cells by mouse mammary tumor virus.
Cell 10:11-18

Robbins, J.H., Kraemer, K.H., Lutzner, M.A., Festoff, B.W. und Coon, H.G. (1974)
Xeroderma pigmentosum. An inherited disease with sun sensitivity, multiple cutaneous neoplasms and abnormal DNA repair.
Ann. Int. Med. 80:221-247.

Roberts, J.M., Buck, L.B. und Axel, R. (1983)
A structure for amplified DNA
Cell 33:53-63.

Robins, D.M., Ripley, S., Henderson, A.S. und Axel, R. (1981)
Transforming DNA integrates into the host chromosome.
Cell 23:29-39.

Royer-Pokora, B., Peterson, W.Jr. und Haseltine, W. (1984a)
Biological and biochemical characterization of an SV40-transformed Xeroderma Pigmentosum cell line.
Exp. Cell Res. 151:408-420

Royer-Pokora, B. und Haseltine, W. (1984b)
Isolation of UV-resistant revertants from a xeroderma pigmentosum complementation group A cell line.
Nature 311:390-392.

Rubin, J.S., Joyner, A.L., Bernstein, A. und Whitmore, G.F. (1983)
Molecular identification of a human DNA repair gene following DNA-mediated gene transfer.
Nature 306:206-208

Rubin, J.S., Prideaux, V.R., Huntington, F.W., Dulhanty, A.M., Whitmore, G.F. und Bernstein, A. (1985)
Molecular cloning and chromosomal localization of DNA sequences associated with a human DNA repair gene.
Mol. Cell. Biol. 5:398-405

Ruddle, F.H. (1979)
Gene transfer in eukaryotes, in: J.E. Celis, A. Graesmann und A. Loyter (Hrg.), Transfer of cell constituents into eukaryotic cells.
Plenum, New York, S.295-309.

- Ruddle, F.H. (1980)
Somatic cell genetics; past, present, and future; in F.E. Arrighi, P.N. Rao und E. Stubblefield (Hrg.), Genes, Chromosomes and Neoplasia. Raven Press, New York, S.7-17.
- Sarcar, A. und Rupp, W.D. (1983)
A novel repair enzyme: uvr ABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region.
Cell 33:249-268.
- Sakar, S., Dasgupta, U.B. und Summers, W.C. (1984)
Error-prone mutagenesis detected in mammalian cells by a shuttle vector containing the supF gene of *Escherichia coli*.
Mol. Cell. Biol. 4:2227-2230.
- Sasaki, M.S. (1973)
DNA repair capacity and susceptibility to chromosome breakage in *Xeroderma pigmentosum* cells.
Mutat. Res. 20:291-293.
- Scahill, S.J., Devos, R., van der Heyden, J. und Fiers, W. (1983)
Expression and characterization of the product of a human immune interferon cDNA gene in CHO cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4654-4658.
- Scangos, G. und Ruddle, F.H. (1981)
Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review.
Gene 14:1-10.
- Scangos, G. Huttner, K.M., Juricek, D.K. und Ruddle, F.H. (1981)
DNA-mediated gene transfer in mammalian cells: molecular analysis of unstable transformants and their progression to stability.
Mol. Cell. Biol. 1:111-120
- Schenborn, E.T. und Mierendorf, R.C.Jr. (1985)
A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure.
Nucl. Acids. Res. 13:6223-6236.
- Schultz, R.A., Barbis, D.P. und Friedberg, E.C. (1985)
Studies on gene transfer and reversion to UV resistance in XP cells.
Som. Cell. Mol. Gen. 11:617-624.
- Scott, M.P., Weiner, A.J., Hazelrigg, T.J., Polisky, B.A., Pirrotta, V., Scalenghe, F. und Kaufmann, T.C. (1983)
The molecular organization of the Anzennapedia locus of *Drosophila*.

Cell 35:763-776.

Seed, B., Parker, R., Davidson, N. (1982)
Representation of RNA in recombinant DNA partial digest libraries.
Gene 19:201-209.

