



KfK 5387 B

Juli 1994

**Erhöhung der Resistenz von
Säugetierzellen gegenüber
DNA-schädigenden Agenzien
durch Transfektion
von humaner cDNA**

**E. Eschbach
Institut für Genetik**

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Genetik

KfK 5387 B

**Erhöhung der Resistenz von
Säugetierzellen gegenüber DNA - schädigenden
Agenzien durch Transfektion von
humaner cDNA**

Erik Eschbach

Dissertation genehmigt von der Fakultät
für Bio- und Geowissenschaften
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

Das genetische Material kann durch eine Vielzahl von chemischen Agenzien (z. B. Alkylantien) und Strahlen (z. B. Röntgenstrahlen) geschädigt werden. Um die funktionale Integrität der DNA zu bewahren, stehen der Zelle verschiedene Reparatursysteme zur Verfügung. DNA - Alkylierungsschäden werden spezifisch durch Alkyltransferasen oder durch Alkylpurin - Glykosylasen, die die Exzisionsreparatur einleiten, entfernt. Die Mechanismen der Reparatur von Schäden, die durch ionisierende Strahlen verursacht werden, sind weitgehend unbekannt.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

1. Die Klonierung der cDNA der humanen N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) und der Apurinen Endonuklease (APE), ihre Expression in einer Zelllinie des Chinesischen Hamsters sowie die Analyse ihrer Fähigkeit zur Vermittlung zellulärer Resistenz nach Alkylantienbehandlung.
2. Die phänotypische Komplementation der Röntgenstrahlen - Hypersensitivität einer Zelllinie der Scid - Maus C.B-17 durch Transfektion mit humanen cDNA - Bibliotheken.

Die cDNA der humanen MPG wurde durch Kolonie - Hybridisierung einer humanen Expressions - cDNA - Bank mit Hilfe einer unvollständigen MPG - cDNA als Sonde kloniert. Die cDNA der humanen APE wurde durch Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotide durch Polymerase - Kettenreaktion (PCR) aus einer DNA - Präparation derselben Genbank isoliert und anschließend in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert. Nach stabiler Transfektion der einzelnen Gene sowie beider Gene gemeinsam in die Chinesische Hamsterzelllinie CHO-9 wurde die Fähigkeit dieser DNA - Reparaturgene zur Vermittlung von zellulärer Resistenz nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien geprüft. Dabei zeigte sich, daß die Überexpression des jeweiligen Reparaturgens die Resistenz der Hamsterzellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von MNNG und MMS nicht verändert. Diejenigen CHO-9 - Zellen, die sowohl die MPG - als auch die APE - cDNA enthalten, zeigten jedoch signifikant erhöhte Resistenz. Diese ist vermutlich auf die spezifisch in diesen Zelllinien exprimierte O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase - Aktivität zurückzuführen, die in der parentalen Zelllinie CHO-9 nicht nachweisbar ist.

Die Scid - Maus C.B-17 ist phänotypisch als immun - inkompetent und Röntgenstrahlen - hypersensitiv charakterisiert. Diese Sensitivität gegenüber Röntgenstrahlen zeigen auch aus der Scid - Maus isolierte und in vitro kultivierte Zellen, wie die Fibroblasten - Zelllinie Sc3T3/w. Mit Hilfe dieser Zelllinie wurde ein Selektionssystem auf der Basis fraktionierter

Röntgenbestrahlung etabliert, das die Selektion von resistenten Scid - Zellklonen nach Transfektion mit humaner cDNA erlaubte. Für die Transfektion wurde eine bereits vorhandene humane Expressions - cDNA -Bank verwendet, sowie eine in dieser Arbeit erstmals konstruierte BPV-cDNA - Bank. In unabhängig voneinander durchgeführten Selektions-experimenten konnten mehrere Scid - Zelllinien isoliert werden, die in Dosis - Effekt - Versuchen partielle bis vollständige Komplementation ihrer Röntgenstrahlen - Hypersensitivität zeigten. Mit der Einzelzell - Gelelektrophorese konnte außerdem der Nachweis geführt werden, daß die analysierten Röntgenstrahlen - resistenten Zellklone vollständig die Fähigkeit zur DNA - Doppelstrangbruch - Reparatur wiedererlangt haben. Durch PCR - Klonierung und "Hirt" - Extraktion konnte aus den Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Zellklonen humane cDNA isoliert werden. Die cDNAs, die aus unabhängig voneinander isolierten Zellklonen kloniert worden waren, zeigen untereinander Kreuzhybridisierung und sind auf eine humane mRNA mit einer Länge von 1.4 kb zurückzuführen. Die stabile Transfektion der Scid - Zelllinie mit dem klonierten 0.7 kb PCR - Produkt und dem Plasmid pcD2-Sc2.1, das durch Kolonie - Hybridisierung mit dem PCR - Produkt als Sonde aus der pcD2 - Genbank isoliert worden war, führte in einigen Selektionsversuchen zu einer deutlich erhöhten Überlebensrate. In Dosis - Effekt - Versuchen mit überlebenden Einzelklonen aus diesen Versuchen konnten jedoch keine Zellklone mit signifikant erhöhter Resistenz gegenüber Röntgenstrahlen isoliert werden. Da in den Röntgenselektionsexperimenten keine phänotypischen Revertanten der Scid - Zelllinie isoliert worden waren, spricht dies für den stabilen Charakter der Scid - Mutation und gegen die Möglichkeit, daß die isolierten Strahlen - resistenten Zelllinien durch Reversion ihrer Mutation entstanden sind. Ferner weist die phänotypische Korrektur von zwei Merkmalen (Röntgenstrahlen - Hypersensitivität und DNA - Doppelstrangbruch - Reparaturdefizienz) der Scid - Zelllinie Sc3T3/w auf eine spezifische Komplementation des Scid - Defektes hin. Die Tatsache, daß aus in verschiedenen Selektionsexperimenten unabhängig voneinander isolierten Zellklonen identische cDNA - Sequenzen isoliert werden konnten, deutet stark auf einen Zusammenhang zwischen der klonierten cDNA und dem Defekt der Scid - Maus C.B-17 hin.

Abstract

Increase of resistance of mammalian cells against DNA damaging agents by transfection of human cDNA

Genetic material can be damaged by a variety of chemical agents (e. g. alkylating agents) and radiation (e. g. x - rays). In order to maintain the functional integrity of the DNA, cells have different repair systems at their disposal. DNA alkylation damages are removed specifically by alkyltransferases or by alkylpurine glycosylases which initiate the excision repair. The repair mechanisms of damage which has been caused by ionizing radiation, are largely unknown.

The aims of the present Ph. D. thesis are:

1. Cloning of the cDNAs of the human N-methylpurine-DNA-glycosylase (MPG) and human apurinic endonuclease (APE), expression of these cDNAs in a Chinese Hamster derived cell line and analysis of the cDNAs ability to confer cellular resistance against alkylating agents.
2. Phenotypic complementation of the ionizing radiation hypersensitivity of a celline derived from the scid mouse C.B-17 by transfection with human cDNA.

The cDNA of the human MPG was cloned by colony hybridization of a human expression - cDNA - library using a truncated MPG - cDNA as a probe. The cDNA of the human APE was isolated by using sequence specific oligonucleotides in a polymerase chain reaction (PCR) out of a DNA preparation of the same gene library and was subsequently cloned in an eukaryotic expression vector. After stable transfection of each cDNA alone and both cDNAs together in the Chinese Hamster cell line CHO-9, the ability of these DNA repair genes to confer cellular resistance against alkylating agents was tested. It turned out, that overexpression of each repair gene alone does not alter the hamster cells' resistance against the cytotoxic effects of MNNG and MMS. In contrast those CHO-9 cells bearing both the MPG - and the APE - cDNA showed a significant increase in resistance. This is presumably due to the O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase activity, which is specifically expressed in the double transfectants but is not found in the parental CHO-9 cell line.

The scid mouse C.B-17 is phenotypically characterized as immune incompetent and hypersensitive against ionizing radiation. This sensitivity against x - rays is also shown by the fibroblast cell line Sc3T3/w isolated from the scid mouse. By using this cell line a selection system on the basis of fractionated irradiation was established allowing for selection of resistant scid cell clones after transfection with human cDNA. For the transfection experiments a preexisting human expression - cDNA library was used, as well as a BPV - cDNA library, that was constructed for the first time during this Ph. D. thesis. Independently performed selection experiments yielded several scid - cell lines showing partial to complete complementation of their x - ray hypersensitivity in dose response experiments. Using the single cell gelelectrophoresis method it was proven that the x - ray resistance of the analysed cell clones is due to the complete recovery of their ability to repair DNA double strand breaks. By means of PCR and "Hirt" - extraction human cDNA could be isolated from x - ray resistant scid cell clones. The cDNAs being isolated from independent cell clones show crosshybridization among each other and descend from a 1.4 kb human mRNA. Stable transfection of the scid cell line with the cloned 0.7 kb PCR product and the plasmid pcD2-Sc2.1, that was isolated by colony hybridization out of the pcD2 - library by using the PCR product as a probe, leads in some selection experiments to a strongly increased survival rate. In dose response experiments with surviving single clones out of these experiments, however none of these clones showed an increased resistance against x - rays. The fact that no phenotypical revertants of the scid cell line were obtained in the x - ray selection experiments argues for the stable character of the scid mutation and against the possibility, that the radioresistance of the isolated scid cell clones is due to mere reversion of the mutation. Moreover the phenotypical correction of two characteristics of the scid cell line Sc3T3/w (x - ray hypersensitivity and deficiency in DNA double strand break repair) points to a specific complementation of the scid defect. The fact that identical cDNA sequences were cloned from independently isolated scid cell clones out of different selection experiments is a strong indication for the connection between the cloned cDNAs and the complementation of the defect in the scid mouse strain C.B-17.

Abkürzungen

Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Amoniumperoxidsulfat
Bp	Basenpaar
BPV	Rirderwarzenvirus (<i>bovine papilloma virus</i>)
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (<i>calf intestine phosphatase</i>)
Cm	Chloramphenicol
CTAB	Hexadecyl - trimethyl - amoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamin - tetraessigsäure
EtOH	Äthanol
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat - Dehydrogenase
Gy	Grey
HAc	Essigsäure
kb	Kilobase
LMP - Agarose	niedrig schmelzende Agarose (<i>low melting point - agarose</i>)
Mex ⁻ , Mex ⁺	Methyltransferase negativ bzw. positiv
MMC	Mitomycin C
MMS	Methyl - methansulfonat
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MNU	N-Methyl-N'- Nitrosoharnstoff
MOPS	3 - (N - Morpholino) - Propansulfonsäure
NH ₄ Ac	Amoniumacetat
Oligo - dT	oligomeres Desoxythymidin
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PEG 6000	Polyethylenglykol 6000
rec ⁻	Rekombinations - defizient
res ⁻	Restriktions - defizient
RT	Raumtemperatur
SDS	Na - Laurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TEMED	N.N.N', N'- tetramethyl - ethylendiamin
U	<i>Unit</i>
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernacht - Kultur
ÜS	Überstand
V(D)J	<i>variable, diversity, joining</i> - Gensegmente der Antigen - Rezeptorgene

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Abkürzungen

Einleitung	1
Material & Methoden	13
Material.....	13
Methoden.....	17
1. Zellkultur.....	17
1.1. Transfektion von Zellen	17
1.1.1. Transfektion durch Kalziumphosphat - Kopräzipitation	17
1.1.2. Transfektion mit Polybren	18
1.1.3. Elektroporation.....	18
1.2. Röntgenbestrahlung der Zelllinien Sc3T3/w und Balb/c	19
1.2.1. Röntgenselektion von transfizierten Scid - Zellen durch fraktionierte Bestrahlung	19
1.2.2. Röntgenselektion mit einer Röntgendosis.....	19
1.2.3. Dosis - Effekt - Versuche mit Röntgenstrahlung.....	19
1.3. Alkylantienbehandlung von CHO-9 - Zellkulturen.....	20
1.3.1. Selektion mit Alkylantien	20
1.3.2. Dosis - Effekt - Versuche mit Alkylantien	20
1.4. Isolierung von Zellklonen.....	20
1.5. Fixieren und Färben von Zellen	21
2. Messung von DNA - DSB - Reparatur	21
3. Messung der Enzymaktivität der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase	22
4. Bakterienkultur.....	22
4.1. Transformation von E. coli mit CaCl ₂	22
4.2. Elektroporation von E. coli	23

5. Präparation von Nucleinsäuren.....	23
5.1. Präparation von DNA.....	23
5.1.1. Präparation kleiner Mengen Plasmid - DNA.....	23
5.1.2. Präparation größerer Mengen Plasmid - DNA.....	24
5.1.3. Hirtextraktion von Plasmid - DNA aus Säugerzellen	24
5.1.4. Präparation von genomischer DNA aus Säugerzellen	24
5.1.5. Präparation von Plasmid - DNA aus cDNA - Genbanken.....	25
5.2. Präparation von RNA.....	25
5.2.1. Präparation von Poly - A+ - RNA	25
5.2.2. Präparation von Gesamt - RNA.....	25
6. Sequenzieren von DNA	26
7. In vitro Synthese von Nucleinsäuren.....	26
7.1. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
7.2. Radioaktive Markierung von DNA - Sonden	27
8. Gelelektrophorese.....	27
8.1. Agarose - Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA und RNA.....	27
8.2. Polyacrylamid - Gelelektrophorese zur Auftrennung von Sequenzier- reaktionen.....	28
9. Blot- und Hybridisieretechniken.....	28
10. Isolieren von E. coli - Klonen aus einer cDNA - Genbank.....	29
11. Klonieren von DNA.....	30
12. Konstruktion der BPV - cDNA Genbank.....	31
Ergebnisse	32
Teil 1	32
Erhöhung der zellulären Resistenz einer Zelllinie des Chinesischen Hamsters durch Transfer von humanen DNA - Reparaturgenen.....	32
1. Klonierung der humanen N-Methylpurin-DNA-Glykosylase und Analyse transgener CHO-9 - Zelllinien.....	32
1.1. Isolierung der vollständigen MPG - cDNA aus der humanen pcD2 - Bank.....	33
1.2. Transfektion der cDNA der N-Methylpurin-DNA-Glykosylase in CHO-9 - Zellen und Analyse der zellulären Resistenz transgener Zelllinien gegenüber Behandlung mit Alkylantien	36
1.3. Transfektion einer MPG - <i>antisense</i> - cDNA in die CHO-9 - Zelllinie	40

2. Klonierung und Charakterisierung der humanen Apurinen Endonuklease und Analyse transgener CHO-9 -Zelllinien.....	42
2.1. PCR - Klonierung der humanen Apurinen Endonuklease aus der pcD2 - Genbank	42
2.2. Expression der humanen Apurinen Endonuklease in CHO-9 - Zellen	44
2.2.1. Transfektion der Zelllinien CHO-9 und CHO-9mpg mit der humanen APE-cDNA	44
2.2.2. Northern Blot - Analyse von stabil mit der APE - cDNA transfizierten CHO-9 - Zelllinien	45
2.2.3. Analyse der stabil mit der APE - cDNA transfizierten CHO-9 - Zelllinien in Dosis - Effekt - Versuchen mit alkylierenden Agenzien....	46
2.2.4. Die CHO-9mpg,ape - Doppeltransfektanten zeigen Methyltransferaseaktivität.....	49
2.3. Analyse der Induzierbarkeit der humanen Apurinen Endonuklease.....	50
Teil II	52
Komplementation der Röntgenstrahlen - Hypersensitivität von Scid - Zellen durch Transfektion mit menschlicher cDNA.....	52
1. Entwicklung eines Röntgenselektionssystems	53
2. Etablieren einer geeigneten Transfektionsmethode.....	55
3. Transfektion der Scid - Zelllinie Sc3T3/w mit der humanen pcD2-cDNA - Bank	55
3.1. Röntgenselektion der stabilen Scid - Transfektantenklone liefert strahlen resistente Zelllinien.....	56
3.2. Analyse der Röntgenselektionierten Scid - Einzelklone in Dosis - Effekt - Versuchen	58
3.3. Analyse der genomischen DNA der Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Transfektanten.....	59
3.4. Klonierung humaner cDNA aus den Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Transfektanten.....	59
3.5. Die klonierten PCR - Produkte zeigen untereinander keine Kreuzhybridisierung.....	61
3.6. Das 0.7 kb PCR - Produkt hybridisiert mit einer 1.4 kb mRNA	63
3.7. Die Sequenz des 0.7 kb PCR - Produktes ist in der EMBL - Datenbank unbekannt	64
3.8. Das retransfizierte 0.7 kb PCR - Produkt führt in einigen Röntgenselektions - Versuchen zur erhöhten Strahlenresistenz der Scid - Zelllinie Sc3T3/w	64

3.9. Durch Kolonie - Hybridisierung der pcD2 - Bank mit dem 0.7 kb PCR - Produkt werden E. coli - Klone mit größerer cDNA isoliert.....	67
3.10. Retransfektion der Plasmide aus der Kolonie - Hybridisierung in die Zelllinie Sc3T3/w.....	68
4. Konstruktion einer BPV-cDNA - Bank	69
4.1. Konstruktion des Plasmides pSB100	70
4.2. Konstruktion der BPV-cDNA - Bank.....	72
5. Transfektion der Scid - Zelllinie mit der BPV-cDNA - Bank.....	72
5.1. Die Pöntgenselektion der Scid - Zellklone, die durch Transfektion mit der BPV-cDNA - Bank erhalten worden waren, liefert resistente Zelllinien	72
5.2. Dosis - Effekt - Versuche mit Röntgenstrahlung	73
5.3. Die sechs unabhängig voneinander isolierten röntgenresistenten Scid - Zellklone enthalten Plasmide mit gleichem Restriktionsmuster und gleich großen cDNA - Insertionen	74
5.4. Kreuzhybridisierung der PCR - Produkte aus den resistenten Scid - Zelllinien des ersten und zweiten Klonierungsansatzes	75
5.5. Die neu isolierten 1.5 kb PCR - Produkte und das 0.7 kb PCR - Produkt zeigen 100%ige Sequenzhomologie.....	76
5.6. Retransfektion der durch Hirtextraktion isolierten Plasmide in die Scid - Zelllinie Sc3T3/w.....	79
6. Die Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Zelllinien reparieren durch ionisierende Strahlen verursachte DNA - Doppelstrangbrüche.....	79
Diskussion.....	83
Literaturverzeichnis.....	96

Einleitung

Das Erbmateriale aller Organismen ist einer Vielzahl von potentiell schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt. Neben der natürlichen UV - Strahlung und den kosmischen Strahlen sind hier künstlich durch den Menschen geschaffene physikalische und chemische Agenzien zu nennen. Dazu gehören auf der einen Seite die Erhöhung der UV - Einstrahlung durch Schädigung der Ozonschicht und die erhöhte Freisetzung ionisierender Strahlung durch die Nutzung der Kernenergie. Auf der anderen Seite werden durch die fortschreitende Industrialisierung und Verkehrsentwicklung chemische Agenzien mit DNA - schädigender Wirkung in die Umwelt emittiert. Die genannten Agenzien bewirken sehr verschiedenartige Schäden an der DNA, die von Mutationen, aufgrund von veränderten Basenpaarungseigenschaften, bis zum Zelltod, durch Blockieren der Transkription und Replikation reichen. Um sich vor diesen DNA - schädigenden Einflüssen zu schützen, besitzen alle Organismen, von einfachen Prokaryonten bis hin zu hoch entwickelten Eukaryonten effektive DNA - Reparatursysteme.

I. DNA - Schäden

Veränderungen in der DNA treten nicht nur nach Einwirkung DNA - schädigender Agenzien, wie Strahlung oder chemischen Verbindungen auf, sondern entstehen zum Teil spontan unter den physiologischen Bedingungen des Zellmilieus. Das Phänomen der Keto - Enol - bzw. der Amino - Imino - Tautomerie, bei dem sich die Ladungsverteilung der Basen vorübergehend ändert, kann während der Replikation zur Basenfehlpaarung und damit zur Mutation (in diesem Fall einer Transition) führen (Watson, 1976). Basen mit exozyklischen Aminogruppen können spontan desaminiert werden. Auf diese Weise wird z. B. Cytosin zu Uracil, einer Base, die normalerweise nicht in der DNA vorkommt (Shapiro 1981). Ein weiteres Beispiel für einen spontan auftretenden DNA - Schaden ist die Hydrolyse der Basen, wobei apurinische bzw. apyrimidinische Stellen (AP - Stellen) in der DNA entstehen (Lindahl et al., 1975). Für *E. coli* wurde eine Häufigkeit von einer spontan auftretenden AP - Stelle pro Genom und pro Generation berechnet. Hochgerechnet auf das sehr viel größere Genom von Säugern entstehen unter den gleichen Bedingungen 10 000 AP - Stellen durch Basenverluste pro Genom und pro Zellgeneration (Lindahl, 1979).

Der Beitrag spontan auftretender DNA - Schäden zur Mutationsinduktion ist in einer Zelle mit einem intakten DNA - Reparatursystem gering. Durch das Einwirken von exogenen DNA - schädigenden Agenzien entstehen jedoch vermehrt Schäden an der DNA, die zum Tod der Zelle führen können, wenn das zelluläre DNA - Reparatursystem überfordert wird. Da insbesondere teilungsaktive Zellen empfindlich auf DNA - Schäden reagieren, macht man sich in der Humanmedizin die Sensitivität schnell wachsender Tumorzellen gegen DNA - schädigende Agenzien zunutze, um diese selektiv abzutöten (Chemotherapie, Strahlentherapie). Eine wichtige Gruppe DNA - schädigender Verbindungen stellen die Alkylantien dar. Als elektrophile Agenzien greifen diese bevorzugt die Ringstickstoff- und Ringsauerstoffatome der DNA - Basen, aber auch die Phosphatgruppen im DNA - Rückgrat an (Roberts, 1978, Beranek, 1990). Neben den monofunktionellen Alkylantien, wie z. B. MNNG und MMS, mit nur einer reaktiven Gruppe gibt es bifunktionelle Alkylantien, wie z. B. Senfgas, die zur Kreuzvernetzung der beiden Stränge der DNA - Doppelhelix führen und damit transkriptions- und replikationshemmend wirken (Friedberg, 1985). Eine andere Gruppe von Chemikalien, die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (z. B. Benzo(a)pyren, N-Acetyl - Aminofluren, Aflatoxin) sind zwar chemisch inert, sie werden aber durch zelleigene Oxygenasen in wasserlösliche, sekretierbare Formen umgewandelt. Dabei können Metabolite entstehen, die mit der DNA reagieren können und als starke Kanzerogene bekannt sind (Friedberg, 1985, Wu et al., 1992).

