

KfK 5312
Juni 1994

**Komplementation
strahlensensitiver Ataxia
telangiectasia-Zellen durch
Transfektion von
cDNA-Bibliotheken und
Cosmidklonen aus
Wildtyp-Zellen**

E. Fritz
Institut für Genetik

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik

KfK 5312

**Komplementation strahlensensitiver Ataxia
telangiectasia-Zellen durch Transfektion von cDNA-
Bibliotheken und Cosmidklonen aus
Wildtyp-Zellen**

Eberhard Fritz

**Dissertation
genehmigt von der
Universität Karlsruhe**

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

ISSN 0303-4003

Zusammenfassung

Ataxia telangiectasia (AT) ist eine seltene menschliche Erbkrankheit, die sich unter anderem in der Überempfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen äußert. Bei kultivierten Zellen von AT-Patienten zeigt sich diese Überempfindlichkeit anhand der verringerten Überlebensrate nach Bestrahlung. AT-Zellen erfahren außerdem, im Unterschied zu normalen Zellen, keine Blockierung in der G1-Phase des Zellzyklus nach Bestrahlung. Die DNA-Synthese in AT-Zellen wird, im Vergleich zu normalen Zellen, durch ionisierende Strahlen nur schwach gehemmt. Aufgrund der strahleninduzierten Hemmung der DNA-Synthese nach Fusion von AT-Zellen unterschiedlicher Patienten werden diese in fünf verschiedene Komplementationsgruppen eingeteilt. Jeder Komplementationsgruppe wird ein unterschiedlicher genetischer Primärdefekt zugeordnet. Durch Kopplungsanalysen, sowie Komplementation der Strahlenüberempfindlichkeit durch Übertragen von Chromosomen oder Chromosomenfragmenten aus normalen Zellen, konnten drei der AT-Gene (Komplementationsgruppen A, C, D) auf dem Bereich q22-23 des menschlichen Chromosoms 11 lokalisiert werden. Die phänotypische Komplementation von AT-Zellen durch Transfektion von Bibliotheken genomischer DNA aus Wildtypzellen war bisher nur bezüglich der Erhöhung der Strahlenresistenz partiell erfolgreich.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die phänotypische Komplementation von AT-Zellen (AT5BIVA, Komplementationsgruppe D) durch stabile Transfektion von cDNA-Bibliotheken angestrebt:

Nach Transfektion von cDNA-Bibliotheken wurden die G418-resistenten Zellklone in einer sequentiellen, mehrtägigen Bestrahlung mit je 0,6 Gy Röntgenstrahlen selektiert. Einer der überlebenden Transfektantenklone (Klon 514) erwies sich in weiteren Strahlenselektionen und Dosis-Effekt-Experimenten als stabil strahlenresistenter im Vergleich zu AT-Zellen. Die Analyse der Zellzyklus-Phasen verdeutlicht, daß sowohl unbestrahlte als auch bestrahlte 514-Zellen in diesem Merkmal komplementiert sind. Die DNA-Synthese ist jedoch nach Bestrahlung nicht stärker hemmbar als in AT-Zellen, sondern zeigt den umgekehrten Effekt.

Aus der genomischen DNA der 514-Zellen konnte ein transfiziertes cDNA-Fragment (AT500-cDNA) isoliert werden, welches eine bisher unbekannte DNA-Sequenz darstellt. Eine zur AT500-cDNA homologe, endogene Sequenz ist in der DNA aller untersuchter menschlicher Zellen, nicht aber in der DNA aus Zellen anderer Spezies vorhanden. Die cDNA-Sequenz konnte auf dem menschlichen Chromosom 11 lokalisiert werden. In menschlichen Zellen ist die AT500-cDNA als Bestandteil von zwei mRNAs nachweisbar.

Aus einer Cosmidbibliothek, die hochmolekulare, genomische DNA aus menschlichen Wildtyp-Zellen enthält, wurden 4 verschiedene Cosmidklone isoliert, die mit AT500 hybridisieren. Diese zur AT500-Sequenz homologen Cosmidklone wurden stabil in AT-Zellen transfiziert und die G418-resistenten Zellen auf ihre Strahlenresistenz getestet. Einer der Cosmidklone vermittelt erneut partielle Strahlenresistenz, die in Strahlenselektionen und Dosis-Effekt-Experimenten zum Ausdruck kommt.

Die Ergebnisse verdeutlichen, daß dem klonierten cDNA-Fragment ein bisher unbekanntes Gen zugrunde liegt, welches in den verwendeten AT-Zellen die Strahlensensitivität sowie die krankhaft veränderte Regulation der Zellzyklusphasen nach Bestrahlung partiell komplementiert und auf dem menschlichen Chromosom 11 lokalisiert ist.

Abstract

Complementation of radiation-sensitive Ataxia telangiectasia cells after transfection of cDNA expression libraries and cosmid clones from wildtype cells.

Ataxia telangiectasia (AT) is a rare human inherited disease characterized by hypersensitivity to ionizing radiation and other clinical features. In cultured cells from AT patients this hypersensitivity is reflected as the reduced clonogenic survival after irradiation. In addition, cultured AT-cells are not delayed in the G1-phase of the cell cycle after irradiation, as compared to normal cells. The rate of DNA synthesis in AT-cells is only weakly inhibited by irradiation, in contrast to normal cells. After fusion of AT-cells from different donors, the inhibition of DNA-synthesis after irradiation in these heterokaryons allows the assignment of the cells to 5 different complementation groups. Each complementation group should reflect a different primary defect.

Linkage analysis revealed the physical localization of 3 AT-genes (complementation groups A, C and D) to human chromosome 11, region q22-23. This localization could be confirmed by complementation of the cellular AT-defects after introducing normal human chromosome 11 or fragments containing 11q22-23 into AT-cells. Up to now, transfection of genomic DNA-libraries from normal human cells could only partially complement the radiation hypersensitivity of AT-cells.

In this Ph.D.-thesis, phenotypic complementation of AT-cells (AT5BIVA) by transfection of cDNA-expression-libraries was addressed:

After stable transfection of cDNA-expression-libraries G418 resistant clones were selected for enhanced radioresistance by a fractionated X-ray selection. One surviving transfectant clone (clone 514) exhibited enhanced radiation resistance in dose-response experiments and further X-ray selections. Cell cycle analysis revealed complementation of untreated and irradiated 514-cells in cell cycle progression. The rate of DNA synthesis, however, is not diminished after irradiation but shows the reverse effect.

A transfected cDNA-fragment (AT500-cDNA) was isolated from the genomic DNA of 514-cells and proved to be an unknown DNA sequence. A homologous sequence could be detected in genomic DNA from human cell lines, but not in DNA from other species. The

cDNA-sequence could be localized to human chromosome 11. In human cells the cDNA sequence is part of two large mRNAs.

4 different cosmid clones containing high molecular genomic DNA from normal human cells could be isolated from a library, each hybridizing to the AT500-cDNA. After stable transfection into AT-cells, one cosmid-clone was able to confer enhanced radiation resistance both in X-ray selections and dose-response experiments.

The results indicate that the cloned cDNA-fragment is based on an unknown gene from human chromosome 11 which partially complements the radiosensitivity and the defective cell cycle progression in AT5BIVA cells.

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AT	Ataxia telangiectasia
BES	N,N-bis(2-hydroxyethyl)2-aminoethansulfonsäure
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie (Aktivität einer radioaktiven Substanz) (1 Ci=3,7x10 ¹⁰ Zerfälle/sec)
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute
DAPI	4,6'-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
FCS	Foetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81m/sec ²)
G418	Geneticin [®] -Sulfat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Gy	Gray (1 Gy = 100 rad)
h	Stunde
M	molar
mA	Milliampere
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
min	Minute
mM	millimolar
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
OD	Optische Dichte

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykoll
pH	pH-Wert, Ionenstärke
pM	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SV40	Simian Virus 40
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit/Enzymeinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
W	Watt
XP	Xeroderma pigmentosum

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Abstract

Abkürzungen

Einleitung 1

Material 12

Methoden 17

1. Zellkultur..... 17

1.1. Fixieren und Färben von Zellen 17

1.2. Stabile Transfektion 17

1.3. Bestrahlung der Zellen..... 18

1.4. Überlebenskurven nach Bestrahlung..... 18

1.5. Röntgen-Selektion..... 18

1.6. Isolieren von Zellklonen..... 19

2. Messung der DNA-Syntheserate 19

2.1. Mit dem "cell harvester" 19

2.2. Mit TCA-Fällung 20

3. Zellzyklus-Analyse 20

4. Analyse von Nukleinsäuren 21

4.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren..... 21

4.2. Phenol-Extraktion von Nukleinsäuren..... 21

4.3. Fällung von Nukleinsäuren 22

4.4. Sequenzierung 22

4.5. Denaturierende Acrylamid-Harnstoff-Gele..... 23

5. Nukleinsäure-Präparationen 23

5.1. Mini-Plasmid-DNA-Präparation..... 23

5.2. Maxi-Plasmid-DNA-Präparation 24

5.3. Plasmid-DNA-Präparation aus cDNA-Bibliotheken 24

5.4. Präparation genomischer DNA aus Säugerzell-Kulturen 25

5.5. Präparation von poly(A)⁺-mRNA aus Zellkulturen..... 25

5.6. Reinigung von Oligonukleotiden 26

6. Nukleinsäure-Synthese..... 26

6.1. Polymerase-Ketten-Reaktion 26

6.2. cDNA-Synthese..... 27

7. Radioaktive Markierung von Nucleinsäuren.....	28
7.1. "Random priming"	28
7.2. Polymerase-Ketten-Reaktion	28
7.3. Abtrennung nicht-inkorporierter radioaktiver Nucleotide.....	28
8. Klonierungstechniken	29
8.1. Restriktionsverdau von DNA	29
8.2. Dephosphoryllierung von DNA-Strangenden.....	29
8.3. Ligation von DNA-Fragmenten.....	29
9. Transformation von Bakterien.....	29
9.1. Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation	29
9.2. Transformation.....	30
10. Agarose-Gelelektrophorese.....	30
10.1. DNA-Gele.....	30
10.2. Isolieren von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	30
10.3. RNA-Gele.....	31
11. Transfer von Nucleinsäuren auf Membranen und Hybridisierung	31
11.1. "Southern-Transfer" von DNA	31
11.2. "Northern-Transfer" von RNA.....	31
11.3. Hybridisierung von Nucleinsäuren und Autoradiographie.....	32
12. "Screenen" einer Cosmidbank	32

Ergebnisse

1. Das experimentelle Komplementations-System	34
1.1. Qualität der verwendeten cDNA-Bibliotheken und Expression in menschlichen Zellen.....	34
1.2. Anzahl unabhängiger AT-Zellen, die cDNA aufgenommen haben	36
1.3. Selektionsprotokoll.....	37
1.4. Revertanten.....	39
2. Selektion des partiell strahlenresistenten Zellklons 514 nach Transfektion von cDNA-Bibliotheken in AT-Zellen	42
2.1. Stabile Transfektion der cDNA-Bibliotheken in AT-Zellen und Isolierung überlebender Zellklone nach Strahlenselektionen.....	42
2.2. Zellklon 514 ist in Dosis-Effekt-Experimenten strahlenresistenter als AT-Zellen.....	42
2.3. Zellklon 514 ist in Strahlenselektionen deutlich resistenter als AT-Zellen und behält diesen Phänotyp in weiteren Strahlenselektionen stabil bei.....	45
3. Phänotypische Charakterisierung des Zellklons 514.....	47
3.1. Die Überlebensfähigkeit des Zellklons 514 in Strahlenselektionen ist nicht die Folge einer verkürzten Generationszeit	47
3.2. Die DNA-Synthese nach Bestrahlung ist in 514-Zellen nicht gehemmt.....	48
3.3. Zellzyklus-Analysen.....	50
3.3.1. Die Verteilung der Zellzyklus-Phasen unbestrahlter 514-Zellen entspricht der normaler Zellen.....	50
3.3.2. Nach Bestrahlung ist die zeitliche Verteilung der Zellzyklus-Phasen von 514-Zellen in Richtung normaler Zellen verändert	53

4. Die erhöhte Strahlenresistenz des Klons 514 war durch sekundäre Transfektionen nicht stabil übertragbar	57
5. Genotypische Charakterisierung des Zellklons 514	60
5.1. Anzahl der transfizierten cDNAs in der zellulären DNA der Klone 514 und AT-514/4.....	60
5.2. Integrationsmuster der Vektorsequenzen nach Hybridisierung der zellulären DNA mit einer für das Neomycin-Resistenzgen spezifischen Sonde	62
6. Isolierung, Klonierung und Charakterisierung eines transfizierten cDNA-Fragments aus dem Genom von 514-Zellen	64
6.1. Isolieren von transfizierten cDNAs mit der Polymerase-Ketten-Reaktion ("PCR").....	64
6.2. Klonierung des 500 bp-Amplifikationsproduktes in pUC9	68
6.3. Sequenzierung des 500 bp-Fragments.....	68
6.4. Re-Amplifikation des klonierten Fragments und Amplifikation eines internen Subfragments mit der "PCR"	69
6.5. Charakterisierung der AT500-cDNA mit Computeranalyse.....	70
6.5.1. Die klonierte DNA-Sequenz ist in der EMBL-Datenbank unbekannt ..	70
6.5.2. Die AT500-cDNA-Sequenz hat kein durchgehend offenes Leseraster und die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen sind in der EMBL-Datenbank unbekannt.	71
6.6. Charakterisierung der zu AT500 homologen genomischen DNA	72
6.6.1. Das klonierte DNA-Fragment tritt nach PCR-Analyse spezifisch in DNA aus menschlichen Zellen auf	72
6.6.2. Hybridisierung genomischer DNA verschiedener Spezies mit dem klonierten Fragment	73
6.6.3. Hybridisierung genomischer DNA aus AT-, 514- und normalen GM637-Zellen mit dem klonierten Fragment	75
6.7. Chromosomale Lokalisierung des AT500-Fragments	77
6.7.1. Hybridisierung von Mensch-Nager-Hybridzelllinien mit dem klonierten Fragment.....	77
6.7.2. "PCR"-Analysen mit DNA aus Hybridzelllinien.....	78
6.8. Expression des AT500-Fragments	80
6.8.1. Aus der cDNA menschlicher Zelllinien ist das AT360-Fragment in PCR-Analysen amplifizierbar.....	80
6.8.2. Das klonierte Fragment erkennt in Hybridisierungen mit mRNA aus GM637-Zellen zwei große mRNA-Spezies	83
7. Isolierung von Cosmiden, die mit AT500 hybridisieren und nach der Transfektion in AT-Zellen erhöhte Strahlenresistenz vermitteln.....	84
7.1. Absuchen einer Cosmidbibliothek nach Klonen, die mit AT500 hybridisieren.....	84
7.2. Stabile Transfektion der Cosmide und Strahlenselektion.....	85
7.3. Überlebenskurven der Cosmid-Transfektanten, die zwei Strahlenselektionen überlebt haben	87

Diskussion	89
-------------------------	----

Literaturverzeichnis	97
-----------------------------------	----

Einleitung

Elektromagnetische Strahlen aus dem Weltraum waren und sind als Energieträger für das Leben auf der Erde eine unabdingbare Voraussetzung. Pflanzen nutzen die Strahlenenergie eines bestimmten Spektrums, um aus CO₂ und Wasser energiereiche Zuckermoleküle zu synthetisieren und bilden damit die Grundlage der Nahrungskette und Energiegewinnung tierischer Organismen.

Besonders die energiereichen UV-Strahlen und ionisierenden Strahlen können aber, durch unkontrollierte Energieabgabe, zur Schädigung der betroffenen Zellen führen. Um dauerhafte Schädigungen der Zellen zu vermeiden, haben sich daher im Laufe der Evolution Schutzmechanismen entwickelt, die entweder die Strahlung abschirmen, oder bereits vorhandene Strahlenschäden beseitigen. Die Unversehrtheit der DNA-Moleküle, als Träger der genetischen Information, ist besonders wichtig für das Überleben und die Fortpflanzung der Zellen. Daher sind verschiedene Mechanismen in der Zelle vorhanden, die Strahlenschäden, aber auch andere umweltbedingte oder spontan auftretende Schäden der DNA reparieren.

Im Zusammenhang mit einer erwarteten steigenden Strahlenbelastung der Menschen durch UV-Strahlen (Ozonloch), aber auch durch ionisierende Strahlen (Reaktor-Unfälle, künstliche und medizinische Strahlenbelastung, Höhenstrahlung im Flugzeug) kommt den DNA-Reparaturmechanismen wachsende Bedeutung zu. Persistierende DNA-Schäden in Zellen der Keimbahn können zu Erbdefekten der nachfolgenden Generation führen (zur Übersicht: Würigler, 1993). In den Körperzellen fördern sie bei den betroffenen Individuen die Krebsentstehung, wie anhand der Krebshäufigkeit von Patienten mit erblichen DNA-Reparatur-Defekten eindrücklich deutlich wird (zur Übersicht: Zabel, 1993).

Klonierung von DNA-Reparatur-Genen

Das Wissen über zelluläre DNA-Reparatursysteme basiert im wesentlichen auf Erkenntnissen, die durch Untersuchungen an Bakterien gewonnen wurden (Hanawalt et al., 1979). Bakterien besitzen Reparaturenzyme, wie DNA-Glycosylasen, Endonukleasen, Photolyasen und Transmethylyasen die sehr spezifisch verschiedene DNA-Schäden erkennen und eliminieren (Lindahl, 1982). Die Exzisionsreparatur, ein universelleres Reparatursystem, schneidet verschiedenartige Läsionen aus der DNA aus und stellt durch die Neusynthese des DNA-Strangs wieder den ungeschädigten Ausgangszustand her (Sancar und Rupp, 1983). Die Komponenten der Exzisionsreparatur (Friedberg, 1985) sind Bestandteil des "SOS-Systems", das nicht nur durch DNA-Schädigungen, sondern allgemein durch "Stress" induziert wird, und zum Beispiel an der Mutagenese und an Rekombinationsprozessen beteiligt ist.

Wie bei Bakterien ist auch bei Eukaryonten die Verfügbarkeit genetisch defekter Mutanten, die einen strahlensensitiven Phänotyp zeigen, Voraussetzung zur Klonierung der zugrunde liegenden DNA-Reparatur-Gene. Die Komplementation des defekten Phänotyps, also die Korrektur der Strahlenüberempfindlichkeit nach Gen-Transfer, wird ausgenutzt zur Identifizierung des Gens, das in der entsprechenden Mutante defekt ist. Von der Hefe *S. cerevisiae* wurden über 50 verschiedene "rad"-Mutanten charakterisiert, die in 3 Gruppen, entsprechend ihrer Überempfindlichkeit gegenüber UV-Strahlen, ionisierende Strahlen oder beiden Strahlentypen eingeteilt sind (Friedberg, 1988). Auch von Nagerzellen wurden mehrere verschiedene Mutanten isoliert, die überempfindlich gegenüber ionisierende und/oder UV-Strahlen sind (Jones et al., 1987; Thacker und Wilkinson, 1991; Hoeijmakers, 1993).

Beim Menschen sind es die Erbkrankheiten Xeroderma pigmentosum, Ataxia telangiectasia (AT) und Cockaynes Syndrom, die mit einem Defekt in der Reparatur strahlengeschädigter DNA in Verbindung gebracht werden. Im Gegensatz zu Hefe- oder Nagermutanten ist die Anzahl menschlicher Zelllinien mit Defekten in der DNA-Reparatur also recht gering, weil diese Defekte für den Organismus vermutlich lethal sind. Die starke Konservierung der Reparaturgene in der Evolution erlaubte es jedoch, defekte Nagermutanten mit menschlichen Genen zu komplementieren. Drei der auf diese Weise charakterisierten menschlichen "ERCC" ("excision repair cross-complementing rodent repair deficiency")-Gene konnten nachträglich als unterschiedliche Primärdefekte verschiedener XP-Patienten erkannt werden (ERCC2, ERCC3 und ERCC5). Die Homologie der menschlichen ERCC-Gene mit entsprechenden Genen anderer Spezies drückt sich nicht nur in der Komplementation defekter Nagermutanten aus. Sie wird auch ersichtlich aus der Tatsache, daß die ERCC-Gene Reparaturgenen der Hefe *S. cerevisiae* strukturell homolog sind, wie Sequenzvergleiche zeigen (Van Duin et al., 1986; Bankmann et al., 1992; Park et al., 1992; McKay und Hanawalt, 1992).

Die Analyse einiger von den ERCC/RAD-Genen kodierten Proteine gab Aufschluß über die zugrunde liegenden Mechanismen der Exzisionsreparatur: Es wurden einzelstrang- und doppelstrang-spezifische DNA-Bindedomänen, Helicase-Aktivitäten, die Beteiligung an Rekombinationsprozessen sowie die Affinität zu Chromatin-Proteinen erkannt (zur Übersicht: Hoeijmakers, 1993). Die Transkription einiger Gene war durch UV-Bestrahlung induzierbar. Während viele Komponenten der hauptsächlich durch UV-Strahlung aktivierten Exzisionsreparatur nach Komplementation der entsprechenden Defekte in Hefe-, Nager- und menschlichen Zellen charakterisiert werden konnten, sind eukaryontische Gene, die spezifisch in der DNA-Reparatur nach ionisierender Strahlung eingreifen, fast ausschließlich aus der Hefe bekannt. Die Kenntnis der darin kodierten Protein-Funktionen ist jedoch noch rudimentär. Die zugrunde liegenden mutierten Zelllinien (rad51, rad52, rad54) zeigen neben der extremen Überempfindlichkeit gegenüber ionisierende Strahlen gravierende Defekte in der DNA-Rekombination und der Reparatur von spontanen oder induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen. Als Konsequenz tritt eine erhöhte chromosomale Instabilität dieser Zellen auf, die zu aneuploiden Zellen führt. Das gleichzeitige Auftreten der erwähnten phänotypischen Defekte

führte zu der Annahme, daß die Reparatur von DNA-Schäden nach ionisierender Bestrahlung mit der DNA-Rekombination verknüpft und von der Exzisions-Reparatur grundsätzlich verschieden ist (Friedberg, 1988).

Von Säugerzellen sind mittlerweile mehrere Mutanten bekannt, die überempfindlich gegenüber ionisierende Strahlen sind (Jones et al., 1987; Thacker und Wilkinson, 1991). Diese Maus oder Rattenzellen konnten aufgrund von Zellfusionen in 8 verschiedene Komplementationsgruppen eingeteilt werden. Ein menschliches Gen (XRCC1), das eine dieser Zelllinien komplementierte, wurde erfolgreich kloniert und ist mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen beteiligt (Thompson et al., 1990).

Zwei Mausstämme wurden beschrieben, die neben der Überempfindlichkeit gegenüber ionisierende Strahlen zusätzlich recht komplexe phänotypische Defekte zeigen: Der Phänotyp der "scid"-Maus ist charakterisiert durch schwerwiegende Immundefekte und ist darin dem der menschlichen Erbkrankheit Ataxia telangiectasia (AT) ähnlich. Die Fusion von "scid"- und AT-Zellen zeigte aber, daß die Strahlenüberempfindlichkeit der resultierenden Hybridzellen aufgehoben war und die zugrundeliegenden genetischen Defekte folglich voneinander verschieden sind (Komatsu et al., 1993).

Charakteristische Merkmale der "wasted"-Maus sind die erhöhte Anzahl spontaner und induzierter Chromosomen-Aberrationen und Defekte des Immun- und Nervensystems, die sich ebenfalls bei AT-Patienten finden. Allerdings ist die Strahlenüberempfindlichkeit nicht in allen Zelltypen der Maus ausgeprägt, so daß auch hier ein zur menschlichen Erbkrankheit AT verschiedener Primärdefekt postuliert wird (Inoue et al., 1986).

Die Erbkrankheit Ataxia telangiectasia

Ataxia telangiectasia (AT) ist eine seltene rezessive Erbkrankheit des Menschen (etwa 1/100.000 Lebendgeburten), die sich in einer Vielzahl unterschiedlicher klinischer Symptome äußert: Homozygote Träger des unbekanntes, defekten Gens leiden unter anderem an Entwicklungsstörungen des Kleinhirns, des Immunsystems und der Haut, die sich meist schon im frühen Kindheitsalter manifestieren. Die Patienten sind außerdem überempfindlich gegenüber ionisierender Bestrahlung (zur Übersicht: Bridges und Harnden, 1982).

Die erwähnten Funktionsstörungen des Kleinhirns korrelieren mit der Degeneration und Atrophie der Purkinje-Zellen (Vinters et al., 1985) und manifestieren sich in den meisten Patienten als motorische Ataxie unterschiedlichen Grades (Boder, 1985).

Der Immundefekt betrifft das zelluläre und humorale System und äußert sich vor allem in der starken Anfälligkeit gegenüber bakterieller Erreger, was meist zu schweren Infektionen der Atemwege führt. Eine Ursache des Immundefekts liegt in der stark unterentwickelten oder sogar gänzlich fehlenden Thymusdrüse (Peterson et al., 1966).

Vermutlich als Folge dieser Immundefizienzen tritt in AT-Patienten eine erhöhte Krebsanfälligkeit auf: Bei bis zu 38% der homozygoten Patienten entwickeln sich Tumore

während des meist kurzen Lebens (Swift, 1985) und zwar hauptsächlich Tumore des lymphoretikulären Systems sowie Karzinome (Spector et al., 1982).

Die Haut von AT-Patienten zeichnet sich durch stark erweiterte Blutgefäße aus. Diese bei alten Menschen häufige Erscheinung tritt bei AT-Patienten schon ab dem 2. bis 6. Lebensjahr auf und wird am deutlichsten sichtbar in der Bindehaut des Auges und im Gesicht (Reed et al., 1966). Auch andere Merkmale, wie frühzeitiges Ergrauen der Haare, weisen bei manchen Patienten auf vorzeitige Alterungsprozesse hin (Boder, 1985). Die durchschnittliche Lebenserwartung von AT-Patienten liegt bei unter 30 Jahren.

Auswirkungen fehlerhafter Gewebedifferenzierungen, wie sie bereits für die Thymusdrüse beschrieben wurden, sind bei den meisten AT-Patienten zu beobachten: Hauptsächlich bei weiblichen Patienten ist die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale verzögert oder gänzlich fehlend (Blaese, 1989). Vermutlich als Folge einer unterentwickelten Leber wird in allen Patienten ein erhöhter Gehalt von Alpha-Fötoprotein im Blutplasma gemessen (Waldmann und McIntyre, 1972). Das Karzinoembryonale Antigen, ein anderes Protein, das normalerweise nur im fötalen Blut vorkommt, tritt ebenfalls oft erhöht auf (Sugimoto et al., 1978). Die Beurteilung der geschilderten klinischen Symptome führte zu der Hypothese, daß in der Embryogenese von AT-Patienten die Interaktion zwischen den Keimblättern Entoderm und Mesoderm (MacFarlin et al., 1972; Waldmann und MacIntyre, 1972) gestört sei.

Nicht erklärbar ist mit dieser Hypothese jedoch ein später entdecktes klinisches Symptom: Aufgrund des Todes zweier Patienten nach einer Strahlentherapie, die zur Krebsbehandlung durchgeführt wurde, wurde die erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierenden Strahlen erkannt (Morgan et al., 1968). Wie sich anhand von Versuchen mit kultivierten AT-Zellen herausstellte, ist diese Hypersensitivität eine prinzipiell auftretende Eigenschaft von AT-Patienten (Taylor et al., 1979).

Heterozygote Träger des defekten Gens (etwa 1-3% der Bevölkerung; Swift, 1986) erscheinen äußerlich normal, kultivierte Zellen von ihnen sind in Bestrahlungsexperimenten aber schwach überempfindlich gegenüber ionisierender Strahlen (Chen et al., 1978; Paterson et al., 1985). Sie haben, nach statistischen Aussagen, ebenfalls ein erhöhtes Krebsrisiko (Swift et al., 1987; Pippard et al., 1988), das nach Strahlenexposition drastisch ansteigt (Swift et al., 1991). Es wird geschätzt, daß 18% aller Brustkrebs-Patientinnen in den USA, sowie 5-10% sämtlicher Krebspatienten ein defektes AT-Allel tragen (Gatti, 1985).

Die Charakterisierung eines AT-Gens ist von hohem wissenschaftlichem Interesse. Man erhofft sich Einblicke in die Zusammenhänge zwischen der Entwicklung des Immunsystems, der Neuropathologie und der Strahlenresistenz. Von klinischer Bedeutung ist die Identifizierung heterozygoter Träger. Diese erhöht krebsanfällige Population muß vor Strahlenbelastung (Mammographie, Strahlentherapie) besonders geschützt werden, um die Krebsentwicklung zu verhindern. Mit der Charakterisierung des Primärdefekts ist die Entwicklung einer Prävention und Schnellidentifizierung von heterozygoten Trägern des defekten Gens denkbar. Durch die Identifizierung heterozygoter AT-Träger könnte die Gesamtdosis der Strahlentherapie zur

Krebsbekämpfung bei der restlichen Population erhöht werden (Gatti, 1985). Dadurch sollten für einige Krebserkrankungen die Heilungschancen drastisch steigen.

Charakteristische Merkmale kultivierter AT-Zellen:

Während die klinischen Untersuchungen verschiedener AT-Patienten eine starke phänotypische Heterogenität offenbarten, sind die Ausprägungen der krankhaft veränderten zellulären Parameter in kultivierten AT-Zellen recht einheitlich:

In Bestrahlungsexperimenten wurde die Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlen bestätigt. Diese Überempfindlichkeit konnte auch für chemische Mutagene gezeigt werden, die analog zu ionisierenden Strahlen DNA-Strangbrüche in der Zelle bewirken, z.B. Bleomycin, Neocarcinostatin und Streptonigrin (Shiloh et al., 1983; Cohen und Simpson, 1983; Zampetti-Bosseler und Scott, 1985).

Nach Bestrahlung normaler eukaryotischer Zellen ist eine Verzögerung des Zellzyklus beim Übergang von der G1- in die S-Phase, sowie von der G2- in die M-Phase zu beobachten (Tolmach et al., 1977; Painter und Young, 1980; Weinert und Hartwell, 1988; Kaufmann et al., 1991; O'Connor et al., 1992). Man vermutet, daß durch diese Verzögerung in der G1-Phase die Replikation strahlengeschädigter DNA und in der G2-Phase die Verteilung derselben auf die Tochterzellen durch zwischenzeitliche Reparatur der DNA-Schäden verhindert wird.

Im Unterschied zu normalen Zellen werden die AT-Zellen beim Durchlaufen der G1-Phase schwächer oder gar nicht verzögert (Nagasawa et al., 1985; Rudolph und Latt, 1989). Neueste Ergebnisse führen diesen Effekt auf eine fehlende Erhöhung des Gehalts des p53-Tumorsuppressor-Proteins in AT-Zellen zurück, die in normalen Zellen nach Bestrahlung stattfindet (Kastan et al., 1992). In der G2-Phase unterscheiden sich primäre und virus-immortalisierte AT-Zelllinien aus bisher unverstandenen Gründen: SV40-immortalisierte Fibroblasten und EBV-immortalisierte Lymphoblasten erfahren einen starken und deutlich längeren G2-Block als normale Zellen. Dieser Block scheint auch nicht vollständig reversibel zu sein (Ford et al., 1984). Hingegen werden primäre AT-Zellen im Durchlaufen der G2-Phase offensichtlich nicht gehemmt (Rudolph und Latt, 1989; Zampetti-Bosseler und Scott, 1985). Sowohl primäre, als auch immortalisierte AT-Zellen unterscheiden sich also im Durchlaufen der Zellzyklus-Phasen nach Bestrahlung deutlich von normalen Zellen.

In Zellen, die sich während der Bestrahlung in der S-Phase befinden, ist eine Hemmung der DNA-Replikation anhand des verringerten Einbaus exogen zugegebener, radioaktiv markierter Nukleotide in die genomische DNA meßbar. Messungen der DNA-Replikation in AT-Zellen erbrachten, daß diese nach Bestrahlung weniger hemmbar ist als diejenige normaler Zellen (Young und Painter, 1989). Die Analyse der Fragmentlängen neusynthetisierter DNA ergab, daß in AT-Zellen die Initiation neuer Replicons, sowie in geringerem Ausmaß auch die Kettenverlängerung nach Bestrahlung deutlich weniger gehemmt wird, als in normalen Zellen (Cramer und Painter, 1981). Als Ursache der gestörten DNA-Syntheserate wird eine veränderte Chromatinstruktur in AT-Zellen diskutiert (Jaspers et al., 1982; Painter, 1982). Auch hier

zeigten sich dieselben Effekte nach Behandlung mit Bleomycin, Streptonigrin und Neocarcinostatin.

Cytogenetische Analysen offenbarten eine erhöhte chromosomale Instabilität von AT-Zellen: Spontane Chromosomen-Aberrationen treten in Zellen mancher Patienten vermehrt auf. Nach Bestrahlung ist jedoch die Rate der Chromosomen-Aberrationen in Zellen aller untersuchter AT-Patienten im Vergleich zu Zellen von Kontrollgruppen stark erhöht (Li und Shiraishi, 1990; Pandita und Hittelman, 1992). Auch die Amplifikation bestimmter Markergene in kultivierten AT-Zellen wird als Kriterium der genomischen Instabilität angesehen (Lücke-Huhle, 1987), ebenso der Befund, daß in AT-Zellen die Rate spontaner intrachromosomaler Rekombinationen bis zu 200fach erhöht ist (Meyn, 1993).

Liegt der AT-Defekt in der Reparatur von DNA-Schäden?

Die Analogie des strahlen-überempfindlichen AT-Phänotyps mit dem UV-überempfindlichen Phänotyp der Erbkrankheit Xeroderma pigmentosum legte schon früh den Verdacht nahe, daß es sich hier ebenfalls um einen Defekt in der DNA-Reparatur und dem zellulären DNA-Metabolismus handelt. Es wurden daher zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die das Auftreten und die Reparatur spezifischer strahleninduzierter DNA-Schäden in AT-Zellen quantitativ und qualitativ analysierten.

Das Hauptinteresse galt daher den DNA-Doppelstrangbrüchen, die durch ionisierende Strahlen, nicht aber durch UV-Strahlen, in großer Anzahl entstehen. Verschiedene Arbeitsgruppen erlangten hier mit unterschiedlichen Methoden zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Es wurde allerdings deutlich, daß die Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung in AT-Zellen keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zu normalen menschlichen Zellen zeigt (Coquerelle und Weibezahn, 1981; Conforth und Bedford 1985; Rüniger et al., 1992; Sikpi, 1992; Blöcher et al., 1991).

Als biochemische Besonderheit haben strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche oft eine basenfreie Desoxyribose-Phosphat-Gruppe am freien 5'-Ende. Zur Reparatur dieser Bruchstelle muß die endständige Gruppe entfernt und durch ein vollständiges Nukleotid ersetzt werden. In Extrakten menschlicher Zellen ist daher nach Zugabe bestrahlter DNA die Freisetzung von Desoxyribose-Phosphaten mit chromatographischen Analysen meßbar. Ausschließlich in Extrakten aus AT-Zellen ist etwa die Hälfte der freigesetzten Desoxyribose-Phosphate zusätzlich kovalent modifiziert; die Art der Modifikation ist nach wie vor unbekannt (Karam et al., 1990).

Die Untersuchungen der DNA-Reparaturfähigkeit nach Behandlungen mit alkylierenden Agentien (MMS, MNNG) erbrachten ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse in verschiedenen Arbeitsgruppen. In einigen Arbeitsgruppen wurde eine zelluläre Überempfindlichkeit bestimmter AT-Zelllinien gegenüber alkylierenden Agentien gemessen, die von anderen Arbeitsgruppen jedoch nicht bestätigt werden konnte (Cohen und Simpson, 1983; Paterson et al., 1979; Barfknecht und Little, 1982). Alle anderen untersuchten, definierten DNA-Schäden,

wie Einzelstrang-Brüche (Kohn et al., 1981; Jaspers et al., 1982; Fornace und Little, 1980), UV-induzierte Thymin-Dimere (Paterson et al., 1977; Kantor et al., 1980), DNA-Quervernetzungen nach Mitomycin C-Behandlung (Jaspers et al., 1982; Ikenaga et al., 1983) und apurinische, bzw. apyrimidinische Stellen in der DNA (Sheridan und Huang, 1978) werden in AT-Zellen offensichtlich normal repariert.

Unabhängig von der quantitativen und qualitativen Analyse strahleninduzierter DNA-Schäden konnten auf der Suche nach den molekularen Ursachen des AT-Defekts einige Enzymaktivitäten, die wahrscheinlich an der Exzisionsreparatur strahlengeschädigter DNA teilnehmen, direkt bestimmt werden: Die Messung der Enzymaktivitäten der Uracil-DNA-Glycosylase (Kuhnlein et al., 1978), der apurinen Endonuclease (Inoue et al., 1981; Moses und Beaudet, 1978), sowie der 3 DNA-Polymerasen α , β und γ (Bertazzoni et al., 1978) erbrachte keine Unregelmäßigkeiten in AT-Zellen. Auch Enzyme, die die Tertiärstruktur der DNA verändern, wurden untersucht: In mehreren Arbeitsgruppen wurden Aktivitäten der Topoisomerasen I und II in AT-Zellen gemessen, die sich von denen normaler Zellen unterscheiden. Verschiedene AT-Zelllinien erbrachten jedoch keine übereinstimmenden Ergebnisse (Smith und Makinson, 1989; Davies et al., 1989; Singh et al., 1988). Die Autoren folgern, daß Veränderungen der Topoisomerase-Aktivitäten vermutlich nicht am primären AT-Defekt beteiligt sind.

Da die ionisierende Strahlung über die Bildung von Radikalen in der Zelle wirkt, wurden die Aktivitäten von Enzymen des Radikalstoffwechsels analysiert. Sowohl die Superoxid-Dismutase, als auch die Katalase zeigten normale Aktivitäten in AT-Zellen (Abeliovitch und Cohen, 1978; Brown und Harnden, 1978). Ebenso traten in AT-Zellen keine Unregelmäßigkeiten der Glutathionkonzentrationen auf, verglichen mit normalen Zellen (Kinsella et al., 1982).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in AT-Zellen keine deutlichen Defekte in bekannten Enzymen des DNA-Metabolismus, der Exzisionsreparatur und des Radikalstoffwechsels gefunden wurden. Die Analyse der Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche erbrachte entweder keine Unterschiede zwischen AT- und normalen Zellen, oder schwache Reparaturdefekte in AT-Zellen. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse mag einerseits auf die angewandten Methoden, andererseits auf Fehlinterpretationen der schwachen Effekte zurückzuführen sein. Analoges gilt für die zelluläre Sensitivität gegenüber alkylierende Agentien und die Topoisomerase-Aktivitäten der AT-Zellen. Die Freisetzung modifizierter Desoxyribose-Phosphate in AT-Zellen deutet jedoch auf eine Beteiligung strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche am zellulären AT-Phänotyp, ebenso wie die in allen untersuchten Fällen gefundene, erhöhte Anzahl von Chromosomen-Aberrationen. Chromosomen-Aberrationen werden als direkte Folge ungenügend oder inkorrekt reparierter Doppelstrangbrüche angesehen (Bender et al., 1974; Natarajan und Obe, 1984).

Genetische Analyse der Erbkrankheit AT

Trotz der vielfältigen klinischen und zellulären Symptome, die scheinbar ohne kausale Verknüpfung in jedem der AT-Patienten auftreten können, geht man aufgrund des Vererbungsschemas davon aus, daß der Primärdefekt jedes Patienten in einem Gen liegt. Allerdings legte die Tatsache der unterschiedlichen Ausprägung der Symptome in verschiedenen AT-Patienten schon früh die Vermutung nahe, daß die zugrunde liegenden genetischen Defekte verschiedenen Ursprungs sind. Um diese Vermutung experimentell zu untersuchen, wurden AT-Zellen aus unterschiedlichen Patienten fusioniert. In den resultierenden Heterodikaryons wurde die DNA-Syntheserate nach Bestrahlung, und somit die gegenseitige Komplementationsfähigkeit verschiedener AT-Zelllinien bestimmt. AT-Zellen, die sich nicht komplementierten, wurden in gemeinsame Komplementationsgruppen eingeteilt. Es wurde so 5 verschiedene Komplementationsgruppen (A,C,D,E,V) ermittelt (Jaspers et al., 1988), denen unterschiedliche genetische Defekte zugeschrieben werden. Nicht auszuschließen ist durch diese Versuche die Möglichkeit der intragenischen Komplementation verschiedener AT-Zellen. In diesem Falle würden verschiedene Komplementationsgruppen verschieden mutierte Allele eines Gens in der Population bedeuten.

Physikalische Lokalisierung der AT-Gene durch Kopplungsanalysen

Mit dem Konzept der "reversen Genetik" wird versucht, ein unbekanntes Gen auf dem Chromosom zu lokalisieren, um nach seiner Isolierung und Charakterisierung die Funktion des darin kodierten Proteins zu bestimmen. Die Basis für die Lokalisierung eines unbekanntes Gens bilden Kopplungsanalysen:

Die genetische Kopplung zwischen einem unbekanntes Gen für eine Erbkrankheit und einem bekannten Markergen deutet auf physikalisch benachbarte Genorte auf dem selben Chromosom hin. Nachgewiesen wird die Kopplung durch klassische Segregationsanalysen, das heißt, man vergleicht in möglichst vielen von der Erbkrankheit betroffenen Familien die Segregation des phänotypischen Defektes von den Allelen bekannter Markergene. Je stärker die Kopplung zwischen Markergen und Erbkrankheit ist, desto näher zueinander liegen die 2 verglichenen Gene auf dem selben Chromosom. Die Zahl der durch "crossing-over" erfolgten Rekombinationsereignisse ist ein Maß für den Abstand der beiden untersuchten Genorte. Da die Häufigkeit von "crossing-over" sequenzabhängig ist, basiert die Aussage der Kopplung immer auf einer Wahrscheinlichkeitsdiagnose.

Anhand der Kopplungsanalysen vieler ausgedehnter Familienstammbäume konnten 3 AT-Gene wie folgt lokalisiert werden: Für die Komplementationsgruppen A, C und D wurde der Chromosomenbereich 11q22-23 als Locus identifiziert (Gatti et al., 1988; Sanal et al., 1990; Ziv et al., 1991; Foroud et al., 1991). Eine Untersuchung, die alle Komplementationsgruppen zusammen betrachtete, bestätigte diesen Locus und machte ihn auch für die anderen Komplementationsgruppen wahrscheinlich (McConville, 1990).

Funktionelle Komplementation des AT-Phänotyps durch DNA-Transfer

In den jahrzehntelangen Bemühungen, eines der AT-Gene zu klonieren, wurden einerseits biochemische Besonderheiten bestrahlter DNA in AT-Zellen gesucht, die die zellulären Defekte erklären und somit zu dem verantwortlichen Protein führen können. Andererseits wurden Untersuchungen an bekannten Enzymen durchgeführt, die an Veränderungen der Struktur, dem Metabolismus und der Reparatur von strahlengeschädigter DNA beteiligt sind. In beiden Fällen war man experimentell im wesentlichen an bereits bekannte DNA-Strukturen und Proteine gebunden, so daß die Suche nach dem unbekanntem "AT-Protein" mehr oder weniger nach dem Ausschlußprinzip bereits bekannter zellulärer Komponenten erfolgte.

Das Konzept der funktionellen Komplementation von AT-Zellen durch Transfer der kompletten genetischen Information gesunder Zellen weist diese erhebliche Einschränkung nicht auf und entspricht dem Konzept, das zur Isolierung menschlicher Onkogene erfolgreich angewandt wurde.