Setlow, R.B., Regan, J.D., German, J. und Carrier, W.L. (1969)
Evidence that xeroderma pigmentosum cells do not perform the first
step in the repair of ultraviolet damage to their DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 64:1035-1041.

Setlow, R.B. und Regan, J.D. (1972)
Defective repair of N-acetoxy-2-acetyl-aminofluorene-induced lesions
in the DNA of Xeroderma pigmentosum cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 46:1019-1024.

Setlow, R.B. (1978)
Repair deficient human disorders and cancer.
Nature 271:713-717.

Setlow, R. (1979)
DNA repair in: Bauburg report 1, assessing chemical mutagens: the risk
to humans; Mc Elheny, V.K. und Abrahamson, S. (Hrsg.); Cold Spring
Harbor Laboratory; S. 81-96.

Shih, C. und Weinberg, R.A. (1982)
Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma
cell line.
Cell 29:161-169

Shimuzu, K., Birnbaum, D., Ruley, A.
Fasano, O., Suard, Y., Elund, L., Taparowsky, E., Goldfarb, M. und
Wigler, M. (1983)
Structure of the ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line
Calu-1.
Nature 304:497-500.

Singer, M.F. (1982)
SINES and LINES: highly repeated short and long interspersed sequences
in mammalian genomes.
Cell 28:433-434.

Singer, M.F. und Skowronski, J. (1985)
Making sense out of LINES: long interspersed repeat sequences in
mammalian genomes.
Trends in Biochem. Sci. 10:119-122

- Stich, H.F. und San, R.H.C. (1971)
Reduced DNA repair synthesis in xeroderma pigmentosum cells exposed to the oncogenic 4-nitroquinidine 1-oxide and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide.
Mutat. Res. 13:279-281.
- Stich, H.F., San, R.H.C., Miller, J.A. und Miller, E.C. (1972)
Various levels of DNA repair synthesis in xeroderma pigmentosum cells exposed to the carcinogens N-hydroxy and N-acetoxy-2-acetylaminofluorene.
Nature New Biol. 238:9-10.
- Southern, E. (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98:503-517.
- Southern, P.J. und Berg, P. (1982)
Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter.
J. Mol. Appl. Genet. 1(4):327-341.
- Spivak, G., Ganesan, A.K. und Hanawalt, P.C. (1984)
Enhanced transformation of human cells by UV-irradiated pSV2 Plasmids.
Mol. Cell. Biol. 4:1169-1171.
- Szybalska, E.H. und Szybalski, W. (1962)
Genetics of human cell lines. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026-2034.
- Takano, T., Noda, M. und Tamura, T. (1982)
Transfection of cells from a xeroderma pigmentosum patient with normal human DNA confers UV resistance.
Nature 296:269-270.
- Takebe, H., Nii, S., Ishii, M.I. und Utsumi, H. (1974)
Comparative studies of host cell reactivation, colony forming ability and excision repair after UV-irradiation of xeroderma pigmentosum, normal human and some other mammalian cells.
Mutat. Res. 25:383-390.
- Takebe, H., Miki, Y., Kozuka, T., Furuyama, J., Tanaka, K., Sasaki, M.S., Fujiwara, Y. und Akiba, H. (1977)
DNA repair characteristics and skin cancers of xeroderma pigmentosum patients in Japan.

Cancer Res. 37:490-495.

Tanaka, K., Sekiguchi, M. und Okada, Y. (1975)
Restoration of ultraviolet-induced unscheduled DNA synthesis of xeroderma pigmentosum cells by concomitant treatment with phage T4 endonuclease V and HVJ.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:4071-4075.

Tanaka, K., Hayakawa, H., Sekiguchi, M. und Okada, Y. (1977)
Specific action of T4 endonuclease V on damaged DNA in xeroderma pigmentosum cells in vivo.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:2958-2962.