Den durch chemische Substanzen verursachten Schäden stehen die DNA - Strahlenschäden gegenüber. Am besten sind die DNA - Schäden untersucht, die durch UV - Strahlen verursacht werden. Dazu gehören Pyrimidin - Dimere und (6 - 4) - Photoprodukte, die durch kovalente Verknüpfung benachbarter Pyrimidinbasen entstehen (Settlow, 1966, Kittler et al., 1979). Das komplexe Schadensbild, das durch ionisierende Strahlen (Röntgen- und γ - Strahlen) hervorgerufen wird, ist weniger gut untersucht. Ionisierende Strahlen können direkt und indirekt Schäden in der DNA erzeugen. Direkte Schäden entstehen durch die Interaktion der Strahlungsenergie mit der DNA selbst, während bei den indirekten Effekten angeregte und ionisierte Moleküle aus der zellulären Umgebung mit der DNA interagieren. Da sich die DNA in einem wässrigen Milieu befindet, sind es überwiegend die Radiolyseprodukte des Wassers, die für die DNA - Schäden verantwortlich sind. Zu den durch ionisierende Strahlen erzeugtem DNA - Schadensspektrum gehören Basenschäden (z. B. Thyminglykol, Harnsäure, Formamidyrimidin) und DNA - Strangbrüche (Ward, 1975).

II. Reparatur von DNA - Schäden

Für die Reparatur der verschiedenen DNA - Schadenstypen steht der Zelle ein ganzes Arsenal von Reparaturenzymen zur Verfügung, die insbesondere in *E. coli* gut untersucht worden sind. Bei der Reparatur von DNA -Schäden kann man zwei Formen unterscheiden: Bei der Reversionsreparatur wird durch einen einzigen enzymatischen Schritt der ursprüngliche Zustand der DNA wiederhergestellt. An der Exzisionsreparatur, in deren Verlauf eine längere DNA - Sequenz ausgetauscht wird, sind dagegen mehrere Enzyme beteiligt.

1. Reversionsreparatur

Bei der Reversionsreparatur können bestimmte DNA - Schäden von einem einzigen Enzym beseitigt werden. Ein solches Enzym ist z. B. die Photolyase, die in der Lage ist, durch UV - Bestrahlung entstandene Pyrimidindimere in den ursprünglichen monomeren Zustand zurückzubilden. Auch bestimmte Alkylierungsschäden in der DNA können durch einen einzigen enzymatischen Schritt repariert werden. Die dafür erforderlichen Enzyme sind Alkyltransferasen, die spezifisch Alkylgruppen von Basen und Phosphatgruppen der DNA entfernen und an ihr aktives Zentrum binden. Im Unterschied zu anderen Enzymen ist diese Bindung irreversibel und führt zur Inaktivierung der Alkyltransferase, weshalb man diese auch als "Suizid" - Enzym bezeichnet. In *E. coli* ist die "Selbstmordaktion" der Ada - Alkyltransferase von besonderer Bedeutung, da das inaktivierte Reparaturenzym zum transkriptionellen Aktivator für sein eigenes Gen und für andere DNA - Reparaturgene wird. Dieses als "Adaptive Antwort" bezeichnete Phänomen ist von Säugerzellen nicht bekannt. Zur Gruppe der Enzyme, die DNA - Schäden durch Reversion reparieren, zählt man auch die Ligase und die Purin - Insertase. Die Ligase repariert Einzelstrangbrüche in der DNA, indem sie das 3'-OH - Ende einer Ribose mit einem benachbarten 5'- Phosphatende verknüpft. Die Existenz der Insertase, die in der Lage sein soll, Basen in AP - Stellen der DNA zu inserieren, wird allerdings kontrovers diskutiert (Lindahl, 1982).

2. Exzisionsreparatur strukturell deformierter DNA

Nur ein geringer Anteil der DNA - Schäden kann durch Reversionsreparatur entfernt werden. Viele Schäden, gleichgültig ob sie durch Strahlung oder durch Chemikalien verursacht wurden, bedingen strukturelle Veränderungen am DNA - Molekül. Dieses allgemeinere Schadensmerkmal wird von Proteinen erkannt, die an der Nukleotid - Exzisionsreparatur (NER) beteiligt sind und die sehr verschiedenartige Schäden, wie Photoprodukte, chemische Addukte und Kreuzvernetzungen, reparieren können. Auch dieser Reparaturmechanismus ist am besten in *E. coli* untersucht worden. Dort sorgen die Gene des uvr - Systems für die in mehreren enzymatischen

Schritten ablaufende Exzision eines DNA - Schadens. Das allgemeine Reparaturprinzip besteht in der Erkennung des Schadens, seiner endonukleolytischen Entfernung als Bestandteil eines Oligonukleotides definierter Länge und der anschließenden DNA - Reparatursynthese, um die entstandene Lücke in der DNA wieder aufzufüllen (Hoeijmakers, 1993a und b). In *E. coli* werden die *uvr* - Gene vom *lex A* - Repressor kontrolliert und sind damit Bestandteil der SOS - Antwort, mit der die Zelle auf DNA - Schädigung reagiert (Friedberg, 1985). In *S. cerevisiae* entsprechen die Gene der *rad 3* - Gruppe funktionell den *uvr* - Genen von *E. coli*. Beim Menschen sind es die ERCC - Gene (ERCC = *excision repair cross complementing genes*) und teilweise die XP - komplementierenden Gene (XP = Xeroderma pigmentosum). Ein interessanter Aspekt der NER ist die präferentielle Reparatur von Schäden an aktiven Genen, die bevorzugt vor nicht transkribierten Genen und dem übrigen Genom repariert werden (Boulikas, 1992, Bootsma et al., 1993).

3. Exzisionsreparatur nach Entfernung spezifischer Basen - Schäden durch Glykosylasen

Wie anhand der Reversionsreparatur beschrieben, können DNA - Schäden von spezifischen Enzymen erkannt und entfernt werden. Bei der eben dargestellten Nukleotid Exzisionsreparatur wird ein allgemeiner Schadenstyp erkannt, der durch die deformierende Wirkung des Schadens auf die DNA - Struktur zustande kommt. Eine Exzisionsreparatur kann aber auch durch Enzyme eingeleitet werden, die spezifische DNA - Schäden erkennen. Zu diesen Enzymen gehören eine Reihe zum Teil sehr substratspezifischer Glykosylasen (Lindahl, 1982). Uracil - Glykosylasen entfernen die Base Uracil aus der DNA, die entweder irrtümlicherweise eingebaut wurde oder durch Desaminierung von Cytosin entstanden ist. Von *Mikrococcus luteus* und dem Phagen T4 ist eine Pyrimidindimer - Glykosylase bekannt, die durch UV - Bestrahlung entstandene Photoprodukte entfernt. Durch Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen können die Basenderivate Formamidopyrimidin und Harnstoff entstehen, die durch entsprechende spezifische Glykosylasen entfernt werden können. Eine besondere Rolle kommt den N-Methylpurin-DNA-Glykosylasen zu, die alkylierte Basen durch Lösen ihrer N-glykosidischen Bindung mit der Ribose aus der DNA entfernen. In *E. coli* gibt es zwei verschiedene Glykosylasen: Die vom *tag* - Gen kodierte 3-Methyladenin-DNA-Glykosylase I wird konstitutiv exprimiert, während das *alk A* - Gen, das für die Glykosylase II kodiert, im Rahmen der "Adaptiven Antwort" der Zelle induziert wird. Beide Enzyme unterscheiden sich zudem in ihrer Substratspezifität: Die Glykosylase I entfernt sehr spezifisch nur 3-Methyladenin. Die Glykosylase II akzeptiert zusätzlich 3-Methylguanin, 7-Methylguanin, 2-Methylcytosin und 2-Methylthymine als Substrate. Eine ebenfalls breite Substratspezifität hat die N-Methylpurin-DNA-Glykosylase der Maus (Engelward et al., 1993), die 3-Methylguanin, 7-Methylguanin und 3-Methyladenin erkennt. Die Glykosylasen der Ratte (O'Connor, 1990)

und des Menschen entfernen spezifisch 3-Methyladenin und 7-Methylguanin sowie geringe Mengen 3-Methylguanin (Chakravarti et al., 1991).

Nach der spezifischen Schadenserkenkung durch die Glykosylasen, werden die schadhaften Basen aus der DNA entfernt und es entstehen apurinische bzw. apyrimidinische (AP) Stellen in der DNA. Da AP - Stellen selbst mutagen und Replikations - blockierend wirken (Ibeanu et al., 1992), müssen sie umgehend weiter bearbeitet werden. Dies geschieht durch Apurine Endonukleasen. In *E. coli* gibt es mehrere Apurine Endonukleasen, die sich in Art und Ausmaß der endonukleolytischen Aktivität unterscheiden. Die Exonuklease III und die Endonuklease IV schneiden den DNA - Strang an der 5' - Seite der AP - Stelle, während die Endonuklease III an der 3' - Seite von der AP - Stelle schneidet. Die Endonukleasen IV und III machen nur ca. 5 - 10% der gesamten Apurinen Endonukleaseaktivität der Zelle aus. Den Hauptanteil dieser enzymatischen Aktivität bestreitet die Exonuklease III mit ca. 85 % (Cunningham et al., 1986). Das APN1 - Protein von *S. cerevisiae* enthält neben der apurinen Endonukleaseaktivität eine 3' - Diesteraseaktivität (Popoff et al., 1990), das APEX - Protein der Maus (Seki et al., 1991) besitzt zusätzlich eine 3' - Phosphatase- und eine 3' --> 5' - Exonukleaseaktivität. Dies steht im Gegensatz zu den Apurinen Endonukleasen aus humanen Fibroblasten und HeLa - Zellen, die keine zusätzlichen Enzymaktivitäten aufweisen (Mosbaugh et al., 1980, Kane et al., 1981). In menschlichen Zellen existieren, wie in *E. coli*, zwei verschiedene apurine Endonukleasen, von denen die eine 5' - und die andere 3' - Incisionen relativ zu einer AP - Stelle macht. Es konnte gezeigt werden, daß in der Xeroderma pigmentosum - Zelllinie der Komplementationsgruppe D die 3' - schneidende Endonuklease fehlt (Mosbaugh et al., 1980). Die Apurine Endonuklease mit der 5' - Aktivität des Menschen wurde inzwischen unabhängig von mehreren Gruppen kloniert (Demple et al., 1991, Zhao et al., 1992, Seki et al., 1992, Harrison et al., 1992, Xanthoudakis et al., 1992).

Nach dem Entfernen einer alkylierten Base durch die N-Methylpurin-DNA-Glykosylase, und dem endonukleolytischen Einschnitt neben der entstandenen AP - Stelle durch die apurine Endonuklease, werden weitere Enzyme dieser in mehreren Schritten ablaufenden Exzisionsreparatur aktiv. Zunächst erzeugt eine Exonuklease durch nukleolytischen Abbau des eingeschnittenen DNA - Stranges in 5' --> 3' - Richtung eine größere Lücke. Diese wird in einem weiteren enzymatischen Schritt durch DNA - Polymeraseaktivität wieder aufgefüllt. Die Ligase beendet schließlich die Exzisionsreparatur, indem sie das Ende des neu synthetisierten DNA - Abschnittes mit dem Ende des angrenzenden DNA - Stranges kovalent verknüpft (zur Übersicht s. Friedberg, 1985).

III. DNA - Reparaturdefekte und humane Erbkrankheiten

Die Notwendigkeit zur DNA - Reparatur wird besonders dann deutlich, wenn Reparaturmechanismen gestört sind. Es gibt einige seltene Fälle von menschlichen Erbkrankheiten, in denen Reparaturfunktionen offensichtlich defekt sind, bzw. wo man solche Defekte aufgrund erhöhter Sensitivität der untersuchten Zellen gegenüber DNA - schädigenden Agenzien, vermutet (Slijepcevic, 1992). Menschen mit der angeborenen Krankheit Xeroderma pigmentosum zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV - Bestrahlung und besitzen eine erhöhte Inzidenz für Hautkrebs. Insgesamt sind 8 Komplementationsgruppen (XP A bis H) bekannt, von denen die meisten durch Defekte in der Inzision, während der Nukleotid Exzisionsreparatur (NER), gekennzeichnet sind (Tanaka et al., 1989, Scherli et al., 1993, Legerski et al., 1992). Der Krankheit Cockayne's Syndrom liegt ein Defekt in der präferentiellen Nukleotid Exzisionsreparatur zugrunde (Leadon et al., 1993). Zellen dieser Patienten sind ebenfalls UV - sensitiv. Bei der autosomal rezessiv vererbten Krankheit Ataxia telangiectasia vermutete man aufgrund der Röntgenstrahlen - Sensitivität von AT - Zelllinien einen Defekt in der Reparatur von DNA - Einzel- u. Doppelstrangbrüchen, was sich experimentell jedoch nicht bestätigen ließ (Coquerelle et al., 1981, Conforth et al., 1985). Möglicherweise wird bei AT - Zellen die DNA - Reparatur aber behindert, da diese nach Behandlung mit Röntgenstrahlen nicht wie normale Zellen die DNA - Replikation stoppen, um DNA - Reparatur durchzuführen, sondern weiter replizieren (Painter et al., 1980). Zellen von Patienten mit der Krankheit Bloom's Syndrom geben einen klastogenen Faktor ins Kulturmedium ab. Er führt als Zusatz im Medium normaler Zellen zu einer signifikant erhöhten Chromosomen - Aberrationsrate. Da die Zugabe des Enzyms Superoxid - Dismutase zum Kulturmedium diesen DNA - schädigenden Einflüssen entgegenwirkt, vermutet man bei dieser Krankheit einen Defekt bei der Entgiftung von Sauerstoffradikalen (Emerit et al., 1981). Patienten mit der Krankheit Fanconi's Anämie zeigen erhöhte Sensitivität gegenüber kreuzvernetzenden Chemikalien, wie MMC, und haben offensichtlich einen Defekt in der Reparatur dieser Schäden (Sasaki et al., 1973). Die Wichtigkeit einer funktionellen DNA - Reparatur wird nicht nur in den genannten Krankheitsbildern der Patienten mit erhöhter Sensitivität gegenüber DNA - schädigenden Agenzien sichtbar, sondern auch darin, daß zumindest einige der Krankheitsbilder mit erhöhter Krebsinzidenz korreliert sind (G. Ross, 1992). Die bereits 1914 von T. Boveri aufgestellte Theorie der somatischen Mutation besagt, daß eine fehlerhafte Reparatur in "kritischen" Genen, die das zelluläre Wachstum regulieren, zur malignen Entartung der Zelle führen kann. Diese Theorie wird von aktuellen Arbeiten gestützt (Sanford et al, 1991, Sanford et al., 1992). Die Rolle einer nachlassenden Effizienz zur DNA - Reparatur wird auch für den Prozess des Alterns diskutiert (Rao 1993, Whitehead et al., 1993).

IV. Klonierung humaner DNA - Reparaturgene

Um die genaue Funktionsweise insbesondere der humanen DNA - Reparaturgene in allen diesen Prozessen besser zu verstehen, ist die Klonierung dieser Gene und die Charakterisierung ihrer Produkte notwendige Voraussetzung. Für die Klonierung humaner DNA - Reparaturgene stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (Kaina et al., 1991a). Die klassische Methode besteht im Transfer von genomischer oder Cosmid - DNA aus einer Reparatur - kompetenten Zelle in eine Zelllinie mit einem Reparaturdefekt. Auf diese Weise wurden inzwischen mehrere ERCC - Gene kloniert (Westerveld et al., 1984, Weber et al., 1988, Weeda et al., 1990a), die an der Nukleotid - Exzisionsreparatur in humanen Zellen beteiligt sind. Als Empfängerzelllinie für menschliche genomische DNA diente das bis jetzt 8 Komplementationsgruppen umfassende CHO - Zellsystem (CHO = *chinese hamster ovary*). Der Vorteil bei der Transfektion von cDNA - Bibliotheken liegt darin, daß selbst Gene, die aufgrund von Intronsequenzen eine sehr umfangreiche genomische Ausdehnung besitzen, mit hoher Wahrscheinlichkeit vollständig in die Empfängerzelle übertragen werden können. Auf diese Weise wurde das humane Methyltransferase - Gen (Tano et al., 1990) sowie die Gene der XP - Komplementationsgruppen C (Legerski et al., 1992) und G (Scherly et al., 1993) kloniert. Mit der Methode der Mikrozellfusion werden ganze Chromosomen in eine Empfängerzelle übertragen. Auf diese Weise konnte der Defekt von Ataxia telangiectasia - Zellen auf Chromosom 11 (Lambert et al., 1991, Kodama et al., 1992) und der XP A - Defekt auf Chromosom 9 (Tanaka et al., 1989) lokalisiert werden. Mithilfe von Antikörpern, die man durch Immunisieren von Kaninchen mit den gereinigten Reparaturenzymen erhält, können Expressionsgenbanken abgesucht werden. Erfolgreiche Beispiele stellen die Klonierung einer menschlichen Uracil - Glykosylase (Vollberg et al., 1989) und der humanen Apurinen Endonuklease (Dempfle et al., 1991) dar. Genbanken können alternativ auch mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden abgesucht werden. Mit einer solchen kurzen Nukleinsäuresequenz aus dem aktiven Zentrum der klonierten Rinderalkyltransferase gelang Rydberg et al. (1990) die Isolierung der humanen O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase. Olsen et al. (1989) isolierten eine humane Uracil - Glykosylase mit einem Oligonukleotid, das vom N - terminalen Ende des gereinigten Proteins abgeleitet worden war. Eine besonders elegante Methode ist der Versuch, *E. coli* - Mutanten mit bekannten DNA - Reparaturdefekten durch Transformation mit humaner cDNA zu komplementieren. Obwohl aus phylogentischer Sicht Welten zwischen dem Prokaryonten *E. coli* und dem Eukaryonten Mensch liegen, ist ein solcher Ansatz, aufgrund der starken Konservierung vieler DNA - Reparaturfunktionen, möglich. Der beste Beweis dafür sind die Klonierung der humanen O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (Tano et al., 1990) und der humanen N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (Chakravarti et al., 1991).

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war die Klonierung von humanen DNA - Reparaturgenen, die an der Exzisionsreparatur geschädigter DNA - Basen beteiligt sind. Für die Klonierung der humanen N-Methylpurin-DNA-Glykosylase stand mir eine 5'-deletierte cDNA von S. Mitra (Oak Ridge, USA) zur Verfügung. Mithilfe dieser cDNA als Sonde sollte eine humane Expressions - cDNA - Bank, die aus RNA primärer menschlicher Fibroblasten hergestellt worden war (Chen et al., 1987) nach der vollständigen cDNA abgesucht werden. Es war ursprünglich geplant, die humane Apurine Endonuklease, die den zweiten Schritt in der Exzisionsreparatur katalysiert, durch Komplementation einer spezifischen *E. coli* - Mutante zu klonieren. Da das Gen jedoch während der Durchführung dieser Arbeit von einer anderen Arbeitsgruppe (Demple et al., 1991) kloniert worden war, wurde die cDNA der humanen Apurinen Endonuklease mit Hilfe der Polymerase - Kettenreaktion nochmals isoliert und in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert. Das Ziel der Experimente in diesem Teil der vorliegenden Arbeit bestand darin, die klonierten an der Exzisionsreparatur beteiligten Gene in Säugerzellen zur Überexpression zu bringen, um die Auswirkungen verstärkter Reparatur von DNA - Alkylierungsschäden auf die Vermittlung zellulärer Resistenz zu untersuchen. Ein geeignetes Zellsystem für dieses Vorhaben ist die Chinesische Hamster - Zelllinie CHO-9, die sensitiv gegenüber Alkylantienbehandlung ist und daher Veränderungen im Resistenzverhalten besonders deutlich zeigt. CHO-9 - Zellen besitzen keine O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase - Aktivität (Mex⁻ - Phänotyp) und wurden in vorhergehenden Arbeiten bereits für die Transfektion des bakteriellen *ada* - Gens und des humanen *mgmt* - Gens erfolgreich verwendet (Kaina et al., 1991b, Fritz, 1992)

V. Der genetische Defekt der Scid - Maus C.B - 17

SCID (*severe combined immunodeficiency*) kennzeichnet eine heterogene Gruppe von Krankheitsbildern des Menschen, die durch eine markante funktionelle Defizienz sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunantwort charakterisiert sind (Blaese, 1989). SCID wird sowohl autosomal rezessiv als auch X - chromosomal - gekoppelt vererbt. Ca. 30 % der Scid - Patienten zeigen eine Defizienz des Enzyms Adenosin - Desaminase, das eine zentrale Rolle im Purinstoffwechsel spielt. In der Abwesenheit des Enzyms steigt die ATP - Konzentration insbesondere in den T - Zellen, die eine hohe Adenosinkinaseaktivität besitzen, stark an und führt zur Inhibition der DNA - Synthese und damit zum Zelltod. Der humorale Defekt ist vermutlich ein sekundärer Effekt, der dadurch entsteht, daß durch die Abwesenheit von T - Helfer - Zellen, die für die Stimulation der B - Zellen notwendig sind, keine Antikörperproduktion stattfindet (Braakmann et al., 1991, Bordignon et al., 1993). Das *ada* - Gen, das für die Adenosin - Desaminase kodiert, befindet sich auf dem Chromosom Nr. 20.

Patienten mit X - Chromosom - gekoppeltem Scid - Phänotyp zeigen ebenfalls schwerwiegende Defekte im dualen System der Immunantwort. Noguchi et al. (1993) zeigten, daß die Krankheit durch Mutationen in der γ - Kette des Interleukin 2 - Rezeptors verursacht wird, der eine entscheidende Rolle in der T - Zell - vermittelten Immunantwort spielt (Taniguchi et al., 1993).