Der experimentelle Ansatz, den defekten AT-Phänotyp durch Übertragen von DNA zu komplementieren, basiert auf folgendem Prinzip: Es wird möglichst die komplette genetische Information einer gesunden Zelle portionsweise in eine hohe Anzahl strahlenüberempfindlicher AT-Zellen eingebracht. Diejenige Zelle, die ein intaktes AT-Gen von der gesunden Zelle aufgenommen hat, sollte damit die Strahlenresistenz normaler Zellen erworben haben. Diese komplementierte Zelle kann über die neu erworbene Eigenschaft der Strahlenresistenz aus der großen Anzahl nicht komplementierter Transfektanten selektioniert werden. Aus der genomischen DNA der phänotypisch komplementierten AT-Zelle sollte die neu eingebrachte DNA, also das gesunde AT-Gen, re-isolierbar sein.

Dieser experimentelle Ansatz war jedoch in mehreren Anläufen nicht erfolgreich (Lohrer et al., 1988). In einem Falle konnte durch Transfer von hochmolekularer DNA aus gesunden menschlichen Zellen die Strahlenüberempfindlichkeit, nicht jedoch die "strahlenresistente DNA-Synthese" korrigiert werden. Die dafür verantwortliche, neu in die Zellen eingebrachte DNA war nicht re-isolierbar (Green et al., 1987). Nach Transfektion von Cosmiden, die ebenfalls hochmolekulare menschliche DNA enthielten, wurde inzwischen ein Cosmidklon isoliert, der gleichfalls lediglich die Strahlenüberempfindlichkeit in AT-Zellen korrigiert (Kapp et al., 1992). Dieser Cosmidklon gewinnt zusätzliche Bedeutung durch die Tatsache, daß die Insertion menschlicher DNA aus der vorhergesagten chromosomalen Region des AT-Gens stammt. Es könnte sich bei diesem Cosmid um ein unvollständiges AT-Gen handeln, das noch Teilfunktionen in der Zelle ausüben, aber nicht alle defekten AT-Merkmale komplementieren kann.

In den beschriebenen Fällen traten methodische Schwierigkeiten auf, die die Effizienz des Transfers intakter komplementierender DNA-Moleküle in die Zellen, und somit die Wahrscheinlichkeit des Erfolgs dieser Experimente entscheidend beeinträchtigten: Menschliche Zellen nehmen nach Transfektion nur sehr ineffizient hochmolekulare genomische DNA stabil auf (Colbere-Garapin et al., 1986; Hoeijmakers et al., 1987; Lohrer et al., 1988). Anteile der

exogenen, hochmolekularen DNA werden mit großer Wahrscheinlichkeit durch Rekombinationsereignisse rearrangiert oder sogar, bei fehlendem Selektionsdruck, aus der genomischen DNA wieder eliminiert (Mayne et al., 1988; Dean et al., 1989). Für diese Ereignisse sind wahrscheinlich repetitive Sequenzen der exogenen und/oder endogenen DNA verantwortlich (Kioussis et al., 1987).

Neuere molekularbiologisch-zellbiologische Methoden erlaubten den Transfer kompletter Chromosomen in AT-Zellen. Der defekte AT-Phänotyp war in mehreren Arbeitsgruppen durch Einbringen eines gesunden Chromosoms 11 komplementierbar (Komatsu et al., 1990; Lambert et al., 1991; Ejima et al., 1991; Kodama et al., 1992). Die Verwendung eines partiell deletierten Chromosoms 11, sowie von Chromosomenfragmenten, die an Trägerchromosomen gekoppelt waren, konnten den komplementierenden Bereich auf die Chromosomenbanden 11q22-23 einengen. Der untersuchte Phänotyp war hierbei immer die zelluläre Sensitivität, das Überleben nach Bestrahlung. In einem Fall konnte außerdem gezeigt werden, daß die strahleninduzierte Erhöhung der Chromosomen-Aberrationen ebenfalls korrigiert wurde (Kodama et al., 1992). Lambert und Mitarbeiter beschrieben eine Korrektur des AT-Defekts durch Fusion mit Mikrozellen, die die normale Chromosomenbande 11q23 enthalten, auf der Ebene des zellulären Überlebens, der Hemmung der DNA-Synthese, sowie des Verlaufs der Zellzyklus-Phasen nach Bestrahlung (Lambert et al., 1991). Die funktionelle Komplementation durch Chromosomen, bzw. Chromosomenfragmente bestätigte also die durch Kopplungsanalysen erfolgte Lokalisierung der Gene. Die Klonierung eines AT-Gens auf der Basis komplementierender Chromosomenfragmente ist jedoch, bedingt durch die Größe derselben, sehr unwahrscheinlich.

Ziel der Arbeit

Die in einer Arbeit (Lambert et al., 1991) gelungene, vollständige Komplementation der zellulären AT-Eigenschaften durch Übertragen von Chromosomenfragmenten hat gezeigt, daß die Korrektur des defekten Phänotyps prinzipiell möglich ist. Die fehlgeschlagenen Versuche, die Strahlenüberempfindlichkeit der AT-Zellen durch Einbringen von Bibliotheken kleinerer DNA-Fragmente, wie genomische DNA oder Cosmid-DNA vollständig zu komplementieren, muß also auf methodische Ursachen zurückzuführen sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die phänotypische Komplementation der AT-Zellen durch Transfektion von cDNA-Expressions-Bibliotheken anzustreben. Diese haben gegenüber den bereits experimentell verwendeten genomischen Bibliotheken und Cosmidbibliotheken folgende Vorteile:

- 1) Es wird nur die gesamte transkribierte Information einer gesunden Zelle zur Transfektion verwendet. Nicht-codierende DNA-Bereiche, sowie repetitive Sequenzen, die insgesamt etwa 95% des gesamten Genoms ausmachen, bleiben ohne Einfluß und stören die Transfektionseffizienz nicht.
- 2) Das Fehlen von Intronsequenzen in der cDNA erhöht drastisch die Chancen, komplette Gene in die Empfängerzellen zu transfizieren. Gleichzeitig steigt durch die geringere Größe der cDNA-Klone, im Vergleich zu genomischer DNA und Cosmid-Klonen, die Wahrscheinlichkeit des stabilen Einbaus in das Genom menschlicher Zellen.
- 3) Die konstitutive Transkription der cDNAs durch vorgeschaltete SV40-Promotoren des pcD-Vektors hat zur Folge, daß die neu eingebrachte genetische Information exprimiert wird.
- 4) Ein im cDNA-Vektor integriertes, dominantes Neomycin-Resistenzgen gewährleistet, daß jeder mit G418 selektionierte Zellklon tatsächlich cDNA-Sequenzen erhalten hat.

Aus der genomischen DNA eines komplementierten Zellklons sollte das Re-Isolieren der dafür verantwortlichen cDNA mit Hilfe des gekoppelten Neomycin-Resistenzgens und/oder der bekannten Vektorsequenzen möglich sein. Der funktionelle Beweis der Resistenzvermittlung einer re-isolierten cDNA sollte anschließend über weitere Transfektionen der cDNA oder homologer DNA-Klone erfolgen.

Material

Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton; 5 g Hefe-Extrakt; 10 g NaCl; pH7,4; Angaben pro Liter

XT-Medium: 50 mM Tris; 20 mM MgSO₄; 25 g Bacto-Trypton; 7,5 g Hefe-Extrakt; 0,1 g Diamino-Pimelinsäure; 0,04 g Thymidin, pH 7,5; Angaben pro Liter

SOB-Medium: 20 g Bacto-Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 ml 1 M NaCl; 2,5 ml 1 M KCl; 10 ml 2 M MgCl₂/MgSO₄; pH7,0; Angaben pro Liter

SOC-Medium: SOB-Medium + 20 mM Glucose

Nach Zugabe von 15 g Bacto-Agar/Liter wurden LB- und XT-Agarplatten hergestellt

Wichtige Puffer und Lösungen

20xSSC: 175,3 g NaCl; 88,2 g NaCitrat; pH7,0; Angaben pro Liter

TE: 10 mM Tris, pH7,4; 1 mM EDTA

10xTBE: 54 g Tris-Base; 27,5 g Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA; Angaben pro Liter

10xCIP-Puffer: 0,5 M Tris, pH9,0; 0,1 M MgCl₂; 1 mM ZnCl₂

10xLigase-Puffer: 0,5 M Tris, pH7,4; 0,1M MgCl₂; 0,1 M DTT; 10 mM Spermidin; 10 mM ATP; 1 mg/ml BSA

STB: 100 mM KCl; 45 mM MnCl₂·4H₂O; 10 mM CaCl₂·2H₂O; 3 mM HAcOCl; 10 mM K-MES; 15% Glycerin; pH6,2

DnD: 90% DMSO; 1 mM DTT; 10 mM KAc; pH7,4

STE: 20 mM Tris; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl; pH7,4

HSB: 10 mM Tris; 5 mM EDTA; 300 mM NaCl; 0,1% SDS; pH7,4

2xBBS: 50 mM BES; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; pH6,95

Zelllinien

AT5BIVA: SV40-immortalisierte Fibroblasten aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia (Komplementationsgruppe D)

GM637: Normale, menschliche SV40-immortalisierte Fibroblasten

XP12RO: SV40-immortalisierte Fibroblasten aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Xeroderma pigmentosum (Komplementationsgruppe A)

Die Zelllinien wurden mir von Prof. H. J. Rahmsdorf sowie Frau Dr. Lücke-Huhle (beide Institut für Genetik, Karlsruhe) zur Verfügung gestellt.

Aus folgenden Zellen wurde genomische DNA und mRNA gewonnen:

- GM2994: Primäre Fibroblasten aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Xeroderma pigmentosum (Komplementationsgruppe A)
- AT-Lymph.: EBV-immortalisierte Lymphozyten aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia (Komplementationsgruppe unbekannt)
- HL60: Promyelozytische Leukämiezellen
- SL88: Primäre, normale, menschliche Fibroblasten
- CHO: Chinesische Hamsterzellen (chinese hamster ovary)
- Frosch: Primäre Froschzellen (*X.laevis*)
- Hefe: *Saccharomyces cerevisiae*
- E14: Embryonale Maus-Stammzellen
- MX-21: Maus-Melanomzellen (K1735)
- AS: Bsp73AS, Rattenzelllinie

Die DNA folgender Zelllinien stand für Hybridisierungs-Analysen zur Verfügung:

1) Mensch-Nager-Hybridzelllinien:

Verschiedene Maus- und Hamsterzelllinien, die unterschiedliche menschliche Chromosomen enthalten. Die DNA war nach Verdau in einem Gel aufgetrennt und auf einer Membran immobilisiert worden. Diese Membran wurde freundlicherweise von Dr. Grzechik (Marburg) zur Verfügung gestellt.

2) Mensch-Maus-Hybridzelllinien:

Die DNA von 4 Mauszelllinien, die unterschiedliche Anteile des menschlichen Chromosoms 11 enthalten, wurde mir von Dr. C. Jones (Denver, USA) zur Verfügung gestellt.

Bakterien

E.coli (DH5 α): F⁻, thi-1, Φ 80d, lacZ Δ M15, endA1, recA1, hsdR17, (r_k⁻, m_k⁺), supE44, d⁻, gyrA96, U196, Δ (lacZYA-argF).

Plasmide

- pSV2neo: Erhalten von Prof. B. Kaina (Institut für Genetik, Karlsruhe)
- pH-cJ-1: Erhalten von Dr. P. Angel (Institut für Genetik, Karlsruhe)
- pcD-MPG: Erhalten von E. Eschbach (Institut für Genetik, Karlsruhe)
- pUC-MPG: Erhalten von E. Eschbach (Institut für Genetik, Karlsruhe)
- pRGAPDH-13: Erhalten von Prof. H. J. Rahmsdorf (Institut für Genetik, Karlsruhe)

DNA-Bibliotheken

- pcD-cDNA-Bibliothek:** Die mit der Bibliothek transformierten Bakterien wurden von Prof. B. Kaina zur Verfügung gestellt und enthalten menschliche cDNAs (Konstruiert von Prof. H. Okayama, Osaka, Japan)
- pcD-Bas-cDNA-Bibliothek:** Diese cDNA erhielt ich von Prof. H. Okayama (Osaka, Japan) und transformierte sie in E.coli DH5 α
- pWE15-Cosmid-Bibliothek:** Erhalten von Prof. B. Kaina und Dr. P. Angel, enthält menschliche genomische DNA (konstruiert von STRATAGENE, LaJolla, USA)

Oligonukleotide

- 1) pcD1: ($T_m = 84,9^\circ\text{C}$) 5'- TCC CTC GAG GGA TTC CCT GGT TCT TTC CGC -3'
- 2) pcD2: ($T_m = 82,2^\circ\text{C}$) 5'- CCC GGA TCC GGT GGT GGT GCA AAT CAA AGA -3'
- 3) AT85: ($T_m = 74,8^\circ\text{C}$) 5'- TCT GAT GTT CAA GAG CAG GAG GAG G -3'
- 4) AT451: ($T_m = 74,1^\circ\text{C}$) 5'- AAA GAA TTT GAC CCA GTG ATT AAG GTG GC -3'
- 5) neo1: ($T_m = 85,5^\circ\text{C}$) 5'- AAG GGA CTG GCT GCT ATT GG -3'
- 6) neo2: ($T_m = 85,5^\circ\text{C}$) 5'- CGA TAC CGT AAA GCA CGA GG -3'
- 7) 1201 (pUC/M13 reverse) 5'- AAC AGC TAT GAC CAT G -3'
- 8) 1212 (pUC/M13) 5'- GTT TTC CCA GTC ACG AC -3'
- 9) oligo (dT): 5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'

Radiochemikalien

α - ^{32}P -dCTP (3000 Ci/mmol), α - ^{35}S -dATP (600 Ci/mmol), ^{14}C -Thymidin (50 $\mu\text{Ci/ml}$; 51,4 mCi/mmol) und ^3H -Thymidin (1 mCi/ml; 45 Ci/mmol) wurden von Amersham-Buchler (Braunschweig), bezogen.

Enzyme

Alle Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Biolabs (Frankfurt), Boehringer (Mannheim), Pharmacia (Freiburg) und USB (Cleveland) bezogen. Taq-Polymerase für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde von Amersham-Buchler bezogen, ProteinaseK von Sigma (München).

Bezugsquellen

Alle hier aufgeführten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in pro analysi (p.A.) Qualität bezogen. Wässrige Lösungen wurden mit über ein Milli-Q Reinstwasser-System (Millipore) gereinigtem Wasser in sterilen Gefäßen angesetzt.

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hameln
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniak	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
APS (Ammonium-Peroxo-Disulfat)	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, Detroit
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto-Trypton	Difco, Detroit
BES	Sigma, München
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Rinder-Serum-Albumin)	Serva, Heidelberg
Butanol	Merck, Darmstadt
Cadmiumchlorid	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Biomol, Hamburg
Chloroform (p.A.)	Merck, Darmstadt
Chloroform (technisch)	Roth, Karlsruhe
DAPI	Sigma, München
Dimethyldichlor-Silan	Merck, Darmstadt
Dinatriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Fluka, Buchs
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
DTT	Boehringer, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
FCS	Gibco, Karlsruhe
Ficoll	Sigma, München
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Gelase, Gelasepuffer	Biozym, Hameln
Geneticin [®] -sulphat (G418)	Gibco, Karlsruhe
GF/C-Filter	Bender und Hobein, Karlsruhe
Giemsa-Färbelösung	Merck, Darmstadt
Glasfaser-Filter	Scatron,
Glucose	Sigma, München
Glutamin	Sigma, München
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glyoxal	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Difco, Detroit
Hyperfilm XR [®]	Amersham-Buchler, Braunschweig
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt

Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid	USB, Cleveland
Isoton	Molter, Neckargemünd
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Gibco, Karlsruhe
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Lachsspermien-DNA (TypIII)	Sigma, München
LMP-Agarose	Biozym, Hameln
Lysin	Sigma, München
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
MES	Roth, Karlsruhe; Sigma, München
Methanol (technisch)	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma, München
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Nylon-Membran (Hybond)	Amersham-Buchler, Braunschweig
Oligo-dT-VII-Cellulose	Pharmacia, Freiburg
PEG	Sigma, München
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Sigma, München
Prime-it-Markierungskit	Stratagene,
Propanol	Merck, Darmstadt
Rhubidiumchlorid	Sigma, München
Sarcosyl	Sigma, München
Schwefelsäure	Sigma, München
SDS	Roth, Karlsruhe
Sephadex G50	Pharmacia, Freiburg
Spermidin	Sigma, München
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Szintillationsflüssigkeit	Packard, Groningen
T7-Sequenzierungs-Kit	Pharmacia, Freiburg
TEMED	Biorad, München
Tetrachlor-Kohlenstoff	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Trinatriumphosphat	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Biorad, München
tRNA	Sigma, München
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Whatman 3MM [®]	Bender und Hobein, Karlsruhe
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen
Zinkchlorid	Sigma, München

METHODEN

1. Zellkultur

Die adhärenent wachsenden menschlichen Zelllinien AT5BIVA, GM637 und XP12RO wurden in Dulbecco's MEM mit 15% FCS kultiviert. Stabile Transfektantenklone, die von diesen Zelllinien erhalten worden waren, wurden zusätzlich mit G418 unter Selektionsdruck kultiviert. Zum Passagieren, bzw. zum Einsetzen der Zellen in die Versuche wurde das Medium abgenommen, kurz mit Trypsin (0,25%) gespült und die Zellen mit Trypsin (ein Zehntel des ursprünglichen Mediumvolumens) abgelöst. Durch Zugabe eines zweifachen Volumens Medium wurde die enzymatische Aktivität des Trypsins abgestoppt und die Zellen bis maximal 1:15 verdünnt und weiterkultiviert. Vor dem Einsetzen in die Versuche wurden die geernteten Zellen in einem "Coulter Counter", verdünnt mit Isoton (1:10 oder 1:20), gezählt. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei 37°C und einem CO₂-Anteil der Luft von 6%.

1.1. Fixieren und Färben von Zellen

Nach Abnehmen des Mediums wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und mit Ethanol bedeckt. Nach 10 -15 min in Ethanol waren die Zellen fixiert und konnten nach Dekantieren des Alkohols mit einer Giemsa/Kristallviolett-Lösung (0,5% Kristallviolett/ 5% Giemsa, in Wasser) angefärbt werden. Nach 15-minütigem Anfärben wurde die Färbelösung zur mehrfachen Nutzung wieder abgenommen, die Kulturgefäße unter fließendem Wasser von restlichem Farbstoff befreit und über Nacht trocknen gelassen.

1.2. Stabile Transfektion (Chen und Okayama, 1987)

Das hier angewandte Transfektionsprotokoll zeichnet sich durch eine hohe Effizienz der DNA-Aufnahme aus. Die Spender-DNA wird in viele individuelle Empfängerzellen eingebaut; diese erhalten nur wenige Kopien der transfizierten DNA. Erreicht wird dies durch eine verzögerte Präzipitation der DNA durch Inkubation bei pH6,9 in 3% CO₂ und bei 35°C.

1 Tag vor der Transfektion wurden 1×10^6 Zellen in 10cm-Petri-Schalen mit 10 ml Medium eingesät. 20 µg DNA wurden mit 0,5 ml 0,25 M CaCl₂ gemischt und unter starkem Schütteln in 0,5 ml 2xBBS (50 mM BES, pH6,95; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄) pipettiert. Die Mischung wurde 10 bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise unter Schwenken der Petri-Schale auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 35°C und 3% CO₂ wurden die Zellen 2mal mit PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen trypsiniert und auf eine 15cm-Petri-Schale in G418-haltiges Medium verteilt. Die Selektion stabiler Transfektanten anhand des dominanten Neomycin-Markergens erfolgte bei 400 µg/ml G418 für AT-Zellen, bzw. 800 µg/ml für

GM637-Zellen während 12-14 Tagen. Stabile Transfektanten wurden in G418-haltigem Medium weiterkultiviert.

Die Transfektions-Effizienz wurde nach der Methode von Chen und Okayama berechnet: Die Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion trypsiniert und eine definierte Anzahl in parallelen Ansätzen mit und ohne Selektionsmedium kultiviert. Nach etwa 14 Tagen wurden die Kolonien fixiert und gefärbt. Der Mittelwert der in Selektionsmedium gewachsenen G418-resistenten Kolonien wurde dividiert durch den Mittelwert der nicht selektionierten Kolonien, der Quotient multipliziert mit 100 ergab so die Transfektionseffizienz in Prozent.

1.3. Bestrahlung der Zellen

Zur γ -Bestrahlung wurden zwei Co^{60} -Strahlenquellen (Atomic Energy of Canada) verwendet:

Gammacell 200, Dosisleistung: 32 rad/min (Stand: 1.6.1993)

Gammacell 220, Dosisleistung: 790 rad/min (Stand: 1.6.1993)

Die Röntgenbestrahlung erfolgte mit einer Philips-Röntgenröhre (Mo 300) bei 250 kV und 10 mA mit einem 1mm dicken Kupfer-Filter (Dosisleistung: 16,1 rad/min).

Die Behandlung der Zellen mit ionisierenden Strahlen konnte direkt im Zellkulturgefäß durchgeführt werden.

1.4. Überlebenskurven nach Bestrahlung

48 Stunden vor der Bestrahlung wurden für jeden Dosis-Wert 5×10^5 Zellen in 10cm-Schalen überimpft. Nach der Bestrahlung der subkonfluenten Kulturen wurden die Zellen sofort gut trypsiniert, gezählt und 2fach bis 3fach parallel ausplattiert. Nach 12 bis 14 Tagen wurden die Kolonien, die aus den eingesäten Einzelzellen entstanden waren, gefärbt und gezählt. Als "Kolonie" wurden Zellklone gewertet, die mit aus mindestens 50 Zellen bestanden.

In einem verkürzten Protokoll wurden die Zellen einer subkonfluenten Petri-Schale direkt trypsiniert, gezählt und verdünnt ausgesät und nach 3 bis 4 Stunden Anheftungszeit die Einzelzellen auf der Petri-Schale bestrahlt.

Die Überlebensrate wurde ermittelt aus dem Quotient der gezählten Kolonien eines Bestrahlungswertes zur Kolonienzahl der unbestrahlten Kontrolle. Die Kolonienzahl der unbestrahlten Kontrolle dividiert durch die Zahl der tatsächlich eingesäten Zellen ist ein Maß für die Platierungseffizienz (PE) der Zellen.

1.5. Röntgen-Selektion

Die Röntgen-Selektion basiert auf dem von Dr. H. Lohrer (Lohrer, 1987) angewandten Prinzip: Um wenige strahlenresistente Zellen aus einer Population strahlensensitiver AT-Zellen retten zu können, mußte eine schwache Dosis ionisierender Strahlen mehrfach appliziert werden. Die Bestrahlungsintervalle lagen aufgrund der Generationszeit der AT-Zellen (22-26 Stunden) bei 24 Stunden. Während der Bestrahlungsintervalle sollten subletal "getroffene" AT-Zellen nicht weiter auswachsen können und die gesamte Population sensitiver Zellen, abhängig von der

verwendeten Dosis, somit in einem bestimmten Zeitraum abgetötet sein ("Endpunkt der Selektion"). Die Häufigkeit der benötigten Bestrahlungen in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis, sowie die Wahrscheinlichkeit des Überlebens resistenter Wildtypzellen ergibt sich rechnerisch aus den für die beiden Zelltypen unterschiedlichen Dosis-Effekt-Kurven. Die experimentell ermittelten Zusammenhänge zwischen Häufigkeit der Bestrahlungen und Bestrahlungsdosis bestätigen die theoretisch ermittelten.

In dieser Arbeit wurden folgende 2 Selektionsregimes angewandt:

- 1) 10^6 Zellen pro 10 cm-Petri-Schalen wurden mit 0,6 Gy 23 mal in 24-Stunden-Intervallen bestrahlt.
- 2) 5×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte wurden 16 mal mit 0,6 Gy in 24-Stunden-Intervallen bestrahlt.

Es wurde je nach Bedarf alle 2 bis 4 Tagen das verbrauchte Medium entfernt und frisches zugegeben.

Nach Anwendung der beiden Selektionsregimes wurde der "Endpunkt der Selektion" in der Regel erreicht, das heißt es waren nach weiterer Kultivierung der bestrahlten Ansätze keine überlebenden AT-Zellen zu Kolonien ausgewachsen. Alle strahlensensitiven AT-Zellen waren durch die Bestrahlung abgetötet worden.

1.6. Isolieren von Zellklonen

Kolonien, die nach der Transfektion oder Röntgenselektion gewachsen waren, wurden in manchen Fällen zur weiteren Untersuchung als Einzelklone isoliert. Dazu wurden, nach vorheriger Markierung der Position am Boden der Kulturgefäße, durch Auf- und Abpipettieren von wenigen μl Trypsin die Zellen direkt im Gefäß trypsiniert und resuspendiert. Die Zellen wurden stufenweise in Vertiefungen von 24-Loch-Platten, danach in 6-Loch-Platten großgezogen. Um Kontamination mit Zellen anderen klonalen Ursprungs auszuschließen, wurden auf diese Weise nur Kolonien isoliert, die vereinzelt, ohne Nachbarzellen in dem Gefäß vorlagen.

2. Messung der DNA-Syntheserate

2.1. Mit dem "cell harvester"

Für jeden Meßpunkt wurden 10^4 Zellen in Vertiefungen von 96-Loch-Platten ausgesät. Nach 12 Stunden wurde den Zellen ^{14}C -Thymidin (Endkonzentration $0,025 \mu\text{Ci/ml}$) zugegeben. Nach weiteren 12 Stunden wurde das Medium abgenommen und frisches zugegeben und sofort bestrahlt. 3 Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen für 60 min mit ^3H -Thymidin (Endkonzentration $5 \mu\text{Ci/ml}$) inkubiert, auf Eis gestellt und trypsiniert. Die Ernte und Lyse der Zellen erfolgte im "cell harvester" (combi cell harvester, Scatron) durch 3 Waschschrte mit

deionisiertem Wasser und Aufsaugen der genomischen DNA auf Glasfaserfilter. Die Filter wurden über Nacht getrocknet, für mindestens 8 Stunden unter Schütteln in Szintilationsflüssigkeit gehalten und im Szintilationszähler die ^3H - bzw. ^{14}C -Zerfälle gezählt. Pro Meßpunkt wurden 8-12 parallele Ansätze durchgeführt.

2.2. Mit TCA-Fällung

Hier wurden 2×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte für jeden Meßpunkt ausgesät. Nach 24 Stunden wurde ^{14}C -Thymidin zugegeben und für weitere 20 Stunden inkubiert. Nach dem darauffolgenden Abnehmen des ^{14}C -Mediums und Zugabe frischen Mediums wurden die Zellen bestrahlt und nach 3 Stunden auf Eis trypsiniert. Die abgelösten Zellen wurden auf GF/C-Filter gesaugt und sofort mit 5 ml Trichloressigsäure die DNA ausgefällt. Mit 10 ml 80% Ethanol und 10 ml 100% Ethanol wurden die Filter gewaschen, danach getrocknet und wie oben beschrieben weiterbehandelt. Pro Meßpunkt wurden 3 parallele Ansätze durchgeführt.

Die Berechnung der DNA-Syntheseaktivität erfolgte durch Abgleichen der gemessenen ^3H -Thymidin-Zerfälle mit der DNA-Menge, die über den internen ^{14}C -Thymidin-Standard berechnet wurde. Der Quotient aus den gemessenen ^3H -Thymidin-Zerfällen/ ^{14}C -Thymidin-Zerfällen ergab die DNA-Syntheserate eines Meßpunktes. Die Mittelwerte der parallelen Meßpunkte nach Bestrahlung wurden mit den unbestrahlten Werten verrechnet. Hieraus ergab sich die durch Bestrahlung reduzierte DNA-Syntheserate.

3. Zellzyklus-Analyse

Zur Untersuchung des zellulären Proliferationsverhaltens wurden durchflußzytometrisch die Zellzyklusphasen einer Zellpopulation bestimmt. Die Zuordnung der Zellen zu einer der Zellzyklusphasen erfolgte nach Proportionalfärbung der zellulären DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff. In dieser Arbeit wurde die DNA mit DAPI (4,6'-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt. Der Farbstoff hat sein Absorptionsmaximum bei 340 nm, sein Fluoreszenzmaximum liegt bei 488 nm. Die Bindung des Farbstoffes erfolgt spezifisch an AT-reicher DNA.

Von den zu analysierenden Zellpopulationen wurden die Kerne präpariert, um Artefakte (cytoplasmatische Fluoreszenz durch Doppelstrang-RNA) auszuschließen. Dabei wurde im wesentlichen die zu einem Einschnitt-Protokoll verkürzte Originalvorschrift von Vindelov ("pH10-procedure", 1977) angewandt: Pro 10^6 Zellen wurde 1 ml DAPI-Lösung (5,4 μM DAPI; 2 mM MgCl_2 ; 0,15 M NaCl; 0,1% Triton-X 100 in 0,1 M Tris, pH7,3) zugegeben. Dadurch wurden die Zellkerne freigesetzt und gleichzeitig die DNA angefärbt. Vor der Fluoreszenzmessung wurden die Zellkerne durch eine Membran (PA-28/16, Nybolt, Schweiz) mit der Porengröße 28 μm filtriert, um Aggregationen der Kerne auszuschließen.

Die Zellkerne wurden in einem PAS-II Durchflußzytometer (Partec) untersucht. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte durch eine UV-Lichtquelle (Quecksilberhochdrucklampe, HBO 100W). Von einem Photomultiplier wurden die von der angefärbten DNA ausgesendeten Lichtimpulse gemessen. Ein nachgeschalteter Vielkanal-Analysator sortierte die aufgenommenen Impulse nach ihrer Intensität. Dabei wurde jede Fluoreszenzintensität einem bestimmten Kanal zugeordnet, der somit einer bestimmten DNA-Menge entspricht. In einem Histogramm wurde die Anzahl der gemessenen Zellkerne pro Kanal aufgetragen.

Die gemessenen Histogramme wurden zunächst mit einem an das Durchflußzytometer gekoppelten Rechner auf Disketten gespeichert. Durch ein Umwandlungsprogramm (MS-File, PARTEC) wurden die Werte für ein DOS-Betriebssystem lesbar gemacht und mit einer Diskette auf einen IBM kompatiblen PC übertragen. Die mathematische Auswertung erfolgte hier mit dem Computerprogramm "MultiCycle" (= multiple option cell cycle fitting, von P. S. Rabinovitch, 1987; Phoenix Flow Systems, San Diego, CA). Dem Auswertungsprogramm liegen folgende biologischen Prinzipien zugrunde: Alle genetisch identischen Zellen einer Kultur haben in der G1-Phase des Zellzyklus den gleichen DNA-Gehalt ($2n$). Sie binden daher gleich viel Fluoreszenzfarbstoff und emittieren die gleiche Fluoreszenzintensität, welche in einem Kanal zusammengefaßt wird. Alle Zellen der (G2+M)-Phase haben den doppelten DNA-Gehalt ($4n$) und werden somit einer doppelt hohen Kanalzahl zugeordnet. Zellen, die in der Replikation begriffen sind (S-Phase), werden je nach bereits replizierter DNA Kanälen zwischen G1 und (G2+M) zugeordnet. Biologische Effekte, sowie Meßungenauigkeiten im optischen und elektrischen System verhindern den idealisierten Fall, daß G1- und (G2+M)-Zellen in einem einzigen Kanal erscheinen. Es kommt daher zu einer Verbreiterung der Spitzen ("peaks").

4. Analyse von Nukleinsäuren

4.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde spektrophotometrisch durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 260 nm durchgeführt. Eine $OD_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA oder 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Einen Hinweis auf Verunreinigungen gibt die OD bei 280 nm (hier absorbieren Phenol, DNA und Proteine). Das Verhältnis der OD_{260} zu OD_{280} sollte im Idealfall 1,8:1 bei DNA und 2:1 bei RNA sein.

4.2. Phenol-Extraktion von Nukleinsäuren

Zum Trennen der DNA von Proteinen nach Restriktionsverdau oder Dephosphoryllierung von DNA-Strangenden wurde die DNA wie folgt aus dem Ansatz extrahiert: Das Volumen wurde mit H_2O bidest. auf mindestens 100 μl aufgefüllt und gleiches Volumen eines Phenol-

Chloroform-Gemisches (Gesättigt mit 0,5 M Tris-Base, pH8,5 und 10 mM EDTA, pH 8,0) zugegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurde zur Phasentrennung 5 min abzentrifugiert, die obere wässrige Phase abgenommen und noch einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert.

4.3. Fällung von Nukleinsäuren

Die gelöste DNA wurde in 3 M Natriumacetat-Lösung (pH4,8) auf eine Endkonzentration von 0,3 M gebracht und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gemischt. Die Fällung erfolgt über Nacht bei -20°C oder 1 Stunde bei -80°C. Das Präzipitat wurde bei 13000xg 20 min abzentrifugiert, zur Entfernung von Salzresten mit 80% Ethanol gewaschen, nochmals abzentrifugiert und unter Vakuum getrocknet.

Hochmolekulare, genomische DNA wurde mit 1 Volumen Isopropanol und 0,3 M Natriumacetat bei Raumtemperatur gefällt. Die ausgefällte DNA konnte auf eine Pasteurpipete aufgespult werden. Durch Schwenken in 80% Ethanol wurden Salzreste entfernt; die DNA wurde einige Stunden luftgetrocknet, in TE aufgenommen und bei 4°C gelagert.

4.4. Sequenzierung

Es wurde in dieser Arbeit die Didesoxy-Methode (Sanger, 1977) mit der Sequenase und den Reagentien von USB (Cleveland, USA) durchgeführt:

Die zuvor gefällte und getrocknete DNA (2 bis 3 µg) wurden in 40 µl Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH; 0,2 mM EDTA, pH8,0) aufgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur denaturiert. Mit 4 µl 2 M Ammoniumacetat (pH4,5) und 100 µl Ethanol wurde die DNA erneut ausgefällt, in 80% Ethanol gewaschen und die getrocknete DNA in 7 µl Wasser aufgenommen. 2 µl 5xSequenzierpuffer, sowie 1 µl Primer (1 bis 5 ng) wurden zugegeben, das ganze 3 min bei 65°C erhitzt und zum Anlagern der Primer an die komplementäre Sequenzen der Matrizen-DNA langsam für 30 bis 60 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Markierungsreaktion wurde gestartet mit 1 µl 0,1 M DTT, 2 µl verdünntem (1:5) Markierungs-Mix, 1 µl ³⁵S-dATP und 2 µl T7-DNA-Polymerase (1:8 verdünnt in TE). Nach 5 min Reaktionszeit wurden je 3,5 µl in Eppendorff-Gefäße überführt, die je 2,5 µl der verschiedenen Terminationsmischungen für die 4 Nukleotide enthielten und auf 37°C vorgewärmt waren. Nach gutem Durchmischen wurden die Gefäße weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden beendet durch Zugabe von je 4 µl Formamid-Probenpuffer. Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben bei 95°C 3 min denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Es wurden je 4 µl der Proben in die Taschen eines 6%igen denaturierenden Harnstoffgels gegeben und bei 1500 V und 12 mA für 2 bis 4 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt.

4.5. Denaturierende Acrylamid-Harnstoff-Gele

Das für Sequenzierreaktionen verwendete Gelsystem trennt DNA durch die 8,3 M Harnstoffkonzentration unter denaturierenden Bedingungen auf. Die Glasplatten (20x39cm) wurden wie folgt vorbehandelt: Beide Glasplatten wurden mit Ethanol gereinigt, die Platte mit dem Ausschnitt wurde mit 1,5 ml Dimethyldichlor-Silan (gelöst in Tetrachlor-Kohlenstoff) gleichmäßig überschichtet, trocknen gelassen und danach kräftig poliert. Auf die andere Platte wurde eine Mischung aus 3,3 ml "Haftsilan" (150 µl Silan in 50 ml Ethanol) und 100 µl 100% Essigsäure gleichmäßig verteilt, trocknen gelassen und nach Abspülen mit Ethanol ebenfalls gut poliert. Die beiden Platten wurden mit 0,1 mm dicken Abstandhaltern zusammengebaut. Für ein 6%iges Gel wurden 30 ml einer 6% Acrylamidlösung mit 8,3 M Harnstoff benötigt: 100 ml einer deionisierten Acrylamid:Bisacrylamid-Lösung (30:0,8) wurden mit 50 ml 10xTBE (1x: 90 mM Tris pH8,3; 90 mM kristall. Borsäure; 2,5 mM EDTA pH8.0) versetzt und darin 250g Harnstoff gelöst. Die dann auf 500 ml mit Wasser aufgefüllte Lösung wurde noch steril filtriert und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Nach 2 min Entgasen und Zufügen von 15 µl TEMED und 250 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung wurde das Gel gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach 30 min war das Gel polymerisiert und konnte bei 4°C einen Tag aufbewahrt werden.

Die Gelplatte wurde dann senkrecht in eine Gelelektrophorese-Apparatur eingespannt und zur gleichmäßigen Wärmeverteilung mit einer Aluminiumplatte bedeckt.

Als Anoden- und Kathodenpuffer dienten je 375 ml 0,5x TBE. Nach Entfernen des Kammes wurden die Taschen von Harnstoff freigespült. In einem Vorlauf (30 min bei 30 W) wurde das Gel vorgewärmt. Die in Formamid-Probenpuffer aufgenommenen Proben wurden 3 min auf 95°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 25-30 Watt bis zur gewünschten Strecke. Nach dem Lauf wurde die mit Dimethyldichlor-Silan beschichtete Platte abgehoben und durch sofortiges Einlegen in 10% Essigsäure etwa 15 min lang der Harnstoff herausgelöst. Nach gründlichem Spülen mit Wasser wurde das Gel bei 80°C mindestens eine Stunde getrocknet und danach bei -80°C autoradiographiert.

5. Nukleinsäure-Präparationen

5.1. Mini-Plasmid-DNA-Präparation

Die Bakterienkolonie wurde in 3 ml LB-Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) überimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml dieser Kultur wurden in Eppendorfgefäße überführt und bei 4000xg 5 min pelletiert. Der Niederschlag wurde in 100 µl Lysozymbilösung (4 µg/ml Lysozym; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA, pH7,8; 25 mM Tris pH8,0) resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung (0,2 M NaOH; 1% SDS) und Mischen wurden 150 µl 3 M

Natriumacetat zugegeben und 5 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Der Überstand wurde abgenommen, mit 1 ml Ethanol versetzt und 10 min auf Eis gestellt. Die ausgefallene Plasmid-DNA wurde durch 10 min Zentrifugation bei 13000xg pelletiert, mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 - 50 µl H₂O gelöst.

5.2. Maxi-Plasmid-DNA-Präparation

Die Bakterienkolonie wurde in 2 ml LB-Nährmedium mit Ampicillin (100 µg/ml) überimpft und bei 37°C etwa 4 Stunden geschüttelt. 200 ml Selektionsmedium wurden mit 150 µl dieser Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Erlenmeyerkolben geschüttelt

Diese Übernachtskultur wurde 10 min bei 4000xg zentrifugiert, der Bakterien-Niederschlag in 10 ml Lysozym-Lösung (50 mM Glucose; 10 mM EDTA, pH7,8; 25 mM Tris pH8,0) resuspendiert und 30 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe und Durchmischen von 20 ml SDS-Lösung (0,2 M NaOH; 1% SDS) wurde erneut 5 min auf Eis abgekühlt. Dadurch ausgefallene Proteine und hochmolekulare genomische DNA konnten durch Zentrifugation (1700xg für 20 min bei 4°C) pelletiert werden. Zum Überstand wurde das 2,5-fache Volumen kaltes Ethanol zugegeben und die Plasmid-DNA mindestens 30 min bei -80°C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren (1700xg; 10 min; 4°C) wurde die DNA getrocknet und erneut in 10 ml 0,1 M NaAcetat und 50 mM Tris pH8,0 gelöst.

Nach Zugabe von 4,5g CsCl und 40 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde die Lösung auf zwei 5 ml Zentrifugenröhrchen (VTi65) verteilt, mit einer CsCl-Lösung der gleichen Konzentration aufgefüllt und zugeschweißt. Nach 16 Stunden Ultrazentrifugation im Beckman VTi65-Vertikalrotor bei 55000 U/min (20°C) wurde die "supercoiled"-Plasmidbande abgesaugt und nach Vereinigen der beiden Ansätze für weitere 6 Stunden ultrazentrifugiert. Nach erneutem Absaugen der "supercoiled"-Plasmidbande konnte das Ethidiumbromid mit wassergesättigtem l-Butanol aus der Lösung extrahiert werden. Die DNA-Lösung wurde mit H₂O auf 4 ml aufgefüllt, NaAcetat zu einer Endkonzentration von 0,2 M zugegeben und die DNA über Nacht bei -20°C ausgefällt. Nach 30 min Zentrifugieren bei 1700xg (4°C) wurde das DNA-Pellet mit 10 ml 80% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet und in Wasser gelöst.

5.3. Plasmid-DNA-Präparation aus cDNA-Bibliotheken

Um die Komplexität der cDNA-Bibliotheken zu erhalten, wurden zur Plasmid-DNA-Präparation in 4 parallelen Ansätzen etwa 10⁶ Bakterienzellen/Platte (25x25 cm) ausplattiert. Nach 24-30 h Wachstum auf XT-Agarose (50 µg/ml Kanamycin) wurden die Bakterienkolonien mit einem Gummischaber abgelöst, in 200 ml XT-Medium gut resuspendiert und wie üblich (s.o.) weiter aufgeschlossen.

5.4. Präparation genomischer DNA aus Säugerzell-Kulturen

Die Zellen einer 15cm-Petri-Schale wurden trypsiniert, in einem 50ml-Falcon-Röhrchen abzentrifugiert, 1mal mit PBS gewaschen und in mindestens 3 ml PBS resuspendiert. Nach Zugabe von einem halben Volumen 3xLysepuffer (3% Sarcosyl; 0,07 M Tris, pH8,5; 0,025 M EDTA, pH8,1) und 1,5 mg/10 ml Proteinase K wurden die Zellen 2 Stunden bei 37°C aufgeschlossen. Die Phenolextraktion erfolgte mit 1 Volumen Phenol durch 45 min Schwenken auf einer Rotationsscheibe und Zentrifugation bei 2000 U/min für 15 min. Die obere wässrige Phase wurde 2 weitere Male mit Phenol versetzt und aufgereinigt. Die Entfernung des Phenols erfolgte auf analoge Weise durch Verwendung von Chloroform:Isoamylalkohol (24:1). Der letzte Überstand wurde über Nacht in 1xTE dialysiert. Auf den RNaseA-Verdau (50 µg/ml RNaseA; 2 Stunden bei 37°C) folgte der ProteinaseK-Verdau (100 mg/ml ProteinaseK, 1 Stunde bei 37°C). Die DNA wurde erneut 2 mal phenolisiert und das Phenol mit Chloroform:Isoamylalkohol entfernt. Die nachfolgende Dialyse erfolgte für 2 Tage in 1xTE mit Pufferwechsel und unter Rühren. Die dialysierte DNA wurde wie beschrieben ausgefällt.

In einem verkürzten Verfahren wurde die DNA einer kleineren Zellmenge isoliert:

Die Zellen einer subkonfluenten 10cm-Petri-Schale wurden mit PBS gewaschen und mit einem Gummischaber in 3 bis 5 ml PBS abgekratzt. Nach Zentrifugation (1000 U/min für 10 min) wurde das Zellpellet in 1 ml 2xTEN (20 mM Tris, pH7,5; 20 mM EDTA; 0,3 M NaCl) resuspendiert. Durch Zugabe von 40 µl 20% SDS (Endkonzentration 0,4%) wurden die Zellen aufgebrochen. Mit 50 µl ProteinaseK (20 mg/ml) und 10 µl Wasser wurde die Lösung 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 2 Phenol- und 1 bis 2 Chloroform:Isoamylalkohol-Schritten wurde die DNA mit 5 ml Ethanol und 75 µl 4 M NaCl gefällt. Die nicht vollständig getrocknete DNA wurde nach dem Aufnehmen in 900 µl TE entweder unter gleichzeitiger Zugabe von RNaseA in Restriktionsverdaus eingesetzt oder einer separaten RNaseA-Behandlung (1 mg/ml RNaseA; 2 Stunden bei 37°C) und ProteinaseK-Behandlung (0,2% SDS; 20 mg/ml ProteinaseK; 1 Stunde bei 37°C) unterworfen. Die RNaseA-/ProteinaseK-behandelte DNA wurde erneut 3 mal mit Phenol sowie 1 mal mit Chloroform:Isoamylalkohol versetzt, Ethanol gefällt, getrocknet und in 50 bis 100 µl TE über Nacht bei 4°C gelöst.