Taub, R.A.; Hollis, G.F., Hieter, P.A., Korsmeyer, S., Waldmann, T.A. und Leder, P. (1983)
Variable amplification of immunoglobulin λ light-chain genes in human populations.
Nature 304:172-174.

Thompson, L.H., Busch, D.B., Brockman, K., Mooney, C.L. und Glaser, D.A. (1981)
Genetic diversity of UV-sensitive DNA repair mutants of Chinese hamster ovary cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3734-3737

Thompson, L.H. und Carrano, A.V. (1983)
Analysis of mammalian cell mutagenesis and DNA repair using in vitro selected CHO cell mutants. In: Cellular responses to DNA damage, Friedberg, E.C. und Bridges, B.A. (Hrg.) S.125-143. Alan R. Liss, New York.

Thompson, L.H., Brookman, K.W., Minkler, J.L., Fuscoe, J.C., Henning, K.A. und Carrano, A.V. (1985a)
DNA-mediated transfer of a human DNA repair gene that controls sister chromatid exchange.
Mol. Cell. Biol. 5:881-884.

Thompson, L.H., Mooney, C.L., Burkhart-Schultz, K., Carrano, A.V. und Siliciano, M.J. (1985b)
Correction of a nucleotide excision repair mutation by human chromosome 19 in hamster-human hybrid cells.
Somat. Cell Mol. Genet. 11:87-92

Thompson, L.H., Mooney, C.L. und Brookman, K.W. (1985c)
Genetic complementation between UV-sensitive CHO mutants and Xeroderma pigmentosum fibroblasts.
Mutat. Res. 150:423-429

- Tlsty, T.D., Brown, P.C. und Schimke, R.T. (1984)
UV-radiation facilitates methotrexate resistance and amplification of the dihydrofolate reductase gene in cultured 3T6 mouse cells.
Mol. Cell. Biol. 4:1050-1056.
- van Duin, M., Westerveld, A. und Hoeijmakers, J.H.J. (1985)
UV-stimulation of DNA-mediated transformation of human cells.
Mol. Cell. Biol. 5:734-741
- van Duin, M., de Wit, J., Odijk, H., Westerveld, A., Yasui, A., Koken, M.H.M., Hoeijmakers, J.H.J. und Bootsma, D. (1986)
Molecular characterization of the human excision repair gene ERCC1: cDNA cloning and amino acid homology with the yeast DNA repair gene RAD 10.
Cell 44:913-923.
- Vermeulen, W., Osseweijer, P., de Jonge, A.J.P. und Hoeijmakers, J.H.J. (1986)
Transient correction of excision repair defects in fibroblasts of 9 xeroderma pigmentosum complementation groups by microinjection of crude human cells extracts.
Mutat. Res. 165:199-206.
- Vieira, J. und Messing, J. (1982)
The pUC plasmid, an M13 mp7-derived system for insertion mutagenesis and screening with synthetic universal primers.
Gene 19:259-268
- Vijg, J., Mullaart, E., van der Schans, G.P., Lohman, P.H.M. und Knook, D.L. (1984)
Kinetics of ultraviolet induced DNA excision repair in rat and human fibroblasts.
Mutat. Res. 132:129-138.
- Walker, G.C. (1984)
Mutagenesis and inducible responses to DNA damage in Escherichia coli.
Microbiol. Rev. 48:60-93.
- Weiss, W.A. und Friedberg, E.C. (1985)
Molecular cloning and characterization of the yeast RAD10 gene and expression of RAD10 protein in E.coli.
EMBO J. 4:1575-1582.
- Westerveld, A., Hoeijmakers, J.H.J., van Duin, M., de Wit, J., Odijk, H., Pastink, A., Wood, R.D. und Bootsma, D. (1984)

Molecular cloning of a human DNA repair gene.
Nature 310:425-429

Wetmur, J.G. und Davidson, N. (1968)
Kinetics of renaturation of DNA
J. Mol. Biol. 31:349-370.

Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L.-S., Pellicier, A., Cheng, T. und
Axel, R. (1977)
Transfer of purified Herpes virus thymidine kinase gene to cultured
mouse cells.
Cell 11:223-232.

Wigler, M., Pellicier, A., Silverstein, S. und Axel, R. (1978)
Biochemical transfer of single-copy eukaryotic genes using total
cellular DNA as donor.
Cell 11:725-731.

Wigler, M., Pellicier, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G. und
Chasin, L. (1979b).
DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus
into mammalian cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1373-1376.

Wigler, M., Sweet, R., Sim, G.-K., Wold, B., Pellicier, A., Lacy, E.,
Maniatis, T., Silverstein, S. und Axel, R. (1979b).
Transformation of mammalian cells with genes from prokaryotes and
eukaryotes.
Cell 16:777-785

Wilcox, D.R. und Prakash, L. (1981)
Incision and postincision of pyrimidine dimer removal in
excision-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Bacteriol. 148:618-623.

Wilkie, N.M., Clements, J.B., Boll, W., Mantei, N., Lonsdale, D. und
Weissman, C. (1979)
Hybrid plasmid containing an active thymidine kinase gene of Herpes
simplex virus 1.
Nucl. Acids Res. 7:859-877.

Witkin, E.M. (1976)
Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*.
Bacteriol. Rev. 40:869-907.

Wolff, S., Rodin, B. und Cleaver, J.E. (1977)
Sister chromatid exchanges induced by mutagenic carcinogens in normal

and xeroderma pigmentosum cells.

Nature 265:347-349.

Wong, T.-K. und Neumann, E. (1982)

Electric field mediated gene transfer.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 107:584-587

Wyman, A.R., Wolfe, L.B. und Botstein, D. (1985)

Propagation of some human DNA sequences in bacteriophage λ vectors requires mutant E.coli hosts.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2880-2884.

Yagi, T. (1982)

DNA repair ability of cultured cells derived from mouse embryos in comparison with human cells.

Mutat. Res. 96:89-98

Yagi, T., Nikaido, O. und Takebe, H. (1984)

Excision repair of mouse and human fibroblast cells, and a factor affecting the amount of UV-induced unscheduled DNA synthesis.

Mutat. Res. 132:101-112.

Yamaizumi, M., Sugano, T., Asahina, H., Okada, Y. und Uchida, T. (1986)

Microinjection of partially purified protein factor restores DNA damage specifically in group A of xeroderma pigmentosum cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:1476-1479.

Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, L., Lawhorne, L. und Treiber G. (1970)

Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethyleneglycol and its application to largescale virus purification.

Virology 40:734-744

Zehetner, G. und Lehrach, H. (1986)

A computer program package for restriction map analysis and manipulation.

Nucl. Acids. Res. 14:335.

Zelle, B. und Lohmann, P.H.M. (1979)

Repair of UV-endonuclease-susceptible sites in the 7 complementation groups of Xeroderma pigmentosum A through G.

Mutat. Res. 62:363-368.

Zelle, B. und Bootsma, D. (1980)

Repair of DNA damage after exposure to 4-nitroquinoline-1-oxide in heterokaryons derived from Xeroderma Pigmentosum cells.

Mutat. Res. 70:373-381.

Zwetsloot, J.C.M., Hoeijmakers, J.H.J., Vermeulen, W., Eker, A.P.M. und Bootsma, D. (1986a)

Unscheduled DNA synthesis in xeroderma pigmentosum cells after microinjection of yeast photoreactivating enzyme.

Mutat. Res. 165:109-115

Zwetsloot, J.C.M., Barbeiro, A.P., Vermeulen, W., Arthur, H.M., Hoeijmakers, J.H.J. und Backendorf, C. (1986b)

Microinjection of Escherichia coli Uvr A, B, C and D proteins into fibroblasts of xeroderma pigmentosum complementation groups A and C does not result in restoration of UV-induced unscheduled DNA synthesis.

Mutat. Res. 166:89-98.