1983 stellten Bosma et al. mit dem Mausstamm C.B-17 ein Tiermodell vor, das ebenfalls durch eine ausgeprägte Immundefizienz charakterisiert ist. C.B-17 - Mäuse sind äußerst empfänglich für Infektionen und zeigen darüber hinaus keine Transplantatabstoßung. Die Tiere besitzen stark unterentwickelte lymphatische Organe und weisen nur extrem geringe B - und T - Zellpopulationen auf. Im Serum der Tiere lassen sich nur sehr geringe Mengen von Immunglobulinen nachweisen (Bosma et al., 1983, Pla et al., 1991, Bosma et al., 1991). Der Scid - Defekt der Maus wird autosomal rezessiv vererbt und konnte von Bosma et al. (1989) auf Chromosom 16 der Maus lokalisiert werden. Die Immundefizienz der Scid - Mäuse ist nicht absolut, da ca. 15% der untersuchten Scid - Mäuse detektierbare Mengen von oligoklonalen Serum - Immunglobulinen aufweisen und auch T - Zellaktivität zeigen (Pennycook et al., 1993). Im Alter von 10 - 14 Monaten zeigen zudem fast alle Mäuse diesen *leaky* - Phänotyp.

Als molekulare Ursache der murinen Immundefizienz wurde ein Defekt in der Rekombination der Antigenrezeptorgene nachgewiesen (Schuler et al., 1986, Hendrickson et al., 1988). Dieser Defekt führt schon sehr früh zu einer Blockade in der Entwicklung der T - Lymphozyten (Carroll et al., 1991) und verhindert die Entstehung reifer, immunkompetenter Lymphozyten. Bei der Entstehung funktioneller Immunglobulin - und T - Zell - Rezeptorgene werden verschiedene Genabschnitte, nämlich die V - (*variable*), D - (*diversity*), J - (*joining*) und C - (*constant*) - Segmente, durch Rekombination vereinigt (Haars et al., 1986, Hayday et al., 1985, Lieber et al., 1992, Lewis et al., 1989, Alt et al., 1992). Dabei werden nach einem bestimmten Mechanismus, der durch konservierte Signal- und *Spacer* - Sequenzen der einzelnen Segmente vorgegeben ist, kodierende und nicht kodierende Verbindungen hergestellt. Die kodierenden Verbindungen sind entscheidend für die Synthese eines aus V, D, J und C - Elementen aufgebauten Antigenrezeptorgens. In mehreren Arbeiten konnte inzwischen gezeigt werden, daß gerade diese Verknüpfungen in den Lymphozyten von Scid - Mäusen entweder gar nicht stattfinden, oder fehlerhaft ablaufen, wodurch teilweise recht umfangreiche Deletionen der DNA - Sequenzen von bis zu 1.0 kb entstehen (Lieber et al., 1988, Roth et al., 1992, Harrington et al., 1992).

Das Scid Maus - Modell ist für die Aufklärung einer Vielzahl von human - medizinischen Fragen im Zusammenhang mit der Pathogenese von Infektionskrankheiten, der Kanzerogenese und der Funktionsweise des Immunsystems geeignet. Von besonderem Interesse ist jedoch die

Klonierung des Gens selbst, welches den Defekt in der V(D)J - Rekombination verursacht. Hoffnungsvolle Kandidaten waren die RAG 1 und RAG 2 Gene (RAG = *recombination activating gene*), die durch Transfektion von humaner genomischer DNA in die murine Fibroblasten - Zelllinie NIH3T3 kloniert worden waren (Schatz et al., 1989, Oettinger et al., 1990). Diese Zelllinie macht selbst keine V(D)J - Rekombination, da sie keine lymphoide Zelllinie darstellt. Mit Hilfe von Plasmid - DNA, die in diese Zelllinien transfiziert worden war und die als Rekombinationssubstrat diente, konnten nach zusätzlicher Transfektion mit DNA aus Lymphoblasten Gene ermittelt werden, die an der V(D)J Rekombination beteiligt sind. Versuche mit transgenen Mäusen, in denen die RAG 1 und 2 Gene ausgeschaltet worden waren (Mombaerts et al., 1992, Shinkai et al., 1992), führten zur künstlichen Herstellung eines Scid - Phänotyps. Im Gegensatz zum Phänotyp der echten Scid - Maus ist die künstlich herbeigeführte Immundefizienz jedoch absolut, d. h. die Mäuse zeigen keinen *leaky* - Phänotyp. Nachdem man wußte, daß die RAG - Gene auf einem anderen Chromosom lokalisiert sind, als die Scid - Mutation, bestand kein Zweifel daran, daß das Scid - Gen nicht den RAG - Genen entspricht sondern für einen weiteren essentiellen Faktor der V(D)J - Rekombination kodiert.

Eine gänzlich neue Erkenntnis im Zusammenhang mit dem Scid - Phänotyp der Maus, stellte die Entdeckung ihrer Röntgenstrahlen - Hypersensitivität dar. Von mehreren Arbeitsgruppen (Fulop et al., 1990, Biedermann et al., 1991, Hendrickson et al., 1991) wurde unabhängig voneinander eine zwei- bis dreifach erhöhte Sensitivität von Zellen der Scid - Maus im Vergleich mit einer syngenen Kontrollzelllinie gefunden. Interessanterweise ist die Röntgensensitivität nicht auf einen bestimmten Zelltyp beschränkt, sondern umfaßt so verschiedenartige Zelltypen wie Fibroblasten, Knochenmarkszellen, gastrointestinale Zellen und basale Epithelzellen der Haut (Tanaka et al., 1993). Scid - Zellen zeigen keine erhöhte Sensitivität gegenüber den monofunktionellen Alkylantien MNNG und MMS und gegenüber UV - Bestrahlung. Sie zeigen dagegen deutlich erhöhte Sensitivität bei Behandlung mit dem Radiomimetikum Bleomycin (Hendrickson et al., 1991). Die Resistenz gegenüber kreuzvernetzenden Agenzien wird kontrovers diskutiert. Während Einigkeit darüber besteht, daß MMC die Überlebensrate von Scid - Zellen nicht beeinträchtigt, senkt die ebenfalls kreuzvernetzende Substanz Mechlorethamin die Überlebensrate von Scid - Zellen um das Dreifache im Vergleich zur Kontrolle (Tanaka et al., 1993).

Sowohl Röntgenstrahlen als auch Bleomycin induzieren Doppelstrangbrüche in der DNA (Radford, 1986). Mit Hilfe verschiedener experimenteller Methoden wie dem Mikronuclei - Test (Fulop et al., 1990), die neutrale Filterelution (Hendrickson et al., 1991), der Pulsfeld - Gelelektrophorese (Biedermann et al., 1991, Chang et al., 1993) und der Chromosomen - Aberrationsanalyse (Disney et al., 1992) konnte nachgewiesen werden, daß Scid - Zellen einen

Defekt in der Reparatur von DNA - Doppelstrangbrüchen besitzen. Die meisten Strangbrüche, die durch Röntgenstrahlen erzeugt werden, können nicht direkt von einer Ligase repariert werden, sondern müssen zuvor prozessiert werden. Chang et al. (1993) zeigten durch die Elektroporation von Restriktionsenzymen, daß der Scid - Defekt nicht in diesem Prozessierungsschritt begründet liegt. Scid - Zellen reagieren auf die von den Restriktionsenzymen verursachten "sauberen" DNA - Doppelstrangbrüche genauso sensitiv, wie auf Röntgenbestrahlung. Scid - Zellen sind aber erstaunlicherweise in der Lage, transfizierte durch Restriktionsenzyme linearisierte Plasmide mit gleicher Effizienz zu rezirkularisieren, wie Reparatur - kompetente Kontrollzelllinien. Das bedeutet, daß der Scid - Defekt nicht die Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der DNA per se betrifft, sondern im Zusammenhang mit der Wiederherstellung der Integrität der sehr viel komplexeren Chromosomenstruktur zu sehen ist. Diese Hypothese wird durch Daten von Disney et al. (1992) bestärkt, die nach Röntgenbestrahlung eine erhöhte Chromosomen - Aberrationsrate in Scid - Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen feststellten.

Die Klonierung des Scid - Gens ist also in mehrfacher Hinsicht interessant: Einerseits würde sie Einblicke in die zentralen Rekombinationsereignisse bei der Herstellung funktioneller Antigenrezeptorgene geben, und andererseits würde sie einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Reparatur von DNA - Doppelstrangbrüchen in Säugerzellen leisten. Von den bisher klonierten menschlichen Genen, die durch Transfektion von Röntgenstrahlen - sensitiven Hamsterzelllinien der XRCC - Komplementationsreihe (XRCC = *x - ray hypersensitivity rodent cross-complementing gene*) mit humaner genomischer DNA und cDNA isoliert worden waren, scheidet zumindest die XRCC - Gene Nr. 2 und Nr. 4 aus, da sie auf anderen Chromosomen lokalisiert sind als die Scid - Mutation (Komatsu et al., 1993). In neueren Arbeiten gelang es mehreren Arbeitsgruppen parallel, den Scid - Defekt durch Fusion einer Scid - Zelllinie mit einer humanen Zelllinie zu beheben. Als komplementierendes Chromosom wurde das humane Chromosom Nr. 8 ermittelt (Kirchgessner et al., 1993, Itoh et al., 1993, Komatsu et al., 1993).

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war die Komplementation einer Röntgenstrahlen - sensitiven Fibroblasten Zelllinie (Sc3T3/w) der Scid - Maus C.B-17 durch Transfektion mit menschlicher cDNA. Im Vordergrund stand, neben der Ermittlung einer geeigneten Transfektionsmethode, die Etablierung eines Röntgenselektionssystems, das die Isolierung resistenter Scid - Zellklone aus einer großen Zahl röntgensensitiver Zellen erlaubt. Für die Transfektion der Scid - Zellen stand mir eine humane Expressions - cDNA - Bank zur Verfügung. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war jedoch die Konstruktion einer zweiten humanen cDNA - Bank, die das Genom des Rinderpapillom Virus (BPV) enthält. Eine BPV - cDNA - Bank hat den Vorteil, daß ihre Plasmide nicht in das Genom der Empfängerzelle

integrieren, sondern episomal in großer Zahl in der Zelle vorliegen. Dies sollte auf der einen Seite eine hohe Expression der Plasmid - kodierten Proteine gewährleisten und auf der anderen Seite die Isolierung der transfizierten cDNA erleichtern.

Material & Methoden

Material

Allgemein gebräuchliche Chemikalien	Merck, Darmstadt Serva, Heidelberg Sigma, München Roth, Karlsruhe
Spezielle Chemikalien	
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Lachsspermin - DNA	Sigma, München
Polybren	Serva, Heidelberg
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
Kristallviolett,	Merck, Darmstadt
Giemsa - Färbelösung	
Seakem LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
LMP - Agarose	
Ethidiumbromid	Sigma, München
Polyacrylamid/Bisacrylamidlösung	Roth, Karlsruhe
Haftsilan, Dimethyldichlorsilan	Fluka, Neu - Ulm
APS	Appligene, Heidelberg
TEMED	BIO RAD, München
Enzyme	
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim Biolabs, Frankfurt Pharmacia, Freiburg USB, Cleveland Merck, Darmstadt
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Taq Polymerase	Amersham, Braunschweig
RNase A (Rinderpankreas)	Sigma, München
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Klenow Enzym	Stratagene, Heidelberg
alkalische Phosphatase (CIP)	Boehringer, Mannheim
T4 - DNA Ligase	Boehringer, Mannheim

Kits

Prime - It II,	Stratagene, Heidelberg
Random Primer Labeling Kit	
Sequenase 2.0 Sequencing Kit	Renner, Dannstadt

Antibiotika

G418	Gibco, Karlsruhe
Hygromycin	Sigma, München
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, München
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim

Mutagene

MMS, MNNG	Sigma, München
-----------	----------------

radioaktive Nukleotide

^{35}S - ATP, ^{32}P - CTP, ^3H - MNU	Amersham, Braunschweig
--	------------------------

Medien für Bakterien

Bacto - Agar,- Hefeextrakt,- Trypton	Difco Laboratoies, Detroit
--------------------------------------	----------------------------

Medien für Zellkulturen

Dulbecco, F12, Fötale Kälberserum	Gibco, Eggenstein
-----------------------------------	-------------------

Material

Hybond - N ⁺ Membranen	Amersham, Braunschweig
Gene Screen ⁺ Membranen,	NEN, Dreieich
Colony/Plaque Screen Membranen	
Whatmann 3MM Papier	Bender & Hobein, Karlsruhe
Hyperfilm MP Röntgenfilme	Amersham, Braunschweig
Zellkulturgefäße, Bakterienschalen,	Greiner, Nürtingen
Einfriergefäße (Kryoröhrchen)	
Quiagen Säulen	Diagen, Düsseldorf
XT - Platten	Nunc, Wiesbaden
15 und 50 ml Blaukappengefäße	Greiner, Nürtingen

Geräte

Röntgenquelle	Phillipsröhre Mo 300 1mm Kupferfilter
^{60}Co - γ - Quelle	Atomic Energie of Canada Ltd.
Mikroskop: Axioskop	Leitz
Elektroporationsgerät für Bakterien: <i>E. coli</i> - Pulser	BIO RAD, München
Elektroporationsgerät für eukaryon- tische Zellen: TRX GHT 1287	Pabisch, Köln
PCR - Gerät: Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer Cetus, Norwalk (USA)

Zelllinien*

Sc3T3/w	Fibroblasten der C.B-17 Scid - Maus
Balb/c	Fibroblasten des Mausstammes Balb/c
CHO-9	Fibroblasten aus dem Ovar des chinesischen Hamsters
HeLaMR	humane Zelllinie eines Gebärmutterkarzinoms (Mex ⁻)
HeLaS3	humane Zelllinie eines Gebärmutterkarzinoms (Mex ⁺)
SL88	humane primäre Fibroblastenzelllinie

* alle Zelllinien wurden von B. Kaina, Kernforschungszentrum - Karlsruhe zur Verfügung gestellt

E. coli* - Stämme

DH5 α	Rekombinations- und restriktionsdefekter <i>E. coli</i> - Stamm zur Klonierung von rekombinanter DNA
HB101	ditto

* Die Bakterienstämme wurden aus der Stammsammlung des IGEN, Kernforschungszentrum Karlsruhe bezogen

Plasmide

pcD2-x	humane Expressions cDNA - Genbank E. Fritz, Kernforschungszentrum Karlsruhe
pCMVT7	eukaryontischer Expressionsvektor mit CMV - Promotor U. Günthert, Kernforschungszentrum Karlsruhe
pSVT7	eukaryontischer Expressionsvektor mit SV40 - Promotor U. Günthert, Kernforschungszentrum Karlsruhe
pdBPV-MMTneo	eukaryontischer Vektor mit BPV - Genom Law et al., 1983
pUC9	bakterieller Klonier - und Expressionsvektor Yanish - Perron et al., 1985
pSV2neo	euk. Expressionsvektor mit dem Neomycin - Resistenzgen Southern et al., 1982
pGAPDH	bakterieller Vektor mit der GAPDH - cDNA der Ratte Fort et al., 1985
pSV2mgmt	euk. Expressionsvektor mit der humanen MGMT - cDNA B. Kaina, Kernforschungszentrum Karlsruhe

Oligonukleotide

pcD2(5')	5'-CCC-GGA-TCC-GGT-GGT-GGT-GCA-AAT-CAA-AGA-3'
pcD2(3')	5'-TCC-CTC-GAG-GGA-TCC-CCT-GGT-TCT-TTC-CGC-3'
APE(5')	5'-GGT-GGG-GAA-TTC-GGT-ACA-GAT-GCC-CAA-GGG-3'
APE(3')	5'-GGG-GGC-TTA-TTT-CCC-AGG-ATC-CAA-GTG-ATT-3'

BamHI/SalI - Adapter:

5'-GAT-CCG-GCA-ACG-AAG-GTA-CCA-G-3'
5'-TCG-ACT-GGT-ACC-TTC-GTT-GCC-G-3'

Lösungen

20x SSC	175.3 g/l NaCl, 88.2 g/l NaCitrat, pH 7.0
TE	10 mM Tris - HCl, 1 mM EDTA, pH8.0
10x TBE	54 g/l Tris - Base, 27.5 g/l Borsäure, 10 mM EDTA
PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.7 mM CaCl ₂ , 0.6 mM MgCl ₂ , 6.5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄

Methoden

1. Zellkultur

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 6% CO₂ in einem Nährmedium kultiviert, das sich aus 45% Dulbecco - Medium, 45 % F12 - Medium und aus 10% FCS zusammensetzt. Transfizierte Zelllinien, die das Neomycin - Resistenzgen exprimieren, erhielten zusätzlich das Antibiotikum G418 (0.6 mg/ml für Sc3T3/w, 1.5 mg/ml für CHO-9). Zum Passagieren wurden die adhären wachsenden Zellen mit 1/10 Volumen (bezogen auf das Volumen des Kulturmediums) 0.25%igem Trypsin (in PBS) abgelöst und, 1:40 verdünnt, in frisches Medium eingesät. Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst trypsiniert, in Medium aufgenommen und durch Zentrifugieren bei 200 g für drei Minuten pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 1.5 ml Einfriermedium (Kulturmedium, 20% FCS, 10% Glycerin) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und stufenweise tiefgefroren: 15 min auf Eis, mindestens 0.5 h bei -20°C, ÜN bei -80 °C und schließlich in flüssigem Stickstoff zur langfristigen Lagerung. Glycerinkulturen wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 10 ml Kulturmedium gewaschen und anschließend in frisches Kulturmedium eingesät.

1.1. Transfektion von Zellen

1.1.1. Transfektion durch Kalziumphosphat - Kopräzipitation (Graham et al., 1973)

Diese Methode wurde zur Transfektion von CHO-9 - Zellen eingesetzt. Wesentlicher Bestandteil der Methode sind zwei Puffer, welche die DNA als Kalziumsalz präzipitieren, wodurch die Aufnahme der DNA in die Zelle ermöglicht wird. 24 h vor der Transfektion wurden 1×10^6 Zellen pro 10 cm Kulturschale eingesät. 20 µg Plasmid DNA wurden in

0.5 ml Transfektionspuffer 1 (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.1) gelöst und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde tropfenweise 0.5 ml Transfektionspuffer 2 (250 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.1) dazugegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde 1 ml der Mischung in 10 ml Medium der Zellkultur pipettiert. Nach weiteren 6 bis 8 h wurden 5 ml 30%iges DMSO zum Transfektionsansatz zugegeben und weitere 30 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit Medium gewaschen und dann für 2 Tage bei 37 °C kultiviert. Zur Selektion auf transfizierte Klone wurden die Transfektionsansätze 1:4 verdünnt in G418 - haltiges (1.5 mg/ml) Medium umgesetzt. Die Zellen wurden bis zur makroskopischen Sichtbarkeit von Kolonien kultiviert (ca. 10 Tage).

1.1.2. Transfektion mit Polybren (Kawai et al., 1984)

Polybren ist ein Polykation und erleichtert der Zelle, ähnlich wie bei der Kalziumphosphat Kopräzipitation, die Aufnahme der negativ geladenen DNA. Diese Methode wurde für die Transfektion der Scid Zelllinie Sc3T3/w angewendet. Exponentiell wachsende Zellen wurden geerntet und in einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro 10 cm Kulturschale eingesät. Nach 18 - 20 h wurde das Kulturmedium durch 3 ml Medium mit 30 µg Polybren und 20 µg Plasmid - DNA ersetzt. Nach 6 h Inkubation bei 37 °C wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen wurden mit 5 ml 30% DMSO für 4 min behandelt. Zuletzt wurden die Zellen einmal mit 10 ml Medium gewaschen. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen geerntet, 1:4 verdünnt in Selektionsmedium (0.6 mg/ml G418) eingesät und bis zur makroskopischen Sichtbarkeit der Klone kultiviert.

1.1.3. Elektroporation (Chu et al., 1987)

Die Elektroporation erlaubt die Aufnahme von großen DNA - Mengen und sehr großen DNA - Molekülen (z. B. genomische DNA). Diese Methode wurde alternativ für die Transfektion der Sc3T3/w Zellen eingesetzt. Exponentiell wachsende Zellen wurden geerntet und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf eine Dichte von 1×10^7 Zellen pro ml Elektroporationspuffer (10 mM Na₂HPO₄, 75 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 130 mM Sucrose, pH 7.2) eingestellt. 200 µl Zellsuspension wurden mit 10 µg Plasmid DNA gemischt und als Tropfen auf eine 10 cm Kulturschale pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit eingetauchter Elektrode bei 1000 Volt, durch 5 Pulse von 1 ms Dauer und einer Frequenz von 1/ms. Nach der Elektroporation wurden direkt 10 ml vorgewärmtes Medium zugegeben und die

Zellen für 2 Tage inkubiert. Danach erfolgte analog zur Polybrentransfektion die Weiterkultivierung und Selektion in G 418 - haltigem Medium.

1.2. Röntgenbestrahlung der Zelllinien Sc3T3/w und Balb/c

1.2.1. Röntgenselektion von transfizierten Scid - Zellen durch fraktionierte Bestrahlung

In 10 cm Kulturschalen wurden 1×10^6 Zellen eingesät, die nach zwei bis drei Tagen einen konfluenten Zellrasen bildeten. In diesem stationären Zustand wurden die Zellen über einen Zeitraum von 3 Tagen insgesamt sechsmal mit einer Röntgendosis von je 2 Gy bestrahlt (Dosisleistung = 14.3 rad/min bei 250 kV und 10 mA). Die Abstände zwischen den Bestrahlungen betragen mindestens 8 h. Zwischen den Bestrahlungen wurde einmal pro Tag das Kulturmedium gewechselt. Am vierten Tag wurden die Kulturen trypsiniert und nach 1:4 - Verdünnung erneut in Kulturmedium eingesät. Überlebende Zellklone wurden nach 8 - 10 Tagen sichtbar.