5.5. Präparation von poly(A)⁺-mRNA aus Zellkulturen

Die Zellen einer subkonfluenten 14cm-Petrischale wurden mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen, in 10 ml kaltem STE (100 mM NaCl; 20 mM Tris, pH7,4; 10 mM EDTA, pH7,8) mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein 50ml-Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 300 µg/ml ProteinaseK und 0,5% SDS wurde die Mischung 30 sec mit einem Ultraturrax-Messerhomogenisator homogenisiert. Nach 45 bis 60 min Inkubation bei 37°C wurde NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugesetzt. Etwa 50 mg Oligo-dT-VII-Cellulose, die in 1 ml HSB (0,3 M NaCl; 10 mM Tris, pH7,5; 5 mM EDTA, pH7,8; 0,1% SDS) resuspendiert war, wurde zugegeben. Durch Mischen über Nacht bei Raumtemperatur auf einer Rotationsapparatur wurde die poly(A)⁺-RNA an die Oligo-dT-VII-Cellulose adsorbiert. Nach

Abzentrifugieren (2 min bei 350xg) wurde die Cellulose 3 mal mit 10 ml HSB gewaschen. Die RNA wurde mit sterilem Wasser von der Cellulose eluiert, indem 3 mal mit je 1 ml Wasser und das letzte Mal mit 1,5 ml Wasser gewaschen wurde. Der erste ml Wasser wurde verworfen, die restlichen 3,5 ml RNA-Lösung vereinigt und durch Zentrifugation von Resten der Cellulose befreit. 300 µl der RNA-Lösung wurden in die Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Die restlichen 3,2 ml wurden in einem 15ml-Greiner-Röhrchen, eventuell unter Zuhilfenahme von 10 µg tRNA, mit Ethanol bei -80°C über Nacht ausgefällt. Die Oligo-dT-VII-Cellulose wurde durch zweimal Waschen mit 10 ml Waschlösung (0,1 M NaOH; 5 mM EDTA, pH7,8) fünfmal Waschen mit Wasser und zweimal Waschen mit HSB regeneriert.

5.6. Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden mittels eines Synthesizers (Gene Assembler Plus, Pharmacia) hergestellt oder von den Firmen MWG, Biotech (Ebersberg) und TIB Molbiol (Berlin) bezogen. Die von den Firmen bezogenen Oligonukleotide konnten direkt in die "PCR" eingesetzt werden; die mit dem Synthesizer hergestellten Oligonukleotide mußten zuvor von unvollständigen Fragmenten gereinigt werden: Die Elution der Oligonukleotide aus der trockenen Kassette erfolgte mit 1 ml 25%iger Ammoniaklösung über Nacht bei 50°C. Nach Eindampfen des Ammoniak, Aufnahme des Pellets in dest. Wasser und nochmaligem Eindampfen erfolgte das Auftrennen der unterschiedlich langen Oligonukleotide durch Dünnschicht-Chromatographie auf Silica 60A Gel-Platten (Laufmittel: 55 ml n-Propanol; 35 ml NH₃; 10 ml H₂O; Kammersättigung). Nach Identifizierung unter UV-Licht (245 nm) und Markierung der Oligonukleotidbande, welche die vollständigen Produkte enthält, wurde das entsprechende Plattenmaterial abgekratzt und die Oligonukleotide mehrmals mit H₂O (1x300 µl; 2x100 µl) eluiert und mit Ethanol gefällt.

6. Nukleinsäure-Synthese

6.1. Polymerase-Ketten-Reaktion ("PCR")

In der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden ausgehend von 2 sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu Endbereichen einer vorgelegten Matrizen-DNA sind, DNA-Fragmente der Matrizen-DNA, die innerhalb der flankierenden Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase kopiert und amplifiziert. Die Amplifikationsprodukte wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Anfärben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

In die Reaktionen wurden folgende Reagentien eingesetzt:

- 10xPuffer: 500 mM KCl; 100 mM Tris-Cl pH8,4; 15 mM MgCl
(Der Puffer wurde selbst hergestellt, bzw. von Amersham bezogen)
- 10xdNTPs: 2 mM dATP; 2 mM dCTP; 2 mM dGTP; 2 mM dTTP; pH7,0
- 10x Primer: 2,5 μ M in TE
- Taq-Polymerase (1-2 U/Ansatz)

Standardansatz: 1/10 Volumen 10xPuffer, 1/10 Volumen 10xdNTPs, 1/10 Volumen 10xPrimer (2 verschiedene), 1-2U Taq-Polymerase und 10 bis 500 ng Matrizen-DNA wurden bei 0°C mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt und im Reaktionsapparat sofort auf die Denaturierungstemperatur gebracht. Die Denaturierung erfolgte prinzipiell bei 94°C für 1 bis 2 min, die optimale Hybridisierungstemperatur und -zeit wurde aufgrund der physikalischen Eigenschaften der als Primer verwendeten Oligonukleotide bestimmt. Die Temperatur zur Kettenverlängerung lag bei 72°C und wurden entsprechend der Länge des erwarteten Produktes zwischen 1 min und 10 min eingehalten. (Als Faustregel gilt, daß die Taq-Polymerase pro Minute DNA-Fragmente mit der Länge 1 kb synthetisieren kann.) Die Anzahl der Reaktionszyklen lag zwischen 30 und 40.

Die Menge an eingesetzter Matrizen-DNA lag bei 10 - 50 ng für klonierte Plasmid- oder Cosmid-DNA. Bei Verwendung hochmolekularer genomischer DNA wurden in der Regel 500 ng DNA als template eingesetzt. Die genomische DNA wurde zuvor 5 min bei 94°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt.

Es wurden 2 Apparate zur Amplifikation verwendet:

- 1) Coy-Tempcyler (Fa. Fröbel, Lindau): Hier wurden 500 μ l-Eppendorff-Gefäße benötigt. Die Reaktionen mußten mit Mineralöl überschichtet werden.
- 2) Perkin-Elmer (Norwalk, USA): Hier kamen spezielle Reaktionsgefäße von Perkin-Elmer zum Einsatz.

6.2. cDNA-Synthese

2-3 μ g poly(A)⁺-mRNA der zu untersuchenden Zelllinie wurden zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die Synthese-Reaktion mit der AMV reversen Transkriptase erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 μ l für 90 min bei 42°C (Reaktionspuffer: 75 mM Tris-HCl, pH7,5; 1,5 mM DTT; 6 mM MgCl₂; dNTP-Mix (Endkonzentration je Nukleotid 1,5 mM); 20 U AMV Reverse Transkriptase). Nach Beendigung der Reaktion wurde das Volumen auf 50 μ l erhöht und die Proben bei -20°C gelagert.

Zur Synthese radioaktiv markierter cDNA wurde ein Hundertstel der üblichen CTP-Menge verwendet. Die Zugabe von 20-50 μ Ci α -P³²-dCTP ermöglichte die radioaktive Markierung der neu synthetisierten cDNA.

7. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

7.1. "Random priming"

Es wurden hierzu die Reagentien von Stratagene (Prime itTM) benutzt. Die DNA-Probe (25 ng) wurde für 5 min bei 95°C denaturiert in Anwesenheit von 10 µl "Random-Primer" (Gesamtvolumen 31 µl). Durch 5 min Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Primer an die Proben-DNA hybridisieren. In die Markierungsreaktion wurden dann 10 µl Nukleotidpuffer (enthält kein dCTP), 20-50 µCi α -P³²-dCTP (3000 Ci/mmol) und 2U T7-Polymerase zu einem Endvolumen von 50 µl gegeben. Die Synthese-Reaktion erfolgte für 10 min bei 37°C und wurde durch Zugabe von 2 µl "Stop-Mix" beendet. Nicht-inkorporierte radioaktive Nukleotide wurden säulen-chromatographisch abgetrennt.

7.2. Polymerase-Ketten-Reaktion ("PCR")

In Abwandlung zum oben beschriebenen Protokoll für die PCR wurde hier ein 10xNukleotid-Mix verwendet, der nur 20 µM dCTP enthält. Zusätzlich wurden dann 20-50 µCi α -P³²-dCTP in die Reaktion eingesetzt, die ansonsten nach dem Standardprotokoll durchgeführt wurde. Die Abtrennung nicht-inkorporierter Nukleotide erfolgte ebenfalls säulenchromatographisch.

Zur Amplifikation und gleichzeitigen Markierung eines Fragments des Neomycin-Resistenzgens wurden 50 ng des pSV2neo-Plasmids als Matrize eingesetzt. Mit den Primern neo1 und neo2 wurde ein 475 bp langes Fragment aus der kodierenden Region des Neomycin-Resistenzgens amplifiziert und dabei radioaktiv markiert. Die Dauer und Temperatur der Reaktionszyklen waren: 1 min bei 94°C, 1 min bei 62°C, 1 min bei 72°C.

7.3. Abtrennung nicht-inkorporierter radioaktiver Nukleotide

Einer sterilen Pasteurpipette wurde die Spitze entfernt und der verbreiterte Ausfluß mit silanisierter Glaswolle locker zugestopft. Die vertikal eingespannte Pasteurpipette wurde mit Sephadex G50 (in TE) bis 1cm unter den oberen Rand aufgefüllt und mit etwa 1 ml TE gewaschen. Die Probe wurde in 100 µl Volumen aufgetragen und nach dem Einlaufen in das Säulenmaterial mit je 100 µl TE eluiert. Die austropfende DNA-Lösung wurde in 100 µl-Fractionen gesammelt, mit dem Handmonitor vermessen und die 3-5 Fractionen mit dem Hauptanteil radioaktiv markierter DNA-Proben vereinigt und zur Hybridisierung eingesetzt.

8. Klonierungstechniken

8.1. Restriktionsverdau von DNA

Für die verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Reaktionsbedingungen eingehalten. Es wurde in der Regel ein 2- bis 3-facher Überschuss an Restriktionsenzym verwendet. Die Enzymeinheit (1 U) ist definiert als diejenige Menge an Enzym, die ein μg DNA des Phagen λ in einer Stunde verdaut.

8.2. Dephosphoryllierung von DNA-Strangenden

Die DNA wurde mit 2-5 U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm ("Calf intestinal phosphatase, CIP") 30 bis 60 min bei 37°C in "CIP-Puffer" (0,5 M Tris, pH9,0; 0,1 M MgCl_2 ; 1 mM ZnCl_2) inkubiert, das Enzym danach bei 65°C 10 min lang inaktiviert und die DNA aus dem Ansatz mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt.

8.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden, je nach Größenverhältnisse der Vektor- und Fremd-DNA, in geeigneten Mengen mit $2\ \mu\text{l}$ 10 mM ATP und $1\ \mu\text{l}$ T4-DNA-Ligase (2 U/ μl) in einem Endvolumen von $20\ \mu\text{l}$ 1xLigationspuffer (50 mM Tris, pH7,4; 10 mM MgCl_2 ; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM ATP) versetzt. Die Reaktion erfolgte bei 15°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 2-3 Stunden. Zur Erhöhung der Ligationseffizienz wurden 15% PEG (Polyethylenglycoll) zugegeben.

9. Transformation von Bakterien

9.1. Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation (Hanahan, 1986)

100 ml SOB-Medium wurden mit einer Übernacht-Kultur von DH5 α angeimpft und bis zu einer OD_{560} von 0,3-0,35 hochwachsen gelassen. Nach 10 min Abkühlen der Zellen in Eiswasser wurden die Zellen abzentrifugiert (3000xg; 10 min; 4°C). Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Bakterien vorsichtig in 10 ml STB auf Eis suspendiert und anschließend das STB-Volumen auf 20 ml erhöht. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen nochmals abzentrifugiert (3000xg; 10 min; 4°C), in 4 ml STB suspendiert und zur Transformation eingesetzt, bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur weiteren Erhöhung der Transformationseffizienz wurde den Zellen in manchen Fällen DnD-Lösung zugesetzt (14 μl /200 μl kompetente Zellen) und weitere 10 min auf Eis inkubiert.

9.2. Transformation

100-200 µl kompetente Zellen wurden mit 10 µl Plasmid-DNA versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und die Bakterien anschließend zur Aufnahme der Fremd-DNA für 90 sec Hitze-geschockt (42°C). Nach nochmaliger Inkubation auf Eis für 2 min wurden die Zellen anschließend zur Expression des im Plasmid vorhandenen Ampicillin-Resistenzgens nach Zugabe von 2 ml SOC-Medium für 1 h im Schüttelinkubator (37°C) inkubiert. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert (3000xg; RT), in 200 µl LB-Medium resuspendiert, diese auf Ampicillin (50 µg/ml) enthaltende LB-Platten ausplattiert und die Platten zum Wachstum der Ampicillin resistenten Bakterien über Nacht bei 37°C inkubiert.

10. Agarose-Gelelektrophorese

10.1. DNA-Gele

Es wurden je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0,8 bis 1,2%ige Agarosegele benützt. Die entsprechende Menge Agarose Typ II wurde in 50 ml 1xTBE (90 mM Tris-Base; 90 mM krist. Borsäure; 2,5 mM EDTA, pH8,3) eingewogen und im Mikrowellenherd aufgeköcht. Nach Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde die Agaroselösung in eine horizontale Elektrophoresekammer (7,5x13,5 cm) gegossen und zum Abkühlen und Erhärten 30-60 min stehen gelassen. Nach Eingießen des Laufpuffers (100 bis 150 ml 1xTBE) und Entfernen des Probenkammes wurden die Proben in Glycerin-Probenpuffer (10 mM EDTA, pH8,0; 10% Glycerin; 0,1% SDS; 0,02% Bromphenolblau) aufgenommen und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgt in der Regel bei 100 V für 60 bis 90 min. Bei Verwendung von LMP-Agarose (Low Melting Point) wurden 50-70 V Spannung angelegt. Die DNA-Banden wurden auf einem UV-Lichttisch (302 nm) sichtbar gemacht.

10.2. Isolieren von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht als Bande der entsprechenden Größe identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das Agarosescheibchen wurde in einen Dialyseschlauch überführt, der mit 0,5 bis 1 ml 1xTE gefüllt war und in einer Gelelektrophorese-Kammer fixiert und mit 1xTBE überschichtet wurde. Während der Elektrophorese (100 V; 30 min) wanderte die DNA aus der Agarose in die Lösung. Diese wurde nach 2 min Umpolen der Spannung aus dem Dialyseschlauch entnommen und die DNA mit Ethanol aus der Lösung gefällt.

Bei Verwendung von LMP-Agarose wurde die DNA enzymatisch eluiert: Das ausgeschnittene Agarose-Scheibchen wurde gewogen und mit 2 µl Gelase-Puffer/100 mg Agarosegel versetzt. Bei 65-70°C wurde die Agarose nach 10-20 min geschmolzen und für weitere 5-10 min bei 40°C gehalten. Die noch flüssige Agarose wurde mit 1,25 U Gelase™ pro 100 mg Gel (bei

1%igem Gel) während einer Stunde bei 40°C abverdaut. Nach Ethanolfällung konnte die DNA quantitativ aus der Lösung isoliert werden.

10.3. RNA-Gele

Für ein 1,4%iges Agarosegel wurden 1,4 g Agarose in 100 ml 1x RNA-Laufpuffer (10 mM Na₂HPO₄; Stammlösung 500 mM, pH6,9 mit konz. Schwefelsäure eingestellt) im Mikrowellenherd für 10 min aufgeschmolzen und dabei autoklaviert. Die abgekühlte Agarose wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Erkalten der Agarose wurden 900 ml Laufpuffer (10 mM Na₂HPO₄) in die Gelkammer gegeben und der Probenkamm entfernt. 4 µl poly(A)⁺-RNA (1 µg/µl; gelöst in H₂O) wurden mit 7,2 µl RNA-Mix (30 µl deionisiertes, steriles Glyoxal; 105 µl steriles DMSO; 4,2 µl 500 mM Na₂HPO₄, pH6,9) gemischt, mindestens 5 min bei 50°C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (1 µg/µl) und 1 µl RNA-Ladepuffer (50% Glycerin; 10 mM Na₂HPO₄; 0,4% Bromphenolblau) wurden die Proben in die Taschen geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgt 2 bis 3 Stunden bei 75 V, bei gleichzeitigem Umwälzen des Laufpuffers (vom + zum - Pol) mittels einer Peristaltikpumpe. Nach Ende des Laufs wurde das Gel unter UV-Licht photographiert.

11. Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen und Hybridisierung

11.1. "Southern-Transfer" von DNA

Die nach Restriktionsverdau gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch Kapillarkräfte auf Nylonmembranen übertragen. Eine genaue Beschreibung des Versuchsaufbaus findet sich in Maniatis (1982). Der Transfer hochmolekularer, genomischer DNA-Fragmente erfolgt unter denaturierenden Bedingungen in 0,4 M NaOH über Nacht auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham). Nach dem Transfer wurde die DNA durch 3 min UV-Bestrahlung (UV-Lichttisch, 302 nm) auf der Membran fixiert, diese in 2xSSC gewaschen und bis zur Hybridisierung bei 40°C aufbewahrt. Der Transfer von Plasmid-DNA-Molekülen erfolgt nach Denaturieren der DNA (2x15 min Einlegen des Gels in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH)), sowie Neutralisieren (2x15 min in Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris, pH7,2; 1 mM EDTA)) in 2xSSC.

11.2. "Northern-Transfer" von RNA

Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA erfolgt wie im Southern-Transfer hochmolekularer DNA-Fragmente, jedoch in 20xSSC.

11.3. Hybridisierung von Nukleinsäuren und Autoradiographie

Zur Hybridisierung der auf einer Nylonmembran fixierten Nukleinsäuren wurde die Membran zum Absättigen unspezifischer Bindungen in Hybridisierungs-Lösung (4xSSC; 1xDenhardt's (0,02% BSA; 0,02% Ficoll; 0,02% PVP), 0,1% SDS; 20-50 µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA) für 1 bis 4 Stunden bei 65°C vorhybridisiert. Zur eigentlichen Hybridisierung wurde eine radioaktiv markierte DNA-Sonde (10^6 - 10^7 cpm pro ml Hybridisierungslösung) zugegeben und über Nacht bei 65°C inkubiert. Die Inkubationen erfolgten in Kunststoffzylindern, die in einem Hybridisier-Ofen um die Längsachse rotierten.

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen in in großen Volumina Waschlösung mit abnehmender Salzkonzentration (2xSSC (dann 1x, 0,5x, 0,1x), 1% SDS) bei 65°C je 2x15 min gewaschen. Die noch feuchte Membran wurde in Haushaltsfolie eingeschweißt.

Sollte die Membran mehrmals mit verschiedenen DNA-Sonden hybridisiert werden, so mußte die alte radioaktive Sonde durch Waschen des Filters in 0,1% SDS bei 95°C für 15 min entfernt werden.

Unter Verwendung einer Verstärkerfolie wurden Röntgenfilme bei -80°C auf die hybridisierten Membranen exponiert.

12. "Screenen" einer Cosmidbank

In der verwendeten Cosmidbank waren genomische DNA-Fragmente menschlicher Zellen mit einer Länge von 30 bis 45 kb im Vektor pWE15 kloniert (Stratagene, LaJolla, USA). Die E.coli-Bakterien, die die Cosmide tragen, wurden mit einer Dichte von 10^6 Zellen pro Platte (25x25cm) auf einer Nylon-Membran ausplattiert, die auf LB-Agarose mit Selektionslösung (50 µg/ml Kanamycin) gelegt worden war ("Master Filter"). Nach 18-24 Stunden Wachstum bei 37°C waren sehr kleine, aber deutlich erkennbare Kolonien zu sehen. Nach Abnehmen des Masterfilters wurden von diesem durch kräftiges Andrücken einer weiteren Membran 2 mal Abdrücke (Replikafilter) gemacht. Masterfilter und Replikafilter wurden nochmals auf LB-Kanamycin-Agarose für 6-8 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Masterplatte wurde bei 4°C gelagert, die Replikafilter weitere 12-24 Stunden kultiviert, so daß die Kolonien jetzt sehr deutlich sichtbar waren. Die Bakterien auf der Membran wurden lysiert, indem diese mit den Kolonien nach oben für je 5 min auf Whatman-Papier gelegt wurde, das mit folgenden Lösungen getränkt war: Zuerst 10% SDS, dann Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH), dann Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris, pH7,2; 1 mM EDTA). Zum Schluß wurde die Membran in 2xSSC überführt, der Bakterien Schleim durch vorsichtiges Abreiben entfernt und die DNA durch Trocknen über Nacht an den Filter fixiert. Die Hybridisierung erfolgte wie oben bereits beschrieben. Nach Identifizierung identischer Signale auf beiden Replikafiltern wurden die entsprechenden Kolonien des Masterfilters in wenigen µl LB-Medium abgekratzt, etwa 1:100 verdünnt und in 10cm-Agarplatten erneut auf LB-

Kanamycin-Medium ausplattiert. Das erneute "Screenen" dieser Bakterienklone erfolgte nach der in Maniatis beschriebenen Methode des "Colony-Lifting" (Maniatis, 1982). Die danach identifizierten positiven Einzelklone wurden in Southern-Analysen charakterisiert.

Ergebnisse

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wird nach der Untersuchung kritischer experimenteller Parameter die Isolierung eines partiell strahlen-resistenten Zellklons nach Transfektion von AT-Zellen mit cDNA-Bibliotheken beschrieben. Nach der phänotypischen und genotypischen Analyse dieses Zellklons folgt die Isolierung und Charakterisierung eines transfizierten cDNA-Fragments aus der genomischen DNA dieser Zellen. Mit dem klonierten cDNA-Fragment als Sonde wurden Cosmidklone, die Insertionen hochmolekularer menschlicher DNA enthalten, aus einer Cosmidbibliothek isoliert. Einer der Cosmidklone vermittelt nach Transfektion in AT-Zellen erhöhte Strahlenresistenz und bestätigt damit den Zusammenhang zwischen der Strahlenresistenz und dem aus der partiell strahlenresistenten Zelllinie klonierten cDNA-Fragment.

1. Das experimentelle Komplementations-System

Der Versuch, den strahlensensitiven AT-Phänotyp durch transfizierte cDNA zu komplementieren, ist im wesentlichen von folgenden experimentellen Parametern abhängig:

1. Von der Qualität der cDNA-Bibliothek und ihrer Expression in menschlichen Zellen
2. Von einer genügend hohen Anzahl individueller AT-Zellen, die cDNA aufgenommen haben;
3. Von dem Selektionsprotokoll;
4. Von der Frage, ob spontane oder durch die Transfektion und Selektion induzierte Revertanten entstehen, die unabhängig von der aufgenommenen cDNA eine erhöhte Strahlenresistenz zeigen.

Diese kritischen Parameter wurden von mir experimentell untersucht und in den nachfolgenden Abschnitten dargestellt:

1.1. Qualität der verwendeten cDNA-Bibliotheken (pcD und pcD-Bas) und Expression in menschlichen Zellen

Die hier verwendeten cDNA-Bibliotheken wurden freundlicherweise von Dr. H. Okayama (Osaka Institute, Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt und sind aus mRNA von GM637-Zellen (pcD), bzw. primären menschlichen Fibroblasten (pcD-Bas) konstruiert worden. Der verwendete Expressionsvektor pcD2 ist in Abbildung 1 gezeigt. Die Transkription der klonierten cDNA steht unter der Kontrolle des konstitutiven SV40-Promotors. Das im Vektor integrierte Neomycin-Resistenzgen erlaubt die direkte Selektion der transfizierten Zellen, die stabil ein cDNA-Plasmid aufgenommen und dadurch Resistenz gegenüber G418 (Neomycinsulfat) erworben haben.

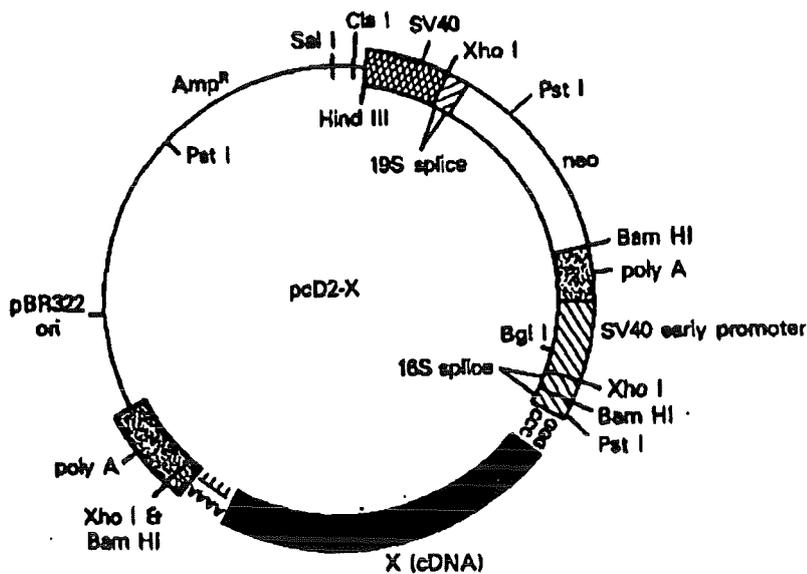


Abb.1: Schematische Darstellung des cDNA-Expressionsvektors pcD2
(entnommen aus: Chen und Okayama, 1983)

Zu erkennen sind das Neomycin-Resistenzgen (neo) und die über poly(A/T)- und poly(G/C)-Brücken inserierte cDNA. Die Transkription beider Gene wird jeweils von einem konstitutiven SV40-Promotor veranlaßt. Beiden Genen sind Polyadenylierungs-Signale nachgeschaltet. Im Vektor befindet sich zwischen dem SV40-Promotor und der inserierten cDNA ein ATG-Startcodon.

Die Anzahl unabhängiger cDNA-Bakterien-Klone wurde von Okayama mit 5×10^5 (pcD), bzw. 5×10^6 (pcD-Bas) angegeben. Nimmt man an, daß eine menschliche Zelle maximal 50.000 verschiedene Gene enthält (Lewin, 1983; Buselmaier und Tariverdian, 1991), so wäre die Gesamtheit aller verschiedenen mRNAs also 10fach bzw. 100fach als cDNA in den Bibliotheken enthalten.

Um die Häufigkeit und Größe der cDNA-Insertionen in den Klonen der Bibliotheken zu untersuchen, wurde die Plasmid-DNA von 96 zufällig gewählten, individuellen Bakterienklonen isoliert, mit BamHI verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Analyse der mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wird deutlich, daß die Bibliotheken in über 95% aller getesteten Einzelklone eine cDNA als Insertion im Expressionsvektor enthalten. Die Größe der cDNA-Insertionen liegt im Bereich zwischen 0,3 und 2,5 kb.

Um abschätzen zu können, ob die cDNA schwach exprimierter Gene repräsentiert ist, wurden über Koloniehybridisierungen c-jun cDNA-Klone aus der pcD-Bas-Bibliothek isoliert. Das c-jun Gen gehört zu den sehr schwach exprimierten Genen in normalen, menschlichen Zellen. Es wird geschätzt, daß eine c-jun mRNA pro 4×10^4 Gesamt-mRNA-Molekülen in einer nicht stimulierten Zelle auftritt (P. Angel, persönliche Mitteilung). Aus der pcD-Bas-Bibliothek wurden so 11 Bakterienklone isoliert, von denen 7 nach Hybridisierung mit einer c-jun-Sonde ein positives Signal zeigten. Die Plasmid-DNA dieser Bakterienklone wurde isoliert, durch Verdau mit BamHI die inserierte cDNA ausgeschnitten, die verdaute DNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Nylon-Membran immobilisiert. Diese Membran wurde mit dem 1,5 kb c-jun-Fragment hybridisiert, das nach Verdau mit HindIII und BamHI aus dem

rekombinanten Plasmid ph-cJ-1 isoliert und radioaktiv markiert worden war. Nach stringentem Waschen zeigte sich auf dem Autoradiogramm, daß 4 von 11 cDNA-Klonen eine vollständige c-jun cDNA mit der Länge von 2,4 kb (Abb.2; Spuren 3, 5, 6, 7) und 3 von 11 Klonen eine unvollständige cDNA (Abb.2; Spuren 8,11,12) enthielten. 4 Bakterienklone enthielten keine c-jun cDNA und hybridisierten nicht mit der eingesetzten Sonde (Negativ-Kontrolle).

Das schwach exprimierte c-jun-Transkript ist also in mehreren Klonen als vollständige cDNA in der pcD-Bas-Bibliothek enthalten.

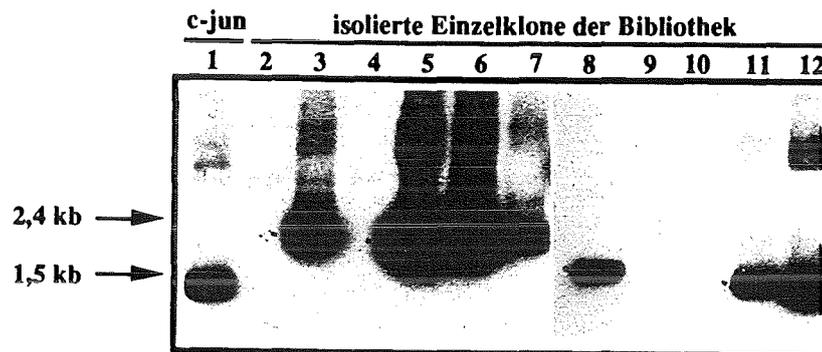


Abb.2: Autoradiogramm verschiedener cDNA-Klone nach Hybridisierung mit einer c-jun-Sonde: Das in menschlichen Zellen schwach exprimierte c-jun Transkript ist als cDNA in der pcD-Bibliothek vollständig enthalten

Über Koloniehybridisierungen wurden potentielle c-jun cDNA-Klone aus der pcD-Bas-Bibliothek isoliert. Die Plasmid-DNA der Bakterienklone wurde präpariert, zum Ausschneiden der Insertion mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Immobilisieren auf einer Nylon-Membran wurde die DNA mit einem radioaktiv markierten c-jun-Fragment hybridisiert und stringent (bis 0,1% SSC) gewaschen.

Die Pfeile zeigen die vollständige c-jun cDNA-Insertion (2,4 kb) sowie das als Sonde eingesetzte, 1,5 kb lange c-jun-Fragment.

Spur 1: 1 µg des c-jun-Fragments, das nach Verdau mit HindIII und BamHI aus dem rekombinanten Plasmid ph-cJ-1 isoliert wurde.

Spur 2-12: Plasmid-DNA individueller Bakterienklone der pcD-Bas-Bibliothek

Die Expression der in den pcD-Vektor inserierten cDNAs nach Transfektion in menschliche Zellen wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen getestet: Okayama und Berg (1983) konnten zeigen, daß die cDNA eines definierten Klons der pcD-Bibliothek nach Transfektion in menschlichen Zellen konstitutiv exprimiert wird. In anderen Arbeitsgruppen wurde nach Transfektion der pcD-Bibliothek der UV-hypersensitive Phänotyp von Xeroderma pigmentosum-Zellen, bzw. der Röntgen-überempfindliche Phänotyp einer Nagerzelllinie korrigiert (Teitz et al., 1990; Thompson et al., 1990).

1.2. Anzahl unabhängiger AT-Zellen, die cDNA aufgenommen haben

Um eine hohe Transfektionseffizienz zu erzielen, wurde die von Chen und Okayama (1987) beschriebene, modifizierte CaPO₄-Transfektion in AT-Zellen getestet. Diese Methode zeichnet sich dadurch aus, daß eine hohe Anzahl individueller Zellen transfiziert wird, von denen jede im Durchschnitt eine geringe Anzahl cDNA-Kopien aufnimmt.

Durch die Ermittlung der Transfektionseffizienzen (siehe Methoden; Chen und Okayama, 1987) konnte für jedes von mir durchgeführte Transfektionsexperiment die Anzahl unabhängiger Transfektanten ermittelt werden. Dazu wurde eine definierte Anzahl von Zellen einen Tag nach der Transfektion vereinzelt auf Petrischalen ausplattiert und für 10 - 12 Tage mit und ohne G418 kultiviert. Anhand der Koloniebildungsfähigkeit wurde der prozentuale Anteil an Zellen bestimmt, die nach der Transfektion stabil die cDNA integriert und damit G418-Resistenz erworben hatten. Die Transfektionseffizienz betrug im Durchschnitt 5% und liegt damit im Bereich der von Chen und Okayama veröffentlichten Daten. Die Gesamtzahl der Transfektantenklone betrug bei Transfektion mit der pcD-Bibliothek 1×10^6 , bei Transfektion mit der pcD-Bas-Bibliothek 1×10^7 ; sie war also doppelt so hoch wie die Anzahl unabhängiger cDNA-Bakterien-Klone der jeweiligen Bibliothek, so daß man annehmen darf, daß bei Integration mehrerer cDNA-Kopien pro Transfektantenzelle jede individuelle cDNA der beiden Bibliotheken in AT-Zellen stabil eingebaut wurde.

1.3. Selektionsprotokoll

In einer geeigneten Selektion sollen aus der Gesamtheit der unabhängigen G418-resistenten Transfektantenklone möglichst effektiv solche mit erhöhter Strahlenresistenz isoliert werden. Die Strahlenselektion der cDNA-Transfektanten soll also 2 Kriterien erfüllen:

1. Alle nicht-komplementierten, strahlensensitiven AT-Zellen müssen absterben ("Endpunkt der Selektion").
2. Strahlenresistente Zellen sollen mit möglichst geringem Verlust die Strahlenselektion überleben.

Beide Kriterien werden erfüllt, wenn man Zellen, die eine Generationszeit von über 24 Stunden haben, mehrfach im 24-Stunden-Rhythmus mit einer schwachen Dosis Röntgen bestrahlt. Grundlage für dieses Verfahren sind die unterschiedlichen Überlebensraten von AT- und normalen Zellen nach ionisierender Bestrahlung. In Dosis-Effekt-Kurven (Abb.3) wird das prozentuale Überleben der Zellen, gemessen an der Fähigkeit der bestrahlten Einzelzellen zur Koloniebildung, in Abhängigkeit von der eingesetzten Strahlendosis dargestellt. Die zur Selektion verwendete Dosis (0,6 Gy) tötet bei jeder Bestrahlung 50% der AT-Zellen ab. Ausgehend von 10^6 eingesetzten AT-Zellen sind also 23 aufeinander folgende Bestrahlungen mit 0,6 Gy nötig, um die gesamte Population abzutöten (Endpunkt der Selektion). Strahlenresistente Kontrollzellen (GM637) überleben diese Prozedur mit etwa 90%iger Wahrscheinlichkeit und wachsen schon während der Bestrahlungen zu Kolonien aus. In einer verkürzten Selektion werden 5×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte eingesetzt und mit 15 Bestrahlungen (0,6 Gy) im 24-Stunden-Rhythmus alle strahlensensitiven AT-Zellen abgetötet.

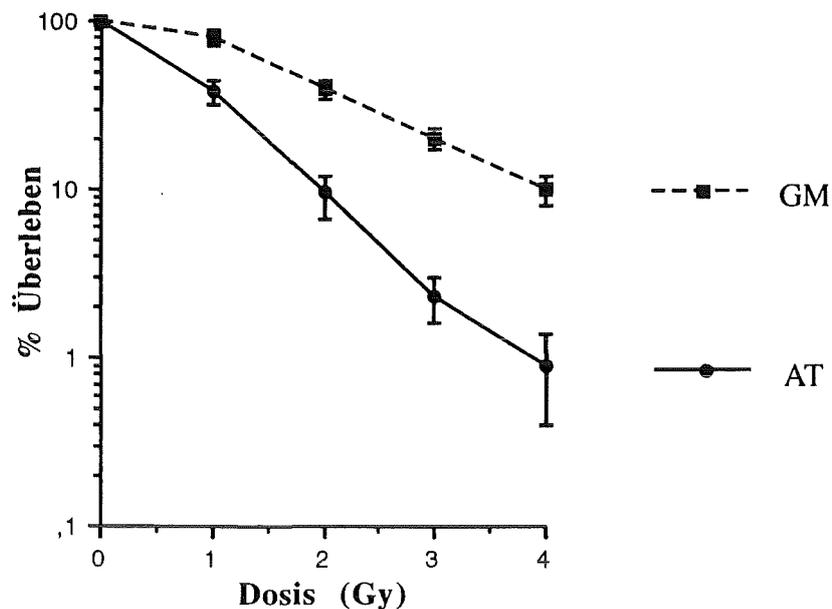


Abb.3: Überlebenskurven von AT-Zellen und normalen Kontrollzellen (GM637) nach Röntgen-Bestrahlung

Die Zellen jedes Klon wurden mit den angegebenen Dosen Röntgen bestrahlt und in 3 parallelen Ansätzen pro Dosis zur Koloniebildung ausgesät. Nach 12 Tagen wurden die Zellen fixiert, mit Giemsa/Kristallviolett blau angefärbt, die Zahl der gewachsenen Kolonien (>50 Zellen) bestimmt und im Verhältnis zur unbestrahlten Kontrolle das Überleben errechnet. Die Kurven stellen die Mittelwerte aus 3 Experimenten dar. Die errechneten Standardabweichungen sind als Fehlerbalken eingezeichnet.

AT: AT5BIVA;SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia

GM: GM637; normale, menschliche Fibroblasten (SV40-immortalisiert)

Das Prinzip der beschriebenen Selektion konnte bereits experimentell verifiziert werden (Lohrer, 1987). Allerdings wurde bisher nicht gezeigt, ob wenige komplementierte AT-Zellen (oder normale Kontrollzellen) in der Umgebung vieler absterbender AT-Zellen die Strahlenselektion überleben können. Denn einerseits werden toxische Stoffwechselprodukte durch absterbende Zellen frei, andererseits wurde ein klastogener Faktor beschrieben, der von AT-Zellen in das Medium sezerniert wird (Shaham und Becker, 1981). Dieses Medium induziert Chromosomen-Aberrationen, wenn man es auf andere Zellen überträgt.

Um die Frage nach dem Einfluß absterbender AT-Zellen auf die Überlebensfähigkeit weniger normaler Zellen in einer Strahlenselektion zu klären, wurden normale Kontrollzellen (GM637) mit dem Plasmid pSV2neo transfiziert, welches die dominante Eigenschaft für G418-Resistenz vermittelt. In Mischungsexperimenten überlebten von 100 GM637neo-Zellen, die zusammen mit 10^6 AT-Zellen eingesät worden waren, etwa 50-60% die Strahlenselektion und waren bereits nach den Bestrahlungen als überlebende Kolonien makroskopisch erkennbar. Diese überlebenden Klone konnten in der nachfolgenden Kultivierung mit G418-haltigem Medium aufgrund ihrer G418-Resistenz eindeutig als GM637neo-Zellen identifiziert werden. Das

Mischungsexperiment verdeutlicht, daß in der Strahlenselektion 10^6 absterbende AT-Zellen einen negativen Einfluß auf die Überlebensfähigkeit normaler Kontrollzellen haben. Während in unvermischten Kulturen verdünnt eingesäte GM637-Zellen mit einer Wahrscheinlichkeit von 90% die Strahlenselektion überleben, waren es in der Mischkultur nur 50 - 60%. Diese Überlebensquote normaler Zellen, bei gemeinsamer Kultivierung mit AT-Zellen, wird aber als ausreichend für die weiteren Experimente angesehen.

In einem analogen Experiment konnte umgekehrt gezeigt werden, daß überlebende Kontrollzellen nicht zum Überleben benachbarter AT-Zellen führten: In diesem Falle wurden AT-Zellen stabil mit pSV2neo transfiziert und das Mischungsexperiment mit 100 GM637 und 10^6 ATneo-Zellen wiederholt. Wiederum waren nach den Bestrahlungen strahlen-resistente Kolonien makroskopisch erkennbar. Nach weiterer zweiwöchiger Kultivierung in G418 waren sie allerdings vollständig abgestorben, wie sich nach Fixieren und Anfärben der Zellen zeigen ließ. Es waren also keine ATneo-Klone unter den überlebenden GM637-Kolonien nach der Selektion vorhanden. Dieses Experiment zeigt, daß durch die Kokultivierung mit strahlenresistenten Kontrollzellen keine strahlen-sensitiven AT-Zellen diese Selektion überlebten.

1.4. Revertanten

Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, daß die Strahlenselektion geeignet war, 10^6 strahlensensitive AT-Zellen abzutöten, während gleichzeitig 60 von 100 in die AT-Population gemischte, resistente GM637-Zellen überlebten. Von großer Bedeutung für das Arbeitskonzept war nun die Frage, ob unter diesen Versuchsbedingungen seltene spontane Revertanten der AT-Zellen auftreten können, die in einer Strahlenselektion als falsch-positive Klone auswachsen würden.

Daher wurden in mehreren Kontrollexperimenten insgesamt $3,5 \times 10^7$ AT-Zellen der Strahlenselektion unterworfen. Diese Zahl entspricht einem Viertel der Anzahl transfizierter Zellen, die in den späteren Versuchen zur Isolierung resistenter Transfektantenklone eingesetzt wurden. Hierbei wuchsen 3 überlebende Zellen nach den Bestrahlungen zu Kolonien aus, die als Einzelklone hochgezogen und erneut auf ihre Resistenz getestet wurden. Keiner der isolierten Einzelklone zeigte eine erhöhte Strahlenresistenz in Dosis-Effekt-Experimenten. Die Reversionsrate liegt also unter $3,5 \times 10^{-7}$. In früheren Experimenten waren unter 5×10^8 Zellen mit dem selben Selektionsschema keine Revertanten gefunden worden (Lohrer, 1987). Gleichzeitig beweisen diese Experimente, daß auch nach 23 Bestrahlungen mit je 0,6 Gy der strahlensensitive Phänotyp eventuell überlebender AT-Zellen nicht verändert wurde. Es wurden also durch die häufigen Bestrahlungen keine Revertanten induziert.

Der Befund, daß überhaupt AT-Klone nach der Strahlenselektion auswachsen konnten, ist durch Schwankungen experimenteller Parameter (Dosisleistung der Röntgenquelle) erklärbar. Der Endpunkt der Selektion, also die Abtötung aller AT-Zellen, wurde in diesen Fällen nicht erreicht.

Unabhängig von der Möglichkeit des Auftretens spontaner oder strahleninduzierter Revertanten birgt die Prozedur der stabilen Transfektion ein großes Potential, phänotypische Veränderungen hervorzurufen. Die Umorganisation der genomischen DNA durch den Einbau zusätzlicher (Fremd-)DNA, die konstitutive Expression von Fremdproteinen (z.B. das Neomycin-Resistenzprotein) und die Wirkungen transfizierter, konstitutiver Promotoren können die genetische Information sowie das Expressionsmuster der Gene der betroffenen Zelle gravierend verändern (Lebkowski et al., 1984). So wurde zum Beispiel eine Erhöhung der Strahlenresistenz von Mauszellen nach Transfektion des Neomycin-Resistenzgens und klonaler Expansion G418-resistenter Einzelzellen beschrieben (Pardo et al., 1991).

Um den Einfluß dieser Parameter (Expression des Neomycin-Resistenzproteins, stabile Integration exogener DNA) auf die AT-Zellen abzuschätzen, wurden AT-Zellen stabil mit pSV2neo transfiziert und der Strahlenselektion unterworfen. In drei unabhängigen Selektionsexperimenten wurden insgesamt $1,6 \times 10^6$ ATneo-Zellen, die aus 5×10^5 individuellen Transfektantenklonen gewachsen waren, auf ihre Strahlenresistenz getestet. Nach dem Fixieren und Anfärben der Hälfte der parallelen Ansätze konnten ein (Experiment A), 12 (Experiment B) und 60 (Experiment C) überlebende Klone gezählt werden (Abb.4), wobei die Experimente B und C einen bzw. vier Tage vor Erreichen des Endpunktes der Selektion abgebrochen worden waren. In der anderen, nicht fixierten Hälfte der parallelen Ansätze waren eine (Experiment A), 14 (Experiment B) und etwa 50 Kolonien (Experiment C) mikroskopisch erkennbar.

Um zu prüfen, ob die überlebenden Kolonien der ersten Selektion tatsächlich erhöht strahlenresistent sind, wurden die nicht fixierten, überlebenden Zellen der Parallelansätze isoliert ("ATneo/r") und erneut in einer Strahlenselektion getestet:

Die 15 überlebenden Kolonien der Experimente A und B wurden als Einzelklone isoliert, während die 50 Kolonien des Experiments C als Mischkultur weitervermehrt wurden. Auffallend hierbei war, daß von den 15 isolierten Einzelklonen nach der Selektion nur 2 Klone voll vital waren und vermehrt werden konnten. Dies kann als verzögertes Absterben nach der Bestrahlung gedeutet werden, das auch von Chang und Little (1991) beschrieben wurde. Die isolierten, vitalen Populationen ("ATneo/r") wurden zur Untersuchung ihrer Strahlenresistenz erneut in Strahlenselektionen eingesetzt. Es zeigte sich, daß weder die Zellen der 2 Einzelklone, noch die der Mischpopulation erhöht strahlenresistent waren.

Die mit Mauszellen gezeigte Erhöhung der Strahlenresistenz nach Transfektion und Expression des Neomycin-Resistenzgens trat also in 5×10^5 unabhängigen AT-Klonen, die mit pSV2neo transfiziert worden waren, nicht auf.

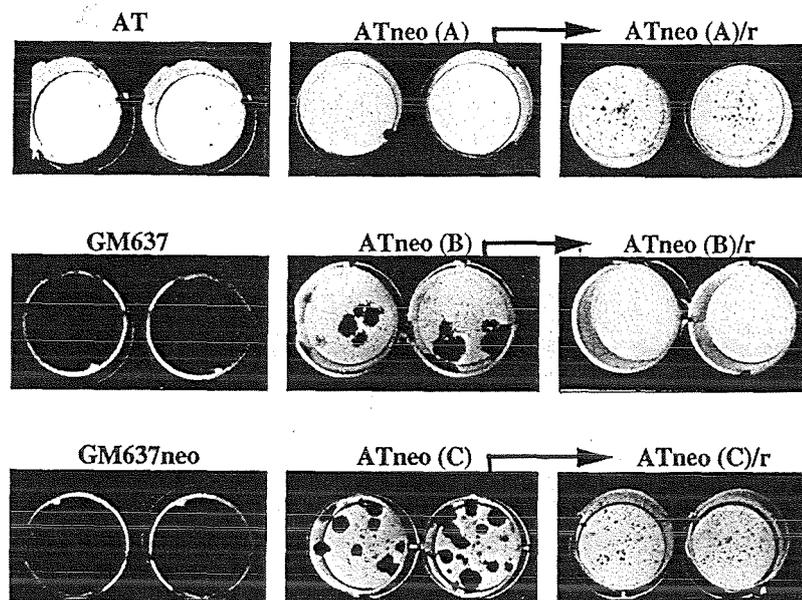


Abb.4: Überlebende Zellen nach einer Strahlenselektion: Stabil transfizierte ATneo-Zellen, die eine erste Strahlenselektion überlebt haben, sind in einer zweiten Strahlenselektion nicht resistenter als AT-Zellen

Pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte wurden 5×10^4 Zellen eingesät, nach 4 bis 6 Stunden mit 0,6 Gy Röntgen bestrahlt und die Bestrahlung 14 mal im 24-Stunden-Rhythmus wiederholt. Nach weiteren 12 Tagen ohne Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa/Kristallviolett blau angefärbt. Es sind 3 verschiedene Experimente (A, B und C) zusammengefaßt; die Kontrollen stammen aus Experiment A. Dargestellt sind die angefärbten Zellen aus einer von mehreren parallel bestrahlten 24-Loch-Platten, mit je 2 Ansätzen pro Zelllinie. Die parallel bestrahlten 24-Loch-Platten lieferten identische Ergebnisse.

➔: Überlebende Kolonien aus einer ersten Selektion wurden isoliert und expandiert, und 5×10^4 Zellen dieser Population (ATneo/r) erneut in Strahlenselektionen getestet

Experiment A: 15 Bestrahlungen: 1 Kolonie wurde isoliert, weitervermehrt und 5×10^4 Zellen dieser Population erneut in der Strahlenselektion getestet.

Experiment B: 14 Bestrahlungen: Von 14 isolierten Kolonien war nur eine vermehrungsfähig und konnte erneut eingesetzt werden.

Experiment C: 11 Bestrahlungen: Die Kolonien wurden als Mischung geerntet und weiterkultiviert und 5×10^4 Zellen erneut in die Strahlenselektion eingesetzt.

AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia

ATneo: Mischung individueller, G418-resistenter AT5BIVA-Klone, die nach stabiler Transfektion mit pSV2neo entstanden

GM637: Normale, menschliche Fibroblasten (SV40 immortalisiert)

GM637neo: Mischung individueller, G418-resistenter GM637-Zellen, die nach stabiler Transfektion mit pSV2neo entstanden

2. Selektion des partiell strahlenresistenten Zellklons 514 nach Transfektion von cDNA-Bibliotheken in AT-Zellen

Im vorausgehenden Kapitel wurden die kritischen Parameter der angestrebten phänotypischen Komplementation von AT-Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Qualität der verwendeten cDNA-Bibliotheken, die geringe Reversionsrate der AT-Zellen sowie die experimentellen Grundlagen der stabilen Transfektion und Strahlenselektion zur Durchführung der geplanten Experimente geeignet waren.

2.1. Stabile Transfektion der cDNA-Bibliotheken in AT-Zellen und Isolierung überlebender Zellklone nach Strahlenselektionen

Die cDNA-Bibliotheken wurden mit der erfolgreich getesteten Methode (siehe Abschnitt 1.2.) in die AT-Zellen transfiziert: Ausgehend von $2,3 \times 10^8$ zur Transfektion eingesetzten AT-Zellen wurden $1,1 \times 10^7$ unabhängige Transfektantenklone erhalten. Von beiden cDNA-Bibliotheken wurden die G418-resistenten Klone geerntet und vereinigt; diese Gemische der stabilen Transfektanten wurden weiter kultiviert und in die Strahlenselektionen eingesetzt.

In mehreren Selektionen wurden die mit cDNA transfizierten AT-Zellen auf ihre Überlebensfähigkeit nach Bestrahlung getestet. Es wurden dabei insgesamt $1,4 \times 10^8$ Zellen eingesetzt, die aus der Expansion der $1,1 \times 10^7$ unabhängigen Transfektantenklone entstanden waren. Insgesamt überlebten 51 unabhängige Zellklone die Bestrahlungen und konnten isoliert und einzeln weitervermehrt werden. In allen Fällen war der Endpunkt der Selektion erreicht worden, das heißt aus mehreren parallel bestrahlten Ansätzen mit AT- oder ATneo-Zellen waren keine überlebenden Klone hervorgegangen.

2.2. Zellklon 514 ist in Dosis-Effekt-Experimenten strahlenresistenter als AT-Zellen

Um ihre Strahlenresistenz zu testen, wurde jeder der 51 Klone mit verschiedenen Dosen Röntgen bestrahlt und die Überlebensfähigkeit gemessen. Lediglich ein Klon (514) zeigte einen resistenteren Phänotyp als nicht transfizierte AT-Zellen. Alle anderen transfizierten und isolierten Einzelklone, die die Strahlenselektion überlebt hatten, waren noch sensitiver als AT-Zellen (Abb.5) und wurden folglich aufgrund von Schwankungen des Selektionssystems als überlebende Klone isoliert.

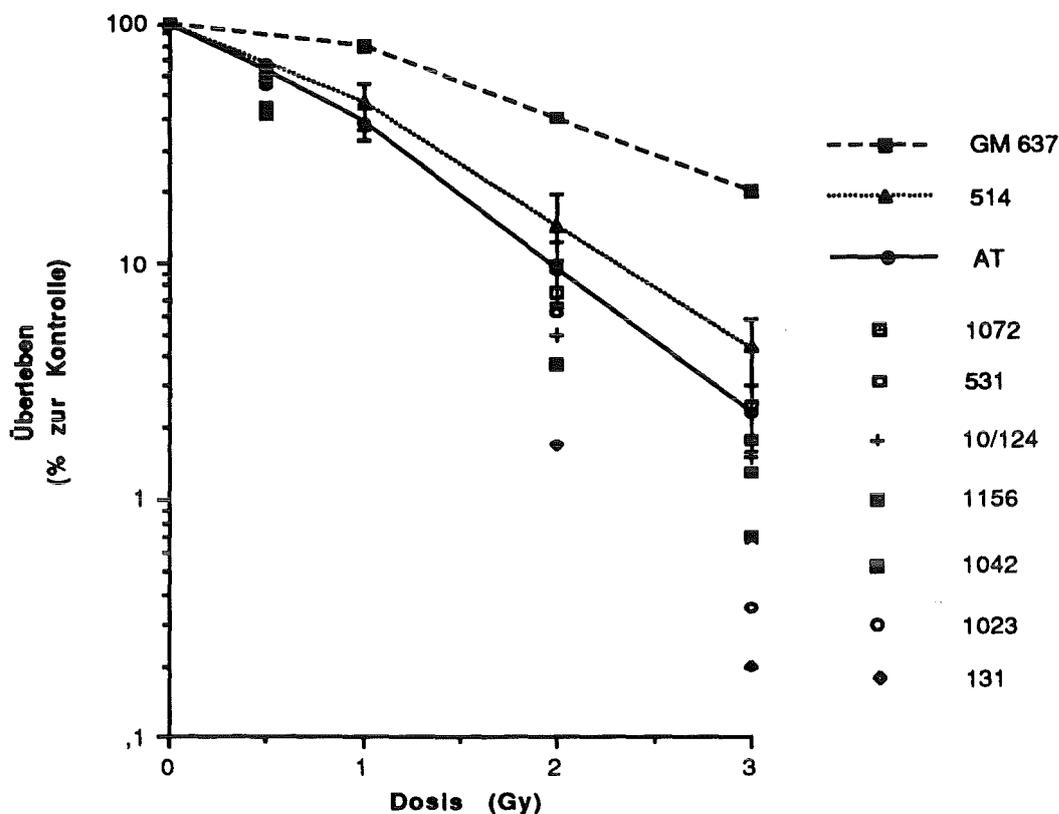


Abb.5: Überlebenskurven der Transfektantenklone, die eine Strahlenselektion überlebt haben, im Vergleich zu Überlebenskurven von AT- und GM637-Zellen

Die Zellen jedes Klons wurden mit den angegebenen Dosen Röntgen bestrahlt und in 2 bis 3 parallelen Ansätzen zur Koloniebildung ausgesät. Nach 12 Tagen wurden die Ansätze fixiert und mit Giemsa/Kristallviolett blau angefärbt, die Zahl der gewachsenen Kolonien bestimmt und im Verhältnis zur unbestrahlten Kontrolle das Überleben errechnet. Die Kurven der AT- und 514-Zellen stellen die Mittelwerte aus 5 bis 9 Experimenten dar. Die errechneten Standardabweichungen sind als Fehlerbalken eingezeichnet.

Die Einzelklone 131, 514, 531, 1023, 1042, 1072, 1156 und 10/124 wurden nach stabiler Transfektion mit der cDNA-Bibliothek als überlebende Klone einer Strahlenselektion isoliert.

AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia

GM637: Normale, menschliche Fibroblasten (SV40-immortalisiert)

Statistische Auswertung der Dosis-Effekt-Kurven von AT- und 514-Zellen:

Die in Abb.5 dargestellten Überlebenskurven der Zellklone AT5BIVA und 514 wurden mit Hilfe des Student-Tests (Lienert, 1962) statistisch ausgewertet. Der Student-Test bewertet, ob die den beiden Kurven zugrunde liegenden Mittelwerte jeder Dosis signifikant voneinander verschieden sind. Die mathematischen Voraussetzungen, d.h. die Normalverteilung der Meßwerte sowie die prinzipiell gleichen Standardabweichungen der Meßgrößen sind erfüllt. Ausgehend von der Nullhypothese, welche besagt, daß die beiden Verteilungen sich nicht

unterscheiden, wird die Prüfgröße t des Student-Tests mit dem kritischen Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit t^* verglichen. Die Prüfgröße t wird mit der Formel

$$t = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{s} \sqrt{\frac{n_x \times n_y}{n_x + n_y}}$$

$x_1 - x_n,$

$y_1 - y_n =$ Stichproben

$\bar{x}, \bar{y} =$ Mittelwerte der Stichproben

$\sigma_{(n-1)} =$ Standardabweichung

errechnet, wobei sich s (Schätzwert für σ) ergibt aus

$$s = \sqrt{\frac{\sigma_x^2 (n_x - 1) + \sigma_y^2 n_y}{n_1 + n_2 - 2}}$$

In Tabelle 1 ist für jeden Dosiswert der Bestrahlung die errechnete Prüfgröße t mit dem entsprechenden kritischen Wert t^* gezeigt. Die Werte für t^* wurden einer Tafel entnommen und geben den Betrag an, der von t überschritten sein muß, um mit 95%iger Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese für zweiseitige Fragestellungen auszuschließen. Da für jede Dosis die Prüfgröße t deutlich größer ist als der kritische Wert t^* , muß die Nullhypothese für jeden Dosiswert abgelehnt werden, das heißt für jeden Dosiswert sind die experimentell ermittelten Mittelwerte signifikant voneinander verschieden. Damit sind auch die Kurven signifikant voneinander verschieden.

Dosis (Gy)	1	2	3
t	3,39	4,86	16,74
t^*	2,23	2,20	2,18

Tabelle 1: Signifikanz der erhöhten Strahlenresistenz unter Anwendung des Student-Tests

Für jeden Dosiswert der Überlebenskurven von AT- und 514-Zellen wurde die Prüfgröße t bestimmt. Sie ist für alle Dosiswerte größer als der kritische Wert t^* , der einer Tafel entnommen wurde (Lienert, 1962) und in Abhängigkeit von der Anzahl der Stichproben für zweiseitige Fragestellungen mit 95%iger Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese zuläßt.

2.3. Zellklon 514 ist in Strahlenselektionen deutlich resistenter als AT-Zellen und behält diesen Phänotyp in weiteren Strahlenselektionen stabil bei

In den oben gezeigten Dosis-Effekt-Kurven waren die Zellen des Klons 514 nur schwach, aber signifikant resistenter gegenüber Röntgenbestrahlung als AT-Zellen. Es stellte sich nun die Frage, ob diese Erhöhung der Resistenz auch in einer weiteren Strahlenselektion zum Ausdruck kommt.

Aus diesem Grunde wurden 514-Zellen erneut in eine Strahlenselektion eingesetzt. Es zeigte sich, daß auch hier eine erhöhte Resistenz zu beobachten war: Bereits nach der letzten Bestrahlung waren erhöhte Zellzahlen im Vergleich zu AT-Zellen sichtbar (Abb.6 A), die während der weiteren Kultivierung zu großen Kolonien auswuchsen (Abb.6 B). Die unmittelbar nach den Bestrahlungen noch sichtbaren AT-Zellen waren hingegen nicht mehr lebensfähig und starben während der weiteren Kultivierung ab. Dieser Phänotyp der 514-Zellen blieb auch nach erneuter Isolierung der überlebenden Kolonien stabil. Es wurden mit den 514-Zellen in mehreren Experimentreihen bis zu 2 Selektionsrunden mit nachfolgender Isolierung und erneuter Strahlenselektion der jeweils überlebenden Zellen durchgeführt. Hierbei blieb der partiell strahlenresistente Phänotyp der jeweils isolierten Zellpopulationen stabil (Abb.6B). Diese Tatsache verdeutlicht, daß keine stärker strahlenresistente Subpopulation der 514-Zellen existiert, sondern daß die Gesamtpopulation eine erhöhte Resistenz aufweist. Im Unterschied zu selten überlebenden Klonen der AT- oder ATneo-Population handelt es sich beim Klon 514 also um stabil veränderte Zellen, die eine erhöhte Strahlenresistenz besitzen.

In insgesamt 7 verschiedenen Experimenten waren 514-Zellen der Strahlenselektion unterworfen worden. Im Durchschnitt waren hierbei, ausgehend von 5×10^4 ausplattierten Zellen, 55 (+/- 15) Kolonien gewachsen, deren weiterkultivierte Zellen in erneuten Strahlenselektionen die erhöhte Resistenz stabil beibehielten. Gleichzeitig hatten in den Ansätzen mit AT- oder ATneo-Zellen keine stabil strahlenresistenten Kolonien überlebt.

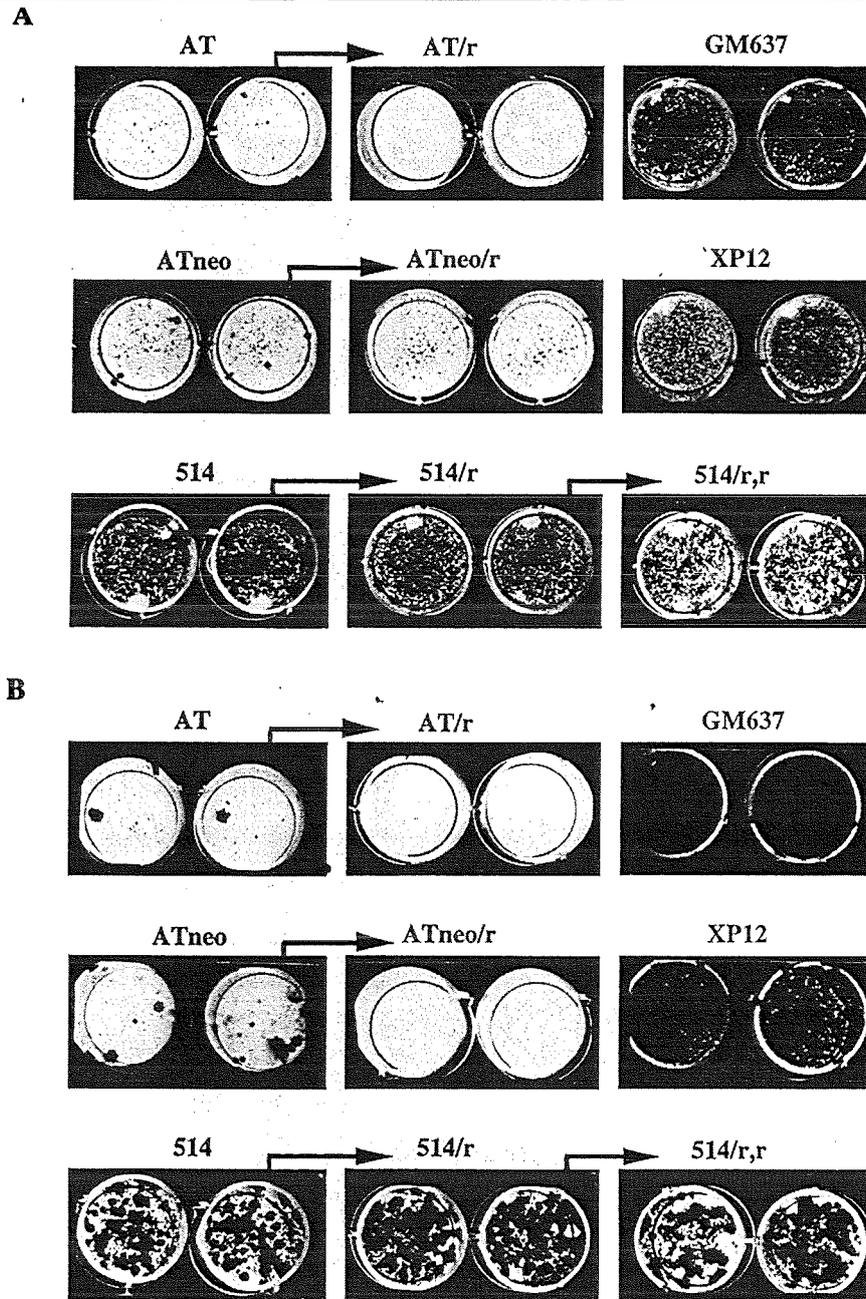


Abb.6: Überlebende Kolonien nach Strahlenselektionen: Die erhöhte Strahlenresistenz des Klon 514 stellt einen stabilen Phänotyp dar

Pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte wurden 5×10^4 Zellen eingesät, nach 4 bis 6 Stunden mit 0,6 Gy Röntgen bestrahlt und im 24-Stunden-Rhythmus die Bestrahlung 14 mal wiederholt. Direkt nach der Bestrahlungsperiode (A), bzw. nach weiteren 12 Tagen ohne Bestrahlung (B) wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa/Kristallviolett blau angefärbt. Dargestellt sind die gefärbten Zellen aus einer von 5 parallel bestrahlten 24-Loch-Platten, mit je 2 parallelen Ansätzen pro Zelllinie. Die parallel bestrahlten 24-Loch-Platten lieferten identische Ergebnisse.

→ = Überlebende Kolonien aus einer Selektion wurden isoliert und expandiert, und 5×10^4 Zellen dieser Population erneut in Strahlenselektionen getestet.

GM637: Normale, menschliche Fibroblasten (SV40-immortalisiert)

AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia

514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA eine Strahlenselektion überlebt hatte

XP: XP12RO; SV40-immortalisierte, UV-überempfindliche Fibroblasten aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Xeroderma pigmentosum

ATneo: Mischung individueller, G418-resistenter AT5BIVA-Klone, die nach stabiler Transfektion mit pSV2neo entstanden

3. Phänotypische Charakterisierung des Zellklons 514

Die DNA-Syntheserate sowie die Verteilung der Zellzyklus-Phasen nach Bestrahlung weichen in AT-Zellen charakteristisch von normalen Kontrollzellen ab und machen zusammen mit der Strahlensensitivität den zellulären AT-Phänotyp aus. In AT-Zellen findet die Hemmung der DNA-Synthese nach Bestrahlung, im Gegensatz zu normalen Zellen, nur schwach statt. Ebenso ist nach Bestrahlung die Hemmung des Durchlaufens der G1-Phase in AT-Zellen kaum ausgeprägt. In der (G2+M)-Phase tritt hingegen eine längere Blockierung immortalisierter AT-Zellen im Vergleich zu primären und immortalisierten normalen Zellen auf. Bei einer spezifischen Komplementation des AT-Defektes durch ein intaktes und vollständiges AT-Gen sollten alle phänotypischen Charakteristika der AT-Zellen zumindest teilweise korrigiert sein. Ob dies für den partiell strahlenresistenten Klon 514 zutrifft, wurde anhand des Einbaus radioaktiv markierter Nukleotide sowie der durchflußzytometrischen Analyse der Zellzyklus-Phasen untersucht, und ist Gegenstand der folgenden Abschnitte.

Zur phänotypischen Charakterisierung des Klons 514 ist außerdem die Generationszeit der Zellen ein wichtiger Parameter.

3.1. Die Überlebensfähigkeit des Zellklons 514 in Strahlenselektionen ist nicht die Folge einer verkürzten Generationszeit

Das Prinzip der hier beschriebenen Strahlenselektion basiert auf schrittweisem Abtöten von Zellen durch sequentielle schwache Bestrahlungen im 24-Stunden-Rhythmus. Zellen mit einer Generationszeit von mehr als 24 Stunden replizieren zwischen den Bestrahlungen nicht und sterben somit nach und nach ab. Sich deutlich schneller teilende Zellkulturen können durch die sich ständig regenerierende Zellzahl zwischen den Bestrahlungsintervallen nicht vollständig abgetötet werden. Solche Zellkulturen würden in den hier angewandten Strahlenselektionen eine erhöhte Resistenz vortäuschen.

Um zu prüfen, ob eine kürzere Generationszeit der 514-Zellen Ursache des Überlebens in der Strahlenselektion ist, wurde die Verdoppelungszeit der 514-Zellen bestimmt: 5×10^4 logarithmisch wachsende Zellen wurden in 5cm-Petrischalen ausplattiert und die Hälfte der Ansätze nach zwei Tagen mit 0,6 Gy bestrahlt. Unmittelbar danach sowie in 24-Stunden-Abständen wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl im "Coulter Counter" bestimmt. Aus dem exponentiellen Bereich der daraus resultierenden Wachstumskurve wurden die Verdopplungszeiten bestimmt. Es zeigte sich, daß 514-Zellen mit 24 Stunden eine geringfügig verlängerte Generationszeit im Vergleich zu deren direkten Vorläuferzellen AT5BIVA haben (22 Stunden, Abb.7). Nach einmaliger Bestrahlung mit einer schwachen Dosis Röntgenstrahlen ist die Generationszeit beider Zelllinien praktisch gleich (25 Stunden bei AT- und 24,5 Stunden bei 514-Zellen). Die erhöhte Überlebensfähigkeit des Klons 514 in der Strahlenselektion ist somit nicht auf eine kürzere Generationszeit der Zellen zurückzuführen.

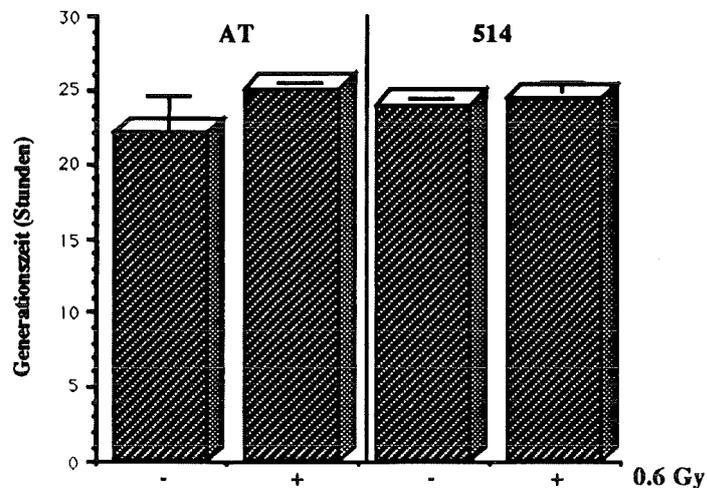


Abb. 7: Generationszeiten der unbestrahlten und bestrahlten AT5BIVA- und 514-Zellen

5×10^4 logarithmisch wachsende Zellen wurden in 5cm-Petrischalen in Doppelansätzen ausplattiert und nach zwei Tagen mit 0,6 Gy bestrahlt. Unmittelbar danach sowie in 24-Stunden-Abständen wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl im "Coulter Counter" bestimmt. Aus dem exponentiellen Bereich der resultierenden Wachstumskurve wurden die Verdoppelungszeiten bestimmt. Die Graphik stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia

514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlenresistenten Phänotyp zeigt

3.2. Die DNA-Synthese nach Bestrahlung ist in 514-Zellen nicht gehemmt

In normalen menschlichen Zellen bewirken ionisierende Strahlen kurzzeitig eine Verzögerung des Durchlaufens der Zellzyklus-Phasen. Dieses Ereignis kann in der S-Phase als Hemmung der DNA-Synthese, anhand des verringerten Einbaus radioaktiv markierter Nukleotide, gemessen werden. Die Hemmung der DNA-Synthese nach Bestrahlung ist in AT-Zellen aller bekannter Komplementationsgruppen signifikant schwächer ausgeprägt als in normalen Zellen. Die verminderte Hemmung der DNA-Synthese wird nicht durch einen vorzeitigen Eintritt der G1-Phase-Zellen in die S-Phase verursacht (Jaspers und Bootsma, 1982). Die Untersuchung der Fragmentlängen neu synthetisierter DNA ergab, daß in AT-Zellen die Initiation neuer Replicons sowie in schwächerem Ausmaß auch die Kettenverlängerung nach Bestrahlung deutlich weniger gehemmt wird als in normalen Zellen. Die Bestimmung der DNA-Syntheserate bis zu 6 Stunden nach der Bestrahlung spiegelt also die Hemmung der Zellen in der S-Phase wieder und gibt keine Auskunft über den Eintritt von Zellen aus der G1-Phase in die S-Phase, oder der S-Phase in die G2-Phase.

Für die Charakterisierung des partiell strahlenresistenten Klons 514 war es von entscheidendem Interesse, ob der in allen AT-Zellen ausgeprägte Phänotyp der "radioresistenten DNA-Synthese" ebenfalls partiell korrigiert wurde. In Vorversuchen wurde der zeitliche Verlauf der DNA-Synthese nach der Bestrahlung gemessen. Im Einklang mit veröffentlichten Daten

anderer Arbeitsgruppen wurde die maximale Hemmung der DNA-Synthese in menschlichen Zellen 3 Stunden nach Bestrahlung beobachtet (Jaspers et al., 1982). Infolgedessen wurde die Dosisabhängigkeit der DNA-Synthese-Hemmung in AT-, 514- und GM637-Zellen 3 Stunden nach der Bestrahlung untersucht.

In Abb.8 sind die Mittelwerte von 3 Experimenten zusammengefaßt, die unter Verwendung des "Cell Harvesters" durchgeführt worden waren (siehe Methoden). Die so ermittelten Werte wurden durch die Ergebnisse von zwei weiteren Experimenten bestätigt, die mit der Methode der TCA-Fällung der genomischen DNA (siehe Methoden) durchgeführt wurden.

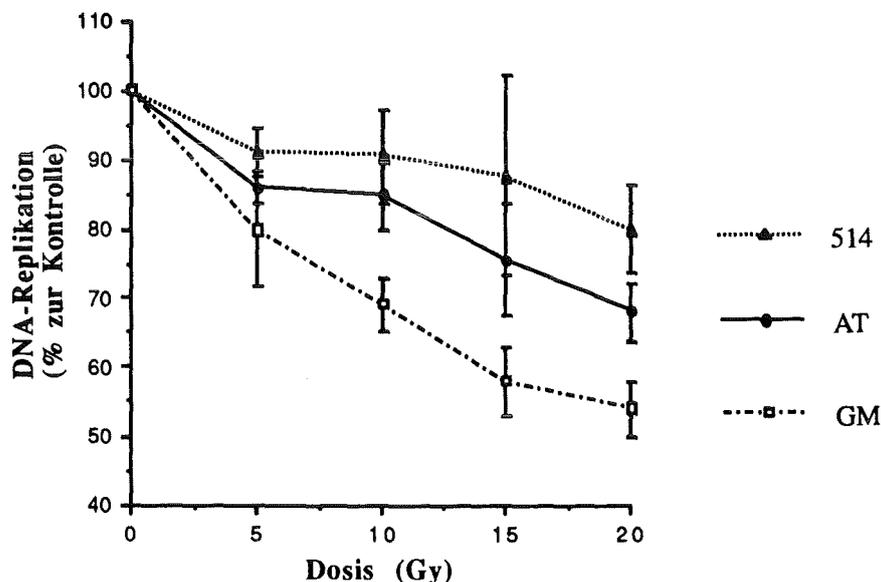


Abb.8: Messung der DNA-Synthese nach Bestrahlung durch Einbau von ^3H -Thymidin: Die "radioresistente DNA-Synthese" der AT-Zellen ist in 514-Zellen nicht komplementiert:

Für jeden Meßpunkt wurden in 4 bis 6 parallelen Ansätzen 10^4 Zellen in Vertiefungen von 96-Loch-Platten ausgesät. Zur Standardisierung der Zellzahl bzw. des DNA-Gehalts wurde den Zellen 12 Stunden nach dem Einsäen ^{14}C -Thymidin (Endkonzentration $0,025 \mu\text{Ci/ml}$) zugegeben, welches in die genomische DNA eingebaut wurde. Nach weiteren 12 Stunden wurde das Medium abgenommen, durch nicht radioaktives ersetzt und die Zellen sofort in der Co- γ -Quelle bestrahlt. 3 Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen für 60 min mit ^3H -Thymidin inkubiert (Endkonzentration $5 \mu\text{Ci/ml}$), auf Eis gestellt und trypsinisiert. Die Lyse der Zellen und Ernte der genomischen DNA erfolgte im "cell harvester" durch 3 Waschschrte mit deionisiertem Wasser und Aufsaugen der genomischen DNA auf Glasfaserfilter.

Nach 8-stündigem Schütteln in Szintillationsflüssigkeit wurde das eingebaute radioaktive Thymidin anhand der ^3H - und ^{14}C -Zerfälle im Szintillationszähler gemessen. Die Berechnung der DNA-Synthese erfolgte durch Abgleichen der gemessenen ^3H -Thymidin-Zerfälle mit der DNA-Menge, die durch den internen ^{14}C -Thymidin-Standard gemessen werden konnte. Der Quotient aus ^3H -Thymidin-Zerfälle/ ^{14}C -Thymidin-Zerfälle ergab die DNA-Syntheserate eines Meßpunktes. Die Mittelwerte der parallelen Meßpunkte nach Bestrahlung wurden mit den unbestrahlten Werten verrechnet. Hieraus ergab sich die durch Bestrahlung reduzierte DNA-Syntheserate.

GM: GM637; normale menschliche Fibroblasten (SV40-immortalisiert)

AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia

514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlenresistenten Phänotyp zeigt

Die Ergebnisse der DNA-Synthesemessung zeigen den erwarteten Unterschied zwischen AT-Zellen und normalen menschlichen Zellen. Die GM637-Zellen sind in den hier gezeigten Experimenten allerdings etwas schwächer in ihrer DNA-Synthese hemmbar als andere normale menschliche Zellen (Young und Painter, 1989).

Auffällig ist das Verhalten der 514-Zellen. Sie sind keinesfalls in Richtung normaler Zellen komplementiert, also stärker durch Bestrahlung in ihrer DNA-Synthese hemmbar als AT-Zellen, sondern zeigen einen entgegengesetzten Effekt: Die DNA-Synthese der 514-Zellen ist deutlich weniger hemmbar als diejenige der direkten Vorläuferzellen AT5BIVA.

Dieses Ergebnis zeigt erstens, daß die fehlende Hemmung der DNA-Synthese nicht mit der erhöhten Überlebensrate nach Bestrahlung korreliert. Zweitens wird deutlich, daß der partiell strahlenresistente Phänotyp der 514-Zellen nicht durch Transfektion und Expression der vollständigen genetischen Information entstanden sein kann, welche in AT-Zellen defekt ist.

3.3. Zellzyklus-Analysen

Im letzten Abschnitt wurde die Hemmung der DNA-Synthese nach Bestrahlung als Kriterium für die Hemmung der Zellen in der S-Phase dargestellt. Im folgenden sollen die Anteile der G1- und (G2+M)-Phasen nach Bestrahlung des partiell strahlenresistenten Klon 514 mit den entsprechenden Kontrollzellen mittels Durchflußzytometrie verglichen werden. Im Unterschied zum vorigen Abschnitt wurden hier über einen längeren Zeitraum alle Zellen einer Population betrachtet. Nach fluoreszenz-vermittelter Messung des DNA-Gehalts der einzelnen Zellen wurden diese in Histogrammen den Zellzyklus-Phasen zugeordnet. Der zeitliche Verlauf des Anteils der Zellen verschiedener Zellzyklus-Phasen an der Gesamtpopulation gibt Auskunft über die strahlen-induzierte Verzögerung der Zellen. Zuvor wird auf die Verteilung der Zellzyklus-Phasen in den unbestrahlten Zellen eingegangen.

3.3.1. Die Verteilung der Zellzyklus-Phasen unbestrahlter 514-Zellen entspricht der normaler Zellen

Abbildung 9 A zeigt die Original-Histogramme von AT- und 514-Zellen nach der Computer-Auswertung.

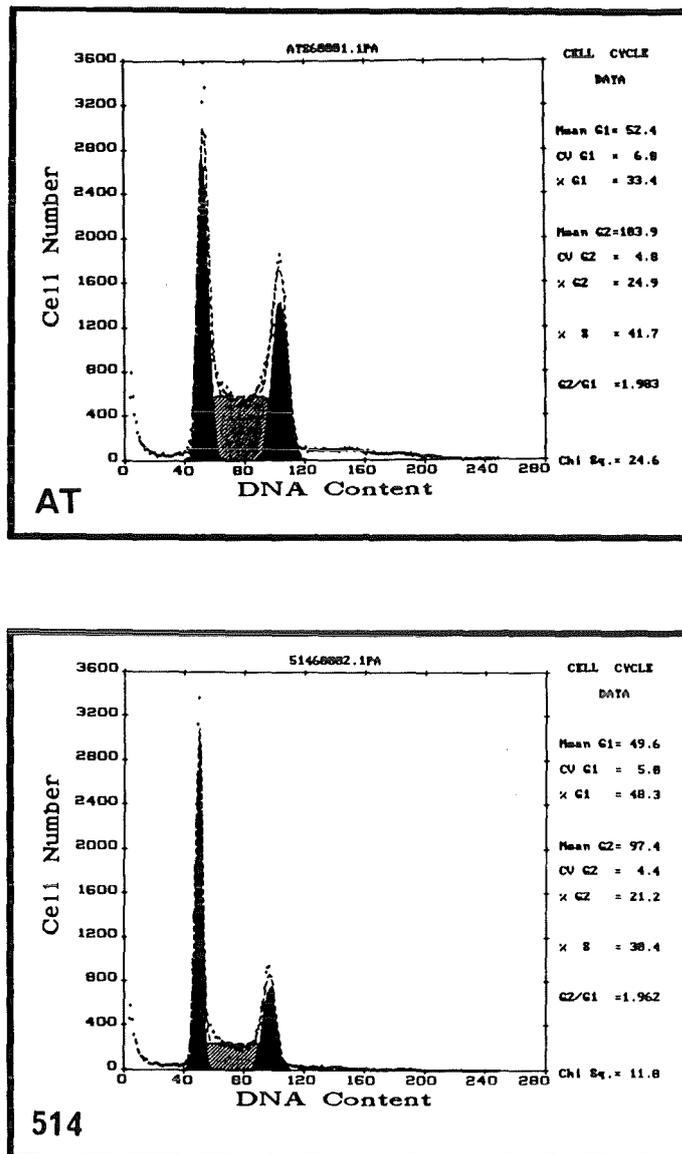


Abb.9 A: Original-Histogramme der Zellzyklus-Phasen unbehandelter AT- und 514-Zellen nach der Auswertung

Von logarithmisch wachsenden Zellkulturen wurden Zellkerne präpariert, die doppelsträngige DNA mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt und im PAS-II Durchflußzytometer der DNA-Gehalt der Kerne bestimmt und Kanälen verschiedener Fluoreszenz-Intensitäten zugeordnet. Die resultierenden Histogramme wurden mit dem Computer-programm "MultiCycle" mathematisch ausgewertet und die Zellkerne entsprechend ihrem DNA-Gehalt den Zellzyklusphasen zugeordnet. Die Daten des Originalausdrucks beziehen sich auf den prozentualen Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase (%G1, %S, %G2), den "coefficient of variation" (cv), der die Abweichungen der Meßwerte vom Mittelwert angibt sowie die Kanalzahlen der Mittelwerte (mean G1, mean G2) und deren Verhältnis zueinander (G1/G2). Ein Histogramm beruht auf Messungen von mindestens 50000 Zellkern-Fluoreszenzen.

AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia

514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlen-resistenten Phänotyp zeigt

In Abbildung 9 B sind die Anteile der Phasen der Zellklone AT, ATneo, 514 und GM637 nach durchflußzytometrischer Messung und computergestützter Auswertung dargestellt. Deutlich erkennbar ist die stark erhöhte Zahl der AT-Zellen in der S-Phase. Dieses Phänomen der S-Phase-Verlängerung wurde von anderen Arbeitsgruppen in AT5BI-Zellen (Zampetti-Bosseler und Scott, 1985), lymphoiden AT-Zellen (Cohen und Simpson, 1980) und AT-Fibroblasten verschiedener Komplementations-Gruppen (Murnane und Painter, 1982) ebenfalls beobachtet. Möglicherweise ist das beobachtete Phänomen Ausdruck für den Befund, daß in AT-Zellen die DNA-Syntheserate nicht bestrahlter Zellen im Vergleich zu normalen Zellen deutlich erniedrigt ist (Lambert et al., 1991). Die Vollendung der kompletten DNA-Synthese dauert somit zwangsläufig länger, was sich in dem prozentualen Anteil der S-Phase-Zellen der Population ausdrückt. Nach stabiler Transfektion und Expression des Neomycin-Resistenzgens änderte sich diese verlängerte S-Phase der AT-Zellen nicht. In 514-Zellen ist hingegen die G1-Phase deutlich verlängert und die S-Phase entsprechend verkürzt. Diese Verteilung entspricht der aus normalen Zellen (GM637), und ist somit als komplementierter Phänotyp der 514-Zellen zu betrachten.

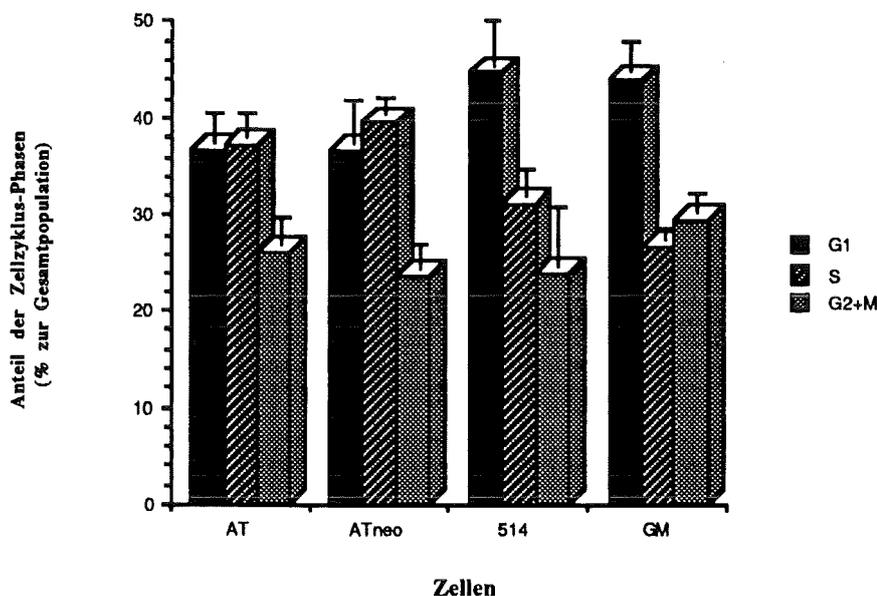


Abb.9 B: Bestimmung der Zellzyklus-Phasen unbehandelter AT-, ATneo-, 514- und GM637-Zellen mittels Durchflußzytometrie

Von logarithmisch wachsenden Zellkulturen wurden Zellkerne präpariert, die doppelsträngige DNA mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt und im PAS-II Durchflußzytometer der DNA-Gehalt der Kerne bestimmt. Die resultierenden Histogramme wurden mit dem Computer-programm "MultiCycle" mathematisch ausgewertet und die Zellkerne entsprechend ihrem DNA-Gehalt den Zellzyklusphasen (G1, S und (G2+M)) zugeordnet. Das Säulendiagramm beruht auf Mittelwerten von 5 unabhängigen Experimenten.

- AT: AT5BIVA: SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia
- ATneo: Mischung individueller, G418-resistenter AT5BIVA-Klone, die nach stabiler Transfektion mit pSV2neo entstanden
- 514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlen-resistenten Phänotyp zeigt
- GM: GM637; normale, menschliche Fibroblasten (SV40-immortalisiert)

3.3.2. Nach Bestrahlung ist die zeitliche Verteilung der Zellzyklus-Phasen von 514-Zellen in Richtung normaler Zellen verändert

Die fehlende Hemmung des Durchlaufens des Zellzyklus nach Bestrahlung wird in AT-Zellen besonders anhand der G1- und S-Phasen deutlich. Erschwert wird die Interpretation der Zellzyklus-Analysen jedoch durch die hohe Empfindlichkeit der AT-Zellen gegenüber geringe Strahlendosen. Für die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Zellzyklus-Phasen nach Bestrahlung sollte daher eine niedrigere Dosis verwendet werden, so daß schnelle, letale Strahleneffekte in den AT-Zellen vernachlässigt werden können.