1.2.2. Röntgenselektion mit einer Röntgendosis

Diese Bestrahlungsmethode wurde verwendet, um die Resistenz von Scid - Zellklonen nach der Retransfektion mit klonierten cDNAs zu testen. Dazu wurden die stabilen G 418 - resistenten Zellklone eines Transfektionsansatzes vereinigt und als gemischte Zellpopulation auf ihre Resistenz gegenüber Röntgenbestrahlung geprüft. Es wurden jeweils 1×10^5 Zellen pro 10 cm - Kulturschale eingesät und diese nach 6 Stunden mit einer Dosis von 5 Gy bestrahlt. Überlebende Zellklone wurden nach 8 bis 10 Tagen sichtbar. Diese wurden entweder für die Quantifikation der Überlebensrate auf der Kulturschale fixiert, oder als Einzelklone für weitere Analysen isoliert.

1.2.3. Dosis - Effekt - Versuche mit Röntgenstrahlung

Zur Erstellung von Dosiseffektcurven der Sc3T3/w Zellen und der Scid - Transfektantenklone wurden je nach Plattierungseffizienz 500 - 2000 Zellen pro 5 cm Kulturschale in 5 ml Medium eingesät. Nach 4 - 6 h Inkubationszeit, in der sich die Zellen am Boden der Kulturschale anheften und ausbreiten konnten, erfolgte die Bestrahlung mit 1.0 bis 4.0 Gy (s. Methoden

1.2.3.). Nach 8 - 10 Tagen Inkubationszeit wurden überlebende Klone makroskopisch sichtbar und konnten ausgezählt werden.

1.3. Alkylantienbehandlung von CHO-9 - Zellkulturen

1.3.1. Selektion mit Alkylantien

Zur Ermittlung der zellulären Resistenz transfizierter CHO-9 - Zellen wurden 10^5 Zellen pro 10 cm Schale eingesät und nach 4 - 6 h mit verschiedenen Dosen MMS und MNNG (s. Ergebnisteil) behandelt, die aus einer 100 mM bzw. 50 mM Stammlösung zugegeben wurde. Eine Ausnahme stellte der im Ergebnisteil unter Punkt 1.3 beschriebene Versuch mit den *antisense* - Konstrukten des humanen MPG - Gens dar, wo 1×10^6 Zellen pro 10 cm - Kulturschale eingesetzt wurden. In diesem Fall wurden die transfizierten CHO-9 - Zellen auf erhöhte zelluläre Sensitivität gegenüber Alkylantien getestet. Nach 1 h Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit frischem Medium 10 bis 14 Tage weiterinkubiert. Danach wurden die Zellkolonien fixiert (s. 1.5) und gezählt.

1.3.2. Dosis - Effekt - Versuche mit Alkylantien

Pro 5 cm Kulturschale wurden ca. 500 Zellen eingesät und nach 4 - 6 h mit steigenden Alkylantiendosen (s. Ergebnisteil) für 1 h inkubiert. MMS wurde aus einer 100 mM, MNNG aus einer 50 mM Stammlösung zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 8 - 10 Tage bis zur makroskopischen Sichtbarkeit der Zellklone inkubiert. Nach Fixieren, Färben und Zählen der Zellkolonien wurde die prozentuale Überlebensfähigkeit der einzelnen Zelllinien berechnet.

1.4. Isolierung von Zellklonen

Durch Selektion mit G 418 oder durch Röntgenstrahlen- bzw. Alkylantienselektion erhaltene Einzelzellklone wurden direkt aus der Kulturschale entnommen. Dazu wurde zunächst das Medium einer 10 cm - Kulturschale abgesaugt und die Zellen kurz mit 1 ml 0.25% Trypsin benetzt, das ebenfalls wieder abgesaugt wurde. Nach fünfminütiger Inkubation im Brutschrank wurden distinkte Klone mit 20 µl Medium abpipettiert und in 6 - Loch - Platten überimpft.

1.5. Fixieren und Färben von Zellen

Um die Anzahl der Zellkolonien nach Überlebensversuchen zu bestimmen, wurden diese angefärbt. Dazu wurde zunächst das Medium dekantiert, die Zellen wurden einmal mit PBS gespült und 5 min mit Methanol fixiert. Nach Dekantieren des Methanols wurden die Zellen mit Färbelösung aus 0.5% Kristallviolett und 5% Giemsa in Wasser überschichtet. Nach ca. 15 min wurde die Färbelösung abgegossen und die Kulturschalen kurz mit Wasser ausgespült.

2. Messung von DNA - DSB - Reparatur

Zur Bestimmung von Doppelstrangbrüchen in den Scid - Zelllinien wurde die neutrale Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) von Oestling et al. (1984) nach einer Modifikation von Olive et al. (1991) eingesetzt. Bestrahlte Zellen werden in Agarosegel aufgenommen, auf einem Objektträger fixiert und einer Gelelektrophorese unterzogen. Geschädigte DNA wird dadurch sichtbar, daß sie wie ein Kometenschweif aus dem Zellkern der zuvor lysierten Zellen herauswandert. Zwei Tage vor dem Versuch wurden 5×10^5 Zellen in eine 5 cm Kulturschale eingesät. Für die Messung der DNA - Reparatur wurde das Kulturmedium durch kaltes PBS ersetzt und die konfluent gewachsenen Zellen in der ^{60}Co - γ - Quelle auf Eis mit einer Dosis von 50 Gy bestrahlt (Dosisleistung (Feb'94) 724 rad/min). Anschließend wurde das zuvor abgenommene Medium wieder zugegeben und die Zellen 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen trypsinisiert und in PBS auf eine Zellzahl von 10^4 pro ml eingestellt. Für die Kontrollmessungen wurden die Zellen einer weiteren Kulturschale trypsinisiert und auf eine Zellzahl von 10^4 Zellen pro ml PBS eingestellt. 5 ml der Zellsuspension wurden in eine 5 cm Kulturschale transferiert, auf Eis mit einer Dosis von 50 Gy bestrahlt und anschließend weiter auf Eis gekühlt. Zu 0.35 ml der bestrahlten Zellsuspension (mit und ohne nachfolgende Inkubation) sowie der unbestrahlten Kontrolle wurde 1 ml 1%ige LMP Agarose (in Wasser) zugegeben. Anschließend wurde das Gemisch auf einen tiefgefrorenen Objektträger aufgetragen. Nach dem Erstarren der Agarose wurden die beschichteten Objektträger in eine Elektrophoresekammer gelegt und vorsichtig mit 100 ml Lysislösung (30 mM EDTA, 0.5% SDS, pH 8.3) überschichtet. Nach vierstündiger Inkubation bei 50 °C wurde die Lysislösung durch 100 ml Waschlösung (90 mM Tris - Base, 90 mM Borsäure, 2mM EDTA) ersetzt. Nach mindestens vierstündigem Waschen mit stündlichem Wechsel der Waschlösung wurde in 100 ml derselben Lösung die Elektrophorese für 20 min bei 25 Volt durchgeführt. Anschließend wurde die Waschlösung durch 100 ml einer Ethidiumbromidlösung (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Wasser) ersetzt. Nach einstündiger Färbung der Präparate wurden diese zweimal mit je 100 ml

Wasser gespült. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 200facher Vergrößerung. Es wurden je 100 Kometen jeder Probe mit einem Okular mit Meßskala vermessen.

3. Messung der Enzymaktivität der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

Das Prinzip dieses Aktivitätstests beruht auf der irreversiblen Bindung von radioaktiv markierten Methylgruppen von Kalbsthymus - DNA an das Methyltransferase - Enzym. Zur Herstellung von radioaktiv markierter, alkylierter Kalbsthymus - DNA wurde diese mit ³H - MNU (16 Ci/mmol) in 0.2 M NaCacaodylat und 1 mM EDTA (pH 7.5) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt und ÜN dialysiert. Die auf diese Weise gereinigte DNA wurde in 50 ml TE aufgenommen. Zur Aktivitätsmessung wurden 0.1 - 1.0 mg Gesamtzellprotein sowie 50 µl der Substrat - DNA (30000 cpm) in einem Gesamtvolumen von 200 - 500 µl eingesetzt (10fach Reaktionspuffer: 700 mM Hepes/KOH, 10 mM DTT, 10 mM EDTA, pH 7.8). Nach Ablauf der Enzymreaktion (15 min bei 37 °C) wurde die DNA durch Zugabe von TCA (Endkonzentration = 10%) und Erhitzen (10 min, 90 °C) hydrolysiert und das Protein durch nachfolgende Inkubation auf Eis (30 min) gefällt. Nach Abzentrifugieren (10 000 g, 4 °C) des Proteins und Waschen des Proteinpellets mit Aceton wurde dieses in 300 µl 0.2 N NaOH hydrolysiert und die gebundene Radioaktivität nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler bestimmt.

4. Bakterienkultur

Alle verwendeten *E. coli* - Stämme wurden in LB - Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl) bei 37 °C kultiviert. Ampicillinresistente Stämme erhielten zusätzlich 50 µg/ml Ampicillin ins Kulturmedium. Zum Einfrieren von *E. coli* - Stämmen wurden ÜNK auf eine Glycerinkonzentration von 15% eingestellt und bei -80 °C gelagert. Zur Herstellung von LB - Agar wurde dem Flüssigmedium 1.5% Agar zugesetzt.

4.1. Transformation von *E. coli* mit CaCl₂ (Cohen et al., 1972)

Herstellung der kompetenten Bakterien: Mit 0.4 ml einer frischen ÜNK, die mit einer Einzelkolonie angeimpft wurde, wurden 40 ml LB - Medium beimpft und bis zu einer Dichte

von $A_{550} = 0.3$ bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Das abzentrifugierte Zellpellet (4000 g) wurde in 20 ml eiskalter 50 mM CaCl_2 - Lösung suspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach nochmaligem Abzentrifugieren wurde das Bakterienpellet in 4 ml CaCl_2 - Lösung aufgenommen.

Transformation: Die Plasmid - DNA bzw. der Ligationsansatz wurden mit 50 mM Tris-HCl - Lösung ($\text{pH } 7.2$) auf ein Volumen von $50\text{ }\mu\text{l}$ eingestellt und mit $300\text{ }\mu\text{l}$ kompetenten Zellen gemischt. Nach 40 min Inkubation auf Eis erfolgte ein zweiminütiger Hitzeschock bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nachdem die Bakteriensuspension 10 min bei RT abgekühlt war, wurde sie mit LB - Medium auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und 45 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen der Suspension auf LB - Platten (1.5% Agar) mit Ampicillin ausplattiert und ÜN bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

4.2. Elektroporation von *E. coli* (Potter et al., 1988)

Herstellung kompetenter Bakterien: 1 l LB Medium wurde mit 10 ml *E. coli* ÜNK angeimpft und bis zu einer Dichte von $A_{550} = 0.5$ bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (4000 g) wurde das Bakterienpellet in 0.5 l 10% igem Glycerin resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und das Pellet schließlich in 4 ml 10% Glycerin aufgenommen.

Transformation: $40\text{ }\mu\text{l}$ Bakteriensuspension wurden mit $1\text{ }\mu\text{l}$ DNA - Lösung gemischt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 0.1 cm überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1.8 kV mit dem *E. coli* - Pulser der Firma BioRAD. Nach dem Puls wurde die Bakteriensuspension in 1 ml LB - Medium 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen auf Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert.

5. Präparation von Nukleinsäuren

5.1. Präparation von DNA

5.1.1. Präparation kleiner Mengen Plasmid - DNA

1 ml einer *E. coli* ÜNK wurde abzentrifugiert und in $200\text{ }\mu\text{l}$ STET (50 mM Tris-HCl , 50 mM EDTA , 8% Sucrose, 0.5% Triton X-100) suspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde die Suspension 45 s auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Anschließend wurde 10 min bei $13\ 000\text{ g}$ zentrifugiert und die pelletierten Zelltrümmer mit einem Zahnstocher aus dem ERG entnommen. Nach Zugabe von $10\text{ }\mu\text{l}$ 5% igem CTAB (in Wasser) wurde erneut für 5 min zentrifugiert. Der

ÜS wurde abgesaugt und das Pellet in 300 µl 1.2 M NaCl - Lösung gelöst. Die Plasmid DNA wurde durch Zugabe von 750 µl EtOH 2 min bei RT gefällt und für 5 min bei 13 000 g zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 70%igem EtOH wurde die DNA in 50 µl TE mit 40 µg/ml RNase gelöst.

5.1.2. Präparation größerer Mengen Plasmid - DNA

Die Präparation wurde exakt nach dem Protokoll für Quiagen - Säulen der Firma Diagen durchgeführt. Dabei wird nach alkalischem Aufschluß der Bakterien (Birnboim et al., 1979) die Plasmid - DNA an eine Säule gebunden, gereinigt und anschließend durch Elution gewonnen.

5.1.3. Hirtextraktion von Plasmid - DNA aus Säugerzellen (B. Hirt, 1967)

Konfluent gewachsene Zellkulturen zweier 10 cm Kulturschalen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Hirtextraktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA) wurden die Zellen abgeschabt, auf 0.6% SDS eingestellt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 250 µl 5 M NaCl und 100 µg/ml Proteinase K zugegeben. Nach 1 h Inkubation auf Eis wurden die Proben 45 min bei 20 000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände je einmal mit Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert und die Plasmid - DNA schließlich ÜN bei -20 °C ausgefällt. Nach dem Zentrifugieren (10 000 g) wurde das Pellet in 50 µl TE aufgenommen.

5.1.4. Präparation von genomischer DNA aus Säugerzellen (Wigler et al., 1979)

Die Zellen zweier konfluent bewachsener 15 cm Kulturschalen wurden einmal mit 10 ml PBS gewaschen und 5 min mit 5 ml Lysislösung (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.3 M NaOH, 10 mM EDTA, 0.2% SDS, 100 µg/ml Proteinase K) behandelt. Anschließend wurde für 5 h bei 50 °C ein Proteinase K - Verdau durchgeführt. Das Lysat wurde zweimal mit einem Volumen Phenol/Chloroform und einmal mit einem Volumen Chloroform extrahiert wobei zur Trennung der wässrigen und organischen Phase mit 6 000 g zentrifugiert wurde. Die DNA wurde mit 2 Volumen EtOH präzipitiert, mit einer Pasteurpipette entnommen und kurz in 70%iges EtOH getaucht. Anschließend wurde die DNA in 5 ml TE/RNase (40 µg/ml) gelöst und nochmals mit Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert. Nach erneutem Präzipitieren wurde die genomische DNA in 2 ml TE aufgenommen.

5.1.5. Präparation von Plasmid - DNA aus cDNA - Genbanken

Eine vollständige menschliche cDNA - Genbank wird von 2×10^5 unabhängigen *E. coli* Klonen repräsentiert (Gassen, 1987). Für die Präparation von Plasmid - DNA wurden 2×10^6 unabhängige *E. coli* - Klone auf XT - Platten ausplattiert. Nach Inkubation ÜN wurden die Klone mit LB - Medium abgeschwämmt und die DNA nach dem Produkt - Protokoll für Quiagen - Säulen präpariert.

5.2. Präparation von RNA

5.2.1. Präparation von Poly - A⁺ - RNA

Die Zellen einer subkonfluent bewachsenen 15 cm Kulturschale wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 10 ml STE (0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) + 0.5% SDS für 5 min lysiert. Nach Überführen in ein 50 ml Blaukappengefäß wurde das Lysat 20 s im Ultrathorax geschert und nach Zugabe von Proteinase K (0.3 mg/ml) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die NaCl - Konzentration auf 0.5 M eingestellt und 50 mg Oligo - dT Cellulose zugegeben. Nach Inkubation ÜN auf einem Rotor wurde die Oligo - dT Cellulose abzentrifugiert und das Pellet dreimal mit eiskaltem HSB (0.3 M NaCl, 10 mM Tris - HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.1% SDS) gewaschen. Die RNA wurde schließlich mit 3 ml Wasser von der Oligo - dT Cellulose eluiert.

5.2.2. Präparation von Gesamt - RNA

Die Zellen einer subkonfluent bewachsenen 15 cm Kulturschale wurden einmal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml PBS mit einem Gummischaber geerntet. Die Zellen wurden suspendiert und in ein ERG überführt. Nach kurzem Abzentrifugieren (1 min 10 000 g) wurde das PBS abgesaugt und das Pellet in 375 µl TNE (10 mM Tris - HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.0) aufgenommen. Nach Zugabe von 26 µl 10%igem NP40 wurden die Proben kurz gemischt und 2 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (30 s bei 13 000 g) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf - Reaktionsgefäß überführt und mit 375 µl Extraktionspuffer (20 mM Tris - HCl, 350 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS, pH 7.8) gemischt. Anschließend wurde zweimal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform

extrahiert. Zum Überstand wurde ein Volumen EtOH zugegeben. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 100 µl der Lösung mit einem weiteren Volumen EtOH versetzt und die RNA ÜN bei -20 °C gefällt.

6. Sequenzieren von DNA

Für Sequenzierungen wurde das Sequenase 2.0 Kit der Firma USB, welches auf der Didesoxymethode basiert (Sanger et al., 1977), eingesetzt. 3 µg Plasmid - DNA wurden in 40 µl Denaturierungspuffer (0.2 M NaOH, 0.2 mM EDTA) für 15 min bei 37 °C denaturiert und anschließend mit 4 µl 2 M NH₄Ac pH 4.5 und 100 µl EtOH gefällt. Das getrocknete DNA - Pellet wurde dann in 7 µl Wasser, 2 µl 5fach Reaktionspuffer und 1 µl Primerlösung (5 ng) gelöst. Das Gemisch wurde 2 min auf 65 °C erhitzt und 30 min auf RT abgekühlt. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0.1 M DTT, 2 µl 1:5 verdünntem Nukleotidmix, 1 µl ³⁵S-dATP und 2 µl 1:8 verdünnter T7-DNA-Polymerase (2 U) gestartet. Nach 5 min Reaktionszeit bei RT wurden je 3.5 µl der Reaktionsmischung mit 2.5 µl der vier verschiedenen Terminationsmischungen gemischt und weitere 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde schließlich durch Zugabe von 4 µl Formamid - Ladepuffer abgestoppt.

7. In vitro Synthese von Nukleinsäuren

7.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR werden mit Hilfe spezifischer Primer, die aufgrund ihrer Komplementarität an eine entsprechende Matrizen - DNA (Plasmid- oder genomische DNA) binden, DNA - Sequenzen vervielfältigt. Die Methode wurde zum Nachweis und zur Klonierung von cDNAs eingesetzt. Im Standardprotokoll wurden 2 µl 10fach Reaktionspuffer, 2 µl Nukleotidmix (je 2.5 mM jedes Nukleotides), je 2 µl 3'- und 5'- Oligonukleotid, 0.1 - 0.5 µg genomische DNA (bzw. 20 ng Plasmid - DNA), 2.5 U Taq Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl inkubiert. In der Regel wurden 35 Cyclen mit den folgenden Zeit - /Temperaturbedingungen durchgeführt: 1min / 94 °C (Denaturierung), 1 min / variable, von der Primersequenz abhängige Temperatur (Hybridisierung), variable von der cDNA - Länge abhängige Zeit / 72 °C (DNA - Synthese). 5 µl der PCR - Reaktion wurden anschließend im Agarosegel analysiert.

7.2. Radioaktive Markierung von DNA - Sonden

Die Markierung von DNA - Sonden für die Hybridisierung an DNA - und RNA - Blots wurde mit dem Prime-It Kit der Firma Stratagene durchgeführt. Das Prinzip dieser DNA - Synthesereaktion beruht darauf, daß Oligonukleotide mit einer Zufallssequenz an entsprechend komplementäre Sequenzen des zu markierenden Matrizen - DNA Stranges binden und als Startermoleküle für die von dem Klenowfragment katalysierte DNA - Synthesereaktion fungieren. Der Standardansatz setzte sich wie folgt zusammen: 25 ng DNA wurden in Wasser und 10 µl Primerlösung für 5 min auf 95 °C erhitzt und kurz auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl Reaktionspuffer, 3 µl ³²P-CTP und 5 U Klenow - Enzym wurde die Reaktion mit einem Endvolumen von 50 µl 10 min bei 37 °C inkubiert. Zur Abtrennung nicht inkorporierter radioaktiver Nukleotide wurde die Reaktion mit 5 µl 2 M NH₄Ac (pH 4.5), 10 µg Glykogen und 125 µl EtOH ÜN ausgefällt. Nach Waschen mit 300 µl EtOH wurde das Pellet in 500 µl TE aufgenommen und wurde nach Denaturierung zum Hybridisieren eingesetzt.

8. Gelelektrophorese

8.1. Agarose - Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA und RNA

Zur Auftrennung von DNA wurden in der Regel 0.8%ige Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer wurde TBE und zum Auftragen der DNA - Proben ein sechsfach konzentrierter Ladepuffer (0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylen Cyanol, 40% Sukrose) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei maximal 60 Volt durchgeführt. Zur Auftrennung von RNA wurden 1%ige Agarosegele und MOPS - Laufpuffer (0.2 M MOPS, 50 mM Na - Acetat, 5 mM EDTA) verwendet. Vor der Elektrophorese wurde die RNA (5 µg Poly - A⁺ - bzw. 20 µg Gesamt - RNA) in 15 µl Denaturierungspuffer (2 ml fünffach MOPS - Laufpuffer, 3.5 ml 37%iges Formaldehyd, 10 ml deionisiertes Formamid) 5 min bei 65 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben in sechsfach konzentriertem Ladepuffer (50% Glycerin, 1 mM EDTA, 0.4% Bromphenolblau) aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 Volt. DNA und RNA wurden durch Anfärben mit Ethidiumbromid (5×10^{-4} mg/ml) und Bestrahlen mit UV - Strahlung sichtbar gemacht.