Infolgedessen wurden unbestrahlte und mit 1 Gy Röntgenstrahlen behandelte Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, für die Durchflußzytometrie aufgeschlossen und angefärbt. Die Anteile der Phasen aus den bestrahlten Zellen wurden mit den unbestrahlten Kontrollen der gleichen Zeitpunkte verrechnet. Die so entstandene Kinetik der Zellzyklus-Phasen nach Bestrahlung mit 1 Gy wird wie folgt beurteilt:

a) Beurteilung der G1-Phasen (Abb.10 A):

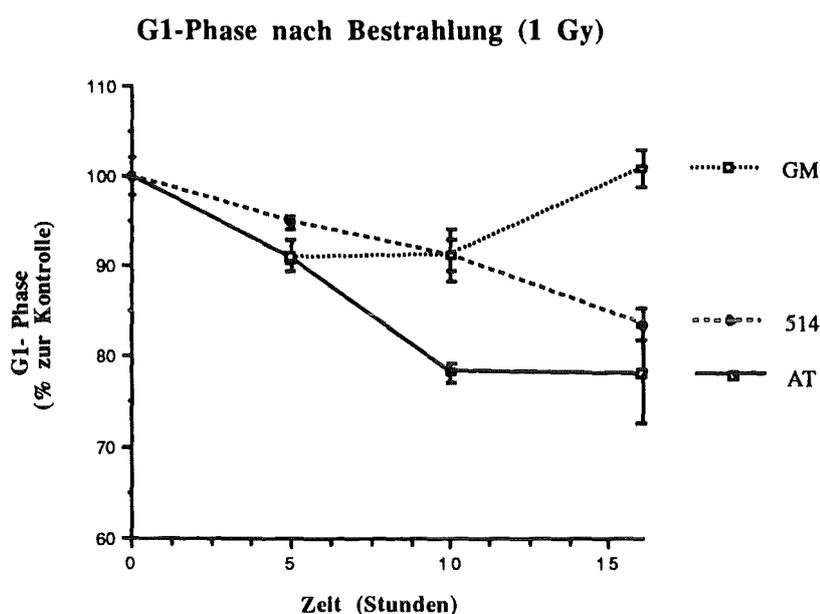


Abb.10 A: Kinetik der G1-Phase nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgen

Logarithmisch wachsende Zellkulturen wurden zum Zeitpunkt 0 mit 1 Gy Röntgen bestrahlt. Nach 6, 10, 16 und 30 Stunden wurden die Zellkerne präpariert, die doppelsträngige DNA mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt und im PAS-II Durchflußzytometer der DNA-Gehalt der Kerne bestimmt. Die resultierenden Histogramme wurden mit dem Computerprogramm "MultiCycle" mathematisch ausgewertet und die Zellkerne entsprechend ihrem DNA-Gehalt den Zellzyklus-Phasen zugeordnet. Die Ergebnisse der bestrahlten Zellen wurden mit den unbestrahlten Kontrollen der gleichen Zeitpunkte verrechnet. Die Meßwerte stellen die Mittelwerte aus 2 Experimenten dar; die errechneten Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

GM: GM637; normale, menschliche Fibroblasten (SV40-immortalisiert)

AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia

514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlenresistenten Phänotyp zeigt

Trotz der gleichzeitigen, mehr oder weniger starken Blockierung aller Zellzyklus-Phasen in normalen Zellen (GM637), nimmt der Anteil der G1-Zellen bis zu 10 Stunden nach Bestrahlung schwach ab und hat nach 16 Stunden wieder den Ausgangswert erreicht. Diese kurze und schwache Abnahme der G1-Zellen entspricht den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Ford et al., 1984); der zugrunde liegende Mechanismus ist unbekannt.

AT-Zellen werden im selben Zeitraum durch die Bestrahlung auf 78% der Kontrolle reduziert, was durch die fehlende Blockierung der G1-Zellen bei gleichzeitiger Blockierung der (G2+M)-Zellen verständlich wird.

514-Zellen zeigen hier einen intermediären Phänotyp: Der Anteil an G1-Zellen nimmt bis zu 10 Stunden nur schwach ab, sinkt aber nach 16 Stunden bis auf 83% der unbestrahlten Kontrolle. Dieses Verhalten der 514-Zellen ist nur durch eine teilweise Blockierung in der G1-Phase im Vergleich zu AT-Zellen erklärbar.

b) Beurteilung der S-Phasen (Abb.10 B):

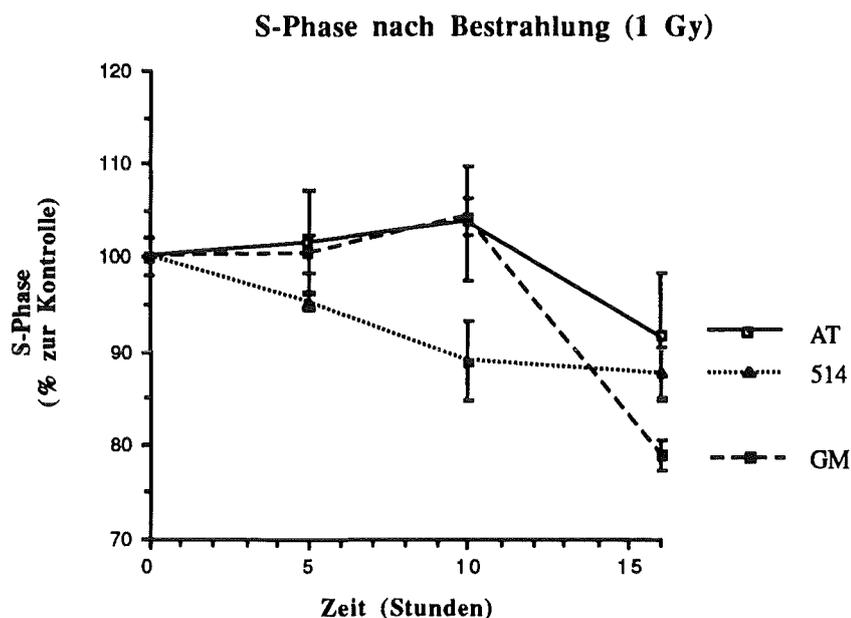


Abb.10 B: Kinetik der S-Phase nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgen
Legende: siehe Abb.10 A

Messungen der DNA-Synthese bestrahlter Zellen ergaben 3 Stunden nach der Bestrahlung eine maximale Hemmung der DNA-Replikation (Jaspers et al., 1982; eigene Daten). Innerhalb mehrerer Stunden nimmt die Replikationsfähigkeit der Zellen und damit die Progression von der S-Phase in die (G2+M)-Phase wieder zu. Konsequenterweise tritt, bei gleichzeitiger Blockierung der G1-Phase, erst 16 Stunden nach der Bestrahlung in der Population normaler Zellen ein starker Abfall der S-Phase-Zellen auf 78% auf. Die G1-Zellen sind zu diesem Zeitpunkt offensichtlich noch blockiert, die S-Zellen gehen schon in die (G2+M)-Phase über.

AT-Zellen sind in der S-Phase schwächer blockiert als normale Zellen und laufen schneller in die (G2+M)-Phase ein. Durch die fehlende Hemmung und Nachlaufen der G1-Phase-Zellen bleibt jedoch der Gesamtanteil der S-Phase-Zellen bis zu 10 Stunden nach der Bestrahlung relativ unverändert. Erst nach 16 Stunden sinkt die Anzahl der S-Phase-Zellen durch die zunehmende Verarmung an nachlaufenden G1-Zellen (durch Blockierung der G2-Zellen) auf 90% ab.

Die Hemmung der 514-Zellen in der S-Phase ist, wie aus den Messungen der DNA-Syntheserate ersichtlich wurde, nach Bestrahlung noch weniger ausgeprägt als in AT-Zellen. Aus dieser Tatsache folgt, daß in der S-Phase bestrahlte 514-Zellen schneller in die (G2+M)-Phase eintreten als AT-Zellen. Die in Abbildung 10 B gezeigte, frühe und kontinuierliche Abnahme des Anteils der S-Phase-Zellen der 514-Population ist daher wiederum nur durch eine teilweise Blockierung der G1-Phase-Zellen, im Unterschied zu AT-Zellen, erklärbar.

(Der in Abb.8, Abschnitt 3.2. gezeigte Unterschied der DNA-Synthese-Hemmung zwischen AT-, 514- und normalen Zellen wird hier nicht deutlich, da hier die Anzahl der Zellen einer Zellzyklus-Phase gemessen wird und nicht deren DNA-Synthese-Aktivität.)

c) Beurteilung der (G2+M)-Phasen (Abb.10 C):

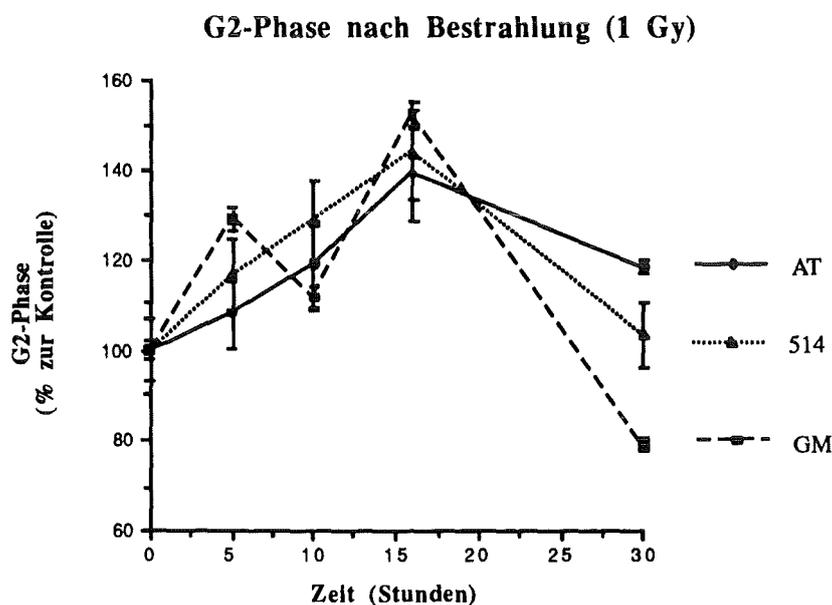


Abb.10 C: Kinetik der G2-Phase nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgen

Legende: siehe Abb.10 A

Die Blockierung aller Zelllinien in der (G2+M)-Phase wird anhand des prozentualen Anstiegs bis zu 16 Stunden nach der Bestrahlung deutlich. Die transiente Blockierung läßt dann nach, was sich in einem schnellen Auslaufen der Zellen, sichtbar als Abfall der Kurven, bis zu 30 Stunden nach der Bestrahlung äußert. Während der Anteil normaler Zellen zu diesem Zeitpunkt durch einen leichten Synchronisierungseffekt der Bestrahlung sogar unter den Ausgangswert

fällt (90% der unbestrahlten Kontrolle), sind die AT-Zellen noch nicht komplett aus der (G2+M)-Phase ausgelaufen. Dieses auch von anderen Arbeitsgruppen dokumentierte Verhalten wird mit der Möglichkeit diskutiert, daß ein Teil der in (G2+M) blockierten Zellen nicht mehr auslaufen kann und als Population letal getroffener Zellen später abstirbt (Ford et al., 1984).

514-Zellen zeigen hier wiederum einen intermediären Phänotyp: Sie sind 30 Stunden nach der Bestrahlung wieder am Ausgangswert angelangt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in unbestrahlten AT-Zellen eine stark verlängerte S-Phase bei gleichzeitig verkürzter G1-Phase auftrat. Die stabile Transfektion und Expression des pSV2neo-Gens in diesen Zellen änderte die Phasen-Verteilung nicht. In den partiell strahlen-resistenten 514-Zellen ist die G1-Phase jedoch verlängert und die S-Phase entsprechend verkürzt. Die Phasenverteilung der 514-Zellen ist somit der Phasenverteilung normaler Zellen ähnlich.

Nach Bestrahlung der Zellen mit 1 Gy zeigen die normalen GM637-Zellen sowie die AT-Zellen die anhand von Vergleichen mit veröffentlichten Daten erwarteten Zellzyklus-Veränderungen: In GM637-Zellen werden alle Zellzyklus-Phasen transient verzögert, in AT-Zellen wird nur die (G2+M)-Phase deutlich blockiert. 514-Zellen zeigen nach Bestrahlung, im Vergleich mit ihren direkten Vorläuferzellen AT5BIVA, ein verändertes Verhalten in allen Zellzyklus-Phasen:

- a) 514-Zellen werden teilweise in der G1-Phase blockiert.
- b) Das Auslaufen aus dem (G2+M)-Block findet nach 30 Stunden vollständig statt, es bleiben keine blockierten Zellen in der (G2+M)-Phase liegen.

Während 514-Zellen also nach Bestrahlung bezüglich der DNA-Synthese-Hemmung den AT-Phänotyp beibehalten, sind sie im Durchlaufen der G1- und (G2+M)-Phase in Richtung normaler Zellen komplementiert. Die beschriebenen Veränderungen der Zellzyklus-Phasen von 514-Zellen sind nicht die Folge einer veränderten Generationszeiten, da die Messung der Verdoppelungszeiten von AT- und 514-Zellen ergeben hatte, daß diese auch nach Bestrahlung nur sehr unwesentlich verschieden sind (siehe Abschnitt 3.1.).

4. Die erhöhte Strahlenresistenz des Klons 514 war durch sekundäre Transfektionen nicht stabil übertragbar

Das letzte Kapitel hat gezeigt, daß der Zellklon 514 nicht nur bezüglich der Strahlenresistenz, sondern auch in der Verteilung der Zellzyklus-Phasen in Richtung normaler Zellen korrigiert ist. Diese Tatsache sowie die erhöhte interzelluläre Kommunikation der 514-Zellen und die morphologische Ähnlichkeit mit GM637-Zellen unterstrichen die Bedeutung der Klonierung einer cDNA aus 514-Zellen, die für die erwähnten zellulären Effekte verantwortlich ist. Die Klonierungsstrategie ging dabei von der Erhöhung der Strahlenresistenz als relativ leicht meßbarem Phänotyp aus.

Falls die erhöhte Strahlenresistenz des Zellklons 514 durch Expression der transfizierten und stabil integrierten cDNA entstanden ist, muß diese Eigenschaft der 514-Zellen prinzipiell ein zweites Mal genetisch übertragbar sein. Die Transfektion der zellulären DNA des Klons 514 in AT-Zellen ("sekundäre Transfektion") sollte mit geringer Effizienz erneut zu erhöht strahlenresistenten Zellklonen führen. Ein wesentlicher Vorteil sekundärer Transfektanten, die den gewünschten Phänotyp exprimieren, liegt in der Tatsache, daß von vielen primär transfizierten cDNAs nur wenige cDNAs, darunter auch die für den gewünschten Phänotyp verantwortliche, im Genom der sekundären Transfektante vorhanden sein sollten. Die genomische DNA solcher sekundärer Transfektanten wäre daher das ideale Ausgangsmaterial zur Klonierung der transfizierten, komplementierenden cDNA.

Die Integration transfizierter DNA erfolgt meist an wenigen Stellen des Empfänger-Genoms; kurze DNA-Fragmente, wie Plasmide, werden oft mehrfach hintereinander eingebaut. Aus diesem Grunde wurde die zelluläre DNA des Klons 514 mit dem Restriktionsenzym Sall geschnitten. Mehrere hintereinander integrierte cDNAs der 514-Zellen sollten durch Sall-Verdau getrennt werden, da im Vektorbereich eine entsprechende Erkennungsstelle vorhanden ist (siehe schematische Darstellung des Expressionsvektors, Abb.1). Eine im pcD-Vektor inserierte cDNA wird dadurch nicht von den Promotor- und Polyadenylierungssequenzen getrennt, gleichzeitig bleibt das pSV2neo-Gen noch mit der cDNA verknüpft. Die Häufigkeit von Sall-Schnittstellen in menschlicher genomischer DNA ist sehr gering (durchschnittliche Restriktionsfragmentlängen betragen 200 kb bis 300 kb), so daß die cDNA selbst intakt bleiben sollte.

Insgesamt wurden 250 µg dieser restriktionsverdauten, zellulären 514-DNA in $2,5 \times 10^7$ AT-Zellen in 25 Ansätzen transfiziert. Nach Zugabe von G418 wurden 2 Zellklone selektioniert, die zumindest das Neomycin-Gen aus dem Genom der 514-Zellen aufgenommen und stabil integriert hatten (AT-514/2 und AT-514/4). Die Effizienz der Aufnahme eines dominanten Markergens aus genomischer DNA betrug also $1,2 \times 10^{-7}$ und entspricht damit der beschriebenen Effizienz früherer Experimente (Lohrer, 1987).

Um die gleichzeitige Aufnahme einer strahlenresistenz-vermittelnden cDNA zu untersuchen, wurde die Strahlenresistenz der Zellklone AT-514/2 und AT-514/4 bestimmt. Sowohl in Dosis-

Effekt-Experimenten als auch in Strahlenselektionen (Abb.14) zeigte sich, daß die sekundären Transfektanten durch Aufnahme genomischer DNA aus 514-Zellen, die an das Neomycin-Resistenzgen gekoppelt ist, nicht strahlenresistenter wurden.

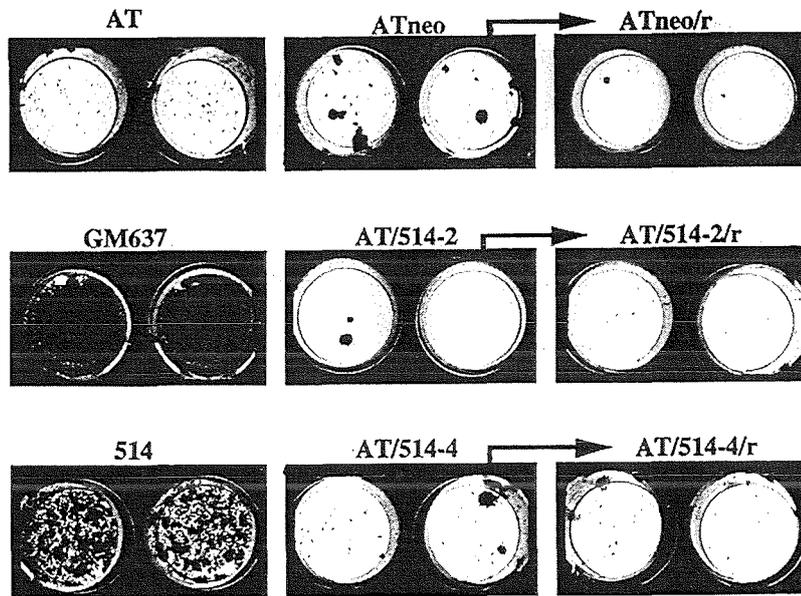


Abb.14: Überlebende Kolonien sekundärer Transfektanten nach einer Strahlenselektion: In sekundäre Transfektanten war die erhöhte Strahlenresistenz der 514-Zellen nicht stabil übertragen worden

Pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte werden 5×10^4 Zellen eingesät, nach 4 bis 6 Stunden mit 0,6 Gy Röntgen bestrahlt und im 24-Stunden-Rhythmus die Bestrahlung 14 mal wiederholt. 12 Tage nach der Bestrahlungsperiode wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa/Kristallviolett blau angefärbt. Dargestellt sind die gefärbten Zellen aus einer von 4 parallel bestrahlten 24-Loch-Platten, mit je 2 Ansätzen pro Zelllinie. Die parallel bestrahlten 24-Loch-Platten lieferten identische Ergebnisse.

→ : Überlebende Kolonien aus einer ersten Selektion wurden isoliert und expandiert, und 5×10^4 Zellen dieser Population (-/r) erneut in Strahlenselektionen getestet

- AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia
- ATneo: Mischung individueller, G418-resistenter AT5BIVA-Klone, die nach stabiler Transfektion mit pSV2neo entstanden
- GM637: Normale, menschliche Fibroblasten (SV40-immortalisiert)
- 514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlenresistenten Phänotyp zeigt
- AT/514-2, AT/514-4: Stabil G418-resistente Zellklone, die nach Transfektion genomischer DNA aus 514-Zellen in AT-Zellen entstanden ("sekundäre Transfektanten")

Das Ergebnis dieser Experimente läßt drei mögliche Interpretationen zu:

1. Die erhöhte Strahlenresistenz des Klons 514 ist nicht durch Expression einer neu transfizierten cDNA entstanden und kann daher in sekundären Transfektionen nicht übertragen werden. Die erhöhte Strahlenresistenz und auch das veränderte Zellzyklus-Verhalten müßte dann unspezifisch aufgrund spontaner oder strahlen-induzierter Mutationen, beziehungsweise durch die genomische Umorganisation nach der Transfektion in den 514-Zellen entstanden sein. Das Zutreffen dieser Möglichkeit erscheint aufgrund der entsprechenden Kontrollen in Kapitel 1 dieser Arbeit sehr unwahrscheinlich.

2. Wahrscheinlicher ist die Folgerung, daß in 514-Zellen nach Transfektion einer cDNA eine partiell komplementierende Aktivität exprimiert wurde. Durch die Transfektion und/oder die hohe genomische Instabilität der AT-Zellen kann die cDNA jedoch von dem Neomycin-Resistenzgen bezüglich der SalI-Schnittstelle entkoppelt worden sein. Daraus würde folgen, daß die komplementierende cDNA in sekundären Transfektionen nach SalI-Verdau nicht mehr zusammen mit der Resistenz für G418 übertragbar ist.

3. Falls die seltene Restriktionsschnittstelle SalI in der unbekannt, komplementierenden cDNA-Sequenz der 514-Zellen vorhanden ist, wird die Übertragbarkeit der kompletten cDNA und die Komplementation des strahlensensitiven Phänotyps in den dargestellten sekundären Transfektionen unwahrscheinlich.

5. Genotypische Charakterisierung des Zellklons 514

Das vorhergehende Kapitel zeigte, daß die erhöhte Strahlenresistenz des Klons 514 nicht erneut durch sekundäre Transfektionen nach Selektion für das Neomycin-Resistenzgen übertragen werden konnte. Die Analyse der genomischen Struktur des Klons 514 sowie der sekundären Transfektanten sollte aufklären, ob eine Entkopplung der cDNA von dem Neomycin-Resistenzgen dafür verantwortlich sein kann. Gleichzeitig war es für alternative Klonierungsstrategien der transfizierten cDNAs in 514-Zellen wichtig, das Integrationsmuster und die Kopienzahl der Vektorsequenzen und somit auch der cDNA im Genom der 514-Zellen abzuschätzen

5.1. Anzahl der transfizierten cDNAs in der zellulären DNA der Klone 514 und AT-514/4

Durch Hybridisierung der genomischen DNA der 514-Zellen mit einer für das Neomycin-Resistenzgen spezifischen Probe können die transfizierten cDNA-Vektorsequenzen detektiert werden. Diese sollten in der DNA von AT-Zellen nicht vorhanden sein; in der DNA der sekundären Transfektanten ist eine geringere Zahl von cDNA-Kopien, im Vergleich mit der DNA aus 514-Zellen zu erwarten. Wegen der Übersichtlichkeit wird hier nur ein Klon der beiden sekundären Transfektanten (AT-514/4) diskutiert. Die genetische Analyse des zweiten Klons (AT-514/2) führte zu ähnlichen Ergebnissen und denselben Schlußfolgerungen.

Je 30 µg genomische DNA der Zellklone AT5BIVA, 514 und des sekundären Transfektantenklons AT-514/4 wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI, BglII und EcoRI verdaut. Aufgrund der entsprechenden Erkennungsstellen im pcD-Vektor (siehe Abb.16) sollten nach BamHI-Verdau drei Fragmente entstehen, die jeweils das Neomycin-Resistenzgen, die cDNA oder die SV40-Promotorregion der cDNA enthalten. BglII und EcoRI haben beide nur eine Erkennungsstelle im Vektor, und zwar vor, bzw. direkt am Anfang des Neomycin-Resistenzgens. Die geschnittene DNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und auf einer Nylon-Membran immobilisiert. Für die Hybridisierung wurde ein über PCR amplifiziertes und dabei radioaktiv markiertes Fragment des Neomycin-Resistenzgens (siehe Methoden) als Sonde für die pcD-Vektorsequenzen eingesetzt. Erwartungsgemäß zeigte die DNA aus nicht transfizierten AT-Zellen kein Signal; in der DNA aus 514-Zellen waren nach Verdau mit den 3 Enzymen je zwei Hauptbanden aufgetreten (Abb.15). Mit der DNA aus der sekundären Transfektante war es nur noch jeweils eine Hauptbande.

Durch den Vergleich der Signalstärke einer definierten Menge des pSV2neo-Plasmids mit der von den geschnittenen genomischen DNAs kann man die Anzahl der integrierten Neomycin-Resistenzgene in der genomischen DNA abschätzen: Das Signal der Kontrollspur (Spur 10) der Abbildung 15 entstand durch 6,5 pg des unverdauten pSV2neo-Plasmids und entspricht somit $4,8 \times 10^6$ Molekülen, bzw. Kopien. Da ein diploides menschliches Genom aus etwa $7,5 \times 10^6$ µg DNA besteht, entsprechen 30 µg genomische DNA $4,2 \times 10^6$ Genom-Kopien. Die Intensität der zwei Hauptbanden in jeder der geschnittenen DNAs von 514-Zellen (Spur 7-9) entspricht

etwa der Intensität der pSV2neo-Kontrolle (Spur 10), so daß man abschätzen kann, daß jede Hauptbande einer Kopie des Neomycin-Resistenzgens entspricht. Es sind also nach dieser Abschätzung zwei Neomycin-Resistenzgene pro diploidem Genom der 514-Zellen vorhanden und somit zwei cDNA-Plasmide. Die schwächeren Nebenbanden sollten durch unvollständigen Verdau der DNA entstanden sein, möglicherweise auch durch Amplifikation von Teilsequenzen des Neomycin-Resistenzgens als Folge der Bestrahlungen.

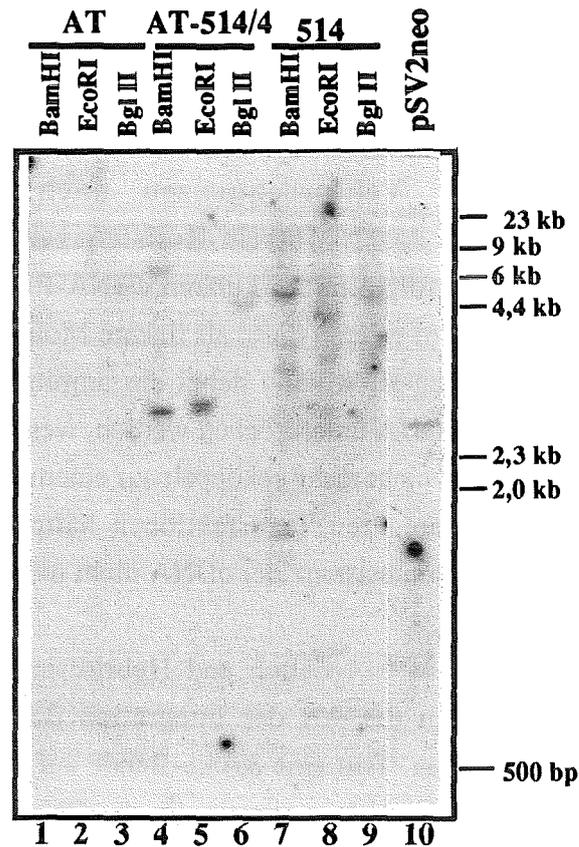


Abb.15: Autoradiogramm gelelektrophoretisch aufgetrennter genomischer DNA aus menschlichen Zellen nach Hybridisierung mit einer für das Neomycin-Resistenzgen spezifischen Sonde

Je 30 µg genomische DNA der Zellklone AT, 514 und AT-514/4 wurden mit den angegebenen Enzymen verdaut, in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf einer Nylon-Membran immobilisiert. Nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, für das Neomycin-Resistenzgen spezifischen Sonde wurde die Membran bis 0,1xSSC gewaschen und eine Autoradiographie angefertigt.

- AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia
- 514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlenresistenten Phänotyp zeigt
- AT-514/4: Stabil G418-resistenter Zellklon, der nach Transfektion genomischer DNA von 514-Zellen in AT-Zellen entstand.
- pSV2neo: 6,5 pg des unverdauten pSV2neo-Plasmids

Die Abschätzung der Kopienzahl wird durch zwei Befunde unterstützt:

1. Nach Verdau mit den Enzymen BglII und EcoRI traten jeweils zwei verschiedene Haupt-Banden auf, die jeweils eine unterschiedliche Fragmentlänge, bzw. ein unterschiedliches Integrationsmuster der beiden posulierten cDNAs repräsentieren. Nach BamHI-Verdau und Hybridisierung traten aufgrund unterschiedlicher Integration ebenfalls zwei Hauptbanden auf, sowie Nebenbanden, die wahrscheinlich durch unvollständigen Verdau der genomischen DNA entstanden sind.

2. Von zwei vorhandenen BglII-Banden in der DNA aus 514-Zellen wurde eine Bande (4,5 kb) in der DNA der sekundären Transfektante (AT-514/4) wiederentdeckt, die aus der genomischen DNA der 514-Zellen übertragen wurde.

5.2. Integrationsmuster der Vektorsequenzen nach Hybridisierung der zellulären DNA mit einer für das Neomycin-Resistenzgen spezifischen Sonde

Die Transfektion der AT-Zellen erfolgte mit zirkulären cDNA-Plasmiden. Bei der stabilen Integration in das Empfänger-Genom werden diese als lineare Moleküle eingebaut. Durch die Öffnung des Plasmids bei der Integration kann dabei die unmittelbare Nachbarschaft des Neomycin-Resistenzgens mit der cDNA unterbrochen werden, weshalb nach Sall-Verdau der genomischen DNA die beiden Gene nicht mehr gekoppelt auf einem DNA-Fragment vorliegen. Für die bereits geschilderten sekundären Transfektionen hätte dies zur Folge, daß die Neomycin-Resistenz und die Strahlenresistenz der cDNA nicht mehr gemeinsam übertragbar wären.

Nach BamHI-Verdau der DNA aus 514-Zellen und Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Neomycin-Sonde kann die Art der Integration der cDNA-Plasmide in die genomische DNA untersucht werden. Tritt eine 3,4 kb-Bande auf, so entspricht diese höchst wahrscheinlich dem vollständigen pcD-Vektor ohne inserierte cDNA und ohne das 0,6 kb lange SV40-Promoter-Fragment (siehe Abb.16, Fall A). Das heißt in diesem Falle muß bei der Transfektion die Ringöffnung zur stabilen Integration der Plasmide in dem vorgelagerten 0,6 kb langen BamHI-Fragment stattgefunden haben, wodurch die cDNA nach Sall-Verdau vom Neomycin-Gen entkoppelt wird.

Die Fragmentlängen nach Hybridisierung mit einer Neomycin-Sonde ergaben in den BamHI-verdauten DNA-Proben der 514-Zellen zwei Hauptbanden mit 5,0 kb und 3,4 kb Länge (Abb.15). Es scheint also für ein transfiziertes cDNA-Plasmid der oben diskutierte Fall der Entkopplung von dem Neomycin-Resistenzgen zuzutreffen. Die 5,0 kb-Bande sollte auf die Integration eines cDNA-Plasmids zurückzuführen sein, das hierzu zwischen dem Neomycin-Resistenzgen und dem Polyadenylierungssignal der cDNA geöffnet wurde (Abb.16, Fall B).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in der genomischen DNA von 514-Zellen mindestens zwei cDNA-Plasmide integriert vorliegen. In einem Fall wurde bei der Integration die cDNA sehr wahrscheinlich vom Neomycin-Resistenzgen entkoppelt. Eine Entkopplung würde erklären, weshalb nach sekundärer Transfektion Sall-verdauter genomischer DNA aus

514-Zellen und Selektion für das Neomycin-Resistenzgen die erhöhte Strahlenresistenz nicht übertragbar war.

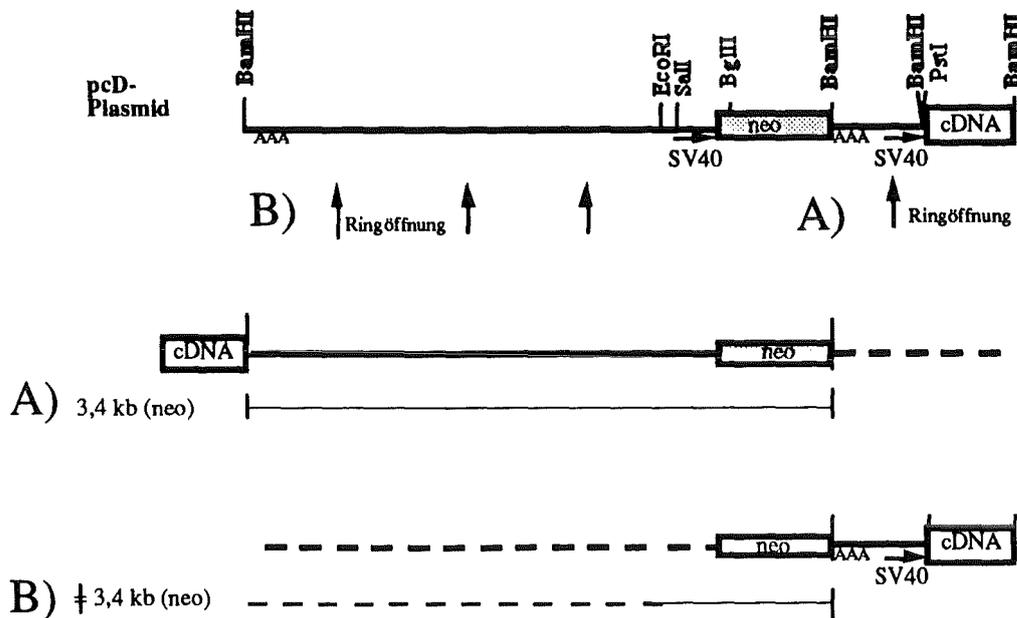


Abb.16: Schematische Darstellung der Öffnung eines cDNA-Plasmids (pcD-cDNA) bei der Integration in die genomische DNA nach Transfektion: Konsequenzen für Hybridisierungsexperimente

Das zirkuläre pcD-Plasmid wurde zur Übersichtlichkeit durch BamHI-Verdau linearisiert dargestellt.

Fette, durchgezogene Linien: Plasmid-DNA

Fette, unterbrochene Linien: Genomische DNA

Dünne Linien: BamHI-Fragmente nach Hybridisierung mit einer Neomycin-Sonde

BamHI, Sall, BglIII, EcoRI: Restriktions-Schnittstellen im pcD-Plasmid

AAA: Polyadenylierungs-Signale

SV40: konstitutiver SV40-Promotor

neo: Neomycin-Resistenzgen

A) Die Ringöffnung des Plasmids beim Einbau in die genomische DNA erfolgte in dem mit einem Pfeil gekennzeichneten Bereich. Nach Hybridisierung mit einer für das Neomycin-Resistenzgen spezifischen Sonde tritt in BamHI-verdauter genomischer DNA eine 3,4 kb-Bande auf.

B) Die Ringöffnung des Plasmids erfolgte in dem mit Pfeilen gekennzeichneten Bereich und liefert nach der Hybridisierung eine BamHI-Bande, deren Länge nicht 3,4 kb beträgt.

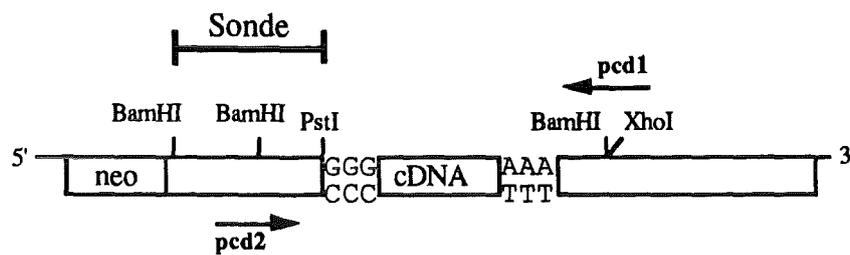
Alternative Strategien zum gleichzeitigen Übertragen der Gene für Neomycin-Resistenz und Strahlenresistenz in sekundären Transfektionen wären denkbar nach Partialverdau der genomischen DNA aus 514-Zellen mit BamHI oder Verdau mit sehr selten schneidenden Enzymen wie z.B. NotI. Im Falle des Partialverdaus wäre eine deutlich größere Menge verdauter DNA aus 514-Zellen zu transfizieren, um das statistisch selten auftretende, gewünschte DNA-Fragment mit beiden Genen zu übertragen. NotI-verdaute, genomische DNA wäre sehr hochmolekular und könnte daher nur sehr ineffizient von AT-Zellen aufgenommen werden (Colbere-Garapin et al., 1986; Hoeijmakers et al., 1987; Lohrer et al., 1988). In beiden Fällen ist die geringe Effizienz sekundärer Transfektionen ein limitierender Faktor für das Gelingen der Experimente. Es wurden daher alternative Klonierungsstrategien angestrebt.

6. Isolierung, Klonierung und Charakterisierung eines transfizierten cDNA-Fragments aus dem Genom von 514-Zellen

In Kapitel 4 wurde dargestellt, daß die Strategie der sekundären Transfektion von DNA aus 514-Zellen in AT-Zellen zwar zu zwei G418-resistenten Klonen führte, diese aber keine erhöhte Strahlenresistenz aufwiesen. In Kapitel 5 konnte durch die Analyse der genomischen Struktur von 514-Zellen gezeigt werden, daß erfreulicherweise nur wenige cDNA-Plasmide in diesen Zellen stabil integriert worden waren. Die Entkopplung einer cDNA-Insertion von dem dominanten Neomycin-Resistenzgen kann die Tatsache erklären, daß G418-resistente Klone aus sekundären Transfektionen nicht erhöht strahlenresistent sind. Zur Klonierung einer strahlenresistenz-vermittelnden cDNA aus 514-Zellen wurde daher eine direkte Klonierungs-Strategie aus der DNA von 514-Zellen getestet. Diese wird wesentlich durch die Tatsache erleichtert, daß nur wenige cDNA-Kopien in der DNA von 514-Zellen vorhanden sind. Gleichzeitig ist sie unabhängig von der unmittelbaren Nachbarschaft des Neomycin-Resistenzgens und dem Gelingen sekundärer Transfektionen.

6.1. Isolieren von transfizierten cDNAs mit der Polymerase-Ketten-Reaktion ("PCR")

Mit dem Enzym Taq-Polymerase können ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden ("Primer") DNA-Fragmente amplifiziert werden, die auf einer Matrizen-DNA innerhalb dieser bekannten Oligonukleotid-Sequenzen liegen. Mit Hilfe von Primern, die komplementär zu denjenigen Bereichen der pcD-Vektor-Sequenzen sind, welche die cDNA-Insertion flankieren, sollte also die in dem Vektor inserierte (unbekannte) cDNA amplifizierbar sein. Da sich die Spezifität der Reaktion nur nach den verwendeten Primern richtet, ist prinzipiell jede cDNA, die nach Transfektion mit den flankierenden Vektorsequenzen in die genomische DNA integriert wurde, auf diese Weise amplifizierbar. In Abbildung 17 A ist die Lokalisation, Orientierung und Nukleotidfolge der hier verwendeten vektorspezifischen Primer pcd1 und pcd2 dargestellt.



Primer 1 (pcd1): 5' - TCC CTC GAG GGA TCC CCT GGT TCT TTC CGC -3'

Primer 2 (pcd2): 5' - CCC GGA TCC GGT GGT GGT GCA AAT CAA AGA -3'

Abb.17 A: Schematische Darstellung der zur Amplifikation der cDNA-Insertion im pcD-Vektor verwendeten Primer pcd1 und pcd2

Gezeigt ist die cDNA-Insertion mit den flankierenden Vektorsequenzen der transfizierten cDNA-Plasmide. Die cDNA ist über poly(G/C)- und poly(A/T)-Brücken in den Vektor kloniert. Die Restriktionschnittstellen des Vektors (BamHI, PstI und XhoI) sowie das Neomycin-Resistenzgen (neo) sind angegeben. Die Lokalisation und Orientierung der Primer pcd1 und pcd2 ist durch Pfeile dargestellt. Der Primer pcd2 ist komplementär zum kodierenden Strang der cDNA. In der Nukleotidabfolge der Primer sind die BamHI-Restriktionsschnittstellen unterstrichen. Die Sonde, die zur Hybridisierung (Abb.17C) verwendet wurde, ist hier ebenfalls dargestellt.

Anhand einer Positivkontrolle konnte das geschilderte Prinzip verifiziert werden: Eine definierte cDNA (Methyl-Purin-Glycosylase, MPG), die als 1,1 kb-Fragment im pcD-Expressionsvektor vorliegt, wurde in AT-Zellen transfiziert. Die genomische DNA eines G418-resistenten Zellklons, der die intakte MPG-cDNA trug, wurde isoliert und als Matrize für die PCR verwendet. Mit den vektorspezifischen Primern pcd1 und pcd2 (Abb.17 A) wurde die inserierte cDNA amplifiziert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung das erwartete Amplifikationsprodukt mit der Größe von 1100 bp sichtbar gemacht (Abb.17 B). Ein Produkt mit der identischen Größe entstand, wenn das zur Transfektion verwendete pcD-MPG-Plasmid als Matrize in die PCR eingesetzt wurde (hier nicht gezeigt).

Mit dieser erfolgreich getesteten Methode sollte jede stabil transfizierte cDNA aus der genomischen DNA der 514-Zellen amplifizierbar sein, sofern sie noch mit den unmittelbar flankierenden Vektor-Sequenzen verknüpft ist. Daher wurde genomische DNA aus AT-Zellen, aus Zellen des partiell strahlenresistenten Klons 514 sowie des Transfektantenklons 1072 als Matrize in die PCR eingesetzt. Der ursprünglich G418-resistente Transfektantenklon 1072 hatte eine Strahlenselektion in G418-freiem Medium überlebt, dabei aber die Resistenz für G418 verloren. Aus der genomischen DNA der AT- und 1072-Zellen waren keine Amplifikationsprodukte nach gelelektrophoretischer Auftrennung zu sehen. Durch unspezifisches Anlagern der Primer an genomische DNA-Sequenzen entstanden jedoch hochmolekulare Amplifikations-

produkte, die nach der gelelektrophoretischen Auftrennung im hochmolekularen Bereich der entsprechenden Spuren sichtbar wurden.

Aus der genomischen DNA des Zellklons 514 konnten mehrere Produkte mit einer Länge von 900 bp, 700 bp und 500 bp sowie kleinere Fragmente amplifiziert werden (Abb.17 B).

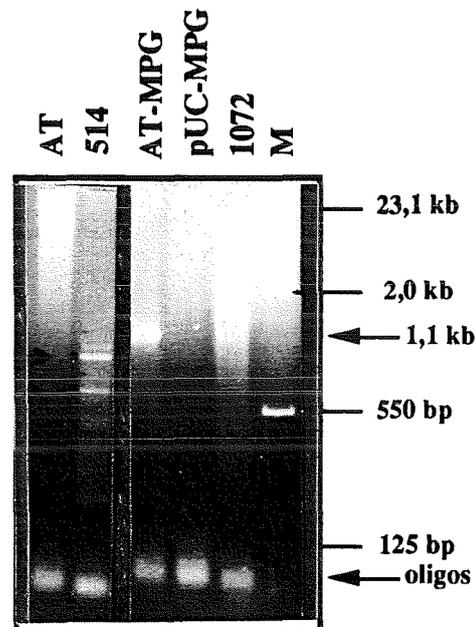


Abb.17 B: Gelelektrophoretische Auftrennung von cDNA-Sequenzen nach Amplifikation aus genomischer DNA transfizierter Zellen

Je 500 ng genomische DNA verschiedener Zellen, bzw. 50 ng Plasmid-DNA wurden als Matrize eingesetzt und mit den vektorspezifischen Primern pcd1 und pcd2 die cDNA-Insertion amplifiziert. Die Dauer und Temperatur der 30 Reaktionszyklen waren: 1 min bei 94°C; 1 min bei 60°C; 3 min bei 72°C. Ein Viertel der PCR-Ansätze wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

- AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia
- 514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlenresistenten Phänotyp zeigt
- AT-MPG: AT-Zellen, die stabil mit dem pcD-MPG-Plasmid transfiziert worden waren
- pUC-MPG: Rekombinantes pUC9-Plasmid mit der MPG-cDNA (1,1 kb nach BamHI-Verdau) als Insertion
- 1072: Primär G418-resistenter AT-Zellklon, der nach einer Strahlenselektion in G418-freiem Medium überlebt, aber die G418-Resistenz verloren hatte
- M: Größenmarker (Δ /HindIII)
- oligos: Unverbrauchte Oligonukleotide (Primer)

Um die Spezifität der Reaktion zu prüfen, und eventuelle schwach amplifizierte DNA-Fragmente zu erkennen, wurden die Amplifikationsprodukte nach der Gelelektrophorese auf einer Nylon-Membran immobilisiert und mit einem pcD-Vektorfragment hybridisiert. Dazu wurde nach Partialverdau des pcD-Vektors mit BamHI und PstI das 0,6 kb-Fragment zwischen dem Neomycin-Resistenzgen und der cDNA (siehe Abb.17 A) nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel eluiert und radioaktiv markiert. Nach der Hybridisierung wurde

stringent gewaschen und die Autoradiographie durchgeführt. Abbildung 17 C zeigt, daß sowohl das 1,1 kb-Amplifikationsprodukt der im pcD-Vektor vorliegenden MPG-cDNA als auch 4 amplifizierte Fragmente (900 bp, 700 bp, 500 bp und 300 bp) aus der genomischen DNA von 514-Zellen mit dem Vektorfragment hybridisieren. In den PCR-Ansätzen mit genomischer DNA aus AT-Zellen sowie aus Zellen des Transfektantenklons 1072, der nach einer Strahlenselektion (zumindest) die Resistenz für G418 verloren hatte, waren keine Amplifikationsprodukte nach der Hybridisierung mit dem pcD-Vektorfragment sichtbar.

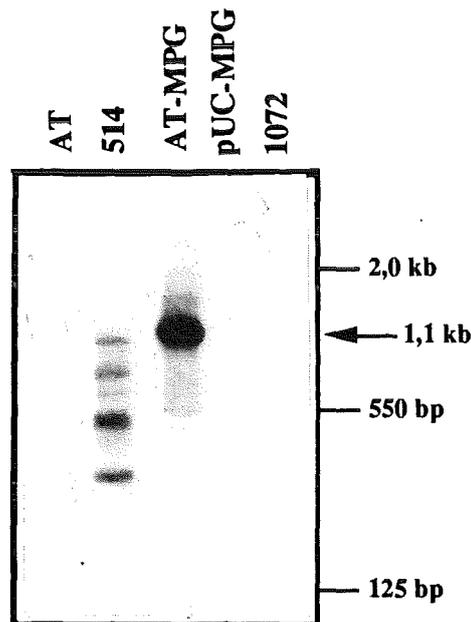


Abb.17 C: Autoradiogramm gelelektrophoretisch aufgetrennter, amplifizierter cDNA-Sequenzen nach Hybridisierung mit einem radioaktiv markierten Vektorfragment

Je 500 ng genomische DNA, bzw. 50 ng Plasmid-DNA wurden als Matrize eingesetzt und mit den vektorspezifischen Primern pcd1 und pcd2 die cDNA-Insertion amplifiziert. Die Dauer und Temperatur der 30 Reaktionszyklen waren: 1 min bei 94°C; 1 min bei 60°C; 3 min bei 72°C. Ein Viertel der PCR-Ansätze wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Nach Immobilisieren auf einer Nylon-Membran wurde mit einem radioaktiv markierten Vektorfragment hybridisiert, stringent gewaschen (0,1xSSC) und die Autoradiographie durchgeführt.

- AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia
- 514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlen-resistenten Phänotyp zeigt
- AT-MPG: AT-Zellen, die stabil mit dem pcD-MPG-Plasmid transfiziert worden waren
- pUC-MPG: Rekombinantes pUC9-Plasmid mit der MPG-cDNA (1,1 kb nach BamHI-Verdau) als Insertion
- 1072: Ursprünglich G418-resistenter AT-Zellklon, der nach einer Strahlenselektion in G418-freiem Medium überlebt, aber die G418-Resistenz verloren hatte

6.2. Klonierung des 500 bp-Amplifikationsproduktes in pUC9

Die aus der genomischen DNA von 514-Zellen amplifizierte PCR-Produkte, die mit der Vektorsequenz hybridisierten, wurden nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel eluiert und mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut. Dadurch wurden Anteile der zur PCR verwendeten Oligonukleotide abgespalten (siehe Abb.17 A). Die auf diese Weise entstandenen Produkte wurden dephosphoryliert und mit dem durch BamHI-Verdau linearisierten Vektor pUC9 ligiert. Die Ligationsansätze wurden in kompetente *E.coli* DH5 α transformiert. Trotz wiederholter Bemühungen konnte so nur das 500 bp-Fragment kloniert werden. Der resultierende, positive *E.coli*-Klon trägt das rekombinante Plasmid (pUC9-AT500), welches nach BamHI-Verdau die 500 bp-Insertion zeigt. Diese wird im Folgenden als AT500 bezeichnet.

6.3. Sequenzierung des 500 bp-Fragments

Das rekombinante pUC9-AT500-Plasmid wurde nach der Sanger-Methode sequenziert. Als Primer wurden "M13/pUC universal primer #1212" und "reverse primer #1201" verwendet. Die DNA-Sequenz des für die cDNA kodierenden Strangs ist in Abbildung 18 gezeigt.

Zur Orientierung sind die flankierenden pUC9-Vektorsequenzen mit den Restriktions-Schnittstellen dargestellt. In der klonierten AT500-Sequenz sind die Anteile der ursprünglichen cDNA-Vektorsequenzen vorhanden, die als Startpunkte für die Amplifikation des Fragments mit den vektorspezifischen Primern pcd1 und pcd2 aus der genomischen DNA des Klons 514 dienen. Die Lokalisation und Orientierung der pcd1- und pcd2-Primer entspricht der Situation in den pcD-Plasmiden: Anschließend an die pcd2-Sequenz folgt eine PstI-Schnittstelle (die hier allerdings eine Sequenzabweichung trägt, Nukleotide 53-57), und eine poly(G)-Brücke, die zur Insertion der cDNA verwendet worden war (siehe Abb. 17 A; Okayama und Berg, 1983). Unmittelbar darauf folgt das "Start"-Codon der cDNA (ATG, Nukleotide 69-72). Die in dem AT500-Fragment beinhaltete cDNA wird im Folgenden als AT500-cDNA bezeichnet.

Auffallend an der dargestellten Nukleotidsequenz ist die Tatsache, daß die Bereiche der beiden Primer pcd1 und pcd2 Sequenzabweichungen tragen. Diese können sowohl durch Mutationen der genomischen Sequenz der 514-Zellen als Folge der Bestrahlungen bei der ersten Selektion entstanden sein als auch durch Kopierfehler der Taq-Polymerase und experimentelle Fehler bei der Klonierung und Sequenzierung des amplifizierten Fragments. Möglicherweise sind sie auch auf Fehler bei der Oligonukleotidsynthese zurückzuführen.

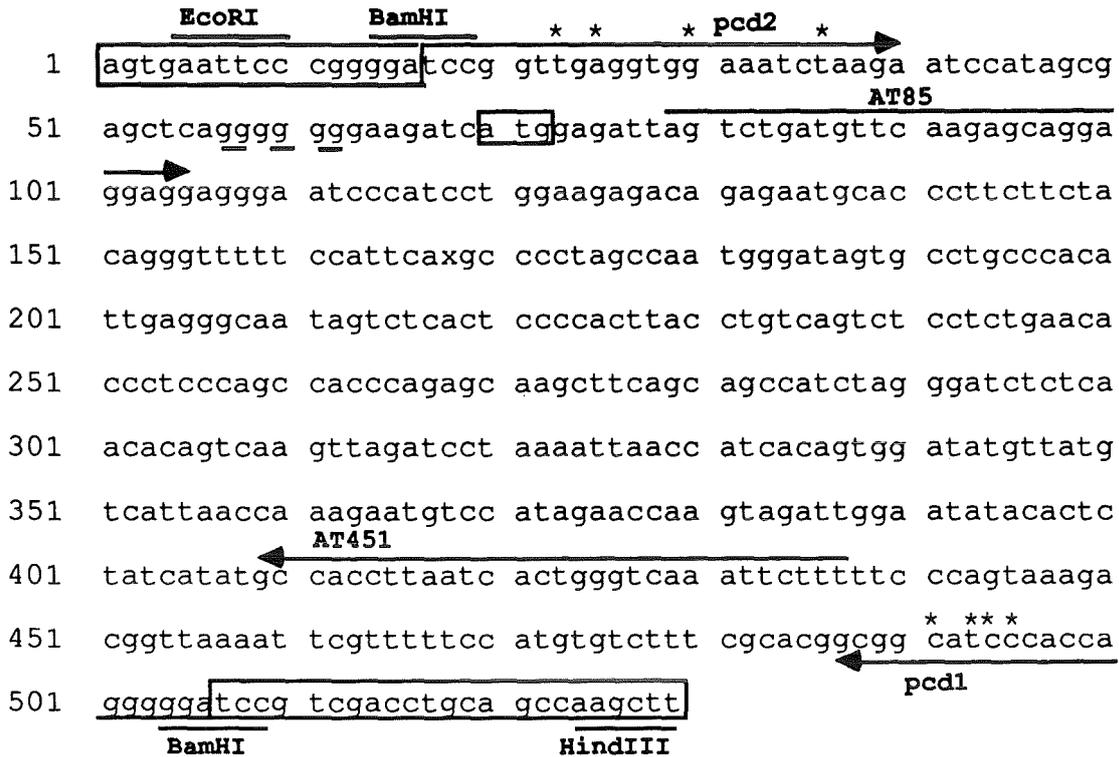


Abb.18: Nukleotidsequenz des klonierten AT500-Fragments

Das rekombinante Plasmid pUC9-AT500 wurde nach der Sanger-Methode unter Verwendung vektorspezifischer Oligonukleotide (pUC/M13 reverse- und universal primer) und dem Enzym Sequenase sequenziert. Nach Auftrennen der Sequenzierreaktion in einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgel konnte die Abfolge der Nukleotide gelesen werden. Dargestellt ist der für die cDNA kodierende Strang. Das ATG-"Start"-Codon ist umrahmt. Als Orientierungshilfen sind die flankierenden pUC9-Vektorsequenzen mit den Restriktions-Schnittstellen umrahmt dargestellt. Die Nukleotidfolgen der ursprünglich zur Amplifikation verwendeten pcD-Primer sind mit Pfeilen, die darin vorhandenen Sequenzabweichungen als Sterne gekennzeichnet. Die Sequenzen und Lokalisierung der Oligonukleotide AT85 (Nukleotide 78-105) und AT451 (Nukleotide 408-436), die als Primer zur Amplifikation eines internen 360 bp langen Subfragments verwendet wurden (siehe nächster Abschnitt), sind ebenfalls mit Pfeilen gekennzeichnet.

6.4. Re-Amplifikation des klonierten Fragments und Amplifikation eines internen Subfragments mit der "PCR"

Mit Hilfe der pcd1- und pcd2-Primer konnte das gesamte AT500-Fragment aus dem rekombinanten Plasmid pUC9-AT500 re-amplifiziert werden (hier nicht gezeigt).

Für Hybridisierungsexperimente war es wichtig, eine AT500-Sonde zu verwenden, die keine Vektorsequenzen mehr enthält. Daher wurden, basierend auf der ermittelten DNA-Sequenz des AT500-Fragments, zwei Oligonukleotide bestimmt, mit denen ein internes Subfragment von AT500 amplifiziert werden konnte. Mit diesen Oligonukleotiden als Primer sollte außerdem ein qualitativer Nachweis des cDNA-Anteils der AT500-Sequenz in unterschiedlichen DNAs über PCR-Analyse möglich sein. Abbildung 18 zeigt die Sequenz, Lokalisation und Orientierung der als Primer verwendeten Oligonukleotide (AT85, AT451) in dem AT500-Fragment. AT451 ist komplementär zu dem für die cDNA kodierenden Strang.

In Abbildung 19 ist die gelelektrophoretische Auftrennung eines PCR-Ansatzes gezeigt, in dem pUC-AT500 als Matrize sowie die Primer AT85 und AT451 verwendet wurden. Das Amplifikationsprodukt hat die erwartete Größe von 360 bp und wird im folgenden als AT360 bezeichnet.

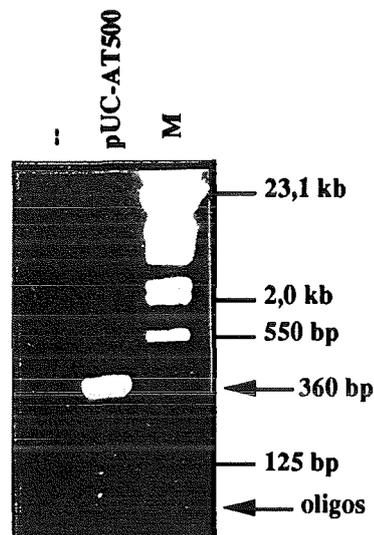


Abb. 19: Gelelektrophoretische Auftrennung des AT360-Fragments nach Amplifikation aus dem rekombinanten Plasmid pUC9-AT500

50 ng DNA des Plasmids pUC9-AT500 wurden als Matrize eingesetzt und mit den Oligonukleotiden AT85 und AT451 das 360 bp-Fragment der klonierten AT500-Sequenz amplifiziert.

Die Dauer und Temperatur der 30 Reaktionszyklen waren: 1 min bei 94°C; 1 min bei 65°C; 1 min bei 72°C. Ein Viertel des PCR-Ansatzes wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

- : Ohne Matrizen-DNA
- pUC-AT500: Rekombinantes Plasmid (AT500 in pUC9)
- M: Größenmarker (Δ /HindIII)
- oligos: Unverbrauchte Oligonukleotide (Primer)

6.5. Charakterisierung der AT500-cDNA mit Computeranalyse

Mit Hilfe eines Software-Programms konnte die klonierte DNA-Sequenz, bzw. deren abgeleitete Proteinsequenz näher charakterisiert werden. Dadurch sollte die Frage beantwortet werden, ob es sich bei der AT500-cDNA um eine bekannte DNA-Sequenz bzw. davon abgeleitete Proteinsequenz handelt, und ob diese mit der Vermittlung der Strahlenresistenz in 514-Zellen in Verbindung gebracht werden kann.

6.5.1. Die klonierte DNA-Sequenz ist in der EMBL-Datenbank unbekannt

Mit dem GCG-Computerprogramm (GCG sequence analysis software package, Version 7.3) konnte die AT500-cDNA-Sequenz mit allen bisher klonierten und sequenzierten DNA-

Sequenzen der EMBL-Datenbank (Stand: August 1993) verglichen werden. Dabei wurde sowohl die komplette EMBL-Bank, als auch die Unterabteilung menschlicher Sequenzen mit der AT500-cDNA verglichen. In beiden Fällen zeigte sich, daß die Sequenz bisher unbekannt ist. Auf der Suche nach auffälligen Homologien zu bekannten Sequenzen wurden die EMBL-Sequenzen mit der besten Übereinstimmung zur AT500-cDNA analysiert. Der Computerausdruck der besten 40 Übereinstimmungen verdeutlichte, daß nur zu zwei bekannten DNA-Sequenzen eine auffällige Homologie vorhanden war: Die mit Abstand beste Übereinstimmung der verglichenen Sequenzen trat mit der menschlichen Glutathiontransferase-mRNA (1,3 kb) auf (Ross und Board, 1992). Hier betrug die Übereinstimmung der verglichenen Nukleotide 57,1% über einen Bereich von 324 Basenpaare. Eine zweite schwache Homologie (59,5%) trat über eine Strecke von 210 kb zu dem 5'-nicht-translatierten Bereich eines U7 snRNA-Pseudogens auf (Soldati und Schümperli, 1990). Alle anderen Übereinstimmungen erstreckten sich höchstens über 100 Basenpaare und betrogen bei dieser Länge maximal 65%.

6.5.2. Die AT500-cDNA-Sequenz hat kein durchgehend offenes Leseraster und die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen sind in der EMBL-Datenbank unbekannt.

Aufgrund der Annahme, daß AT500 eine cDNA-Sequenz darstellt, die für ein Protein kodiert, wurde das Leseraster der Sequenz untersucht. Ausgehend vom wahrscheinlichen "Start"-Codon (ATG) der cDNA wurde die DNA-Sequenz in die entsprechende Aminosäure-Sequenz translatiert. Es zeigte sich hierbei, daß nach 44 Aminosäuren ein "Stop"-Codon auftrat. Auch die Translation in den übrigen 5 Leserastern erbrachte keine durchgehende, putative Aminosäurekette.

Auf der Suche nach Homologien zu bereits bekannten Proteinen wurden die sechs verschiedenen Aminosäuresequenzen mit den ebenfalls translatierten Sequenzen der EMBL-Bank verglichen. Es war keine annähernd identische Proteinsequenz in der EMBL-Bank vorhanden, deren Homologie zu den translatierten Aminosäuresequenzen von AT500 sich über einen längeren Bereich (mindestens 30 Aminosäuren) erstreckte.

Die geschilderten Sequenzanalysen können folgendermaßen interpretiert werden:

Die klonierte AT500-Sequenz ist sowohl auf DNA- wie auch auf Protein-Ebene unbekannt. Mit den zur Amplifikation verwendeten vektorspezifischen Primern, die homolog zu SV40-Promotor- und Polyadenylierungs-Sequenzen sind, wurde keine bekannte virale SV40-DNA als Artefakt aus der genomischen DNA der 514-Zellen amplifiziert. AT500 ist keine bekannte repetitive Sequenz.

Die Tatsache, daß AT500 kein durchgehend offenes Leseraster besitzt, kann folgende Ursachen haben:

1. Die ermittelte Sequenz kann artifizielle Fehler enthalten, die nicht in der genomischen Sequenz der 514-Zellen vorhanden sind. Als Fehlerquellen kommen hier die Kopierfehler der

Taq-Polymerase bei der Amplifikation des Fragments aus der genomischen DNA sowie die Klonierungs- und Sequenzierungsreaktionen in Frage.

2. Die ermittelte AT500-Sequenz entspricht der Sequenz in der DNA aus 514-Zellen und stellt somit eine mutierte und/oder unvollständige cDNA-Sequenz dar. In diesem Fall stellen sich die Fragen, warum es zur Mutation und/oder Deletion der cDNA-Sequenz gekommen ist, und ob die davon abgeleitete Aminosäure-Sequenz als funktionelles Protein in der Zelle wirken kann.

Punkt 1 ist durch die genomische Instabilität der AT-Zellen sowie die in Kapitel 1 ausführlich beschriebenen Effekte der Transfektion und Strahlenselektion leicht erklärbar. Zu Punkt 2 kann gesagt werden, daß auch unvollständige Proteine, in manchen Fällen sogar nur das aktive Zentrum eines Proteins, biologische Funktionen in der Zelle ausüben können (Pierre und Laval, 1981; Angel et al, 1989).

6.6. Charakterisierung der zu AT500 homologen genomischen DNA

Die vergleichende Computeranalyse verdeutlichte, daß AT500 eine bisher unbekannte DNA-Sequenz darstellt. Unter der Annahme, daß AT500 Bestandteil einer menschlichen cDNA ist, sollte die Sequenz spezifisch in DNA aus menschlichen Zellen auffindbar sein.

Da AT500 ursprünglich als transfizierte cDNA aus dem Genom von 514-Zellen amplifiziert worden war, mußte das zusätzliche Auftreten dieser Sequenz in der genomischen DNA aus 514-Zellen, im Unterschied zu DNA aus AT-Zellen, zu erkennen sein.

6.6.1. Das klonierte DNA-Fragment tritt nach PCR-Analyse spezifisch in DNA aus menschlichen Zellen auf

In der genomischen DNA unterschiedlicher Zelllinien aus verschiedenen Spezies wurde die Anwesenheit des klonierten DNA-Fragmentes mit PCR-Analysen untersucht. Die als Startermoleküle verwendeten Oligonukleotide AT85 und AT451 wurden zur Amplifikation des internen 360 bp-Fragmentes in die PCR eingesetzt. Als Matrizen-DNA wurde genomische DNA der menschlichen fibroblastischen Zelllinien AT5BIVA (sowie stabile Transfektantenlinien derselben), HL60 (promyelozytische menschliche Zellen) und SL88 (primäre fibroblastische Zelllinie) eingesetzt. Als nicht-menschliche DNA wurde genomische DNA aus immortalisierten Hamster- (CHO, chinese hamster ovary), aus Frosch- (*Xenopus laevis*) sowie aus Hefezellen eingesetzt. In mehreren unabhängigen Experimenten zeigte sich, daß ausschließlich in der DNA menschlicher Zellen das erwartete Amplifikationsprodukt als einzige und ausgeprägte Bande nach gelelektrophoretischer Auftrennung vorhanden war (Abb.20). Aus der DNA aus Hamster-, Frosch- und Hefezellen wurden lediglich geringe Mengen verschiedenster niedermolekularer DNA-Fragmente unspezifisch amplifiziert, die als Anhäufung schwacher DNA-Banden nach gelelektrophoretischer Auftrennung sichtbar wurden.

Daraus folgt, daß in PCR-Analysen das untersuchte Fragment ausschließlich aus der DNA menschlicher Zellen amplifizierbar ist. Außerdem ist das PCR-Produkt unabhängig von der Immortalisierung der Zellen durch SV40-DNA vorhanden. Die genomische AT360 Sequenz scheint nicht durch Introns unterbrochen zu sein.

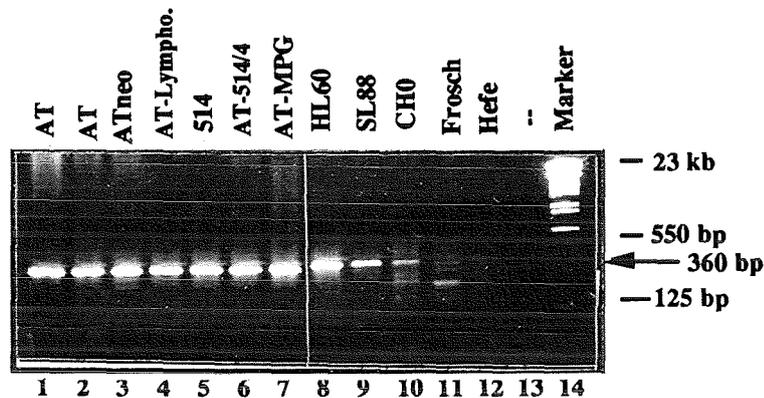


Abb.20: Gelelektrophoretische Auftrennung des AT360-Fragments nach Amplifikation aus genomischer DNA verschiedener Spezies

Je 500 ng genomische DNA aus menschlichen Zelllinien sowie Zellen anderer Spezies wurden als Matrize eingesetzt und mit den Oligonukleotiden AT85 und AT451 das 360 bp-Fragment der klonierten AT500-Sequenz amplifiziert.

Die Dauer und Temperatur der 30 Reaktionszyklen waren: 1 min bei 94°C; 1 min bei 65°C; 1 min bei 72°C. Ein Viertel der PCR-Ansätze wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

- AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia
 ATneo: Mischung individueller, G418-resistenter AT5BIVA-Klone, die nach stabiler Transfektion mit pSV2neo entstanden
 AT-Lympho: Lymphoblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia
 514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlenresistenten Phänotyp zeigt
 AT-514/4: Stabil G418-resistenter Zellklon, der nach Transfektion genomischer DNA aus 514-Zellen in AT-Zellen entstand
 AT-MPG: AT-Zellen, die stabil mit dem pcD-MPG-Plasmid transfiziert worden waren
 HL60: Promyelozytische menschliche Zelllinie
 SL88: Primäre menschliche Fibroblasten-Linie
 CHO: Hamsterzellen (chinese hamster ovary)
 Frosch: Primäre Froschzellen (*Xenopus laevis*)
 Hefe: *Saccharomyces cerevisiae*
 --: Ohne Matrizen-DNA
 Marker: Größenmarker (Δ /HindIII)

6.6.2. Hybridisierung genomischer DNA verschiedener Spezies mit dem klonierten Fragment

Da die im letzten Abschnitt gezeigten PCR-Analysen abhängig sind von der Spezifität der verwendeten Primer, bezieht sich die Aussagekraft der PCR nur auf die Homologie der Primer, die an die entsprechenden genomischen Sequenzen hybridisieren und die Länge der amplifizierten DNA. Um zu testen, ob in der DNA anderer Spezies Sequenzen vorhanden sind, die über weite Strecken zu AT500 homolog, aber aufgrund fehlender Homologie zu den

Primer-Sequenzen in der PCR nicht amplifizierbar sind, wurden Hybridisierungen durchgeführt.

Je 20 µg menschliche, genomische DNA sowie genomische DNA aus verschiedenen Mausschwänzen (zur Verfügung gestellt von R.Zwacka) wurden nach Verdau mit BamHI in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran übertragen und mit dem klonierten AT360-Fragment hybridisiert. Es zeigte sich, daß nach dem Waschen der Filter mit mittlerer Stringenz (0,5xSSC) starke Hybridisierungssignale mit der menschlichen DNA auftraten, jedoch keine Hybridisierung mit der Maus-DNA zu sehen war (Abb.21). Als Kontrolle für die Existenz und Hybridisierbarkeit der Maus-DNA war dieselbe Membran zuvor mit einer mausspezifischen Probe (genomisches Fragment des Mpv17-Gens aus Mauszellen; Weiher et al., 1990) hybridisiert worden. Nach der Hybridisierung waren polymorphe Mpv17-Allele als Banden der Größe 2,8 kb und 6,3 kb in der Maus-DNA, jedoch keine Signale in der menschlichen DNA auf dem Autoradiogramm zu sehen.

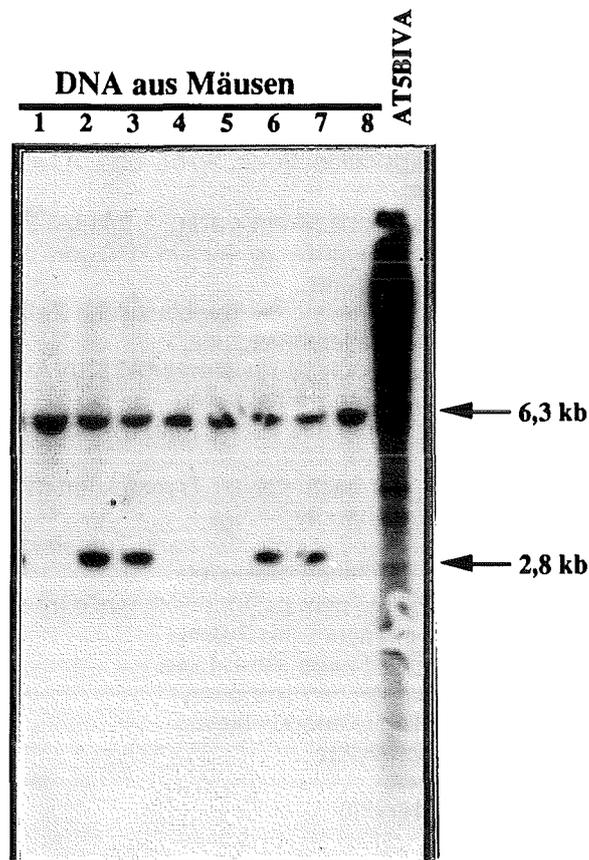


Abb.21: Autoradiogramm gelelektrophoretisch aufgetrennter, genomischer DNA aus menschlichen Zellen und Mausschwänzen nach Hybridisierung mit dem AT360-Fragment sowie einer mausspezifischen, radioaktiv markierten Sonde

Je 20 µg genomische DNA wurden mit BamHI verdaut und nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Nylon-Membran übertragen. Zuerst wurde mit einer radioaktiv markierten, mausspezifischen Sonde (Mpv-17) hybridisiert, die nach stringentem Waschen (0,1xSSC) nur bei der Maus-DNA in der Autoradiographie Banden mit der Größe 2,8 kb und 6,3 kb hervorbrachte. Nach einer zweiten Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten AT360-Fragment wurde nur bis 0,5xSSC gewaschen. Das Autoradiogramm zeigt, daß die AT360-Sonde nur DNA aus menschlichen Zellen erkennt.

Spur 1-8: Genomische DNA aus verschiedenen Mäusen

AT5BIVA: SV40-immortalisierte Zellen von einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia

Dieses Experiment zeigt, daß in der DNA aus Mauszellen zusätzlich zu den Maus-spezifischen Signalen (Mpv17) keine Signale nach Hybridisierung mit der AT360-Sonde auftreten. Das Ergebnis steht somit im Einklang mit den PCR-Analysen des letzten Abschnitts und bestätigt das spezifische Auftreten der klonierten Sequenz in menschlicher DNA.

6.6.3. Hybridisierung genomischer DNA aus AT-, 514- und normalen GM637-Zellen mit dem klonierten Fragment

Die letzten zwei Abschnitte zeigten die Spezifität der Herkunft des klonierten AT500-Fragments aus menschlicher DNA. Die Sequenzanalyse (Abschnitt 6.6.) und die Re-Amplifizierbarkeit des AT500-Fragments mit den pcD-Primern (Abschnitt 6.4.) bestätigten, daß das AT500-Fragment nach Amplifikation mit denselben vektorspezifischen Primern aus der genomischen DNA der 514-Zellen isoliert worden war. Durch Hybridisierungen sollte die zusätzliche Integration des AT500-Fragments in die genomische DNA der 514-Zellen nachweisbar sein.

Je 30 µg genomische DNA der Zellklone GM637, AT5-BIVA, 514 und des sekundären Transfektantenklons AT-514/4 wurde mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut, in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran immobilisiert. Für die Hybridisierung wurde das über PCR amplifizierte und dabei radioaktiv markierte AT360-Fragment eingesetzt. Nach dem Waschen der Membran mit mittlerer Stringenz (0,5xSSC) zeigten sich in allen getesteten DNAs eine Vielzahl starker Signale unterschiedlicher Fragmentlängen, die den Eindruck einer repetitiven Sequenz vermittelten (siehe auch letzter Abschnitt). Nach erneutem Waschen mit 0,1xSSC traten einzelne distinkte Banden als spezifische Hybridisierungssignale in den verschiedenen verdauten DNAs auf (Abb.22 A).

Die Analyse der Banden ergab, daß in der DNA der untersuchten Zelllinien eine 3,5 kb-Bande nach BglIII-Verdau, eine 0,9 kb-Bande nach EcoRI-Verdau sowie eine 6 kb-Bande nach BamHI-Verdau aufgetreten waren. Aufgrund der identischen Fragmentgrößen in den verschiedenen DNAs kann gefolgert werden, daß die hier aufgetretenen Signale auf die in allen untersuchten Zellen vorhandenen, endogenen Sequenzen von AT500 zurückzuführen sind. In der DNA aus 514-Zellen konnte eine zusätzliche, schwache 2,0 kb-Bande nach EcoRI-Verdau (Abb.22 A, Spur 8) erkannt werden. Da die endogene Kopie der AT500-Sequenz in diploiden Zellen doppelt vorkommt, ist die Intensität der transfizierten Bande des AT500-Fragments entsprechend schwächer. In einem weiteren Experiment konnte eine zusätzliche schwache 0,2 kb-Bande nach BglIII-Verdau (Abb.22 B, Spur 5) in der genomischen DNA aus 514-Zellen nachgewiesen werden, für die analoges gilt. Die Größe der vollständigen, in 514-Zellen transfizierten cDNA wird aus diesem Experiment nicht ersichtlich. Je nach Art der Integration in das zelluläre Genom und Restriktionsschnittstellen der unbekannt Sequenz können unterschiedliche Banden nach Hybridisierung mit der AT360-Sonde auftreten.

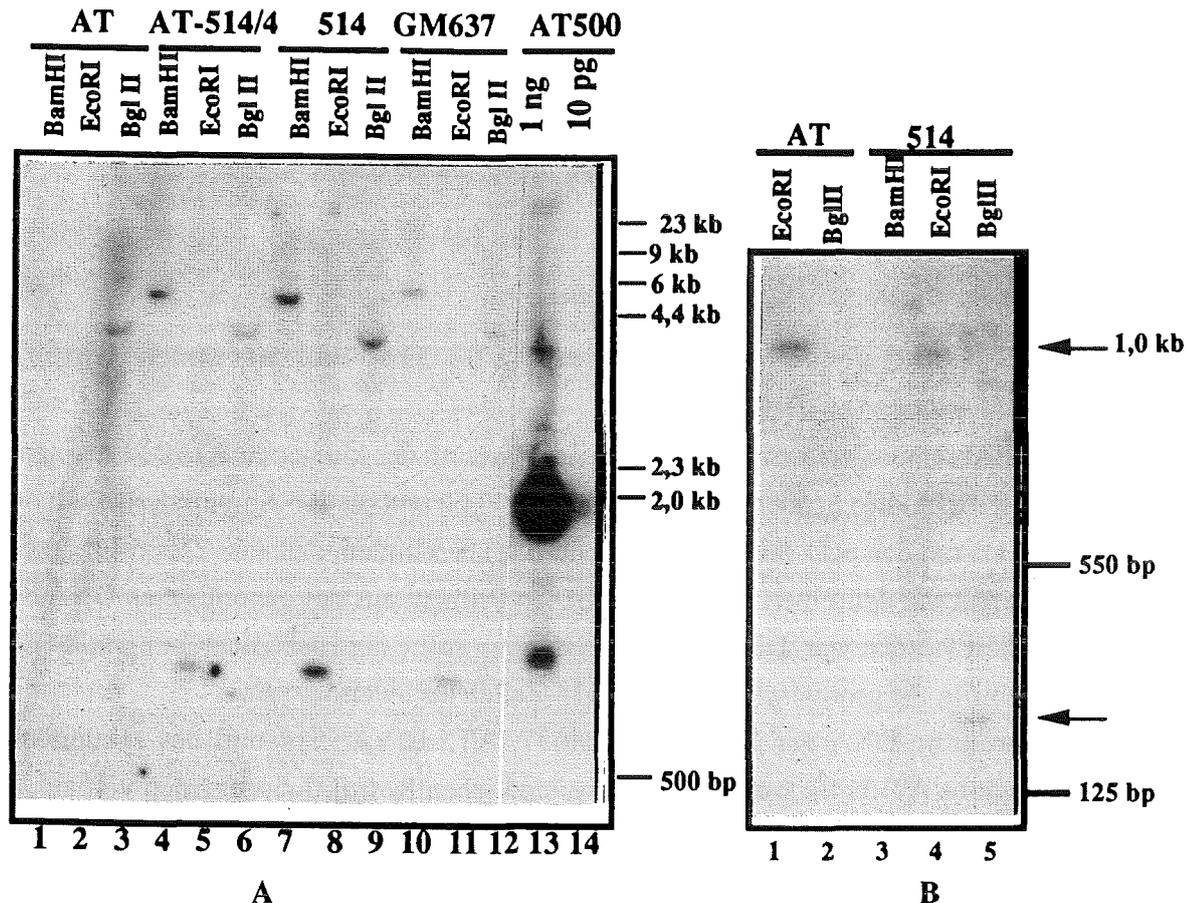


Abb.22 A und B: Autoradiogramm geelektrophoretisch aufgetrennter, genomischer DNA aus menschlichen Zellen nach Hybridisierung mit AT500

Je 30 µg genomische DNA der Zellklone AT, 514, GM637 und AT-514/4 wurden mit den angegebenen Enzymen verdaut, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf einer Nylon-Membran immobilisiert. Die DNA auf der Membran wurde mit dem radioaktiv markierten AT500-Fragment hybridisiert, bis 0,1xSSC gewaschen und eine Autoradiographie durchgeführt.

A, B: Verschiedene Experimente, die parallel durchgeführt worden waren

- AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia
- AT-514/4: Stabil G418-resistenter Zellklon, der nach Transfektion genomischer DNA aus 514-Zellen in AT-Zellen entstand.
- 514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlenresistenten Phänotyp zeigt
- GM637: Normale, menschliche Fibroblasten (SV40-immortalisiert)
- AT500: Unverdaute DNA des rekombinanten Plasmids pUC9-AT500

Das Auftreten zusätzlicher Banden in der DNA aus 514-Zellen nach Hybridisieren mit AT500 bestätigt, wie auch die Sequenzanalyse, den Ursprung der klonierten Sequenz aus einem ursprünglich in diese Zellen transfizierten cDNA-Plasmid. Es wird außerdem deutlich, daß die klonierte Sequenz nur eine von mehreren möglichen transfizierten cDNAs erkennt. Die Tatsache, daß in der DNA aus Zellen der sekundären Transfektante AT-514/4 keine zusätzlichen Banden auftreten, zeigt, daß die AT500-cDNA in der sekundären Transfektion vermutlich vom Neomycin-Resistenzgen entkoppelt wurde. Sie war deshalb nicht zusammen mit dem Neomycin-Resistenzgen übertragbar, weshalb die mit G418-selektionierten Zellen des sekundären Transfektantenklons auch nicht erhöht strahlenresistent sind. Dasselbe gilt für die

Zellen des zweiten sekundären Transfektantenklons AT-514/2, der hier nicht gezeigt ist. Hieraus läßt sich eine Korrelation zwischen dem Auftreten der klonierten AT500-cDNA und der Strahlenresistenz der Zellen ableiten.

6.7. Chromosomale Lokalisierung des AT500-Fragments

Die phänotypischen Daten des Zellklons 514 zeigen, daß eine partielle Komplementation der AT-Zellen in 2 von 3 zellulären Parametern stattgefunden hat. Das aus der DNA der 514-Zellen klonierte AT500-Fragment konnte als Bestandteil einer menschlichen DNA charakterisiert werden, war aber über die vergleichende Analyse mit Sequenzen bekannter Gene nicht identifizierbar. Daher war es von Interesse, die chromosomale Lokalisation dieser Sequenz zu erfahren. Besonders wichtig war die Frage, ob das klonierte Fragment auf dem postulierten Locus für die AT-Gene, dem Chromosomenbereich 11q22-23 kartiert.

6.7.1. Hybridisierung von Mensch-Nager-Hybridzelllinien mit dem klonierten Fragment

Um zu erkennen, auf welchem Chromosom das AT500-Fragment kartiert, wurden genomische DNAs aus unterschiedlichen Mensch-Nager-Hybridzelllinien mit dem Fragment hybridisiert. Jede dieser untersuchten Nagerzelllinien enthält einige menschliche Chromosomen. Durch den Vergleich der mit der Sonde hybridisierenden Zelllinien mit den in den jeweiligen Zellen enthaltenen menschlichen Chromosomen kann das Chromosom identifiziert werden, welches die als Sonde eingesetzte DNA enthält. Die genomische Instabilität der Hybridzelllinien und das Auftreten von Chromosomenfragmenten läßt jedoch in der Regel keine 100%ige Korrelation der eingesetzten Sonde zu einem Chromosom zu.

Die DNAs der unterschiedlichen Hybridzelllinien waren nach EcoRI-Verdau gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran immobilisiert worden. Diese Membran wurde mir freundlicherweise von Dr. Grzechik (Marburg) zur Verfügung gestellt.

Nach Hybridisierung mit dem AT360-Fragment wurde die Membran mit 0,5xSSC gewaschen, da nach dem Waschen mit höherer Stringenz auf dieser Membran keine Signale aufgetreten waren. Wie in den Experimenten zuvor (Abb.21) trat auch hier nach dem Waschen mit verminderter Stringenz ein stark ausgeprägtes Bandenmuster auf (Abb.23). Als positives Signal wurde die 0,9 kb-Bande gewertet, die nach stringentem Waschen (0.1xSSC) als spezifische EcoRI-Bande in dem Experiment des letzten Abschnitts aufgetreten war. Nach dem Vergleich der Anwesenheit menschlicher Chromosomen mit dem Auftreten der 0,9 kb-Bande kamen 3 menschliche Chromosomen als Träger der AT500-Sequenz in Frage, die Chromosomen 11, 17 und 22. Alle anderen in den verschiedenen Hybridzelllinien enthaltenen menschlichen Chromosomen zeigten eine sehr viel schlechtere Korrelation (<50%) zu dem spezifischen Hybridisierungssignal. Die Verteilung der 3 in Frage kommenden Chromosomen in den unterschiedlichen Hybridzelllinien ist in Abbildung 23 dargestellt. Auch in diesem

Experiment zeigte sich die Spezifität von AT500 für menschliche DNA-Sequenzen: Kontroll-DNA aus Hamsterzellen (Spur 13) und Mauszellen (Spur 17) ohne menschliche DNA-Anteile zeigten auch bei verminderter Stringenz keinerlei Kreuzhybridisierung.

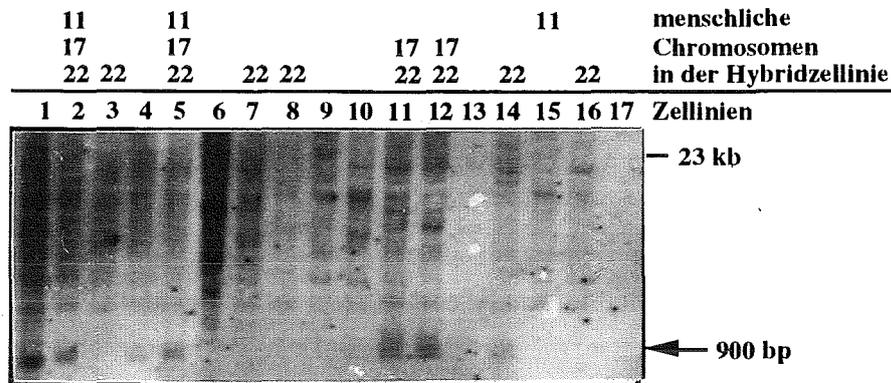


Abb.23: Autoradiogramm gelelektrophoretisch aufgetrennter genomischer DNA aus Mensch-Maus-Hybridzellen nach Hybridisierung mit dem AT360-Fragment

Je 10 µg genomische DNA aus Mensch-Nager-Hybridzellen waren mit EcoRI verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Nylonmembran immobilisiert worden (Grzechik, Marburg). Nach Hybridisierung mit dem 360 bp-Fragment wurde der Filter bis 0,5xSSC gewaschen und eine Autoradiographie durchgeführt.

Die Verteilung der 3 Chromosomen mit der besten Korrelation zu dem spezifischen Hybridisierungssignal (Chromosomen 11, 17 und 22) in den verschiedenen Hybridzelllinien ist gezeigt.

- Spur 1: Genomische DNA aus menschlichen Zellen
- Spuren 2-12: Genomische DNA aus Hamsterzellen, die verschiedene Anteile menschlicher Chromosomen enthalten
- Spur 13: Genomische DNA aus Hamster-Kontrollzellen
- Spuren 14-16: Genomische DNA aus Mauszellen, die verschiedene Anteile menschlicher Chromosomen enthalten
- Spur 17: Genomische DNA aus Maus-Kontrollzellen

6.7.2. "PCR"-Analysen mit DNA aus Hybridzelllinien

Die Hybridisierung der DNA aus Hybridzellen im vorigen Abschnitt deutete auf eine mögliche Lokalisierung des AT500-Fragments auf Chromosom 11 und damit auf dem Chromosom mit dem postulierten Locus für die AT-Gene. Eine genauere Analyse der Lokalisation war durch die Existenz von Mensch-Hamster-Hybridzelllinien möglich, die als einzige menschliche DNA definierte Fragmente des Chromosoms 11 enthalten (Tanigami, 1992). Genomische DNA dieser Zelllinien wurde mir freundlicherweise von Dr. C. Jones (Eleanor Roosevelt Institute, Denver, USA) zur Verfügung gestellt. Über die spezifische Amplifikation des AT360-Fragments aus der genomischen DNA dieser Zelllinien kann eine qualitative Aussage über die Existenz des gesuchten Fragments in der DNA getroffen werden. Da das Fragment in Nagerzelllinien nicht vorhanden ist und somit nicht amplifiziert werden kann, ist das mögliche Amplifikationsprodukt ausschließlich auf die menschlichen DNA-Anteile der Hybridzelllinien zurückzuführen.