8.2. Polyacrylamid - Gelelektrophorese zur Auftrennung von Sequenzierreaktionen

Zur Auftrennung von Sequenzierreaktionen wurden 20 x 40 cm Gele verwendet. Die Haftplatte wurde zweimal mit 2 ml Haftsilan (100 ml EtOH, 0.3 ml Haftsilan, 3 ml HAc) beschichtet, die Ohrenplatte zweimal mit 2 ml Repellösung (5% Dimethyldichlorsilan in CCl₄). Beide Platten wurden anschließend poliert und mit seitlichen 0.4 mm Abstandhaltern zusammengesetzt. 40 ml PA - Gel (100 ml 30%ige gebrauchsfertige PA - Mischung, 50 ml 10fach TBE, 150 g Harnstoff, mit Wasser ad 500 ml) wurden mit 0.3 ml 10%igem APS und 30 µl TEMED gemischt und zwischen die Glasplatten eingefüllt. In das noch flüssige Gel wurde ein Haifischzahnkamm gesteckt. Nach dem Auspolymerisieren wurde das PA - Gel in die vertikale Elektrophoresekammer eingespannt, die Puffertanks mit TBE gefüllt und die Zähne des Haifischkamms ca. 1 mm tief in die PA - Matrix geschoben. Nach Erhitzen der Sequenzierproben für 2 min bei 75 °C wurden 4 µl pro Geltasche aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 40 mA, 1.8 kV für 1.5 bzw. 2.5 h durchgeführt. Nach dem Lauf wurden Haifischkamm und Abstandhalter entfernt und die Ohrenplatte vorsichtig abgehoben. Nach 10minütigem Fixieren in 10%iger HAc wurde der Harnstoff unter fließendem Wasser aus dem Gel ausgewaschen. Anschließend wurde das Gel 2 h bei 85 °C getrocknet. Die Autoradiographie wurde ÜN bei RT durchgeführt.

9. Blot- und Hybridisieretechniken

Zum Transfer von Nukleinsäuren aus Agarosegelen auf Hybond-N⁺ - Nylonmembranen wurde die Kapillarblottechnik (Southern, 1975) angewendet. Für den Transfer von DNA (*Southern Blot*) wurde 0.4 M NaOH als Fließmittel verwendet, für den Transfer von RNA (*Northern Blot*) 20fach SSC. Der *Northern Blot* wurde anschließend in 50 mM NaOH fixiert. Nach beiden Transfermethoden wurden die Membranen abschließend mit 2fach SSC gespült. Bei der *Dot Blot* Technik wird DNA bzw. RNA durch ein Vakuum, das an eine Blotvorrichtung, angelegt wird, auf die angefeuchtete Membran gesaugt. Nach anschließendem Fixieren mit NaOH und Spülen mit 2fach SSC kann die Membran direkt für die Hybridisierung eingesetzt werden. Zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuren durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA - Sonden (Denhardt, 1966) wurde zunächst für mindestens 6 h eine Prähybridisierung bei 65 °C durchgeführt. Die Prähybridisierungslösung enthielt 5fach SSC, 5fach Denhardt's Reagenz (je 2% BSA, Ficoll, Polyvinylpyrolidon in der 100fachen Stammlösung). Für die eigentliche Hybridisierung wurde das Volumen der Prähybridisierungslösung auf 1/5 reduziert und die zuvor durch 10 minütige Inkubation bei 100 °C denaturierte, radioaktiv markierte DNA - Sonde zugegeben. Nach ÜN Inkubation

wurden die Membranen wie folgt gewaschen: 5 min mit 4fach SSC, 15 min mit 2fach SSC (geringe Stringenz), 15 min mit 1fach SSC (mittlere Stringenz) und gegebenenfalls 15 min mit 0.5fach SSC (hohe Stringenz). Alle Wasch - Lösungen enthielten 0.5% SDS. Nach dem Einschweißen der Membranen in Plastikfolie wurden Autoradiogramme angefertigt. Zum Entfernen der radioaktiven DNA - Sonde von der Membran, um z. B. Rehybridisierungen mit der GAPDH - cDNA durchzuführen, wurden DNA - Membranen in 0.5% SDS, RNA - Membranen in 0.1% SDS in destilliertem Wasser für 5 min bei 100 °C inkubiert und anschließend auf RT abgekühlt.

10. Isolieren von *E. coli* - Klonen aus einer cDNA - Genbank

Um in einer cDNA - Genbank mit Hilfe einer spezifischen Sonde einen bestimmten plasmidhaltigen *E. coli* - Klon nachzuweisen, wurde die Methode der Kolonie - Hybridisierung angewendet (Grunstein et al., 1975). Zunächst wurde der Bakterientiter der Genbank durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe bestimmt. Anschließend wurden auf 4 XT - Platten (25 x 25 cm) je 5×10^5 Bakterien auf einer *Genescreen plus* - Membran ausplattiert. Am nächsten Tag wurden von jeder Membran zwei Kopien durch Aufeinanderpressen zweier Membranen hergestellt und ihre Position zueinander durch Nadelstiche eindeutig festgelegt. Nach ÜN Inkubation wurden die Originalplatten bei 4 °C gelagert und die Membrankopien auf chloramphenicolhaltige Platten aufgelegt und erneut ÜN inkubiert. Chloramphenicol bewirkt die Amplifikation der Plasmid DNA in *E. coli*. Durch dreiminütiges Auflegen der Membranen auf die jeweilige Lösung wurden die Bakterienkolonien lysiert (0.2 M NaOH, 0.1% SDS), die DNA auf den Membranen fixiert (0.5 M NaOH) und anschließend neutralisiert (1 M Tris - HCl pH 7.4). Die Zellreste wurden mit Hilfe eines Kleenextuches mit einer Lösung aus 2fach SSC und 0.1% SDS abgerieben. Zum Schluß wurden die Membranen gründlich mit 2fach SSC abgespült. Durch Hybridisieren mit einer spezifischen DNA - Sonde identifizierte *E. coli* - Klone wurden mit 10 µl 10 mM MgSO₄ - Lösung von der Originalplatte abpipettiert und in insgesamt 100 µl derselben Lösung suspendiert. Um Einzelklone zu erhalten wurde die Kolonie - Hybridisierung ein zweites, gegebenenfalls ein drittes Mal mit geeigneten Verdünnungen der Bakteriensuspension durchgeführt. Für die Wiederholungen wurden die Bakterienkolonien durch Auflegen einer *Colony - Screen* Membran direkt von der Agarplatte gelöst.

11. Klonieren von DNA

In dieser Arbeit wurden sowohl durch PCR amplifizierte DNA - Sequenzen als auch durch Restriktionsverdau erhaltene DNA - Fragmente in Plasmidvektoren kloniert. Der Klonierungsvorgang umfaßt die enzymatische Modifikation der DNA, die Isolierung von DNA - Fragmenten aus Agarosegelen und die Transformation geeigneter Bakterienstämme mit rekombinanter DNA, sowie die Präparation dieser DNA. Ein typischer *Restriktionsverdau* wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt und setzte sich wie folgt zusammen: 2 µl 10fach Reaktionspuffer, ca. 5 U Restriktionsendonuklease, 0.1 - 0.5 µg Plasmid - DNA. Die meisten Reaktionen wurden bei 37 °C für 1 h inkubiert. Für manche Klonierungen war es notwendig die durch Restriktionsendonukleasen erzeugten DNA - Enden durch andere Enzyme zu modifizieren. Für die *Erzeugung von stumpfen Enden* wurde das Klenow - Fragment der Polymerase I von *E. coli* verwendet. Dieses wurde in einer Menge von 5 U zusammen mit den 4 notwendigen Desoxyribonukleotiden (1 µl eines 0.5 M Nukleotidgemisches) dem Restriktionsansatz zugegeben und für weitere 15 min bei 30 °C inkubiert. In Klonierungsexperimenten, in denen die Vektor - DNA nur durch eine Restriktionsendonuklease linearisiert wurde, wurde anschließend ein Verdau mit alkalischer Phosphatase (CIP) durchgeführt, wobei die 5' - *Phosphatgruppen der DNA entfernt* und eine Rezirkularisierung der DNA bei der anschließenden Ligation verhindert wurde. Um ein quantitatives Ablaufen der Reaktion zu gewährleisten, wurde zuvor durch Restriktionsenzyme gespaltene DNA durch Phenolextraktion und anschließende EtOH - Präzipitation gereinigt. Der Reaktionsansatz enthielt in einem 20 µl Reaktionsvolumen 2 µl 10fach Reaktionspuffer, die gereinigte DNA und die alkalische Phosphatase. Bei der Dephosphorylierung der DNA galten unterschiedliche Reaktionsbedingungen in Abhängigkeit davon, ob die gespaltene DNA 5' - oder 3' - oder stumpfe Enden aufwies. Für 5' - Enden wurde 1 U CIP pro 100 pmol Enden zugesetzt und die Reaktion für 30 min bei 37 °C inkubiert. Bei 3' - oder stumpfen Enden wurde 1 U pro 2 pmol Enden zugegeben. Die Reaktion wurde in diesem Fall zunächst 15 min bei 37 °C und anschließend, nach erneuter Zugabe von CIP, 45 min bei 55 °C inkubiert. Bei der *Ligation von DNA* wurde in der Regel ein zweifacher Überschuß des zu klonierenden DNA - Fragmentes im Verhältnis zur Vektor - DNA eingesetzt. Der vollständige Ligationsansatz setzt sich bei einem Volumen von 20 µl wie folgt zusammen: 2 µl 10fach Ligationspuffer, 1 U T4 - DNA Ligase, Vektor und Insert - DNA in Nanogrammmengen. Für die Ligation von stumpfen Enden wurde außerdem 15% PEG 6000 zugegeben. Die Inkubation erfolgte grundsätzlich ÜN bei 15 °C. Durch Restriktionsverdau oder PCR erhaltene DNA - Fragmente wurden zunächst in 0.8%igen Agarosegelen aufgetrennt und anschließend durch *Elektroelution* isoliert. Zunächst wurde die relevante Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit einem ausreichenden Volumen TBE in einen Dialyseschlauch überführt. Der verschlossene Dialyseschlauch wurde in eine

Elektrophoresekammer mit TBE - Puffer gelegt. Bei einer Spannung von 100 Volt wurde die DNA aus dem Agaroseblöckchen eluiert. Anschließend wurde die Spannung für 1 min umgepolt, um die DNA vom Dialyseschlauch zu lösen. Die DNA - Lösung wurde einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert und anschließend ÜN mit EtOH und Glykogen präzipitiert. Das Pellet wurde dann in einem geeigneten Volumen TE aufgenommen.

12. Konstruktion der BPV - cDNA Genbank

Die Konstruktion dieser Genbank wurde bis auf eine zusätzliche Manipulation exakt mit Hilfe der unter Punkt 11 beschriebenen Techniken durchgeführt. Zunächst wurde das Plasmid pdBPV-MMTneo mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut. Dabei wurde das in diesem Plasmid komplett vorhandene BPV - Genom als 8.0 Kb BamHI - Fragment freigesetzt. Dieses wurde durch Agarosegelelektrophorese vom Restplasmid getrennt und anschließend durch Elektroelution isoliert. Ein zweites Plasmid (pcD2-scid2.1, in dieser Arbeit kloniert) wurde durch Sall - Verdau linearisiert und durch CIP dephosphoryliert. Um die BamHI - Enden des BPV - Fragmentes mit den Sall - Enden des pcD2 - Plasmides zu ligieren, wurden zwei Oligonukleotide verwendet, die über einen Bereich von 18 Bp komplementär sind und daher miteinander zu einem doppelsträngigen DNA - Stück aggregieren können. Sie besitzen darüber hinaus nicht komplementäre 5' - Sequenzen, die zur Ausbildung von Sall bzw. BamHI - Enden führen. Der auf diese Weise entstandene Adapter befand sich zusätzlich im Ligationsansatz (Haymerle et al., 1986). In einem 20 µl Reaktionsvolumen wurden je 0.04 pmol der zu ligierenden DNA mit 100 pmol beider Oligonukleotide und Wasser zunächst 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT (15 min) wurden Ligationspuffer und Ligase in den üblichen Mengen zugegeben und der Reaktionsansatz ÜN bei 15 °C inkubiert. Der Ligationsansatz konnte ohne Phosphorylierung und nochmaliges Reinigen für die Transformation von kompetenten Bakterien nach der CaCl₂ - Methode eingesetzt werden. Das auf diese Weise klonierte Plasmid pSB100 wurde mit der Restriktionsendonuklease Sall verdaut, wobei das BPV - Genom als Sall - Fragment isoliert wurde. Die Plasmid - DNA der pcD2 - Genbank wurde ebenfalls mit Sall verdaut und anschließend durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Der darauf folgende Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 200 ng pcD2-cDNA, 400 ng BPV-DNA, 1 µl 10fach Ligationspuffer, 1 U T4 - DNA Ligase in einem Reaktionsvolumen von 10 µl. Für die anschließende Elektroporation von *E. coli* HB101 wurden 2 µl des 1:5 verdünnten Ligationsansatzes eingesetzt.

Ergebnisse

Teil 1

Erhöhung der zellulären Resistenz einer Zelllinie des Chinesischen Hamsters durch Transfer von humanen DNA - Reparaturgenen

Der erste Teil dieser Arbeit befaßt sich zunächst mit der Klonierung der humanen N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) und der humanen Apurinen Endonuklease (APE). Beide Enzyme sind an der in mehreren enzymatischen Schritten ablaufenden Exzision von DNA - Schäden beteiligt. Die MPG leitet den Reparaturprozess ein, indem sie spezifisch methylierte Basen in der DNA erkennt und diese entfernt. Zurück bleibt eine apurine bzw. apyrimidinische Stelle, die von der Apurinen Endonuklease erkannt und durch einen endonukleolytischen Einschnitt des schadhafte DNA - Stranges weiter bearbeitet wird. Der Einschnitt wird durch Exonukleaseaktivität erweitert und anschließend von einer Polymerase durch DNA - Neusynthese wieder aufgefüllt. Die Exzisionsreparatur wird schließlich durch eine Ligase abgeschlossen, die die verbleibende Unterbrechung im DNA - Strang durch Knüpfen einer kovalenten Bindung beseitigt. Nach der jeweiligen Beschreibung der Klonierungsexperimente wird die Herstellung transgener Zelllinien mit den klonierten humanen DNA - Reparaturgenen dargestellt. Dazu wurde eine Zelllinie des Chinesischen Hamsters (CHO-9) verwendet, die keine O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase - Aktivität besitzt (Mex⁻ - Phänotyp) und daher besonders sensitiv auf Behandlung mit alkylierenden Agenzien reagiert. In anschließend durchgeführten Versuchen, in denen die transgenen Zelllinien mit alkylierenden Agenzien behandelt wurden, wurde der Beitrag der transfizierten humanen DNA - Reparaturgene zur Resistenzvermittlung der Nagerzelllinie geprüft.

1. Klonierung der humanen N-Methylpurin-DNA-Glykosylase und Analyse transgener CHO-9 - Zelllinien

Durch Verwendung einer unvollständigen cDNA der humanen N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) als Sonde wurde in dieser Arbeit die vollständige cDNA - Sequenz aus einer humanen Expressions - cDNA - Bank kloniert. Die unvollständige MPG-cDNA wurde uns von S. Mitra (Oak Ridge, USA) zur Verfügung gestellt. Sie war durch Komplementation einer *E. coli* - Mutante isoliert worden, die sowohl in der induzierbaren Alk A - Glykosylase

als auch in der konstitutiv exprimierten Tag - Glykosylase mutiert ist (Volkert et al., 1986). Zur Transformation dieses *E. coli* - Stammes wurde cDNA verwendet, die aus mRNA humaner, DNA - reparaturkompetenter HeLaS3 - Zellen synthetisiert und anschließend in den bakteriellen Expressionsvektor pUC9 kloniert worden war (Tano et al., 1990).

In diesem Plasmid steht die cDNA unter der Kontrolle des lac - Promotors, der ihre Transkription steuert. Im Falle der klonierten MPG - cDNA von S. Mitra stellte sich heraus, daß der 5' - Bereich ihrer Sequenz unvollständig ist und kein Startkodon enthält. Die Transkription und Translation des unvollständigen Gens ist in *E. coli* aber dennoch möglich, da der Vektor pUC9 ein Startkodon im korrekten Leseraster zur Verfügung stellt. Da die Deletion im 5' - Bereich offenbar keinen essentiellen Bereich für die Funktion des Glykosylase - Proteins betrifft, konnte die reparaturdefekte *E. coli* - Mutante mit der unvollständigen cDNA des MPG - Gens komplementiert werden (Chakravarti et al., 1991).

Da ein Ziel dieser Arbeit darin bestand, die Expression der MPG in Säugerzellen zu untersuchen, mußte das MPG - Gen in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert werden. Dieser Vektor mußte entweder so beschaffen sein, daß er, analog zur Situation im beschriebenen prokaryontischen System, die Expression der unvollständigen MPG - cDNA erlaubt, oder es mußte die vollständige cDNA des Gens isoliert und in einen geeigneten eukaryontischen Expressionsvektor kloniert werden. In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung der vollständigen MPG - cDNA aus der humanen pcD2 - cDNA - Bank (Chen et al., 1987) mit der Methode der Kolonie - Hybridisierung (Grunstein et al., 1987) beschrieben. In den Plasmiden dieser Genbank ist die cDNA gerichtet hinter den frühen SV40 - Promotor kloniert worden, was deren Transkription in Säugerzellen ermöglicht.

1.1. Isolierung der vollständigen MPG - cDNA aus der humanen pcD2 - Bank

Nach einer statistischen Berechnung wird eine komplette menschliche cDNA - Bank von 2×10^5 unabhängigen *E. coli* - Klonen repräsentiert (Gassen, 1987). Für die Suche nach der vollständigen MPG - cDNA wurden insgesamt 2×10^6 unabhängige *E. coli* - Klone der pcD2 - cDNA - Bank nach der Methode der Kolonie - Hybridisierung analysiert. Als Sonde diente die unvollständige MPG - cDNA - Insertion des Plasmides pPG23 von S. Mitra (s. Abb. 1). Sie wurde nach EcoRI - Verdau und anschließender Agarosegelelektrophorese als 0.9 kb - Fragment isoliert. Dieses Fragment wurde durch Verwendung des "Random - Primer - Labeling - Kits" der Firma Stratagene mit ^{32}P -dCTP radioaktiv markiert und für die Hybridisierung mit der DNA der *E. coli* - Klone der pcD2 - Bank eingesetzt. Nach mehreren Hybridisierungszyklen konnten positive *E. coli* - Klone angereichert und schließlich als

Einzelklone isoliert werden. Die aus diesen Klonen isolierte Plasmid - DNA wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

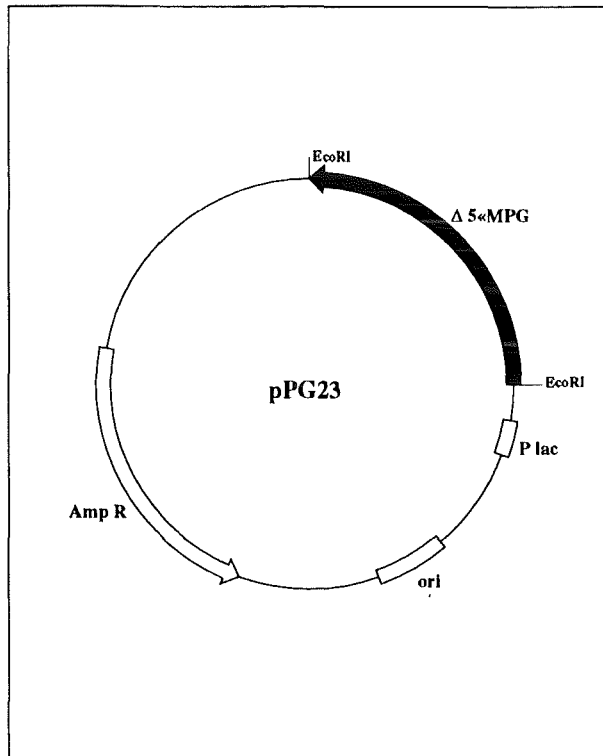


Abb. 1 Schematische Darstellung des Plasmides pPG23. Das rekombinante Plasmid besteht aus den Sequenzen des prokaryontischen Expressionsvektors pUC9 (Yanish - Perron et al., 1985) und der unvollständigen humanen MPG - cDNA ($\Delta 5' \text{MPG}$) (Chakravarti et al., 1990). Diese steht als EcoRI - Insertion unter der Transkriptionskontrolle des lac - Promotors (P lac). Amp R = Ampicillin - Resistenzgen, ori = Replikationsursprung

Anschließend wurde die DNA im *Southern Blot* - Verfahren auf eine Nylonmembran übertragen und nochmals mit der MPG - spezifischen Sonde hybridisiert. Das Autoradiogramm (s. Abb. 2) zeigt insgesamt 3 verschieden große Banden, die cDNAs von 0.7, 1.0 und 1.2 kb entsprechen.

Eins der Plasmide (Plasmid - DNA, die in Bahn 9 der Abb. 2 analysiert wurde), das eine 1.2 kb - Insertion enthält, wurde stellvertretend für die Plasmide, die eine gleich große Insertion enthielten durch Sequenzanalyse näher charakterisiert. Dazu wurden Oligonukleotide verwendet, die auf der Basis der Sequenz der unvollständigen MPG - cDNA synthetisiert worden waren. Das Oligonukleotid Mpg12 (s. Abb. 3) ermöglicht die Sequenzierung in den unbekanntem 5' - Bereich der neu isolierten cDNA. Mit dem Oligonukleotid Mpg11 konnte überprüft werden, ob der 3' - Bereich der neu isolierten cDNA mit der bekannten MPG - cDNA aus pPG23 übereinstimmt.