Die Ergebnisse der PCR-Analyse in Abbildung 24 zeigen, daß in den Hybridzelllinien R304-A2 und P3-27A die AT360-Sequenz vorhanden ist, in den Zelllinien R229-3A und R28-4D jedoch nicht. Die Kontrollen mit DNA aus menschlichen Zellen (Spur 5+6) sowie dem rekombinanten

Plasmid pUC-AT500 (Spur 9) als Matrizen zeigten das erwartete Signal. Sowohl aus der DNA von Hamsterzellen (Spur 7) als auch von Mauszellen (Spur 8) war das AT360-Fragment erwartungsgemäß nicht amplifizierbar.

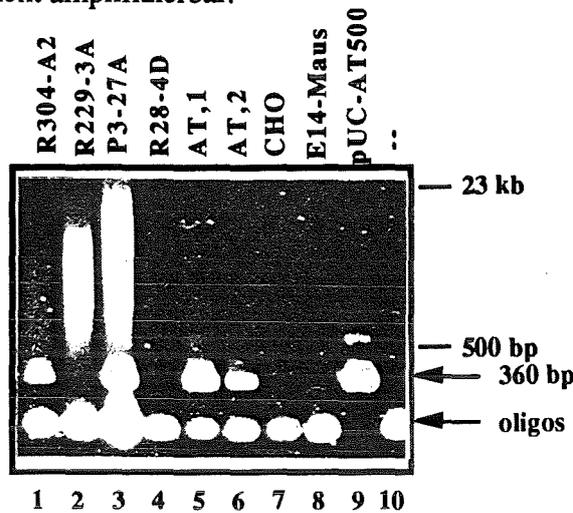


Abb. 24: Gelelektrophoretische Auftrennung des AT360-Fragments nach Amplifikation aus genomischer DNA von Mensch-Hamster-Hybridzelllinien

Je 500 ng genomische DNA verschiedener Zelllinien, bzw. 50 ng Plasmid-DNA wurden als Matrize eingesetzt und mit den Oligonukleotiden AT85 und AT451 das interne 360 bp-Fragment amplifiziert. Die Dauer und Temperatur der 30 Reaktionszyklen waren: 1 min bei 94°C; 1 min bei 65°C; 1 min bei 72°C. Ein Viertel des PCR-Ansatzes wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

- R304-A2, P3-27A,
- R229-3, R28-4D: Hamsterzelllinien, die als einzige menschliche DNA Anteile des Chromosoms 11 enthalten (wurden von Dr. C. Jones zur Verfügung gestellt)
- AT,1 und AT,2: AT5BIVA-Zellen
- CHO: Hamsterzellen (chinese hamster ovary)
- E14: Mauszellen (embryonale Maus-Stammzellen)
- pUC-AT500: Rekombinantes pUC9-Plasmid mit dem inserierten AT500-Fragment
- : Ohne Matrizen-DNA
- oligos: Nicht verbrauchte Oligonukleotide (Primer)

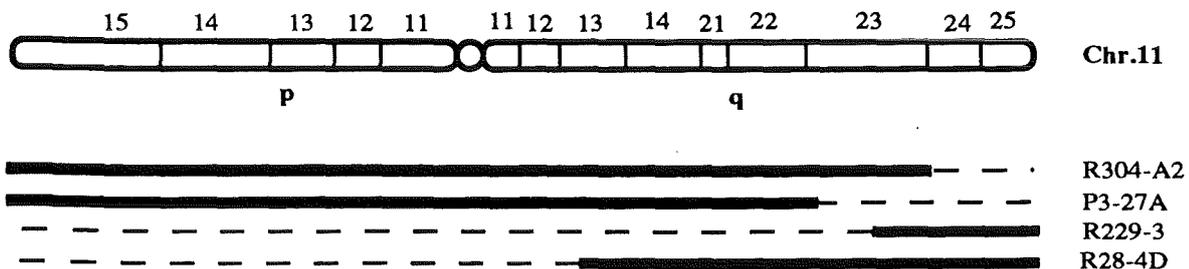


Abb.25: Schematische Darstellung der Anteile menschlicher DNA von Chromosom 11 in den Hybridzelllinien (in Anlehnung an Tanigami, et al., 1992)

Durchgehende fette Balken repräsentieren die DNA-Anteile des menschlichen Chromosoms 11, die in den entsprechenden Hybridzelllinien enthalten sind. Die mit Nummern gekennzeichneten Chromosomenbänder sind maßstabsgetreu dargestellt.

- R304-A2, P3-27A,
- 229-3, R28-4D: Hamster-Hybridzelllinien, die als einzige menschliche DNA Anteile des Chromosoms 11 enthalten (von Dr. C. Jones zur Verfügung gestellt)

Über den Vergleich der in den Hybridzelllinien enthaltenen Chromosom 11-Anteile (siehe Schema der Abbildung 25) wird deutlich, daß die AT360-Sequenz auf dem kurzen Arm oder dem langen Arm im Bereich vom Zentromer bis zur Bande 13 liegen muß.

Dieser Befund bestätigt die Lokalisation des AT360-Fragments auf Chromosom 11; die für die AT-Gene postulierte chromosomale Region 11q22-23 scheidet für das AT360-Fragment in diesem Experiment jedoch aus.

6.8. Expression des AT500-Fragments

Die im Abschnitt 6.6. beschriebene Sequenzanalyse des AT500-Fragments gab keinen zwingenden Hinweis auf die Frage, ob das klonierte Fragment Bestandteil einer cDNA bzw. exprimierten RNA ist. Daher wurde durch Hybridisierungen von gelelektrophoretisch aufgetrennter und immobilisierter mRNA, sowie der sensitiveren Methode der PCR-Analysen revers transkribierter mRNA, die Expression des klonierten Fragments untersucht. Die Größe einer hybridisierenden, homologen mRNA sollte klären, ob die AT500-cDNA Bestandteil einer größeren mRNA ist.

6.8.1. Aus der cDNA menschlicher Zelllinien ist das AT360-Fragment in PCR-Analysen amplifizierbar

Aus poly-(A)⁺-mRNA unterschiedlicher menschlicher Zelllinien wurde mit dem Enzym Reverse Transkriptase des Avian Myeloblastosis Virus (AMV), ausgehend von poly(dT)-Oligomeren, die an den terminalen poly(A)-Enden der mRNA hybridisieren, der Gegenstrang synthetisiert. Dieser cDNA-Strang diente als Matrize für die Amplifikation des AT360-Fragments. In Abbildung 26 A ist zu sehen, daß aus der mRNA aller untersuchten menschlichen Zelllinien nach cDNA-Synthese das AT360-Fragment amplifiziert werden konnte.

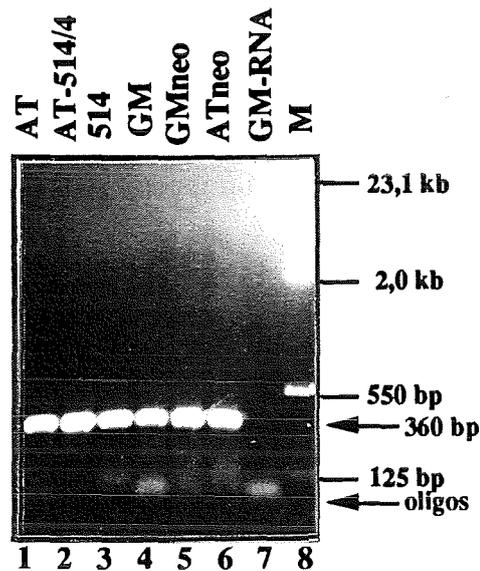


Abb.26 A: Gelelektrophoretische Auftrennung des AT360-Fragments nach Amplifikation aus cDNA, die durch reverse Transkription aus mRNA verschiedener Zelllinien erhalten wurde

Nach reverser Transkription von poly(A)⁺-RNA aus unterschiedlichen Zellen wurde je 1 µg cDNA als Matrize eingesetzt und mit den Oligonukleotiden AT85 und AT451 das 360 bp-Fragment des klonierten AT500-Fragments amplifiziert.

Die Dauer und Temperatur der 30 Reaktionszyklen waren: 1 min bei 94°C; 1 min bei 65°C; 1 min bei 72°C. Ein Viertel des PCR-Ansatzes wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

- AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia
- AT-514/4: Stabil G418-resistenter Zellklon, der nach Transfektion genomischer DNA aus 514-Zellen in AT-Zellen entstand.
- 514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlenresistenten Phänotyp zeigt
- GM: GM637; normale, menschliche Fibroblasten (SV40-immortalisiert)
- GMneo: Mischung individueller, G418-resistenter GM637-Zellen, die nach stabiler Transfektion mit pSV2neo entstanden
- ATneo: Mischung individueller, G418-resistenter AT5BIVA-Klone, die nach stabiler Transfektion mit pSV2neo entstanden
- GM-RNA: Es wurde nicht cDNA, sondern 1 µg poly(A)⁺-mRNA aus GM637-Zellen als Matrize eingesetzt
- M: Größenmarker (λHindIII)
- oligos: Nicht verbrauchte Oligonukleotide (Primer)

In identisch transkribierten cDNAs aus der mRNA von Rinder-, Maus- und Rattenzellen konnte auf analoge Weise mit den für AT360 spezifischen Primern kein Produkt mit der PCR amplifiziert werden (Abb. 26 B). Als Kontrolle für die Enzymaktivität der Reversen Transkriptase und der Neusynthese einer cDNA wurden in einem parallelen Ansatz mit Maus-mRNA radioaktive Nukleotide zugesetzt. Der Einbau radioaktiver dCTPs in die neue cDNA wurde nach Abtrennung der nicht inkorporierten Nukleotide mit Sephadex G50 und Cerenkov-Messung der inkorporierten Radioaktivität bestätigt.

In Kontrollansätzen, die anstelle der revers transkribierten cDNA 1 µg poly-(A)⁺-mRNA als Matrize enthielten, traten keine Amplifikationsprodukte auf. Dies zeigt, daß keine DNA-

Verunreinigungen in der mRNA vorhanden waren, die als Matrize hätten dienen und amplifiziert werden können.

Zusammenfassend machen diese Analysen deutlich, daß in menschlichen Zellen eine mRNA transkribiert wird, die zu AT500 homologe Bereiche enthält. Diese Bereiche können nach cDNA-Synthese mit den spezifischen Primern für das AT360-Fragment amplifiziert werden. Die mRNA tritt in normalen GM637-Zellen, 514- und AT-Zellen auf.

In Zellen anderer Organismen (Maus, Ratte) konnte die AT360-spezifische mRNA nicht nachgewiesen werden.

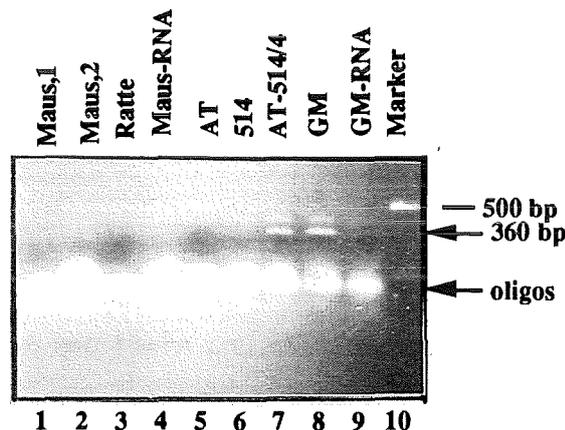


Abb.26 B: Gelelektrophoretische Auftrennung des AT360-Fragments nach Amplifikation aus cDNA, die durch reverse Transkription aus mRNA verschiedener Spezies erhalten wurde

Nach reverser Transkription von poly(A)⁺-RNA aus unterschiedlichen Zellen wurde je 1 µg cDNA als Matrize eingesetzt und mit den Oligonukleotiden AT85 und AT451 das 360 bp-Fragment des klonierten AT500-Fragments amplifiziert.

Die Dauer und Temperatur der 30 Reaktionszyklen waren: 1 min bei 94°C; 1 min bei 65°C; 1 min bei 72°C. Ein Viertel des PCR-Ansatzes wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

- Maus 1: mRNA aus E14-Mauszellen (embryonale Maus-Stammzellen)
- Maus 2: mRNA aus kultivierten MX21-Mauszellen
- Ratte: Rattenzellen (Bsp37-AS)
- Maus-RNA: Es wurde nicht cDNA, sondern 1 µg poly(A)⁺-mRNA als Matrize eingesetzt
- AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia
- 514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlenresistenten Phänotyp zeigt
- AT-514/4: Stabil G418-resistenter Zellklon, der nach Transfektion genomischer DNA aus 514-Zellen in AT-Zellen entstand.
- GM: GM637; normale menschliche Fibroblasten (SV40-immortalisiert)
- GM-RNA: Es wurde nicht cDNA, sondern 1 µg poly(A)⁺-mRNA als Matrize eingesetzt
- Marker: Größenmarker (λ/HindIII)

6.8.2. Das klonierte Fragment erkennt in Hybridisierungen mit mRNA aus GM637-Zellen zwei große mRNA-Spezies

Poly-(A)⁺-mRNA aus GM637-Zellen wurde isoliert, in einem 1,4%igen Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und auf einer Nylon-Membran immobilisiert. Die RNA auf der Membran wurde mit der AT500-cDNA hybridisiert und bis 0,5xSSC gewaschen. Nach einem Tag Exposition des Films konnten 2 Banden identifiziert werden, die knapp über der Bande der 28S-RNA (etwa 6 kb) liegen (Abb.27).

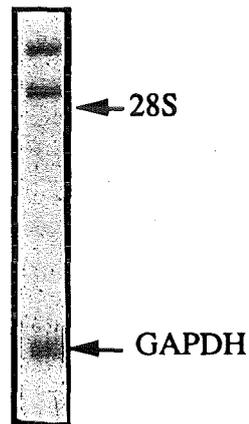


Abb.27: Autoradiogramm gelelektrophoretisch aufgetrennter poly(A)⁺-mRNA aus GM637-Zellen nach Hybridisierung mit dem AT500-Fragment.

Poly(A)⁺-mRNA aus GM637-Zellen wurde isoliert und nach Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen in einem Agarosegel auf eine Nylon-Membran übertragen. Nach der Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten AT500-Sonde wurde bis 0,5xSSC gewaschen und die Autoradiographie durchgeführt. In einer nachfolgenden Kontroll-Hybridisierung wurde eine radioaktiv markierte GAPDH-Sonde auf identische Weise verwendet. Dargestellt sind die beiden AT500-Banden oberhalb der 28S-RNA sowie die Bande der GAPDH-mRNA.

Die in dieser Arbeit klonierte AT500-cDNA scheint also nur einen kleinen Teil von 2 großen mRNAs darzustellen.

7. Isolierung von Cosmiden, die mit AT500 hybridisieren und nach der Transfektion in AT-Zellen erhöhte Strahlenresistenz vermitteln

Die geschilderten Untersuchungen der vorhergehenden Kapitel zeigten folgende wichtige Eigenschaften des aus der partiell strahlenresistenten Zelllinie 514 klonierten AT500-Fragments:

1. Die AT500-cDNA ist nur in menschlichen Zellen vorhanden und ist auf Chromosom 11 lokalisiert. Nach Hybridisierung mit AT500 traten keine homologen Sequenzen in der DNA aus Mauszellen auf.
2. In der genomischen DNA des partiell strahlenresistenten Klons 514, nicht aber der strahlensensitiven sekundären Transfektanten AT-514/2 und AT-514/4 konnten nach Hybridisierung mit dem AT360-Fragment zusätzliche, transfizierte Banden zu den endogenen Sequenzen entdeckt werden. Die Größe der in die 514-Zellen transfizierten, vollständigen AT500-cDNA ist jedoch unbekannt.
3. Die von der AT500-Sequenz abgeleitete RNA wird in den untersuchten menschlichen Zellen als Bestandteil von zwei großen mRNAs konstitutiv exprimiert.

Spielt die mit der AT500-cDNA hybridisierende mRNA, bzw. das davon abgeleitete Protein eine Rolle bei der Entstehung des partiell strahlenresistenten Klons 514? Um diese Frage zu beantworten, wurden in einer menschlichen Cosmidbibliothek Cosmidklone gesucht, die mit AT500 hybridisieren. Sollten Cosmidklone, die ein Gen tragen, welches mit AT500 hybridisiert, den AT-Phänotyp komplementieren, dann wäre die Erhöhung der Strahlenresistenz in 514-Zellen durch das der AT500-cDNA zugrunde liegende Gen erklärbar.

7.1. Absuchen einer Cosmidbibliothek nach Klonen, die mit AT500 hybridisieren

In einer Cosmidbibliothek (Stratagene, LaJolla, USA) mit genomischer DNA aus menschlichen Zellen wurden Klone gesucht, die mit dem AT500-Fragment hybridisieren. In die Cosmid-Vektoren dieser Klone sind Fragmente menschlicher, genomischer DNA mit einer Größe von 30-45 kb inseriert. Die genomische DNA war nach Partialverdau mit MboI in die BamHI-geschnittenen Vektoren kloniert worden. Die Anzahl der primären Cosmidklone betrug $1,4 \times 10^6$. Der Cosmidvektor selbst ist 8,1 kb groß und trägt ein Neomycin-Resistenzgen.

Zur Identifizierung positiver Klone wurde in einer PCR das 360 bp-Fragment amplifiziert, dabei gleichzeitig radioaktiv markiert und als Sonde in die Koloniehybridisierung eingesetzt. Es wurden aus etwa 2×10^6 ausplattierten, individuellen Klonen der Bibliothek 4 positive Cosmidklone isoliert. Nach Präparation der Cosmid-DNA wurde diese jeweils mit den Enzymen EcoRI und NotI geschnitten, deren Erkennungsstellen die Klonierungsstelle flankieren und somit die Insertionen ausschneiden. Aufgrund der unterschiedlichen Bandenmuster nach Verdau mit den angegebenen Enzymen und gelelektrophoretischer

Auftrennung wird ersichtlich, daß die Klone unterschiedliche Insertionen menschlicher genomischer DNA tragen (Abb.28). Nach Immobilisieren der DNA und Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten AT360-Fragment traten spezifische Banden der menschlichen DNA auf, die mit der Sonde hybridisieren (hier nicht gezeigt).

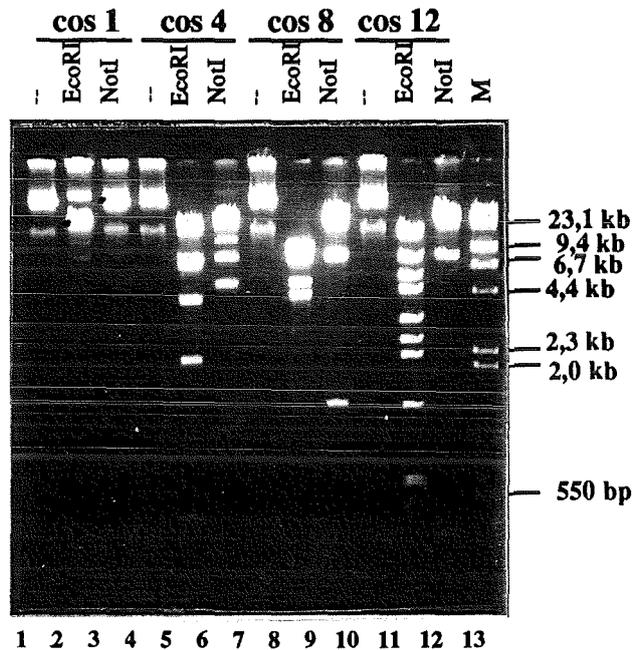


Abb.28: Gelelektrophoretische Auftrennung der 4 Cosmidklone nach Verdau mit verschiedenen Enzymen

Die Cosmidklone cos1, cos4, cos8 und cos12 waren nach Hybridisierung einer Cosmidbibliothek mit dem AT360-Fragment isoliert worden. Je 1 µg DNA wurde mit den angegebenen Enzymen verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mit den Enzymen EcoRI und NotI wird die inserierte, genomische DNA aus menschlichen Zellen aus dem pWE15-Vektor ausgeschnitten.

--: Unverdaute Cosmid-DNA

M: Größenmarker (λ/HindIII)

7.2. Stabile Transfektion der Cosmide und Strahlenselektion

Die 4 Cosmide wurden einzeln in AT-Zellen transfiziert und mit Hilfe des Neomycin-Resistenzgens, das integriert in dem Vektor pWE15 vorliegt, stabile Transfektanten selektiert. Hierbei war zu bedenken, daß bei zufallsgemäßigem Öffnen der transfizierten DNA während der Integration in das zelluläre Genom der Anteil unterbrochener Sequenzen der klonierten, menschlichen DNA recht groß sein kann. Statistisch betrachtet, sollten in den transfizierten Cosmiden etwa 4/5 der Bruchstellen innerhalb der klonierten menschlichen DNA (Größe: 30-45 kb) und 1/5 im Cosmidvektor selbst (Größe: 8,1 kb) liegen. (Das Neomycin-Resistenzgen ist in dieser Kalkulation nicht berücksichtigt; es mußte intakt sein, da auf G418-Resistenz selektiert wurde.) Aus diesem Grunde sind bei 4/5 der stabilen Transfektanten auch keine phänotypische Veränderung zu erwarten.

Daher wurden die stabilen Transfektanten jedes Cosmids (etwa 1×10^4 G418-resistente Kolonien in jeder Transfektion) vereinigt und als Gesamtpopulation in Strahlenselektionen eingesetzt (Abb.29). Nach der ersten Strahlenselektion, in welcher Transfektanten mit unterbrochenen Sequenzen der klonierten, menschlichen DNA nicht überleben sollten, wurden die überlebenden Zellen erneut in weitere Strahlenselektionen eingesetzt. Theoretisch sollte also nach der ersten Strahlenselektion eine Anreicherung resistenter Zellen zu erwarten sein, falls die in den Cosmiden klonierten menschlichen Sequenzen tatsächlich Strahlenresistenz vermitteln.

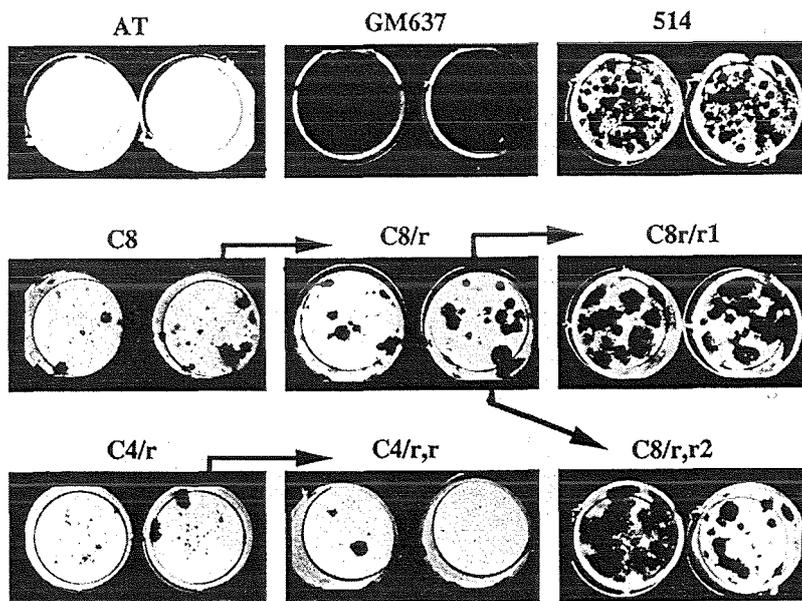


Abb.29: Überlebende Kolonien einer Strahlenselektion mit AT-Zellen, die stabil mit dem Cosmid 4, bzw. Cosmid 8 transfiziert worden sind

Pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte wurden 5×10^4 Zellen eingesät, nach 4 bis 6 Stunden mit 0,6 Gy Röntgen bestrahlt und im 24-Stunden-Rhythmus die Bestrahlung 14 mal wiederholt. 12 Tage nach der Bestrahlungsperiode wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa/Kristallviolett blau angefärbt. Dargestellt sind die gefärbten Zellen aus einer von 4 parallel bestrahlten 24-Loch-Platten, mit je zwei Ansätzen pro Zelllinie. Die parallel bestrahlten 24-Loch-Platten lieferten identische Ergebnisse.

- Überlebende Kolonien aus einer Selektion wurden isoliert und expandiert und 5×10^4 Zellen dieser Population erneut in Strahlenselektionen getestet
- AT: AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia
 - GM637: Normale menschliche Fibroblasten (SV40-immortalisiert)
 - 514: AT5BIVA-Zellklon, der nach stabiler Transfektion mit cDNA einen partiell strahlenresistenten Phänotyp zeigt
 - C4, C8: Gesamtheit der unabhängigen AT-Klone, die stabil mit Cosmid 4, bzw. Cosmid 8 transfiziert worden waren

Die erste Selektion der primären Cosmid-Transfektanten erbrachte in jeder Transfektanten-Population zwischen 2 und 5 überlebende Klone pro Vertiefung der 24-Loch-Platten. Die überlebenden Klone der parallelen Ansätze wurden jeweils als Mischung weiterkultiviert und erneuten Strahlenselektionen ausgesetzt. Nur in der mit Cosmid 8 (C8) transfizierten

Population traten auch nach der zweiten Selektion erneut überlebende Klone auf (C8/r). Es waren in diesen Ansätzen zwischen 5 und 10 überlebende Kolonien pro Ansatz gewachsen. Die Anzahl dieser Klone war also im Vergleich zu der Anzahl von Klonen nach der ersten Selektion deutlich erhöht. Die Anreicherung resistenter Zellen nach der ersten Selektion hat demnach stattgefunden. Nach einer 3. Selektion der Zellen, die aus überlebenden Kolonien der zweiten Selektion gewachsen waren (C8/r,r1 und C8/r,r2), zeigte sich, daß der strahlenresistente Phänotyp der Cosmidtransfektanten noch nicht stabil war: Auch hier überlebten mehr Kolonien als zuvor (10 bis 20 Kolonien pro Ansatz), es fand also noch eine weitere Anreicherung resistenter Zellen statt. In Abbildung 29 sind die Selektionsexperimente der mit Cosmid 8 und Cosmid 4 transfizierten AT-Populationen dargestellt. Cosmid 4 repräsentiert hier einen Cosmidklon, der nach Transfektion in AT-Zellen ebenso wie die Cosmide 1 und 12 keine Resistenz in Strahlenselektionen vermittelt.

7.3. Überlebenskurven der Cosmid-Transfektanten, die zwei Strahlenselektionen überlebt haben

Die Population der C8/r,r-Zellen erwies sich in Strahlenselektionen als deutlich resistenter, verglichen mit AT-Kontrollzellen und AT-Zellen, die mit anderen Cosmiden transfiziert worden waren. Es stellte sich nun die Frage, ob auch in Dosis-Effekt-Experimenten diese Resistenz auftritt. Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, sind die C8/r,r-Zellen über den gesamten getesteten Dosisbereich resistenter als AT-Zellen.

Die erhöhte Resistenz der mit Cosmid 8 transfizierten AT-Zellen ist also sowohl in der Strahlenselektion als auch in Dosis-Effekt-Experimenten zu erkennen. Da der Cosmidklon aufgrund der Hybridisierung mit der AT500-Sequenz isoliert wurde, ist wiederum eine Korrelation der AT500-Sequenz mit einer erhöhten Strahlenresistenz gegeben.

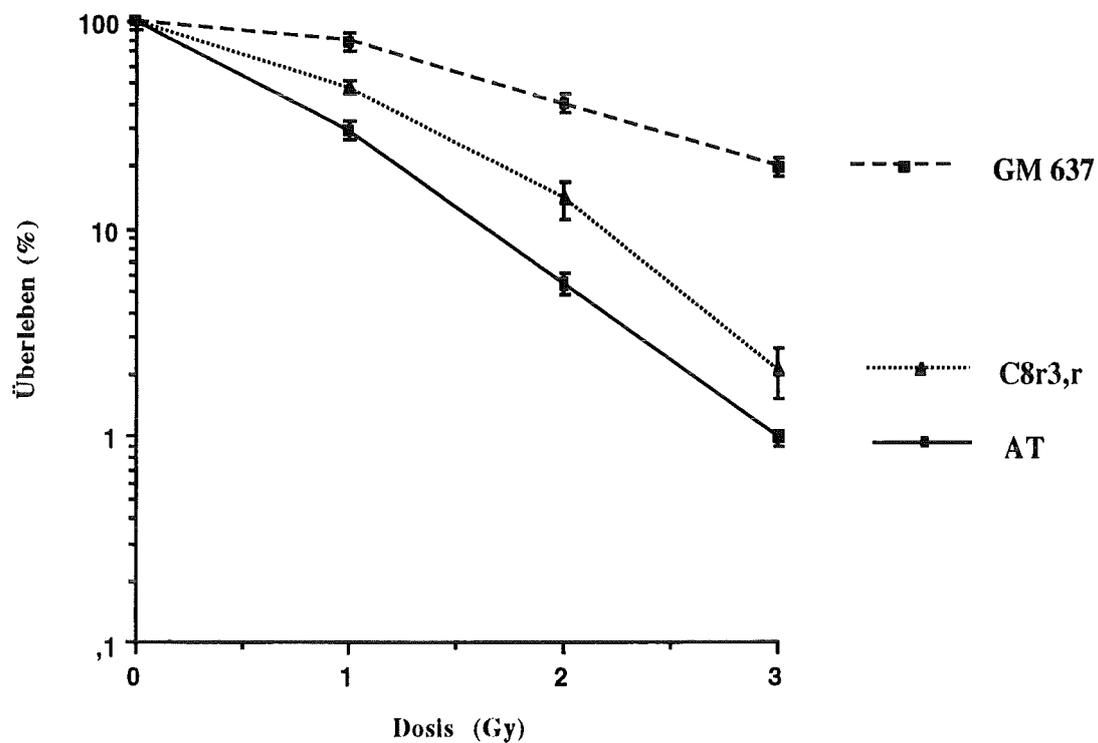


Abb.30: Überlebenskurven der mit Cosmid 8 transfizierten und in Strahlenselektionen selektionierten Transfektanten-Population im Vergleich mit AT- und GM637-Überlebenskurven:

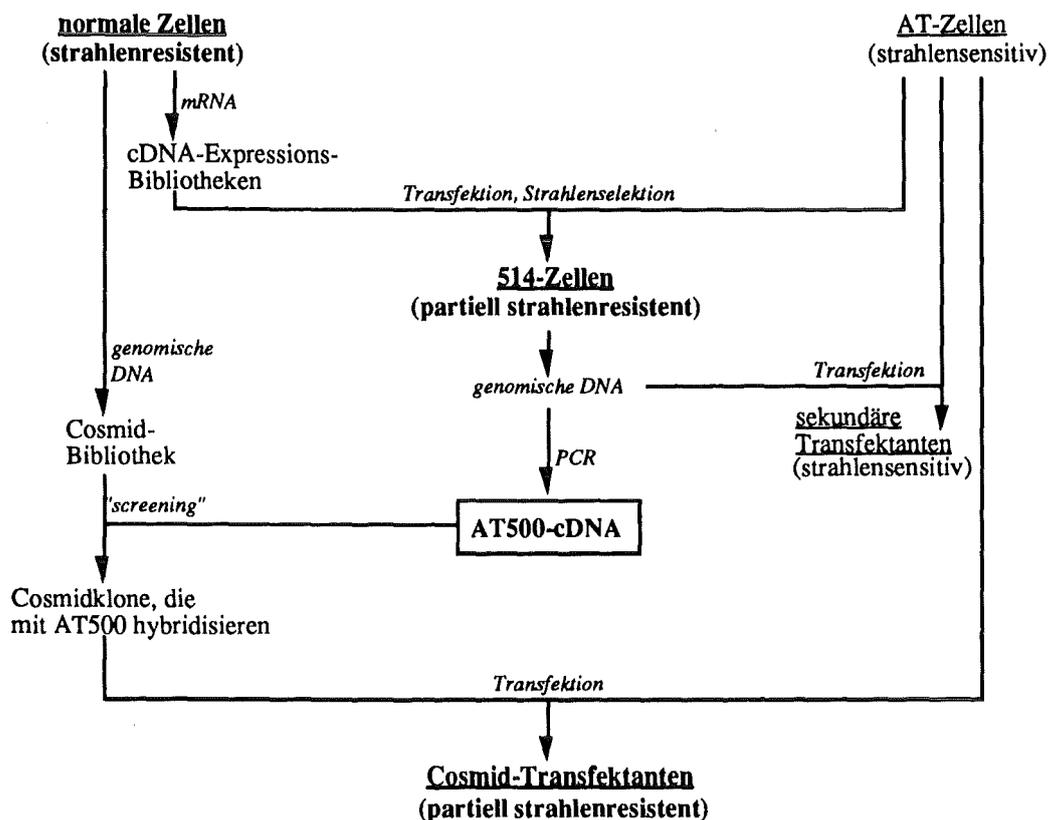
Die Zellen jedes Klons wurden mit den angegebenen Dosen Röntgenstrahlen behandelt und in 2 bis 3 parallelen Ansätzen zur Koloniebildung ausgesät. Nach 12 Tagen wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa/Kristallviolett blau angefärbt, die Zahl der gewachsenen Kolonien bestimmt und im Verhältnis zur unbestrahlten Kontrolle das Überleben errechnet. Die Kurven stellen die Mittelwerte aus 3 Experimenten dar. Die errechneten Standardabweichungen sind als Fehlerbalken eingetragen.

- AT : AT5BIVA; SV40-immortalisierte, fibroblastische Zellen aus einem Patienten mit der Erbkrankheit Ataxia telangiectasia
- GM637: Normale menschliche Fibroblasten (SV40-immortalisiert)
- C8r3,r: AT-Zellen, die stabil mit Cosmid 8 transfiziert und als überlebende Kolonien von 2 aufeinander folgenden Strahlenselektionen isoliert worden waren.

Diskussion

Ataxia telangiectasia (AT) ist eine seltene, rezessive Erbkrankheit des Menschen, die sich unter anderem in der Überempfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen äußert. AT-Patienten, also homozygote Träger des unbekanntes, defekten Gens, leiden außerdem an Entwicklungsstörungen der Haut, des Kleinhirns und des Immunsystems. In kultivierten Zellen von AT-Patienten wird die Strahlenüberempfindlichkeit anhand des verringerten Überlebens deutlich. Zwei weitere zelluläre Charakteristika sind die schwache Hemmung der DNA-Synthese sowie die fehlende Blockierung der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus nach Bestrahlung. Die Bemühungen, den zellulären AT-Phänotyp durch Gen-Transfer zu komplementieren, waren bisher nur durch Übertragen des Chromosoms 11 oder Fragmenten dieses Chromosoms eindeutig erfolgreich. Diese Experimente bestätigten gleichzeitig die aufgrund von Kopplungsanalysen postulierte Lokalisation des AT-Defekts auf dem Chromosom 11, Bande q22-23.

Nach Transfer einer cDNA-Bibliothek in AT-Zellen (AT5BIVA, Komplementationsgruppe D), sekundären Transfektionen, Isolieren eines transfizierten cDNA-Fragments und Transfektion homologer Cosmidklone konnte in der vorliegenden Arbeit eine menschliche DNA-Sequenz des Chromosoms 11 charakterisiert werden, die AT-Zellen partielle Strahlenresistenz verleiht. Das nachfolgende Schema dokumentiert den Ursprung der DNA-Sequenz und der transgenen Zelllinien, die in dieser Arbeit hergestellt und verwendet wurden.



Phänotypische Eigenschaften der 514-Zellen

514-Zellen zeigen in Dosis-Effekt-Experimenten und in Strahlenselektionen stabil einen partiell strahlenresistenten Phänotyp. In umfangreichen Kontrollen mit nicht transfizierten und pSV2neo-transfizierten AT-Zellen war kein erhöht strahlenresistenter Zellklon selektioniert worden.

Die Analyse der Verteilung der Zellzyklusphasen in 514-Zellen verdeutlicht, daß dieses Merkmal in unbestrahlten 514-Zellen vollständig, in bestrahlten 514-Zellen teilweise komplementiert ist: Die für die unbestrahlten AT-Zellen typische, verlängerte S-Phase ist in 514-Zellen auf das Niveau normaler Zellen reduziert. Nach Bestrahlung der Zellen wird deutlich, daß 514-Zellen, im Unterschied zu AT-Zellen, eine Verzögerung in der G1-Phase erfahren. Damit sind 514-Zellen normalen Zellen ähnlich, so wie auch im schnelleren und vollständigen Auslaufen der G2-Phase-Zellen nach der Bestrahlung, verglichen mit AT-Zellen.

Die dritte charakteristische Eigenschaft der AT-Zellen, die nur schwach hemmbare DNA-Synthese nach Bestrahlung, ist in 514-Zellen nicht in Richtung normaler Zellen korrigiert, sondern zeigt den umgekehrten Effekt: 514-Zellen sind noch weniger durch Bestrahlung in der DNA-Synthese hemmbar, als AT-Zellen. Dieser Befund ist insofern überraschend, als er von anderen Arbeitsgruppen, die die Strahlensensitivität von AT-Zellen partiell komplementieren konnten, nicht beobachtet wurde. Andererseits konnte dieses AT-Merkmal auch von keiner anderen Arbeitsgruppen zusammen mit der Strahlenüberempfindlichkeit der Zellen durch Transfer von DNA-Bibliotheken korrigiert werden (Lehmann et al., 1986; Kapp und Painter, 1989).

Diese Tatsache deutet darauf hin, daß die fehlende Hemmung der DNA-Synthese nach Bestrahlung nicht mit der zellulären Sensitivität gegenüber Bestrahlung korreliert. Als Konsequenz sind 2 verschiedene Gene zu fordern, die den primären AT-Defekt jedes Patienten ausmachen, aufgrund der Kopplungsanalysen aber eng benachbart sein sollten. Dabei würde je ein defektes Gen die Strahlensensitivität, das andere die nicht hemmbare DNA-Synthese bedingen. Die Existenz zweier verschiedener, aber eng benachbarter mutierter Gene in jeder AT-Zelllinie würde erklären, warum die gleichzeitige Komplementation der verschiedenen AT-Phänotypen zwar nach Transfer von Chromosomen oder Chromosomenfragmenten (Lambert et al., 1991), nicht aber durch einzelne DNA-Klone wie Cosmide oder genomische Klone geglückt ist.

Zusammenfassend macht der phänotypische Vergleich deutlich, daß 514-Zellen in 2 von 3 möglichen, nach Bestrahlung auftretenden zellulären Charakteristika der AT-Zellen partiell komplementiert sind. Die 3. Eigenschaft, die DNA-Syntheserate nach Bestrahlung ist erstaunlicherweise noch stärker in Richtung des defekten AT-Phänotyps verändert. Diese Befunde verdeutlichen, daß es sich bei den 514-Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um spontane Revertanten der AT-Zellen handelt, und unterstützen die in Kapitel 1 der Ergebnisse gezeigten Kontrollexperimente der Transfektion und Strahlenselektion. Gleichzeitig kann

gefolgert werden, daß in 514-Zellen nicht die vollständige genetische Information, die in den hier verwendeten AT-Zellen defekt ist, durch die cDNA-Transfektion eingebracht wurde.

Molekulargenetische Analyse des Zellklons 514

Nach Hybridisierung mit einer Sonde für das Neomycin-Resistenzgen wurden zwei unterschiedlich integrierte cDNA-Vektoren entdeckt. Dadurch wurde bestätigt, daß nur wenige cDNAs durch die hier verwendete Transfektionsmethode stabil eingebaut wurden. Die Analyse der Fragmentlängen zeigte, daß bei der Integration in das zelluläre Genom eine der cDNAs von dem Neomycin-Resistenzgen entkoppelt wurde.

Die Amplifikation der transfizierten cDNAs unter Verwendung vektorspezifischer Primer lieferte 4 Produkte aus der genomischen DNA von 514-Zellen. Daraus folgt, daß die Analyse der Kopienzahl nach der Hybridisierung mit der Sonde für das Neomycin-Resistenzgen nicht korrekt war, oder daß tatsächlich nur 2 Kopien des Neomycin-Resistenzgens, aber 4 amplifizierbare cDNAs im Genom der 514-Zellen vorhanden sind. Da transfizierte DNA-Sequenzen ohne entsprechenden Selektionsdruck wieder aus dem Genom eliminiert werden können (Mayne et al., 1988; Dean et al., 1989), ist es möglich, daß ursprünglich transfizierte Neomycin-Resistenzgene verloren gingen, da prinzipiell eine Kopie zur Vermittlung der Resistenz gegenüber G418 ausreicht.

Mit experimentellen Standardmethoden konnte, trotz mehrerer Versuche, nur das 500 bp große Amplifikationsprodukt der 514-DNA (AT500) kloniert werden. Mit Hilfe interner Primer war ein Subfragment (AT360) der AT500-Sequenz amplifizierbar. In den mit AT360 hybridisierten, nach Restriktionsverdau gelelektrophoretisch aufgetrennten DNAs menschlicher Zelllinien trat jeweils eine spezifische Bande auf, die auf endogene AT500-Sequenzen zurückzuführen ist. In der DNA aus 514-Zellen konnte eine zusätzliche Bande identifiziert werden, die auf die transfizierte cDNA zurückzuführen sein sollte.

Sekundäre Transfektanten sind nicht strahlenresistenter als AT-Zellen

Die sekundären Transfektanten (AT514/2 und AT-514/4) sind nach Transfektion genomischer DNA aus 514-Zellen in AT-Zellen entstanden. Um zu testen, ob mit dem Neomycin-Resistenzgen gleichzeitig die, für die erhöhte Strahlenresistenz der 514-Zellen verantwortliche cDNA aufgenommen wurde, wurde die Strahlensensitivität der sekundären Transfektanten getestet. Sowohl in Dosis-Effekt-Experimenten, als auch in Strahlenselektionen waren beide sekundären Transfektantenklone nicht strahlenresistenter als AT-Zellen.

Die genomische Analyse der beiden Klone bestätigte die Integration eines Neomycin-Resistenzgens aus der genomischen DNA von 514-Zellen. Es wurden jedoch keine zusätzlichen, transfizierten AT500-Sequenzen entdeckt. Dies kann durch die gezeigte Entkopplung einer cDNA von dem Neomycin-Resistenzgen in der DNA aus 514-Zellen bedingt sein. Die fehlende Erhöhung der Strahlenresistenz der sekundären Transfektanten ist somit erklärbar. Das Konzept der sekundären Transfektion konnte also in dieser Arbeit, wie auch in

früheren Berichten (Lehmann et al., 1986; Kapp und Painter, 1989), nicht zur erneuten Übertragung der Strahlenresistenz in AT-Zellen und damit der Klonierung der dafür verantwortlichen DNA beitragen.