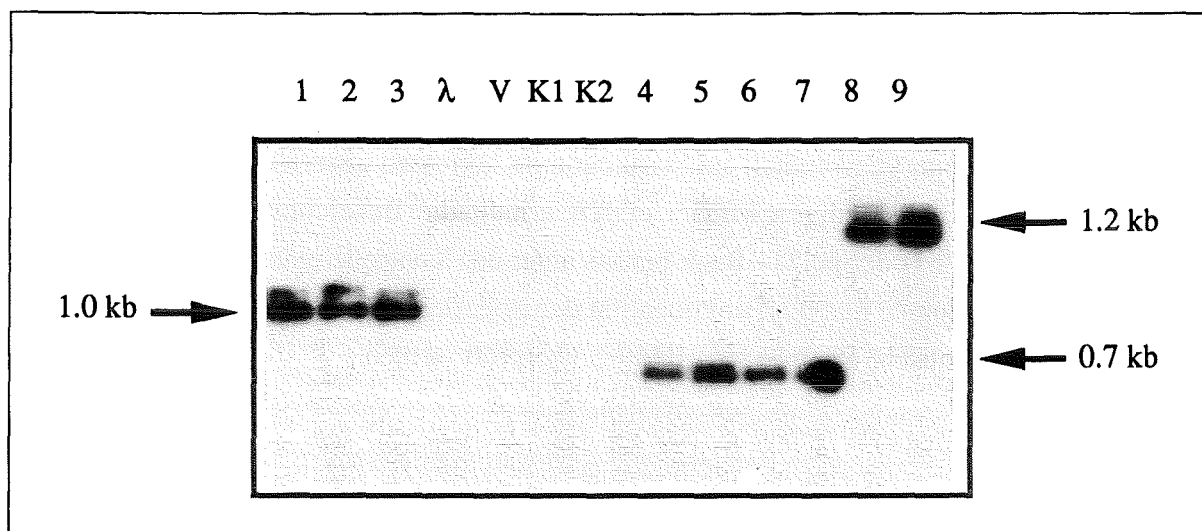


Abb. 2 Autoradiogramm verschiedener MPG - cDNA - Klone nach Hybridisieren mit der pPG23 - cDNA - Insertion: die Plasmid - Klone mit 1.2 kb - cDNA - Insertionen enthalten die potentiell vollständige humane MPG - cDNA.

Durch Kolonie - Hybridisierung mit der unvollständigen MPG - cDNA - Insertion aus dem Plasmid pPG23 als Sonde, konnten mehrere MPG - cDNA - Klone aus der pcD2 - Genbank isoliert werden. Die Plasmid - DNA der *E. coli* - Klone wurde präpariert, mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Übertragen auf eine Nylonmembran wurde die immobilisierte DNA mit der cDNA - Insertion aus pPG23 hybridisiert und anschließend mit hoher Stringenz ($0.5 \times \text{SSC}$) gewaschen. Das Autoradiogramm zeigt die verschieden großen MPG - cDNA - Insertionen der analysierten pcD2 - Plasmide. Bahn 1 - 3 = pcD2-mpg1.0-1, -2 und -3, Bahn 4 - 7 = pcD2-mpg0.7-1, -2, -3 und -4, Bahn 8 und 9 = pcD2-mpg1.2-1 und -2, K1 und K2 = Kontrollplasmide, die in der Kolonie - Hybridisierung nicht mit der pPG23 - cDNA - Insertion hybridisierten, V = pUC9, λ = λ - DNA als Größenmarker.

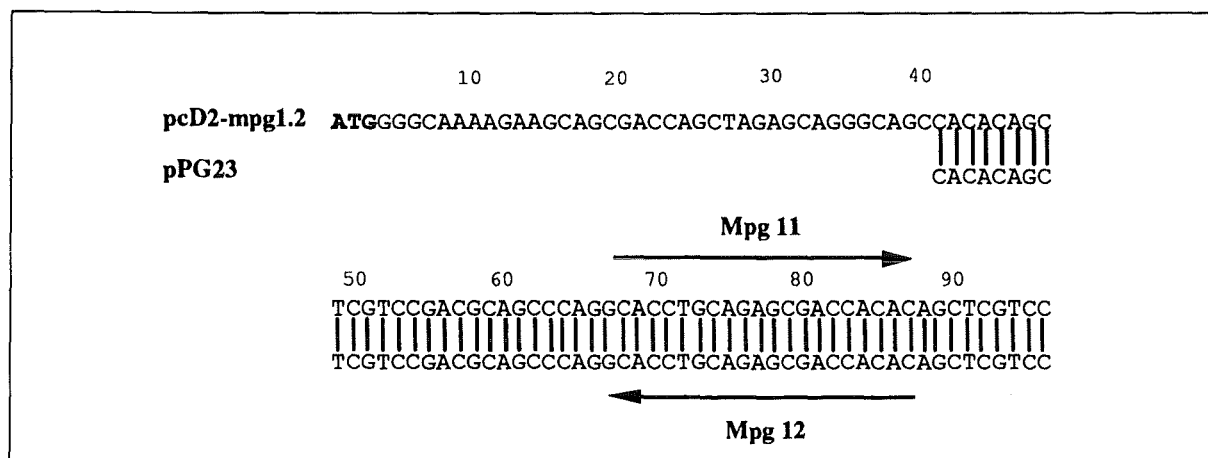


Abb. 3 Schematischer Sequenzvergleich der MPG - cDNA - Insertionen der Plasmide pPG23 und pcD2-mpg1.2.

Die cDNA - Insertionen der Plasmide pPG23 und pcD2-mpg1.2 wurden in 3'- und 5'- Richtung ansequenziert. Dazu wurden Oligonukleotide verwendet, die von der pPG23 - cDNA - Insertion abgeleitet wurden. Das Oligonukleotid Mpg 11 erlaubt die Sequenzierung in die 3'- Richtung und zeigt, daß beide Sequenzen in diesem Bereich 100%ig identisch sind. Mit Hilfe des Oligonukleotides Mpg 12 konnten die 5'- Bereiche der cDNAs sequenziert werden. Die cDNA - Insertion des Plasmides pcD2-mpg1.2 zeigt einen erweiterten 5'-Bereich im Vergleich zur pPG23 - cDNA und enthält ein Startkodon im korrekten Leseraster.

Der Vergleich der neu isolierten cDNA mit der bereits klonierten unvollständigen MPG - cDNA ergab 100%ige Homologie im ansequenzierten 3'- Bereich der beiden Gene. Der vollständig sequenzierte 5'- Bereich der neu isolierten cDNA - Sequenz ist, verglichen mit der cDNA aus pPG23, um 46 Bp erweitert und enthält ein Startkodon im korrekten Leseraster (s. Abb. 3).

Das Plasmid mit der vollständigen MPG - cDNA erhielt die Bezeichnung pcD2-mpg1.2 (s. Abb. 4). Da die cDNAs der pcD2 - Bank bereits unter der Kontrolle eines eukaryontischen Promotors vorliegen, konnte nun die Funktionalität der isolierten cDNA durch Transfektion in eine geeignete eukaryontische Rezipienten - Zelllinie überprüft werden.

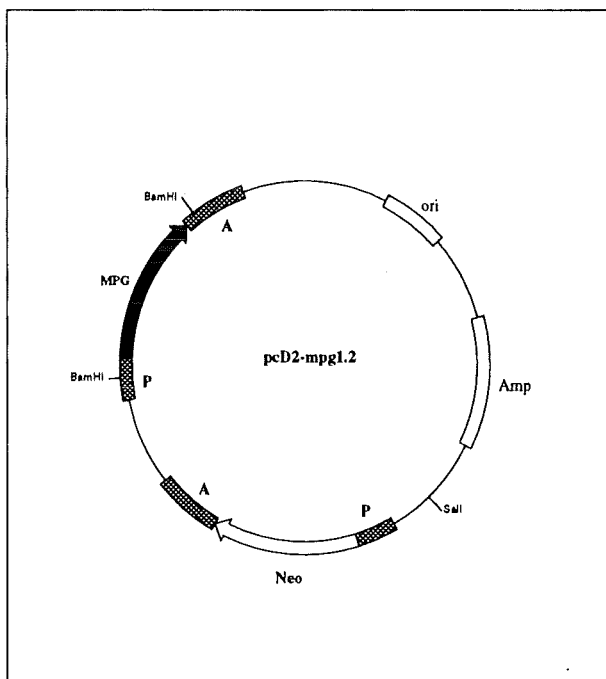


Abb. 4 Schematische Darstellung des Plasmids pcD2-mpg1.2 mit der vollständigen humanen MPG - cDNA. Das Plasmid enthält außerdem das Neomycin - Resistenzgen (Neo), das die Selektion von stabil mit diesem Plasmid transfizierten Säugerzellen mit dem Antibiotikum G 418 erlaubt. Beide Gene stehen unter der Transkriptionskontrolle des viralen frühen SV40 - Promotors (P) und besitzen nachgeschaltete SV40 - Polyadenylierungssignale (A). Amp R = Ampicillin - Resistenzgen, ori = Replikationsursprung

1.2. Transfektion der cDNA der N-Methylpurin-DNA-Glykosylase in CHO-9 - Zellen und Analyse der zellulären Resistenz transgener Zelllinien gegenüber Behandlung mit Alkylantien

Mit Hilfe eines *E. coli* - Stammes, der in beiden Glykosylase - Genen (tag und alk A) mutiert ist, konnte gezeigt werden, daß die durch Alkylantien verursachten 3-Methyladenin - Schäden toxisch für die Zelle sind. Die Überexpression des Tag - Proteins führte in diesen Mutanten zur erhöhten Resistenz gegenüber Alkylantien (Karran et al., 1982, Lindahl et al., 1988). Es war daher interessant, herauszufinden, ob das verstärkte Entfernen von 3-Methyladenin auch in Säugerzellen zur erhöhten Resistenz gegenüber Alkylantien führt. Da aber keine Zelllinie

bekannt ist, die in der MPG mutiert ist, sollte dies durch Überexpression der humanen MPG in der etablierten Nagerzelllinie CHO-9 überprüft werden. Die Expression der MPG - cDNA in der Nagerzelllinie wird durch den frühen viralen SV40 - Promotor (SV40 = Simian Virus 40) ermöglicht. Das ebenfalls im pcD2 - Vektor enthaltene Neomycin - Resistenzgen erlaubt die Selektion von stabil mit der MPG - cDNA transfizierten CHO-9 - Zellklonen durch das Antibiotikum G 418 (= Neomycin).

Es wurden mehrere Transfektionen mit dem in dieser Arbeit isolierten Plasmid pcD2-mpg1.2 durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde Lachsspermien - DNA mit pSV2neo und als Positivkontrolle das Plasmid pSV2mgmt mit pSV2neo kotransfiziert. pSV2neo enthält das Neomycin - Resistenzgen. pSV2mgmt kodiert für das in CHO-9 - Zellen nicht exprimierte MGMT - Protein, das sehr effizient O⁶-Methylguanin - Schäden entfernt (Tano et al., 1990, Kaina et al., 1991b), eine Basenmodifikation, die bei der Behandlung von Zellen mit alkylierenden Agenzien entsteht.

Zelllinie	Mittlere Anzahl von Zellkolonien nach Behandlung mit:				
	MNNG		MMS		
	12,5 µM	15,0 µM	1,5 mM	2,0 mM	2,5 mM
CHO-9	1.7	0.3	9.5	1.3	0
C neo	11.0	6.5	4.7	4.7	0
C mpg	5.3	1.0	3.0	0.7	0
C mgmt	1195.0	740.7	n. b.	n. b.	n. b.

Tab. 1 Überlebensfähigkeit von transgenen CHO-9 - Zelllinien nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien: Das humane MPG - Gen führt nicht zu einer Erhöhung der zellulären Resistenz der CHO-9 - Zellen.

Für die Transfektionen wurden je 20 µg DNA eingesetzt, wobei pSV2neo zu 10% enthalten war. Nach 10tägiger Selektion mit G 418 wurden pro Transfektionsansatz (je 2 10 cm - Kulturschalen) ca. 100 - 200 stabile Neomycin - resistente Transfektantenklone erhalten. Diese wurden geerntet, vereinigt und als gemischte Zellpopulation zu 1 x 10⁵ Zellen pro 10 cm - Kulturschale eingesät. Nach 6 h wurde MNNG bzw. MMS für 1 h zugegeben. Nach 10 Tagen wurden überlebende Zellklone fixiert, gefärbt und gezählt. Die Werte stellen Mittelwerte von je 2 Platten aus insgesamt 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Plattierungseffizienz betrug 40 - 50 %.

C neo = CHO-9 - Zellen mit Lachsspermien - DNA und dem Plasmid pSV2neo transfiziert, C mpg = CHO-9 - Zellen mit dem Plasmid pcD2-mpg1.2 transfiziert, C mgmt = CHO-9 - Zellen mit dem Plasmid pSV2mgmt und pSV2neo transfiziert, n. b. = nicht bestimmt

Nach Transfektion und G 418 - Selektion wurden jeweils 100 bis 200 stabile Neomycin - resistente Zellklone pro Transfektionsansatz erhalten. Die Zellklone jedes Transfektionsansatzes wurden geerntet und als gemischte Zellpopulation für die anschließende Selektion mit den Alkylantien MMS und MNNG eingesetzt (s. Methoden 1.3.1). Wie die Tabelle 1 zeigt, führt

die Transfektion der MPG - cDNA des Plasmides pcD2-mpg1.2 in den Selektionsexperimenten mit MMS und MNNG nicht zur erhöhten Resistenz der CHO-9 - Zellen, verglichen mit den nicht transfizierten CHO-9 - Zellen und den Neomycin - resistenten CHO-9 - Kontrollen, die durch Transfektion mit Lachsspermien - DNA und dem Plasmid pSV2neo erhalten worden waren. Verglichen mit den CHO-9neo - Transfektanten ist sogar eine geringfügige Sensitivierung gegenüber den angewendeten Alkylantien erkennbar. Im Unterschied dazu zeigen die mit pSV2mgmt stabil transfizierten CHO-9 - Zellklone eine deutliche Resistenzzunahme gegenüber MNNG (mit MMS wurde in diesem Fall nicht selektioniert).

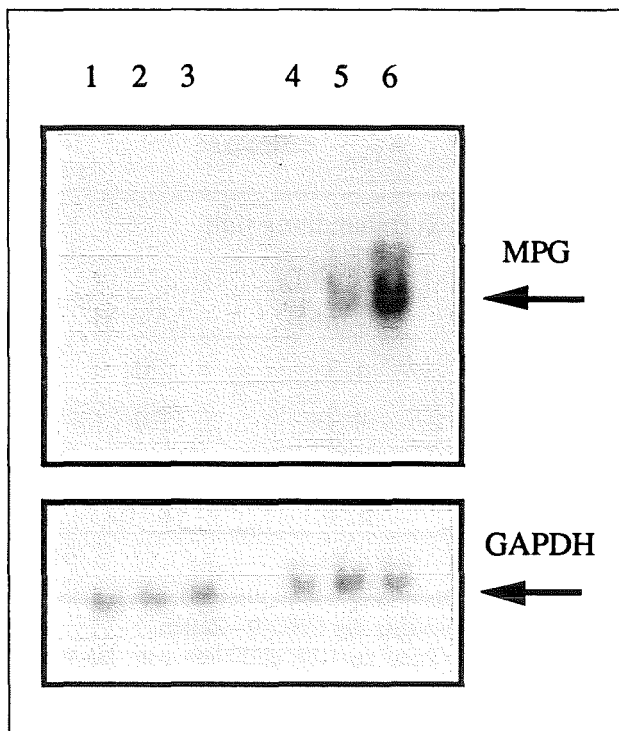


Abb. 5 Autoradiogramm gelelektrophoretisch aufgetrennter Gesamt - RNA aus CHO-9 - Zellen nach Hybridisierung mit der MPG - cDNA: stabil mit der pcD2-mpg1.2 transfizierte CHO-9 - Zellklone zeigen Transkription der humanen MPG - cDNA.

Nach Isolierung der Gesamt - RNA wurde diese in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Nach der Hybridisierung mit der radioaktiv markierten MPG - cDNA wurde stringent ($1 \times \text{SSC}$) gewaschen und ein Autoradiogramm erstellt. In einer nachfolgenden Kontrollhybridisierung wurde eine radioaktiv markierte GAPDH - Sonde auf identische Weise eingesetzt. In den einzelnen Bahnen wurde mRNA der folgenden Zelllinien aufgetragen: 1 = nicht transfizierte CHO-9 - Zellen, 2 und 3 = mit pSV2neo transfizierte CHO-9 - Zellen, 4 - 6 = mit pcD2-mpg1.2 transfizierte CHO-9 - Zellen (Der Klon, dessen RNA in Bahn 6 analysiert wurde trägt in der Publikation von Ibeanu et al. (1992) die Bezeichnung TK91/9-MPG-C7)

Diese Selektionsexperimente wurden durch die Untersuchung individueller Zellklone ergänzt. Hierbei wurde auch geprüft, ob die transfizierte MPG - cDNA in den CHO-9 - Transfektanten transkribiert wird. Dazu wurden G 418 - resistente Zellklone aus der Transfektion mit dem Plasmid pcD2-mpg1.2 isoliert, gesamt - RNA präpariert und nach Agarosegelelektrophorese im *Northern Blot* - Verfahren auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend wurde die membrangebundene RNA mit der MPG - cDNA (EcoRI - Fragment aus pPG23 s. Abb. 1) hybridisiert. Wie das Autoradiogramm in der Abb. 5 zeigt, weisen einige der CHO-9 - Transfektantenklone eine deutliche MPG - Transkription auf. Da die entsprechenden

Kontrollzellklone unter den gleichen Versuchsbedingungen kein Hybridisierungssignal aufweisen, kann man schlußfolgern, daß die erhöhte Menge an MPG - mRNA in den CHO-9 - Transfektantenklonen aus der Transfektion mit der humanen MPG - cDNA resultiert.

Es wurde auch gezeigt (Hartenstein, 1992, Ibeanu et al. 1992), daß der CHO-9mpg - Transfektantenklon, der im Autoradiogramm der Abb. 5 (Bahn 6) das stärkste Hybridisierungssignal mit der MPG - Sonde zeigte, in vivo und in vitro mehr 3-Methyladenin und 7-Methylguanin pro Zeiteinheit aus alkylierter DNA entfernt, als entsprechende Kontrollzellklone. Damit war nachgewiesen, daß durch die Transfektion der MPG - cDNA in Hamsterzellen die Entfernung von potentiell toxischen Alkylierungsschäden tatsächlich verstärkt worden war.

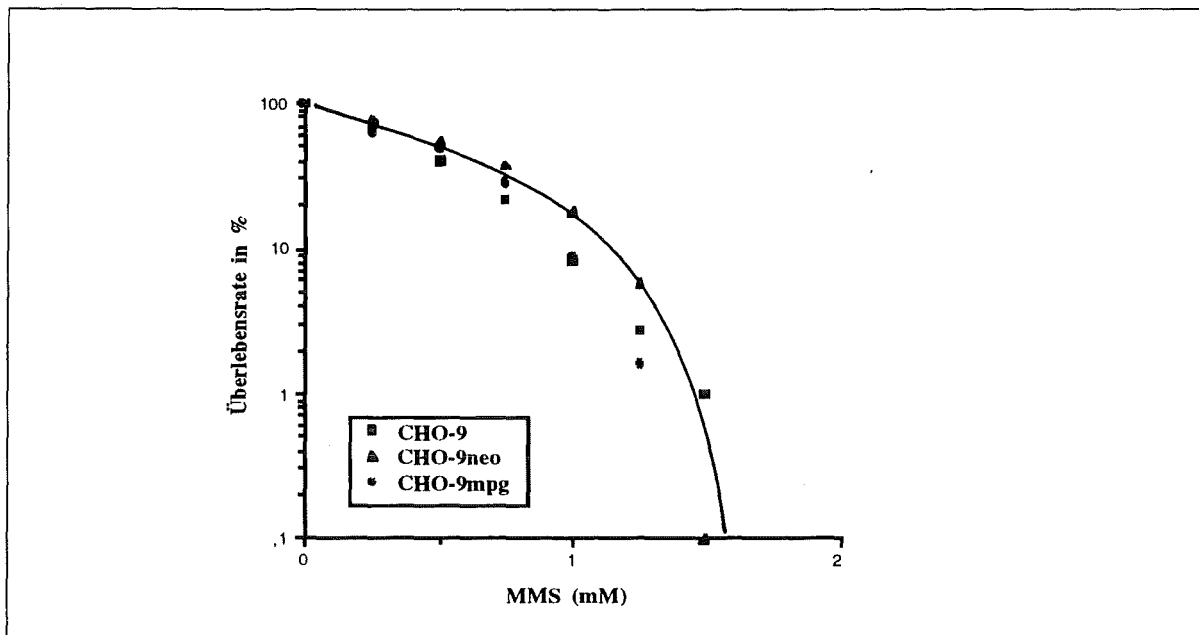


Abb. 6 Überlebenskurve eines CHO-9mpg - Zellklons im Vergleich mit einer nicht transfizierten CHO-9 - Zelllinie und einer mit pSV2neo transfizierten CHO-9 - Zelllinie: Die Expression der humanen MPG - cDNA führt nicht zur erhöhten Resistenz der transfizierten CHO-9mpg - Zelllinie gegenüber Behandlung mit MMS. Es wurden definierte Zellzahlen jeder Zelllinie eingesät und nach 6 h für 1 h mit der angegebenen MMS - Konzentration behandelt. Nach 8 - 10 Tagen wurden die Zellkolonien fixiert, gefärbt und gezählt. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen. CHO-9 = nicht transfizierte CHO-9 - Zelllinie, CHO-9neo = mit pSV2neo stabil transfizierte CHO-9 - Zelllinie, CHO-9mpg (= TK91/9-MPG-C7) = mit pcD2-mpg1.2 stabil transfizierte CHO-9 - Zelllinie.

Derselbe Transfektantenklon wurde außerdem in Dosis - Effekt - Versuchen gegenüber steigenden Dosen von MMS getestet. Wie der Verlauf der Überlebenskurven in der Abb. 6 zeigt, besitzt dieser Zellklon, verglichen mit der nicht transfizierten CHO-9 - Zelllinie und einem nur mit pSV2neo transfizierten CHO-9 - Zellklon, keine erhöhte Resistenz gegenüber MMS.

1.3. Transfektion einer MPG - *antisense* - cDNA in die CHO-9 - Zelllinie

Da die Überexpression der N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) in CHO-9 - Zellen nicht zur Erhöhung ihrer Resistenz gegenüber alkylierenden Agenzien führte, wurde in einem alternativen experimentellen Ansatz untersucht, ob durch Herabsetzen der endogenen Glykosylaseaktivität der CHO-9 - Zellen eine Sensitivierung dieser Zelllinie gegenüber Alkylantien erreicht werden kann. Da es keine MPG - defizienten Zelllinien gibt, sollte eine Verringerung der endogenen Glykosylase - Aktivität der CHO-9 - Zellen durch stabile Transfektion eines MPG - *antisense* - Konstruktes versucht werden. In diesem Konstrukt wird die MPG - cDNA von ihrem 3' - Ende her transkribiert, so daß eine *antisense* - mRNA entsteht. Die *antisense* - RNA hybridisiert in der Zelle mit der endogen synthetisierten MPG - *sense* - RNA und sollte dadurch die Synthese des Glykosylaseproteins verhindern.

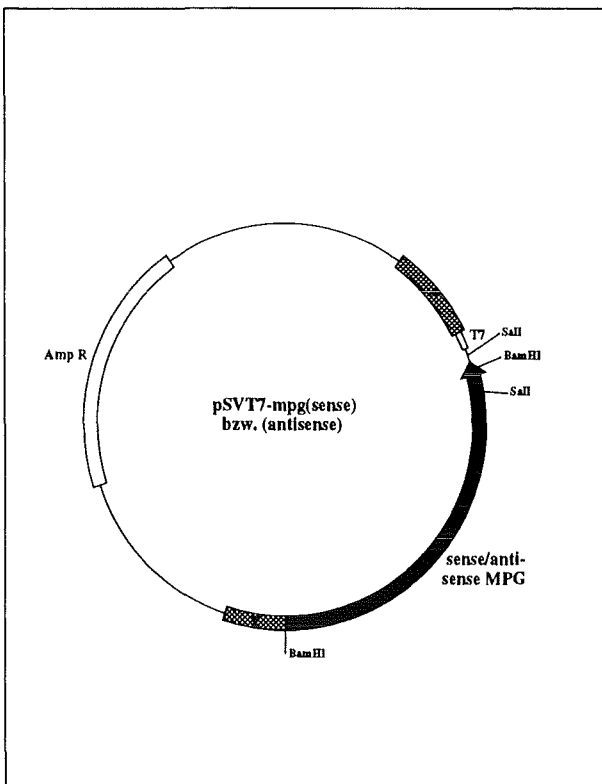


Abb. 7 Schematische Darstellung des Plasmides pSVT7-mpg(*sense*) bzw. (*antisense*). Das eukaryontische Expressionsplasmid pSVT7 enthält die MPG - cDNA in *sense* bzw. *antisense* - Orientierung. P = früher SV40 - Promotor, A = SV40 - Polyadenylierungssignal, T7 = T7 - Promotor, Amp R = Ampicillin - Resistenzgen.

Zur Herstellung des MPG - *antisense* -Konstruktes wurde die MPG - cDNA durch BamHI - Verdau aus dem Plasmid pcD2-mpg1.2 isoliert. Die Klonierung des BamHI - cDNA - Fragmentes in den eukaryontischen Expressionsvektor pSVT7 erfolgte ungerichtet, da dieser durch BamHI - Verdau linearisiert worden war und das Fragment daher während der Ligation in zwei verschiedenen Orientierungen inserieren konnte. Da die MPG - cDNA eine interne Sall - Schnittstelle besitzt, konnten durch Restriktionsanalyse der rekombinanten Plasmid - DNA aus transformierten *E. coli* - Klonen, sowohl das pSVT7-mpg(sense) - als auch pSVT7-mpg(antisense) - Plasmid isoliert werden (s. Abb. 7). Die Plasmide pSVT7-mpg(sense) und pSVT7-mpg(antisense) wurden jeweils zur stabilen Transfektion von CHO-9 - Zellen eingesetzt, wobei das Neomycin - Resistenzgen auf dem Plasmid pSV2neo kotransfiziert wurde. CHO-9 - Zellen, die mit Lachsspermien - DNA und pSV2neo kotransfiziert worden waren, dienten als Negativkontrollen. Es wurden 90 bis 150 unabhängige G 418 - resistente Zellklone pro Transfektionsansatz erhalten, die als gemischte Zellpopulation für die Mutageneselektion mit MMS und MNNG eingesetzt wurden (s. Methoden 1.3.1.). Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich ist, führt die Transfektion der MPG - *antisense* - cDNA nicht zu einer veränderten Sensitivität der Transfektanten gegenüber MMS und MNNG. Die Mutageneselektion der Transfektantenklone, die mit dem pSVT7-mpg(sense) - Plasmid stabil transfiziert worden waren, führt analog zu dem Ergebnis, das bereits mit dem pcD2-mpg1.2 - Plasmid (s. Tabelle 1) erhalten worden war, nicht zur Erhöhung der Resistenz der CHO-9 - Zelllinie.

Zelllinie	Mittlere Anzahl von Zellkolonien nach Behandlung mit:			
	MNNG		MMS	
	12.5 μ M	15.0 μ M	1.5 mM	2.0 mM
C neo	88.3	7.5	11.3	5.0
C mpg(s)	101.0	1.3	0.7	0.7
C mpg(a)	115.3	5.3	7.7	0.0

Tab. 2 Überlebensfähigkeit von CHO-9 - Zellen nach stabiler Transfektion mit *sense* - und *antisense* - MPG - cDNA: Die Transfektion mit dem *antisense* - MPG - Konstrukt führt nicht zur erhöhten Sensitivierung der CHO-9 - Zelllinie gegenüber Alkylantien.

Für die Transfektionen wurden je 20 μ g DNA eingesetzt, wobei pSV2neo zu 10% enthalten war. Nach 10tägiger Selektion mit G 418 wurden pro Transfektionsansatz (je 2 10 cm - Kulturschalen) ca. 90 bis 150 stabil Neomycin - resistente Transfektanten erhalten. Diese wurden geerntet, vereinigt und als gemischte Zellpopulation zu 1×10^6 Zellen pro 10 cm Kulturschale eingesät. Nach 6 h wurde MNNG bzw. MMS für 1 h zugegeben. Nach 10 Tagen wurden überlebende Zellklone fixiert, gefärbt und gezählt. Die Werte stellen Mittelwerte von je 2 Platten aus insgesamt 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Plattierungseffizienz betrug 40 bis 50%.

C neo = CHO-9 - Zellen mit Lachsspermien - DNA und dem Plasmid pSV2neo transfiziert, C mpg(s) = CHO-9 - Zellen mit den Plasmiden pSVT7-mpg(sense) und pSV2neo transfiziert, C mpg(a) = CHO-9 - Zellen mit den Plasmiden pSVT7-mpg(antisense) und pSV2neo transfiziert.

2. Klonierung und Charakterisierung der humanen Apurinen Endonuklease und Analyse transgener CHO-9 - Zelllinien

Da die humane Apurine Endonuklease (APE) zu Beginn der Durchführung dieser Arbeit noch nicht kloniert worden war, war eine Zielsetzung das Gen dieses Reparaturenzyms zu isolieren. Analog zur Klonierung der N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (Chakravarti et al., 1991) wurde versucht, durch Transformation einer spezifischen *E. coli* - Mutante mit humaner cDNA das gesuchte Gen zu isolieren. Die Mutante BW528 (xth⁻, nfo⁻) ist in der Exonuklease III und der Endonuklease IV, die die meiste Apurine Endonuklease - Aktivität in *E. coli* ausmachen, defekt und daher hypersensitiv gegenüber MMS und Wasserstoffperoxid (Cunningham et al., 1986). Aus transformierten *E. coli* - Klonen konnte eine cDNA isoliert werden, die jedoch 100%ige Sequenzhomologie zum humanen Elongationsfaktor 2 zeigte und daher nicht als die gesuchte Sequenz des Reparaturenzyms in Frage kam. Während dieser Arbeiten gelang Demple et al. (1991) die Klonierung der APE des Menschen durch Absuchen einer humanen Expressions - cDNA - Bank mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das gereinigte Reparaturenzym. Um die Sequenz des APE - Gens in einen Expressionsvektor zu klonieren, wurde ihre cDNA schließlich durch Anwendung der Polymerase - Kettenreaktion (PCR) aus einer Plasmid - Präparation der pcD2 - Genbank amplifiziert.

2.1. PCR - Klonierung der humanen Apurinen Endonuklease aus der pcD2 - Genbank

Zur publizierten Sequenz der humanen APE (Demple et al., 1991) wurden Oligonukleotide synthetisiert, die aufgrund ihrer Komplementarität an die außerhalb der kodierenden Sequenz der cDNA liegenden 5'- bzw. 3'- Enden der Sequenz binden (s. Abb. 8 A). Mit Hilfe dieser spezifischen Oligonukleotide wurde eine Polymerase - Kettenreaktion (PCR) an einer Plasmid - DNA - Präparation der pcD2 - Genbank (Chen et al., 1987) durchgeführt. Die gesamte PCR - Reaktion wurde anschließend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Wie die Abb. 8 B zeigt, konnte ein Fragment definierter Länge amplifiziert werden. Das Fragment, das mit einer Länge von ca. 1.0 kb die Länge der humanen APE - cDNA hat, wurde durch Elution aus dem Agarosegel isoliert. In die zur PCR - Amplifikation synthetisierten Oligonukleotide waren zusätzlich durch gezielten Basenaustausch Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI (5'- Oligonukleotid) und BamHI (3'- Oligonukleotid) eingeführt worden (s. Abb. 8 A). Da diese Enzyme nicht in der APE - cDNA schneiden, konnte das gereinigte cDNA - Fragment nach Doppelverdau mit diesen beiden Enzymen gerichtet in den eukaryontischen Expressionsvektor pCMVT7 inkloniert werden. In diesem Vektor steht die cDNA unter der Transkriptionskontrolle des starken viralen CMV - Promotors (CMV = Cytomegalie Virus) (s. Abb. 8 C).

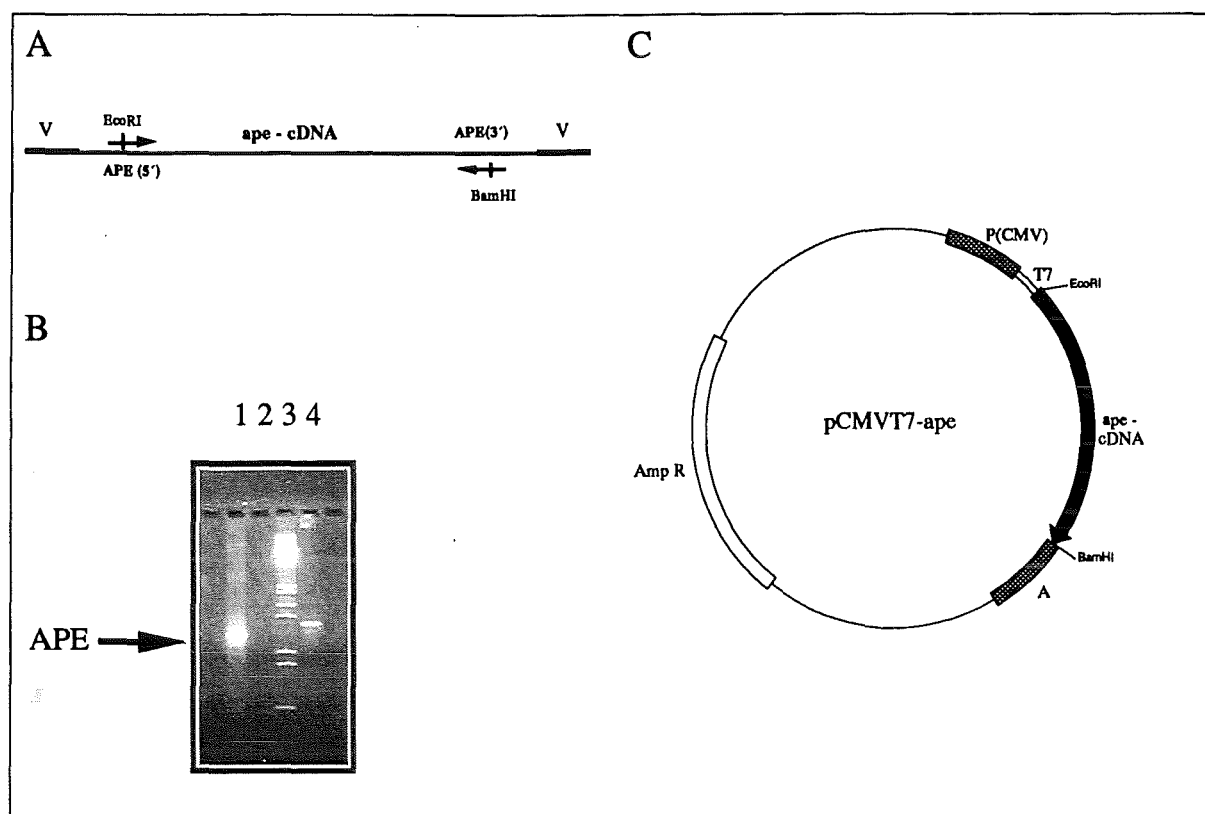


Abb. 8 PCR - Klonierung der humanen APE - cDNA.

In (A) ist schematisch das Prinzip der Amplifikation der humanen APE-cDNA dargestellt. Die Oligonukleotide APE(5') und APE(3') binden an komplementäre Sequenzen außerhalb des kodierenden cDNA - Bereiches (ape - cDNA) und fungieren als Startermoleküle für die DNA - Synthese in der PCR. APE(5') enthält eine EcoRI - Schnittstelle, APE(3') enthält eine BamHI - Schnittstelle. Die genaue Sequenz der Oligonukleotide ist im Materialteil aufgeführt. V = pcD2 - Vektorsequenz.

Das Foto in (B) zeigt die im Agarosegel aufgetrennte PCR - Reaktion, die mit den genannten Oligonukleotiden an einer Plasmidpräparation der pcD2 - cDNA - Bank durchgeführt wurde. Es wurde ein Fragment mit einer Länge von 1.0 kb amplifiziert, welches der Länge der APE - cDNA entspricht (APE). 1 = PCR - Reaktion, 2 = Negativkontrolle der PCR - Reaktion, 3 = Größenmarker, 4 = Positivkontrolle der PCR - Reaktion.

In (C) ist das Plasmid pCMVT7-ape schematisch dargestellt. Es enthält die gerichtet einklonierte APE - cDNA unter der Transkriptionskontrolle des viralen CMV - Promotors (P(CMV)). T7 = T7 - Promotor, A = SV40 - Polyadenylierungssignal, Amp R = Ampicillin - Resistenzgen.

Der Beweis dafür, daß tatsächlich die cDNA der humanen APE kloniert worden war, wurde durch Ansequenzieren der 3'- und 5'- Enden der amplifizierten Sequenz geführt. Die Sequenzierung, für die dieselben Oligonukleotide verwendet wurden, wie für die PCR, ergab 100%ige Homologie der ansequenzierten Bereiche von je 100 Nukleotiden, mit der publizierte Sequenz der humanen APE (Demple et al., 1991).

2.2. Expression der humanen Apurinen Endonuklease in CHO-9 - Zellen

Durch die Überexpression einzelner Reparaturenzyme kann geprüft werden, ob die normalerweise in der Zelle vorhandene Konzentration des untersuchten Proteins einen limitierenden Einfluß auf den gesamten Reparaturprozess hat. Für die humane MPG, die stabil in CHO-9 - Zellen transfiziert worden war, war zuvor gezeigt worden, daß ihre Überexpression nicht mit einer Zunahme der Resistenz der Transfektantenklone gegenüber alkylierenden Agenzien einhergeht. In einem analogen experimentellen Ansatz sollte nun geprüft werden, ob eine verstärkte Expression der humanen APE in CHO-9 - Transfektanten zu einer Erhöhung der Resistenz der Zellen nach Behandlung mit DNA schädigenden Agenzien führt. Parallel wurde eine CHO-9 - Zelllinie, die bereits die humane MPG überexprimiert, stabil mit dem Gen der humanen APE transfiziert. Durch Etablieren dieser Doppeltransfektanten konnte geprüft werden, ob die APE in CHO-9 - Zellen limitierend in der Exzisionsreparatur von DNA - Schäden wirkt. Sollte dies zutreffen, so war zu erwarten, daß die apurinen Stellen, die durch die Überexpression der humanen MPG in CHO-9mpg - Zelllinien vermehrt gebildet werden nicht schnell genug repariert werden. Das wiederum würde die ausbleibende Resistenzzunahme dieser Zelllinie gegenüber Alkylantien erklären. Es wurde daher in Dosis - Effekt - Versuchen mit alkylierenden Agenzien untersucht, ob das beschleunigte Entfernen der apurinen Stellen durch das gleichzeitige Überexprimieren der MPG und der APE, die Überlebensrate der CHO-9 - Zellen erhöht. Dies könnte man erwarten, sofern die Kapazität der in der Exzisionsreparatur nachfolgenden Enzyme ausreicht, um die von der MPG und der APE eingeleiteten Reparaturprozesse zu Ende zu führen.

2.2.1. Transfektion der Zelllinien CHO-9 und CHO-9mpg mit der humanen APE-cDNA

Für die Transfektion der CHO-9 - und CHO-9mpg - Zelllinien wurde die Methode der Kalziumphosphat - Kopräzipitation eingesetzt. Zur Herstellung stabiler Transfektanten der CHO-9 - Zelllinie wurde das Plasmid pCMVT7-ape, das die in dieser Arbeit durch PCR klonierte APE-cDNA enthält, zusammen mit dem pSV2neo - Plasmid transfiziert. Für die Selektion von stabilen APE - exprimierenden Transfektanten der Zelllinie CHO-9mpg, die schon das Neomycin - Resistenzgen exprimiert, mußte ein Plasmid mit einem anderen Resistenzgen kotransfiziert werden. Für die Transfektion dieser Zelllinie wurde daher das Plasmid pCMVT7-ape mit dem Plasmid pSV2hygro kotransfiziert, das für das Hygromycin B - Resistenzgen kodiert. In einer Kontrolltransfektion wurde Lachsspermien - DNA mit dem pSV2hygro - Plasmid in die CHO-9mpg - Zelllinie kotransfiziert. Nach der Selektion mit 1.5 mg/ml G 418 konnten von der mit dem APE - Gen transfizierten CHO-9 - Zelllinie stabil

G 418 - resistente Zellklone isoliert werden. Von der CHO-9mpg - Zelllinie, die mit dem APE - Gen transfiziert worden war, wurden Zellklone isoliert, die sowohl gegen Hygromycin B (0.2 mg/ml) als auch gegen G 418 (1.5 mg/ml) resistent waren.

2.2.2. Northern Blot - Analyse von stabil mit der APE - cDNA transfizierten CHO-9 - Zelllinien

Da die APE - cDNA unter der Kontrolle des starken viralen CMV - Promotors steht, wurde eine hohe Transkriptionsrate der transfizierten humanen cDNA in den CHO-9 - Zellen erwartet.

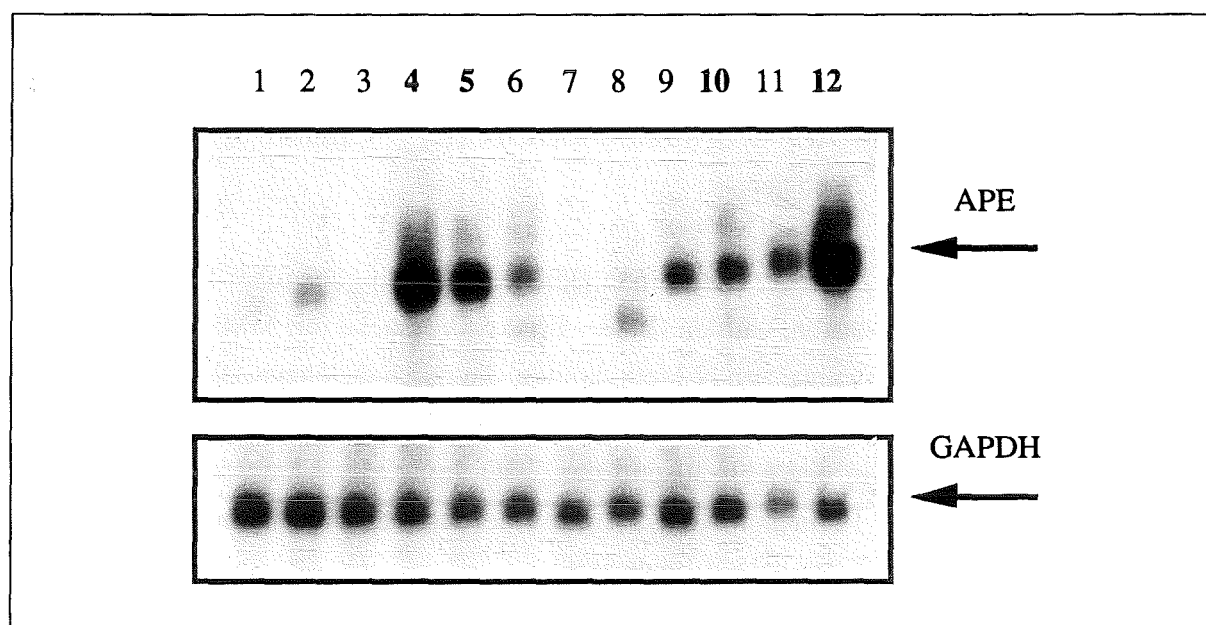


Abb. 9 Autoradiogramm gelelektrophoretisch aufgetrennter Gesamt - RNA aus transgenen CHO-9 - Zelllinien nach Hybridisieren mit der APE - cDNA: Einige der stabil mit der APE - cDNA transfizierten CHO-9 - und CHO-9mpg - Zelllinien zeigen hohe Transkriptionsaktivität des humanen DNA - Reparaturgens. Nach Präparation und gelelektrophoretischer Auftrennung der Gesamt - RNA wurde diese auf eine Nylonmembran übertragen und mit der radioaktiv markierten humanen APE - cDNA hybridisiert. Nach Waschen mit mittlerer Stringenz (1 x SSC) wurde die Autoradiographie durchgeführt. Zum Überprüfen auf gleiche aufgetragene RNA - Mengen wurde die Membran analog mit einer GAPDH - Sonde rehybridisiert. In den einzelnen Bahnen wurde Gesamt - RNA der folgenden stabil transfizierten Zelllinien analysiert: 1 = CHO-9; 3 = CHO-9 mit pSV2neo (CHO-9(neo)); 2, 4, 5, 9, 11 = CHO-9 mit pCMVT7-ape und pSV2neo (CHO-9ape); 7 = CHO-9mpg mit pSV2hygro (CHO-9mpg(hygro)); 6, 8, 10, 12 = CHO-9mpg mit pCMVT7-ape und pSV2hygro transfiziert (CHO-9mpg,ape). Der Inhalt der Klammern in dieser Legende stellt den Namen der transgenen Zelllinie dar. Zusammen mit der Nummer der Bahn in diesem Autoradiogramm kennzeichnet er einen bestimmten Klon. Die fettgedruckten Bahn - Nummern dieses Autoradiogramms markieren die Klone, die in Dosis - Effekt - Versuchen analysiert wurden (s. Abb. 10)

Um die Transkriptionsaktivität zu analysieren, wurde von mehreren stabil Neomycin - resistenten CHO-9 - Zellklonen und von mehreren stabil Hygromycin B (+ Neomycin) - resistenten CHO-9mpg - Zellklonen die Gesamt - RNA präpariert und, nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel, im *Northern Blot* - Verfahren auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit der APE - cDNA, die aus dem Plasmid pCMVT7-ape isoliert worden war. Die gleichmäßige Beladung des Filters mit der RNA wurde anschließend durch Hybridisieren mit der GAPDH - cDNA der Ratte geprüft. Wie das Autoradiogramm in der Abb. 9 zeigt, weisen sowohl einige der CHO-9ape - Transfektantenklone als auch einige der CHO-9mpg,ape - Doppeltransfektantenklone eine deutliche Transkription des transfizierten humanen Gens auf. Die RNA - Präparationen der Kontrollen (CHO-9(neo) und CHO-9mpg(hygro)) zeigen bei den verwendeten Hybridisierungsbedingungen von mittlerer Stringenz nur schwache Hybridisierungssignale, die vermutlich auf Kreuzhybridisierung mit dem endogenen APE - Transkript der Hamsterzellen beruhen.