Ein Cosmid mit menschlicher, genomischer DNA, die homolog zu AT500 ist, vermittelt nach Transfektion Strahlenresistenz in AT-Zellen

Die Cosmidtransfektanten gehen auf 4 individuelle Cosmidklone zurück. Diese waren aufgrund der Hybridisierung mit der AT360-Sonde aus einer Cosmidbibliothek isoliert worden, deren Klone jeweils 30-45 kb menschliche genomische DNA aus normalen Zellen enthalten. Nach Transfer in AT-Zellen konnten stabile Transfektanten durch das im Vektor integrierte Neomycin-Resistenzgen selektioniert werden. Da die hochmolekulare DNA bei der stabilen Integration in das zelluläre Genom oft rearrangiert wird, sind phänotypische Veränderungen nur in wenigen, einzeln isolierten Transfektantenklonen oder nach Vorselektion der gesamten Transfektanten-Population zu erwarten. Kapp und Mitarbeiter (1992) hatten nach Transfektion eines Cosmids, welches das putative AT-D-Gen enthält, in 3 von 50 individuellen Transfektantenklonen eine schwach erhöhte Strahlenresistenz finden können. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Transfektanten-Populationen der 4 verschiedenen Cosmide in zwei aufeinander folgenden Strahlenselektionen auf ihre Strahlenresistenz getestet. In der mit dem Cosmid 8 transfizierten Population wurde deutlich, daß nach jeder Selektion die Anzahl der überlebenden Klone stieg, bedingt durch eine Anreicherung strahlenresistenter Cosmid-Transfektanten. AT-Zellen, die mit anderen Cosmiden transfiziert worden waren, zeigten in den aufeinander folgenden Strahlenselektionen keine Erhöhung der Strahlenresistenz. Die nach der 2. Strahlenselektion überlebende Population der Cosmid 8-Transfektanten erwies sich auch in Dosis-Effekt-Experimenten als deutlich strahlenresistenter, als nicht transfizierte und mit anderen Cosmiden transfizierte AT-Zellen.

Die Möglichkeit, daß das Cosmid 8 unabhängig von der Hybridisierung mit der AT500-DNA "zufällig" die Strahlenresistenz in AT-Zellen erhöht, kann nahezu ausgeschlossen werden: Nach Transfektion kompletter Cosmid-Bibliotheken mit Insertionen menschlicher genomischer DNA in AT5BIVA-Zellen konnten Kapp und Painter (1989) lediglich einen stabil strahlenresistenten Zellklon isolieren. Die erhöhte Resistenz dieses Cosmids war, im Vergleich zu normalen Zellen, ebenfalls nur partieller Natur. Dies zeigt eindeutig, daß die komplementierende Eigenschaft von Cosmid 8 auf seine Sequenzhomologie zur AT500-cDNA zurückzuführen ist.

Charakterisierung der klonierten AT500-cDNA

1) Homologien zu DNA anderer Spezies:

Mit Hilfe interner Primer war ein Subfragment (AT360) der AT500-Sequenz aus allen getesteten menschlichen genomischen DNAs, nicht aber aus der DNA anderer Spezies (Nager, Frosch, Hefe) amplifizierbar. Auch Hybridisierungen von Maus- und Hamster-DNA erbrachten bei mittlerer Stringenz keinerlei Kreuzhybridisierungen mit der AT500-cDNA. Somit konnte

gezeigt werden, daß die Sequenz spezifisch menschlichen Ursprungs, und zwischen Mensch und Maus nur schwach konserviert ist.

Die Hybridisierung der DNA aus Mensch-Nager-Hybridzelllinien mit unterschiedlicher Verteilung menschlicher Chromosomen erbrachte bei mittlerer Stringenz starke Hybridisierungssignale mit AT500 in den DNAs aller Hybridzelllinien. Homologe DNA-Sequenzen scheinen also innerhalb des menschlichen Genoms auf mehreren verschiedenen Chromosomen vorzukommen. Die Tatsache, daß nach Verdau mit 3 verschiedenen Enzymen jeweils eine definierte Einzelbande nach stringenter Hybridisierung mit AT500 auftritt, spricht jedoch eindeutig gegen eine repetitive Sequenz!

2) Chromosomale Lokalisierung:

Die Auswertung der Hybridisierung der Mensch-Nager-Hybridzelllinien ließ eine mögliche Lokalisierung der AT500-DNA auf dem menschlichen Chromosom 11 zu. Daher wurden mit der DNA aus Mensch-Maus-Hybridzelllinien, die als einzige menschliche DNA verschiedene Anteile des Chromosoms 11 enthalten, PCR-Analysen durchgeführt, die die Anwesenheit der gesuchten Sequenz in der zellulären DNA zeigen sollten. Die Ergebnisse dieser Analysen bestätigten die Anwesenheit der AT500-Sequenz auf Chromosom 11 und deuten auf eine Lokalisierung des Fragments auf dem kurzen Arm oder dem langen Arm zwischen Zentromer und Bande 13. Hierbei gehen jedoch negative PCR-Ergebnisse, also das Fehlen des Amplifikationsprodukts aus einer Zelllinie, in die Interpretation mit ein. Betrachtet man nur die von der Aussagekraft stärkeren, positiven Aussagen der PCR-Analysen, so kann der in Frage kommende Bereich bis zu der Bande 23 des langen Arms reichen. Damit würde sich der Bereich mit dem, aufgrund von Kopplungsanalysen postulierten Locus des AT-D-Gens (11q22-23, Komplementationsgruppe D) überschneiden. Letztlich wird nur eine In-Situ-Hybridisierung gespreiteter Metaphase-Chromosomen oder die Cosegregation von bekannten Markergenen die chromosomale Lokalisierung der AT500-cDNA zuverlässig bestimmen können.

3) Ist das klonierte Fragment Bestandteil einer in menschlichen Zellen vorkommenden RNA?

In revers transkribierten cDNAs aus der mRNA menschlicher Zellen konnte mit PCR-Analysen das interne 360 bp-Fragment der AT500-Sequenz nachgewiesen werden. Die Sequenz war wiederum in allen getesteten menschlichen Zellen, nicht aber in Zellen anderer Spezies als Bestandteil von mRNAs vorhanden.

Die Hybridisierung gelelektrophoretisch aufgetrennter poly(A)⁺-mRNAs aus normalen GM637-Zellen zeigte, daß zwei große mRNA-Spezies dieser Zellen (>6 kb) das AT500-Fragment oder zumindest eine sehr stark homologe Sequenz enthalten. Die AT500-Sequenz repräsentiert also höchstwahrscheinlich einen kleinen Bestandteil von zwei sehr viel größeren mRNAs. Hier stellt sich die Frage, ob ein so kleiner Anteil einer mRNA, wie sie die AT500-cDNA darstellt, in der Zelle phänotypische Veränderungen hervorrufen kann. Da in mehreren Arbeitsgruppen die biologische Aktivität verkürzter Proteine berichtet wurde (Pierre und Laval, 1981; Angel et al., 1989), ist die Resistenzvermittlung durch die AT500-cDNA in 514-Zellen

durchaus möglich. Eine unvollständige, transfizierte cDNA könnte außerdem die zwar signifikante, aber nur schwache phänotypische Komplementation der 514-Zellen erklären. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, daß die mit der Taq-Polymerase amplifizierte und dann klonierte AT500-cDNA nur einen Teil der in 514-Zellen transfizierten, komplementierenden cDNA darstellt. Dieser Fall kann durch unspezifische Hybridisierung einer der zur Amplifikation verwendeten Primer an interne cDNA-Sequenzen auftreten, und ist umso wahrscheinlicher, je länger die transfizierte cDNA ist. Denn die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA, die länger als etwa 5 kb sind, ist sehr unwahrscheinlich. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, daß die Größe der vollständigen AT500-cDNA in 514-Zellen unbekannt ist. Hybridisierungsanalysen können hierüber keine Information geben, da die vollständige Sequenz, deren Restriktionsschnittstellen sowie die Art der Integration in das zelluläre Genom unbekannt sind.

4) Analyse der DNA-Sequenz

Die Sequenzanalyse der AT500-cDNA ergab, ausgehend von einem internen ATG-Start-Codon, ein offenes Leseraster, das für 44 Aminosäuren kodiert. Der Vergleich mit den in der EMBL-Datenbank gespeicherten Sequenzen zeigte auf DNA- und Proteinebene jedoch keine Identität oder auffällige Homologie zu bereits bekannten Genen oder Proteinen.

Mögliche Mechanismen der phänotypischen Komplementation durch AT500

Der hier angewandte, experimentelle Ansatz der phänotypischen Komplementation kann nicht ausschließen, daß eine "unspezifische" Korrektur des defekten Phänotyps in den Zellen stattfindet. Unspezifisch nennt man eine Korrektur dann, wenn durch die (Über-)Expression transfizierter Gene über Umwege ein phänotypischer Defekt korrigiert wird, ohne daß zwangsläufig der primäre genetische Defekt der Empfänger-Zellen aufgehoben wird. So wurde z.B. durch Transfer und Expression des Casein-Kinase-II-Gens in XP-Zellen deren UV-hypersensitiver Phänotyp korrigiert, ohne daß der primäre Gendefekt komplementiert worden war (Teitz et al., 1990).

Eine unspezifische Erhöhung der Strahlenresistenz wäre durch Abfangen strahleninduzierter Radikale, z.B. durch die Überexpression Cystein-reicher Proteine oder Peptide möglich. Die Analyse der Aminosäuresequenz der AT500-cDNA nach Translation in allen 6 möglichen Leserastern ergab jedoch keine Anhäufung von Cysteinen. Die Möglichkeit, daß durch Überexpression Cystein-haltiger Proteine oder Peptide die strahleninduzierten Radikale in 514-Zellen abgefangen werden, scheidet also zur Erklärung der erhöhten Strahlenresistenz aus. Die hier gezeigte, partielle Komplementation von 2 AT-spezifischen Eigenschaften, und die Tatsache, daß in mehreren Arbeitsgruppen keine unspezifische Komplementation oder Reversion des Phänotyps von AT-Zellen beobachtet wurde, läßt vielmehr einen unspezifischen Effekt unwahrscheinlich erscheinen.

Neueste Untersuchungen konnten eine Korrelation zwischen der Blockierung der Zellen in der G1-Phase und einem erhöhten Gehalt des Tumorsuppressor-Proteins p53 nach Bestrahlung

herstellen: Es zeigte sich, daß in AT-Zellen die Erhöhung des p53-Proteingehalts durch ionisierende Bestrahlung, im Unterschied zu normalen Zellen, nicht erreicht werden konnte. Die fehlende Erhöhung des p53-Proteingehalts ging gleichzeitig mit einer fehlenden Hemmung der G1-Phase-Zellen nach Bestrahlung einher (Kastan et al., 1992; Kuerbitz et al., 1992). Neueste, noch unveröffentlichte Ergebnisse zeigen allerdings, daß auch manche AT-Zellen auf Bestrahlung mit einer Erhöhung der p53-Proteinmengen reagieren. Die seltene, menschliche Erbkrankheit Li-Fraumeni-Syndrom (LFS) zeichnet sich, ähnlich AT, durch erhöhte chromosomale Instabilität (Amplifikation, Chromosomen-Aberrationen) sowie eine erhöhte Krebsrate aus (Bischoff et al., 1990; Li et al., 1988). Die molekulare Ursache dieses Syndroms liegt hier in mutierten p53-Genen. Auch in LFS-Zellen findet keine Hemmung der G1-Phase-Zellen nach Bestrahlung statt (Yin et al., 1992).

Ist die nach Bestrahlung auftretende Blockierung der 514-Zellen in der G1-Phase auf eine erhöhte p53-Proteinmenge zurückzuführen? Um diese Frage zu klären, wurde der p53-Proteingehalt der AT- und 514-Zellen untersucht. Aus eigenen, hier nicht gezeigten Experimenten wurde klar ersichtlich, daß in unbestrahlten und bestrahlten 514-Zellen keine erhöhten p53-Mengen im Vergleich zu deren Vorläuferzellen AT5BIVA auftreten. Auch die Größe des geelektrophoretisch aufgetrennten und mit Antikörpern sichtbar gemachten p53-Proteins der 514-Zellen unterschied sich nicht von dem aus AT-Zellen. Es ist zudem fraglich, ob in den hier verwendeten, SV40-immortalisierten Zellen p53 in der Lage ist, spezifische Zellzyklus-Effekte zu vermitteln. Denn p53 wird durch das T-Antigen des SV40 gebunden und dadurch wahrscheinlich inaktiviert (Lechner et al., 1992).

Die gleichzeitige Verzögerung der G1-Phase nach Bestrahlung und erhöhte Resistenz der 514-Zellen warf außerdem die Frage auf, ob und wie diese beiden Merkmale kausal miteinander verknüpft sind. Kann z.B. eine "unspezifisch" verlängerte G1-Phase nach Bestrahlung die Strahlenresistenz der 514-Zellen erhöhen? Diese erstmals von Painter und Young (1980) formulierte Hypothese (Abhängigkeit der Strahlenresistenz von der Verzögerung der Zellzyklus-Phasen) konnte für AT-Zellen widerlegt werden: Eine experimentelle Verzögerung der Zellzyklus-Phasen nach Bestrahlung führte nicht zur Erhöhung der Strahlenresistenz von AT-Zellen (Cox et al., 1981). Die unmittelbar nach Bestrahlung auftretenden Chromosomenschäden in AT-Zellen sind außerdem unabhängig von der Zellzyklus-Progression (Conforth und Bedford, 1985). Die Koffein-Behandlung von Zellen reduziert die Verzögerung der Zellzyklus-Phasen nach ionisierender Bestrahlung (Tolmach et al., 1977). Untersuchungen von Koffein-behandelten und bestrahlten Zellkulturen verdeutlichen, daß auch in normalen Zellen eine reduzierte Zellzyklus-Hemmung nicht mit deren Strahlenresistenz korreliert (Busse et al., 1978; Musk, 1991).

Diese Befunde zeigen, daß die erhöhte Strahlenresistenz der 514-Zellen sehr wahrscheinlich nicht auf eine unspezifische Blockierung der G1-Phase-Zellen nach Bestrahlung zurückzuführen ist. Die komplementierende Aktivität, also das, der AT500-cDNA entsprechende Gen(produkt) sollte daher spezifisch in dem Mechanismus eingreifen, der in den

hier verwendeten AT-Zellen defekt ist, und die krankhaft veränderten Eigenschaften nach ionisierender Bestrahlung bedingt.

Ausblick

Kapp und Mitarbeiter (1992) konnten das bisher einzige Gen klonieren, das möglicherweise in Patienten mit der Erbkrankheit AT defekt ist: Nach Transfektion von Cosmiden in AT5BIVA-Zellen wurde der strahlensensitive Phänotyp der AT-Zellen, nicht aber deren schwach hemmbare DNA-Syntheserate partiell komplementiert. Inzwischen konnten die dafür verantwortlichen Cosmide sowie eine homologe cDNA kloniert werden.

Ein Vergleich des von mir isolierten cDNA-Fragments mit den Eigenschaften des von Kapp und Mitarbeitern klonierten, putativen AT-D-Gens (Komplementationsgruppe D) zeigt folgende Parallelen: Das putative AT-D-Gen konnte nur die Strahlensensitivität der AT-Zellen partiell komplementieren, nicht aber deren ungehemmte DNA-Synthese nach Bestrahlung. Hybridisierungen mit dem klonierten Gen erbrachten ebenfalls keine unterschiedlichen Bandenmuster in der genomischen DNA aus verschiedenen normalen Zelllinien und 4 AT-Zelllinien unterschiedlicher Patienten. Nach Hybridisierung von RNA zeigte sich, daß die verwendete Gen-Sonde ebenfalls 2 große mRNAs (etwa 4,5 kb und 5,5 kb) erkennt. Das putative AT-D-Gen liegt, aufgrund der Analyse von In-Situ-Hybridisierungen gespreiteter Metaphase-Chromosomen, im Bereich q23 des Chromosoms 11, also im postulierten Bereich für die AT-Gene.

Aufbauend auf den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen sollte es möglich sein, die Identität der vollständigen AT500-cDNA, deren genaue Lokalisation auf dem Chromosom 11 und deren Rolle bei der Entstehung der menschlichen Erbkrankheit AT festzustellen.

Literaturverzeichnis

Abeliovitch, D., Cohen, M. M. (1978). Normal activity of nucleoside phosphorylase, superoxide dismutase, and catalase in skin fibroblasts cultured from AT patients. *Israel J. Med. Sci* **14**: 284-287.

Angel, P., Smeal, T., Meck, J., Karin, M. (1989). Jun and v-Jun contain multiple regions that participate in transcriptional activation in an independent manner. *New Biol.* **1**: 35-43.

Bankmann, M., Prakash, L., Prakash, S. (1992). Yeast RAD14 and human Xeroderma pigmentosum group A DNA-repair genes encode homologous proteins. *Nature* **355**: 555-558.

Barfknecht, T. R., Little, J. B. (1982). Hypersensitivity of AT fibroblasts to DNA alkylating agents. *Mut. Res.* **94**: 369-382

Bender, M. A., Griggs, H. G., Bedford, J. S. (1974). Mechanisms of chromosomal aberration production. III. Chemicals and ionizing radiations. *Mut. Res.* **23**: 197-212.

Bertazzoni, U., Scovassi, A., Stefanini, M., Giuliotto, E., Spadari, S., Pedrini, A. M. (1978). DNA polymerase α , β , and γ in inherited diseases affecting DNA repair. *Nucl. Acids Res.* **5**: 2189-2196.

Bischoff, F., Yim, S. O., Pathak, S., Grant, G., Siciliano, M. J., Giovanella, B. C., Strong, L. C., Tainsky, M. A. (1990). Spontaneous immortalization of normal fibroblasts from patients with Li-Fraumeni cancer syndrome. *Cancer Res.* **50**: 7979-7984.

Blaese, R.M. (1989). Genetic immunodeficiency syndromes with defects in both T- and B-lymphocyte functions. In: *"The metabolic basis of inherited disease"* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Ed.) Part II, Chapter 110, McGraw-Hill, Inc. New York: 2697-2709.

Blöcher, D., Sigut, D., Hannan, M. A. (1991). Fibroblasts from Ataxia telangiectasia (AT) and AT heterozygotes show an enhanced level of residual DNA double-strand breaks after low dose-rate γ -irradiation as assayed by pulsed field gel electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* **60**: 791-802.

- Boder, E. (1985). Ataxia telangiectasia: an overview. In: "Ataxia-Telangiectasia: Genetics, Neuropathology and Immunology of a degenerative disease of childhood" (R.A. Gatti, M. Swift, Ed.), Alan. R. Liss, New York: 1-63.
- Bridges, B. A., Harnden, D. G. (1982). Ataxia Telangiectasia: a molecular link between cancer, neuropathology and immune deficiency. Wiley and Sons, Chichester.
- Brown, K. W., Harnden, D. G. (1978). Erythrocyte superoxide dismutase in AT and Fanconi's anaemia. *Lancet* 2: 1260-1261.
- Buselmaier, W., Tariverdian, G. (1991). Humangenetik, Springer-Verlag.
- Busse, P. M., Bose, S. K., Jones, R. W., Tolmach, L. J. (1978). The action of caffeine on X-irradiated Hela cells. *Rad. Res.* 76: 292-307.
- Chang, W. P., Little, J. B. (1991). Delayed reproductive death in X-irradiated Chinese hamster ovary cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 60: 483-496.
- Chen, C. Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2745-2752.
- Chen, P., Lavin, M. F., Kidson, C., Moss, D. (1978). Identification of AT heterozygotes, a cancer-prone population. *Nature* 274: 484-486.
- Cohen, M. M., Simpson, S. J. (1980). Growth-kinetics of AT lymphoblastoid cells - evidence for a prolonged S-period. *Cyt. Cell Gen.* 28: 24-33.
- Cohen, M. M., Simpson, S. J. (1983). Increased clastogenicity and decreased inhibition of DNA synthesis by neocarzinostatin and tallysomyin in AT lymphoid cells. *Mut. Res.* 112: 119-128.
- Colbere-Garapin, F., Ryhiner, M.-L., Stephanie, I., Kourilsk, P., Garapin, A.-C. (1986). Patterns of integration of exogenous DNA sequences transfected into mammalian cells of primate and rodent origin. *Gene* 50: 279-288.
- Conforth, M. N., Bedford, J. S. (1985). On the nature of a defect in cells from individuals with Ataxia telangiectasia. *Science* 227: 1589-1591.

- Coquerelle T. M., Weibezahn, K. W. (1981). Rejoining of DNA double-strand breaks in human fibroblasts and its impairment in one AT and two Fanconi strains. *Jr. Supramolec. Struct. Cell Bioch.* **17**: 369-376.
- Cox, R., Masson, W. K., Weichselbaum, R. R., Nove, J., Little, J. B. (1981). The repair of potentially lethal damage in X-irradiated cultures of normal and ataxia telangiectasia human fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* **39**: 357-365.
- Cramer, P., Painter, R. B. (1981). Bleomycin-resistant DNA synthesis in AT cells. *Nature* **291**: 671-672.
- Davies, S. M., Harris, A. L., Hickson, D. (1989). Overproduction of topoisomerase II in an ataxia telangiectasia fibroblast cell line: comparison with a topoisomerase II-overproducing hamster cell mutant. *Nucl. Acid Res.* **17**: 1337-1351.
- Dean, S. W., Kincla, L., Sykes, H. R., Lehmann, A. R., Wise, I. A. (1989). Instability of extrachromosomal cosmid DNA in SV40-transformed human (Ataxia-telangiectasia) cells. *Exp. Cell Res.* **183**: 473-483.
- Ejima, Y., Oshimura, M., Sasaki, M. S. (1991). Determination of the chromosomal site for the human radiosensitive ataxia telangiectasia gene by chromosome transfer. *Mut. Res.* **250**: 337-343.
- Ford, M. D., Martin, L., Lavin, M. F. (1984). The effects of ionizing radiation on cell cycle progression in AT. *Mut. Res.* **125**: 115 - 122.
- Fornace, A. J., Little, J. B. (1980). Normal repair of DNA single strand breaks in patients with Ataxia telangiectasia. *Biochim. Biophys. Acta* **607**: 432 - 437.
- Foroud, T., Wei, S., Ziv, Y., Sobel, E., Lange, E., Chao, A., Gorodia, T., Huo, Y., Tolun, A., Chessa, L., Chamley, P., Sanal, O., Salman, N., Julier, C., Concannon, P., McConville, C., Taylor, A. M. R., Shiloh, Y., Lange, K., Gatti, R. A. (1991). Localization of an Ataxia-Telangiectasia locus to a 3-cM interval on chromosome 11q23: linkage analysis of 111 families by an international consortium. *Am. J. Hum. Genet.* **49**: 1263-1279.
- Friedberg, E. A. (1985). DNA repair, Freeman and Company, San Francisco, USA.
- Friedberg, E. A. (1988). Deoxyribonucleic acid repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**: 70-102.

Gatti, R. A., Berkel, I., Boder, E., Braedt, G., Chamley, P., Concannon, P., Ersoy, F., Foroud, T., Jaspers, N. G. J., Lange, K., Lathrop, G. M., Leppert, M., Nakamura, Y., O'Connell, P., Paterson, M., Salser, W., Sanal, O., Silver, J., Sparkes, R. S., Susi, E., Weeks, D. E., Wei, S., White, R., Yoder, F. (1988). Localization of an ataxia telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 336: 577-580.

Gatti, R. A. (1990). Localizing the genes for Ataxia-Telangiectasia: a human model for inherited cancer susceptibility. In: "Advances in cancer research" (Vande Woude, G., F., Klein, G., Ed.) Academic Precc, Inc., San Diego: 77-104.

Green, M. H. L., Lowe, J. E., Arlett, C. F., Harcourt, S. A., Burke, J. F., James, M. R., Lehmann, A. R. (1987). A gamma-ray-resistant derivative of an Ataxia telangiectasia cell line obtained following DNA-mediated gene transfer. *J. Cell. Sci. Suppl.* 6: 127-137.

Hanahan, D. (1986). Techniques for the transformation of E.coli. In: *DNA cloning* (D.M. Glover, Ed.) IRL Press, Oxford 1: 109-135.

Hanawalt, P. C., Cooper, P. K., Ganesan, A., Smith, C. A. (1979). DNA repair in bacteria and mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 783-836.

Hoeijmakers, J. H. J., Odijk, H., Westerveld, A. (1987). Differences between rodent and human cell lines in the amount of integrated DNA after transfection. *Exp. Cell Res.* 169: 111-119.

Hoeijmakers, J. H.J. (1993). Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. *TIG* 9: 211-217.

Ikenaga, M., Mirodikawa, M., Abe, J., Mimakim R. (1983). The sensitivities to radiations and radiomimetic chemicals of cells from patients with AT. *Ja. J. Hum. Genet.* 28: 1-10.

Inoue, T., Yokoiyama, A., Kada, T., (1981). DNA repair enzyme deficiency and in vitro complementation of the enzyme activity in cell-free extracts from AT fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 655: 49-53.

Inoue, T., Aikawa, K., Tezuka, H., Kada, T., Shultz, L. D. (1986). Effect of DNA-damaging agents on isolated spleen cells and lung fibroblasts from the mouse mutant "wasted", a putative animal model for Ataxia telangiectasia. *Cancer Res.* 46: 3979-3982.

Jaspers, N. G. J., Bootsma, D. (1982). Genetic heterogeneity in ataxia-telangiectasia studied by cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 2641-2644.

Jaspers, N. G. J., de Wit, J., Bootsma, D. (1982). The rate of DNA synthesis in ataxia-telangiectasia fibroblasts after exposure to DNA damaging agents. In: "Ataxia-telangiectasia - a cellular and molecular link between neuropathology and immune deficiency." (B.A. Bridges and D.G. Harnden, Ed.): 339-345.

Jaspers, N. G., Gatti, R. A., Baan, C., Linssen, P. C. M. L., Bootsma, D. (1988). Genetic complementation analysis of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome: a survey of 50 patients. *Cytogenet. Cell Genet.* **49**: 259-263.

Jones, N. J., Cox, R., Thacker, J. (1987). Isolation and cross-sensitivity of X-ray sensitive mutants of V79-4 hamster cells. *Mut. Res.* **183**: 279-286.

Kantor, G. J., Petty, R. S., Warner, C., Phillips, D. J. H., Hill, D. R. (1980). Repair of radiation-induced DNA damage in non-dividing populations of human diploid fibroblasts. *Biophys. J.* **30**: 339-414.

Kapp, L. N., Painter, R. B. (1989). Stable radioresistance in ataxia-telangiectasia cells containing DNA from normal human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **56**: 667-675.

Kapp, L. N., Painter, R. B., Loh-Chung, Y., van Loon, N., Richard, C. W., James, M. R., Cox, D. R., Murnane, J. P. (1992). Cloning of a candidate gene for ataxia telangiectasia group D. *Am. J. Hum. Genet.* **51**: 45-54.

Karam, L. R., Calsou, P., Franklin, W. A., Painter, R. B., Olsson, M., Lindahl, T. (1990). Modification of deoxyribose-phosphates of ataxia telangiectasia cells. *Mut. Res.* **236**: 19-26.

Kastan, M. B., Zhan, Q., Wafik, S. E., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., Fornace, A. J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in Ataxia-Telangiectasia. *Cell* **71**: 587-597.

Kaufmann, W. K., Boyer, J. C., Estabrooks, L. L., Wilson, S. J. (1991). Inhibition of replicon initiation in human cells following stabilization of topoisomerase-DNA cleavable complexes. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3711-3718.

- Kinsella, T. J., Mitchell, J. B., McPherson, S., Russo, A., Tietze, F. (1982). In vitro X-ray sensitivity in AT homozygote and heterozygote skin fibroblasts under oxic and hypoxic conditions. *Cancer Res.* **42**: 3950-3956.
- Kioussis, D., Wilson, F., Daniels, C., Leveton, C., Taverne, J., Playfair, J. H. L. (1987). Expression and rescuing of a cloned human tumor necrosis factor gene using an EBV-based shuttle cosmid vector. *EMBO J.* **6**: 355-361.
- Kodama, S., Komatsu, K., Okumura, Y., Oshimura, M. (1992). Suppression of X-ray-induced chromosome aberrations in ataxia telangiectasia cells by introduction of a normal human chromosome 11. *Mut. Res.* **293**: 31-37.
- Kohn, K. W., Ewig, R. A. G., Erickson, L. C., Zwelling, L. A. (1981). Measurement of strand breaks and cross-links by alkaline elution. In: "DNA-Repair" a laboratory manual research procedures, vol.1 (E.C. Friedberg, P.C. Hanawalt eds.) Marcel Dekker, New York: 379-401.
- Komatsu, K., Kodama, S., Okumura, Y., Koi, M., Oshimura, M. (1990). Restoration of radiation resistance in ataxia telangiectasia by the introduction of normal human chromosome 11. *Mut. Res.* **235**: 59-63.
- Komatsu, K., Yoshida, M., Okumura, Y. (1993). Murine scid cells complement ataxia telangiectasia cells and show a normal post-irradiation response of DNA synthesis. *Int. J. Radiat. Biol.* **63**: 725-730.
- Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V., Kastan, M. B. (1992). Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7491-7495.
- Kuhnlein, U., Lee, B., Linn, S. (1978). Human uracil DNA glycosylase: studies in normal and repair defective cultured fibroblasts. *Nucl. Acids Res.* **5**: 117-125.
- Lambert, C., Schultz, R. A., Smith, M., Wagner-McPherson, C., McDaniel, L., Donlon, T., Stanbridge, E. J., Friedberg, E. C. (1991). Functional complementation of ataxia telangiectasia group D (AT-D) cells by microcell-mediated chromosome transfer and mapping of the AT-D locus to the region 11q22-23. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5907-5911.

- Lebkowski, J. S., DuBridge, R. B., Antell, E. A., Greisen, K. S., Calos, M. P. (1984). Transfected DNA is mutated in monkey, mouse and human cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1951-1960.
- Lechner, M. S., Mack D. H., Finicle, A. B., Crook, T., Vousden, K. H., Laimins, L. A. (1992). Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J.* **11**: 3045-3052.
- Lehmann, A. R., Arlett, C. F., Burke, J. F., Green, M. H. L., James, M. R., Lowe, J. E. (1986). A derivative of an Ataxia telangiectasia (A-T) cell line with normal radiosensitivity but A-T-like inhibition of DNA synthesis. *Int. J. Radiat. Biol.* **49**: 639-643.
- Lewin, B. (1983). *Genes*, Wiley & Sons, New York.
- Li, F. P., Fraumeni, J. F., Mulvihill, J. J., Blattner, W. A., Dreyfus, M. G., Tucker, M. A., Miller, R. W. (1988). A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* **48**, 5358-5362.
- Li, M., Shiraishi, Y. (1990). A unique human mutant B-lymphoblastoid cell line (ataxia telangiectasia) which exhibits increased sister-chromatid exchange retaining hypersensitivity to neocarzinostatin and bleomycin. *Mut. Res.* **230**: 167-175.
- Lindahl, T. (1982). DNA repair enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **51**: 61-87.
- Lohrer, H. (1987). Veränderung der Strahlenresistenz eukaryotischer Zellen durch Transfer von genomischer Wildtyp-DNA und Metallothionein-Genen. *Dissertation, Universität Karlsruhe (TH)*.
- Lohrer, H., Blum, M., Herrlich, P. (1988). Ataxia telangiectasia resists gene cloning: an account of parameters determining gene transfer into human recipient cells. *Molec. gen. Genet.* **212**: 474-480.
- Lücke-Huhle, C., Hinrichs, S., Speit, G. (1987). DHFR gene amplification in cultured skin fibroblasts of Ataxia telangiectasia patients after methotrexat selection. *Carcinogenesis* **8**: 1801-1806.
- MacFarlin, D. E., Strober, W., Waldmann, T. A. (1972). Ataxia-telangiectasia. *Medicine* **51**: 281.

- Mayne, L. V., Jones, R., Dean, S. W., Harcourt, S. A., Lowe, J. E., Priestley, A., Steingrimsdottir, H., Sykes, H., Green, M. H. L., Lehmann, A. R. (1988). SV40-transformed normal and DNA-repair-deficient human fibroblasts can be transfected with high frequency but retain only limited amounts of integrated DNA. *Gene* **66**: 65-76.
- McConville, C. M., Formstone, C. J., Hernandez, D., Thick, J., Taylor, A. M. R. (1990). Fine mapping of the chromosome 11q22-23 region using PFGE, linkage and haplotype analysis; localization of the gene for ataxia telangiectasia to a 5cM region flanked by NCAM/DRD2 and STMY/CJ52.75. *Nucl. Acid Res.* **18**: 4335-4343.
- McKay, M., Hanawalt, P. (1992). Workshop on DNA-repair genes. *Mut. Res.* **274**: 157-161.
- Meyn, M. S. (1993). High spontaneous intrachromosomal recombination rates in Ataxia-Telangiectasia. *Science* **260**: 1327-1330.
- Morgan, J. L., Holcomb, T. M., Morrissey, R. W. (1968). Radiation reaction in Ataxia telangiectasia. *Am. J. Dis. Child* **116**: 557-558.
- Moses, R. E., Beudet, A. L. (1978). DNA endonuclease activities in repair-deficient human cell lines. *Nucl. Acids Res.* **5**: 463-473.
- Murnane, J. P., Painter, R. B. (1982). Complementation of the defects in DNA synthesis in irradiated and unirradiated AT cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 1960-1963.
- Musk, S. R. R. (1991). Reduction of radiation-induced cell cycle blocks by caffeine does not necessarily lead to increased cell killing. *Rad. Res.* **125**: 262-266.
- Nagasawa, H., Latt, S. A., Lalande, M. E., Little, J. B. (1985). Effects of X-radiation on cell-cycle progression, induction of chromosomal aberrations and cell killing in AT fibroblasts. *Mut. Res.* **148**: 71-82.
- Natarajan, A. T., Obe, G. (1984). Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations (III): restriction endonucleases. *Chromosoma* **90**: 120-127.
- 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.

O'Connor, P. M., Ferris, D. K., White, G. A., Pines, J., Hunter, T., Longo, D. L., Kohn, K. W. (1992). Relationships between cdc2 kinase, DNA cross-linking, and cell perturbations induced by nitrogen mustard. *Cell Growth Differ.* **3**: 43-52.

Painter, R. B., Young, B. R. (1980). Radiosensitivity in AT: a new explanation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7315-7317.

Painter, R. B. (1982). Structural changes in chromatin as the basis for radiosensitivity in ataxia telangiectasia. *Cytogenet. Cell Genet.* **33**: 139-144.

Painter, R. B. (1985). Altered DNA-synthesis in irradiated and unirradiated AT-cells. In: "Ataxia-Telangiectasia: Genetics, Neuropathology and Immunology of a degenerative disease of childhood" (R.A. Gatti, M. Swift, Ed.), Alan. R. Liss, New York: 89-100.

Pandita, T. K., Hittelman, W. N. (1992). Initial chromosome damage but not DNA damage is greater in Ataxia Telangiectasia cells. *Rad. Res.* **130**: 94-103.

Pardo, F. S., Bristow, R. G., Taghian, A., Ong, A., Borek, C. (1991). Role of transfection and clonal selection in mediating radioresistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10652-10656.

Park, E., Guzder, S. M., Koken, M. H. M., Jaspers-Dekker, I., Weeda, G., Hoeijmakers, J. H. J., Prakash, S., Prakash, L. (1992). Rad25 (SSL2), the yeast homolog of the human xeroderma pigmentosum group B DNA repair gene, is essential for viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 11416-11420.

Paterson, M. C., Smith, B. P., Knight, P. A., Anderson, A. K. (1977). AT: an inherited human disease involving fibroblasts from AT heterozygotes manifested by defective repair. In: "Research in Photobiology" (A. Castellani, Ed.), Plenum Press, NY: 207-218.

Paterson, M. C., Anderson, A. K., Smith, B. P., Smith, P. J. (1979). Enhanced radiosensitivity of cultured fibroblasts from Ataxia-Telangiectasia heterozygotes manifested by defective colony-forming ability and reduced DNA repair replication after hypoxic γ -irradiation. *Cancer Res.* **39**: 3725-3734.

Paterson, M. C., MacFarlane, S. J., Gentner, N. E., Smith, B. P. (1985). Cellular hypersensitivity to chronic γ -radiation in cultured fibroblasts from AT-heterozygotes. In: "Ataxia-Telangiectasia: Genetics, Neuropathology and Immunology of a degenerative disease of childhood" (R.A. Gatti, M. Swift, Ed.), Alan. R. Liss, New York: 73-87.

- Peterson, R. P. A., Cooper, M. D., Good, R. A. (1966). Lymphoid tissue abnormalities associated with AT. *Am. J. Med.* **41**: 342-359.
- Pierre, J., Laval, J. (1981). Specific nicking of DNA at apurinic sites by peptides containing aromatic residues. *J. Biol. Chem.* **256**: 10217-10220.
- Pippard, E. C., Hall, A. J., Barker, D. J., Bridges, B. A. (1988). Cancer in homozygotes and heterozygotes of Ataxia telangiectasia and Xeroderma pigmentosum in Britain. *Cancer Res.* **48**: 2929-2933.
- Reed, W. B., Epstein, W. L., Boder, E., Sedgwick, R. (1966). Cutaneous manifestations of AT. *J. Am. Med. Ass.* **195**: 746-753.
- Ross, V. L. und Board, P. G. (1992). Alternate splicing of a new glutathione transferase. (Nicht veröffentlicht; Sequenz in EMBL-Datenbank gespeichert)
- Rudolph, N. S., Latt, S. A. (1989). Flow cytometric analysis of X-ray sensitivity in ataxia telangiectasia. *Mut. Res.* **211**: 31-41.
- Rünger, T. M., Poot, M., Kraemer, K. H. (1992). Abnormal processing of transfected plasmid DNA in cells from patients with Ataxia telangiectasia. *Mut. Res.* **293**: 47-54.
- Sanal, O., Wei, S., Foroud, T., Malhotra, U., Concannon, P., Charmley, P., Salser, W., Lange, K., Gatti, R. A. (1990). Further mapping of an Ataxia-Telangiectasia locus to the chromosome 11q23 region. *Am. J. Hum. Genet.* **47**: 860-866.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.
- Sancar, A., Rupp, W. D. (1983). A novel repair enzym: uvr ABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell* **33**: 249-268.
- Shaham, M., Becker, Y. (1981). The AT clastogenic factor is a low molecular weight peptide. *Hum. Gen.* **58**: 422-424.
- Sheridan, R. B., Huang, P. C. (1978). Apurinic and/or apyrimidinic endonuclease activity in AT cell extracts. *Mut. Res.* **52**: 129-136.

- Shiloh, Y., Tabor, E., Becker, Y. (1983). Repair of potentially lethal and sublethal damage induced by neocarzinostatin in normal and AT skin fibroblasts. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **110**: 483-390.
- Sikpi, M. O., Freedman, M. L., Dry, S. M., Lurie, A. G. (1992). Mutation spectrum in γ -irradiated shuttle vector replicated in Ataxia-Telangiectasia lymphblasts. *Rad. Res.* **130**: 331-339.
- Singh, S. P., Mohamed, R., Salmond, C., Lavin, M. F. (1988). Reduced DNA topoisomerase II activity in ataxia-telangiectasia cells. *Nucl. Acids Res.* **16**: 3919-3929.
- Smith, P. J., Makinson, T. A. (1989). Cellular consequences of overproduction of DNA topoisomerase II in an Ataxia-Telangiectasia cell line. *Cancer Res.* **49**: 1118-1124.
- Soldati, D. und Schümperli, D. (1990). Structures of four human pseudogenes for U7 small nuclear RNA. *Gene* **95**: 305-306.
- Spector, B. D., Filipovitch, A. H., Perry, G. S. III, Kersey, J. H. (1982). Epidemiology of cancer in AT. In: "Ataxia Telangiectasia: a molecular link between cancer, neuropathology and immune deficiency" (Bridges, B. A. and Harnden D. G. Ed.) Wiley and Sons, Chichester: 103-140.
- Sugimoto, T., Sawada, T., Tozowa, M., Kidowaki, T., Kusunoki, T., Yamaguchi, N. (1978). Plasma levels of carcinoembryonic antigen in patients with AT. *J. Pediatr.* **92**: 436-438.
- Swift, M. (1985) In: "Ataxia-Telangiectasia: Genetics, Neuropathology and Immunology of a degenerative disease of childhood" (R.A. Gatti, M.Swift eds.), Alan R. Liss, New York: 133-146.
- Swift, M., Morrell, D., Cromartie, E., Chamberlin, A. R., Skolnick, M. H., Bishop, D. T. (1986). The incidence and gene frequency of Ataxia telangiectasia in the United States. *Am. J. Hum.Genet.* **39**: 573-583.
- Swift, M., Reitnauer, P. J., Morrell, D., Chase, C. L. (1987). Breast and other cancers in families with Ataxia telangiectasia. *N. Engl. J. Med.* **316**: 1289-1294
- Swift, M., Morrell, D., Massey, R. B., Chase, C. L. (1991). Incidence of cancer in 161 families affected by Ataxia-Telangiectasia. *N. Engl. J. Med.* **325**: 1831-1836.

- Tanigami, A., Tokino, T., Takiguchi, S., Mori, M., Glaser, T., Park, J. W., Jones, C., Nakamura, Y. (1992). Mapping of 262 DNA Markers into 24 Intervals on Human Chromosome 11. *Am. J. Genet.* **50**: 56-64.
- Taylor, A. M. R., Rosney, C. M., Campbell, J. B. (1979). Unusual sensitivity of AT cells to bleomycin. *Cancer Res.* **39**: 1046-1050.
- Teitz, T., Eli, D., Penner, M., Bakhanashvili, M., Naiman, T., Timme, T., Wood, C. M., Moses, R. E., Canaani, D. (1990). Expression of the cDNA for the beta subunit of human casein kinase II confers partial UV resistance on xeroderma pigmentosum cells. *Mut. Res.* **236**: 1-13.
- Thacker, J., Wilkinson, R. E. (1991). The genetic basis of resistance to ionising radiation damage in cultured mammalian cells. *Mut. Res.* **254**: 135-142.
- Thompson, L. H., Brookman, K. W., Jones, N. J., Allen, S. A., Carrano, A. V. (1990). Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6160-6171.
- Tolmach, L. J., Jones, R. W., Busse, P. M. (1977). The action of caffeine on X-irradiated Hela cells. *Rad. Res.* **71**: 653-665.
- Van Duin, M., de Wit, J., Odijk, H., Westerveld, A., Yasui, A., Koken, M. H. M., Hoeijmakers, J. H. J., 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**: 919-923.
- Vincent, R. A., Fink, A. J., Huang, P. C. (1980). Unscheduled DNA synthesis in cultures AT fibroblast-like cells. *Mut. Res.* **72**: 245-249.
- Vindelov, L. (1977). Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. *Virchows Arch. Biol. Cell Pathol.* **24**: 227-242.
- Vinters, H. V., Gatti, R. A., Rakic, P. (1985). In: "Ataxia-Telangiectasia: Genetics, Neuropathology and Immunology of a degenerative disease of childhood" (R.A. Gatti, M. Swift, Ed.), Alan R. Liss, New York: 233-255.
- Waldmann, T. A., MacIntyre, K. R. (1972). Serum alpha-fetoprotein levels in patients with AT. *Lancet* **2**: 1112-1115.

Weiherr, H., Noda, T., Gray, D. A., Sharpe, A. H., Jaenisch, R. (1990). Transgenic mouse model of kidney disease. Insertional inactivation of ubiquitously expressed gene leads to nephrotic syndrome. *Cell* **62**: 425-434.

Weinert, T. A., Hartwell, L. H. (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **241**: 317-322.

Würgler, F. E. (1993). Genetische Endpunkte. In: "*Mutationsforschung und genetische Toxikologie*" (R. Fahrig, Ed.), *Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt*: 18-29

Yin, Y., Tainsky, M. A., Bischoff, F. Z., Strong, L. C., Wahl, G. M. (1992). Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* **70**: 937-948.

Young, B. R. und Painter, R. B. (1989). Radioresistant DNA synthesis and human genetic diseases. *Hum. Genet.* **82**: 113-117.

Zabel, B. (1993). Tumorprädisposition und hereditäre Mutationen. In: "*Mutationsforschung und genetische Toxikologie*" (R. Fahrig, Ed.), *Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt*: 112-133.

Zampetti-Bosseler, F., Scott, D. (1985). The effect of caffeine on X-ray induced mitotic delay in normal human and retinoblastoma fibroblasts after X-irradiation. *Int. J. Radiat Biol.* **39**: 547-558.

Ziv, Y., Rotmann, G., Frydman, M., Dagan, J., Cohen, T., Foroud, T., Gatti, R. A., et al., (1991). The AT-C (AT complementation group C) locus localizes to 11q22-q23. *Genomics* **9**: 373-375.