2.2.3. Analyse der stabil mit der APE - cDNA transfizierten CHO-9 - Zelllinien in Dosis - Effekt - Versuchen mit alkylierenden Agenzien

Um die zelluläre Empfindlichkeit der transgenen Hamsterzelllinien gegenüber der toxischen Wirkung von Alkylantien zu testen, wurden Dosis - Effekt - Versuche mit MMS und MNNG durchgeführt. Beide Agenzien induzieren N-Methylpurine, die durch die enzymatische Aktivität der MPG und der APE repariert werden. Es wurden je zwei Zellklone der CHO-9ape - (Zellklone Nr. 4 und Nr. 5 in der Abb. 9) und der CHO-9mpg,ape - Transfektantenklone (Zellklone Nr. 10 und Nr. 12 in der Abb. 9), die eine stark erhöhte Transkription des transfizierten humanen APE - Gens zeigen, analysiert.

Es wird deutlich, daß die Zellklone CHO-9ape(4) und CHO-9ape(5), die nur mit dem humanen APE - Gen transfiziert worden waren, keine erhöhte zelluläre Resistenz gegenüber den eingesetzten Alkylantien zeigen (s. Abb. 10 A und B). Im Gegensatz dazu zeigen die Zellklone CHO-9mpg,ape(10) und CHO-9mpg,ape(12), die nach Transfektion beider humaner Reparaturgene erhalten worden waren, einen signifikanten Anstieg ihrer zellulären Resistenz (s. Abb. 10 C und D).

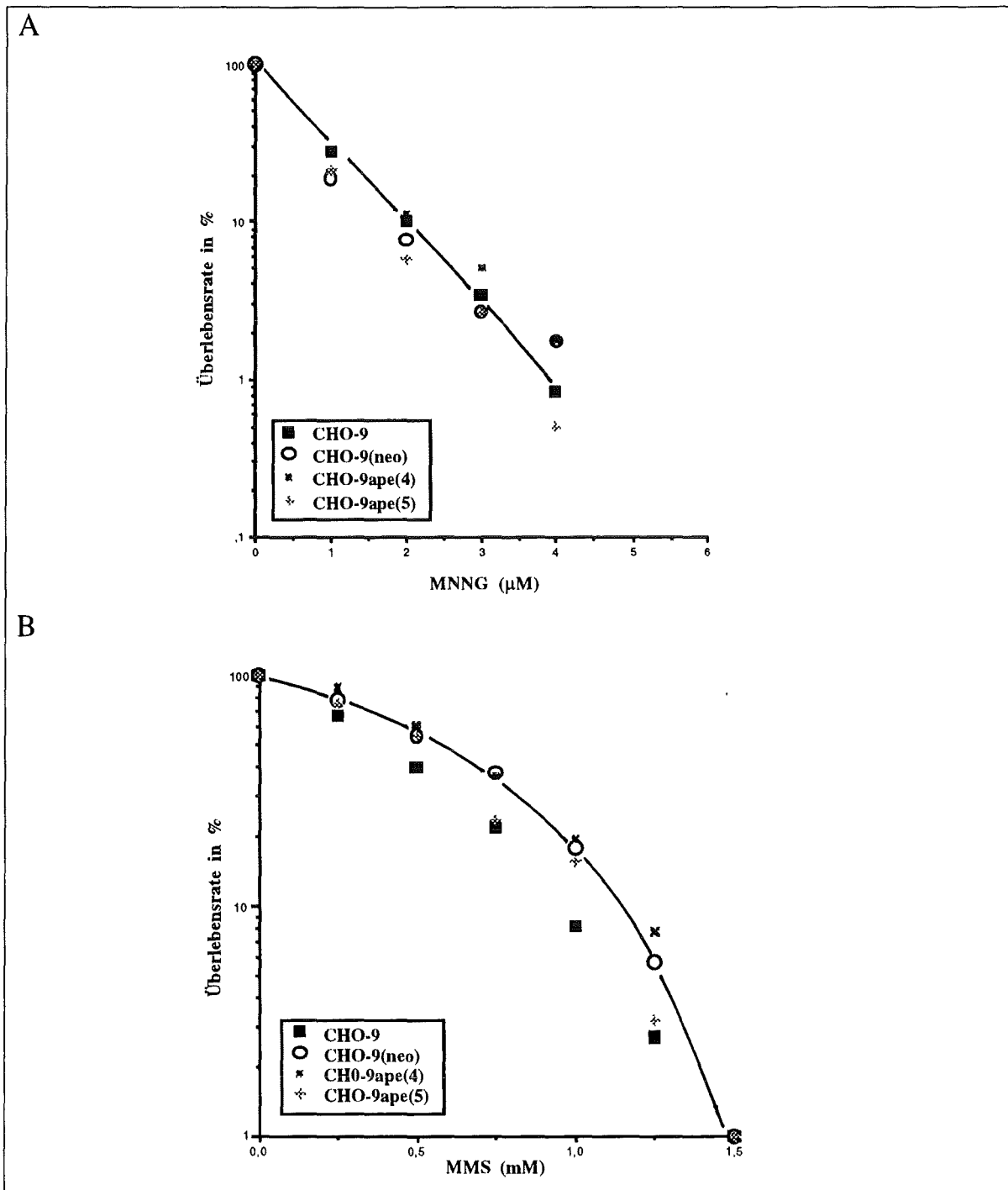


Abb. 10 A und B Dosis - Effekt - Kurven von stabil mit der humanen APE - cDNA transfizierten CHO-9 - Zelllinien im Vergleich zu nicht transfizierten CHO-9 - Zellen und einer mit pSV2neo stabil transfizierten Zelllinie: Die CHO-9ape - Zelllinien zeigen, verglichen mit der Ausgangszelllinie CHO-9, keine erhöhte zelluläre Resistenz gegenüber den monofunktionellen Alkylantien MMS und MNNG.

Es wurde eine definierte Zellzahl jeder Zelllinie in Kulturschalen eingesät und nach 6 h für 1 h in den angegebenen Dosierungen mit den Alkylantien behandelt. Nach 8 - 10 Tagen konnten die Kolonien fixiert, gefärbt und gezählt werden. Die Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Eingezeichnet ist der Kurvenverlauf des Kontrollzellklons CHO-9(neo). CHO-9(neo) = CHO-9 - Zellen mit pSV2neo, CHO-9ape(4) und (5) = CHO-9 - Zellen mit pCMVT7-ape und pSV2neo stabil transfiziert; Klon Nr. 4 und Nr. 5.

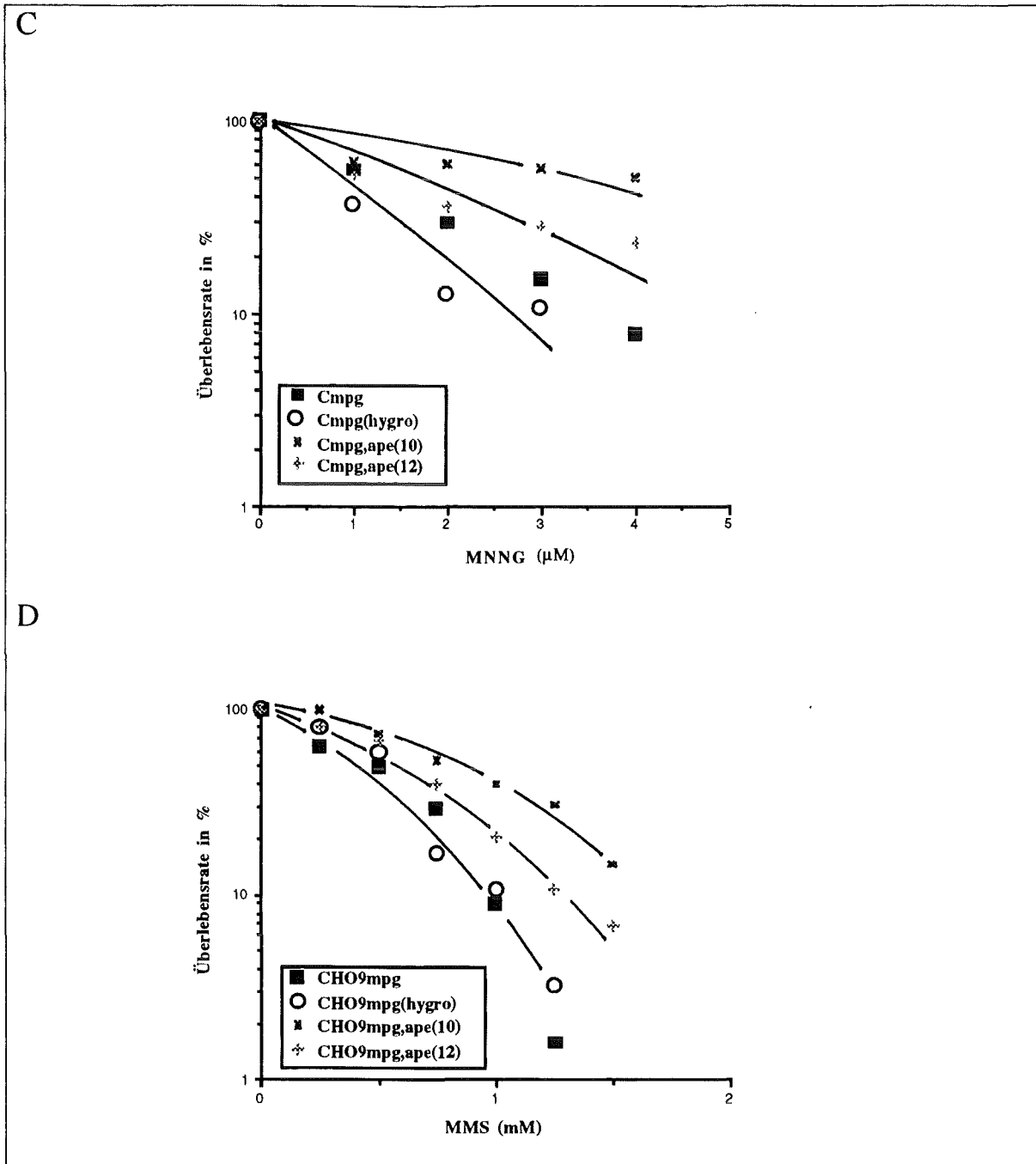


Abb. 10 C und D Dosis - Effekt - Kurven von stabil mit der humanen APE - cDNA transfizierten CHO-9mpg - Zelllinien im Vergleich zu den Kontroll - Zelllinien CHO-9mpg und CHO-9mpg(hygro): Die mit beiden humanen DNA - Reparaturgenen stabil transfizierten CHO-9 - Zelllinien zeigen gegenüber den monofunktionalen Alkylantien MMS und MNNG eine deutlich erhöhte Überlebensrate im Vergleich zu den Kontroll - Zelllinien.

Die Versuche wurden analog zu Abb. 11 A und B durchgeführt. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen. Eingezeichnet sind die Kurven für den Kontrollzellklon CHO-9mpg(hygro) und für die Doppeltransfektanten CHO-9mpg,ape(10) und (12). CHO-9mpg = CHO-9 - Zelllinie, die das humane MPG - Gen exprimiert, CHO-9mpg(hygro) = CHO-9mpg mit pSV2hygro stabil transfiziert, CHO-9mpg,ape(10) und (12) = CHO-9mpg mit pCMVT7-ape und pSV2hygro stabil transfiziert: Klon Nr. 10 und Nr. 12.

2.2.4. Die CHO-9mpg,ape - Doppeltransfektanten zeigen Methyltransferaseaktivität

Verschiedene alkylierende Agenzien verursachen unterschiedliche Alkylierungsmuster an der DNA (Beranek, 1990). Untersuchungen an der DNA von Rattenleberzellen ergaben, daß MNNG wesentlich mehr O⁶-Methylguanin erzeugt als MMS (9.2% gegenüber 0.3% gemessen an der Gesamt - DNA - Alkylierung). Beide Agenzien induzieren vergleichbare Mengen an 3-Methyladenin (MNNG = 8.6 %, MMS = 9.4 %).

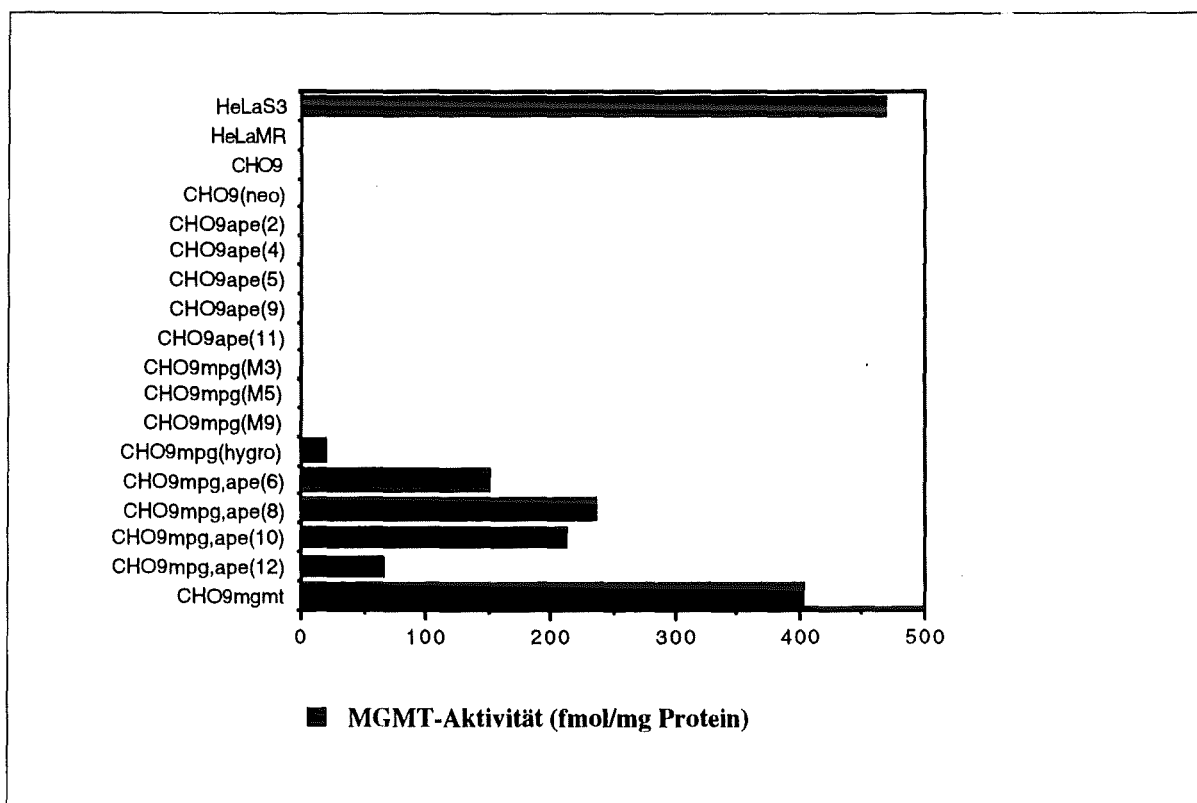


Abb. 11 MGMT - Aktivität in verschiedenen humanen und CHO-9 - Zelllinien: Die CHO-9 - Doppeltransfektanten, die sowohl mit dem humanen MPG - als auch mit dem humanen APE - Gen transfiziert worden waren, zeigen signifikant erhöhte MGMT - Aktivität.

Zur Bestimmung der MGMT - Aktivität wurden 0.1 - 1.0 mg Gesamtzellprotein sowie 50 µl der radioaktiv markierten Substrat - DNA in einem Gesamtreaktionsvolumen von 200 - 500 µl eingesetzt. Nach Ablauf der Enzymreaktion (15 min bei 37 °C) wurde die DNA durch Zugabe von TCA hydrolysiert (10 min bei 90 °C). Nach Ausfällen der Proteine wurde deren gebundene Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Die Aktivität wurde als fmol gebundenes O⁶-Methylguanin pro mg Protein des Zellrohextraktes errechnet. HeLaS3 = humane Cervix - Karzinom - Zelllinie mit Mex⁺ - Phänotyp, HeLaMR = humane Cervix - Karzinom - Zelllinie mit Mex⁻ - Phänotyp, CHO-9 = Fibroblasten - Zelllinie des Chinesischen Hamsters mit Mex⁻ - Phänotyp, CHO-9mgmt = CHO-9 - Zellen stabil mit dem humanen MGMT - Gen transfiziert und daher phänotypisch Mex⁺. Die übrigen Zellklone sind in der Legende der Abb. 9 beschrieben.

O⁶-Methylguanin ist eine für Säugerzellen höchst toxische Läsion, wie Untersuchungen an CHO-9 Zelllinien gezeigt haben, die mit dem humanen O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) - und dem bakteriellen *ada* - Gen (kodiert für eine Alkyltransferase von *E. coli*) transfiziert worden waren (zur Übersicht s. Kaina et al., 1993). Die deutliche Resistenz der CHO-9 - Doppeltransfektanten (CHO-9mpg,ape(10) und (12)) gegenüber MNNG warf die Frage auf, ob diese Zellen das Reparaturprotein MGMT exprimieren, welches den genannten DNA - Schaden repariert.

Ausgehend von dieser Überlegung wurde die MGMT - Aktivität in Zellextrakten der Transfektanten bestimmt. Als Positivkontrollen diente die menschliche Zelllinie HeLaS3 (Mex⁺ - Phänotyp) und eine mit dem humanen MGMT - Gen transfizierte Zelllinie CHO-9mgmt. Als Negativkontrollen dienten die menschliche Zelllinie HeLaMR (Mex⁻ - Phänotyp) und die nicht transfizierte CHO-9 - Zelllinie (Mex⁻ - Phänotyp). Tatsächlich zeigten die Doppeltransfektanten, die in den Dosis - Effekt - Versuchen resistenter gegenüber MNNG waren (CHO-9mpg,ape(10) und (12) s. Abb. 10 C), deutliche MGMT - Aktivität. Neben diesen wurden noch zwei weitere Doppeltransfektanten - Klone getestet, die ebenfalls MGMT - Aktivität zeigten (CHO-9mpg,ape(6) und (8)). Dagegen weisen die transgenen CHO-9 - Zelllinien, die nur ein humanes DNA - Reparaturgen enthalten (fünf CHO-9ape - Zellklone und drei CHO-9mpg - Zellklone), diese Enzymaktivität nicht auf. Sie besitzen also, wie die nicht transfizierte Ausgangszelllinie CHO-9, den Mex⁻ - Phänotyp. Das Auftreten der MGMT - Aktivität scheint nach den vorliegenden Daten spezifisch für die Doppeltransfektanten zu sein.

2.3. Analyse der Induzierbarkeit der humanen Apurinen Endonuklease

Für das Überleben einer Zelle ist eine schnelle Reaktion auf die Induktion von DNA - Schäden, die die Transkription und die Replikation hemmen können, essentiell. In *E. coli* gibt es die gut untersuchten Prozesse der "Adaptiven Antwort" und der SOS - Antwort, die eine zelluläre Reaktion auf DNA - schädigende Ereignisse darstellen. Ausgehend von der Induktion weniger Gene (*ada* für die "Adaptive Antwort", *rec A* für das SOS - System), wird eine ganze Kaskade von DNA - Reparaturgenen aktiviert. In Säugern sind zwei DNA - Reparaturgene bekannt, deren Transkriptionsprodukte durch DNA - Schädigung verstärkt exprimiert werden können. Das ist die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (Fritz et al., 1991), die durch Reversionsreparatur O⁶-Methylguanin aus der DNA beseitigt, und die β -Polymerase, die für die Reparatursynthese der DNA in der Exzisionsreparatur zuständig ist (Fornace et al., 1989). Für die N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) konnte Hartenstein (1992) eine schwache Induktion auf RNA - Ebene sowie eine deutliche Induktion auf Proteinebene nach Behandlung

mit Alkylantien und ionisierenden Strahlen nachweisen. Es war daher von Interesse herauszufinden, ob auch die humane APE nach Behandlung mit DNA - schädigenden Agenzien induziert werden kann.

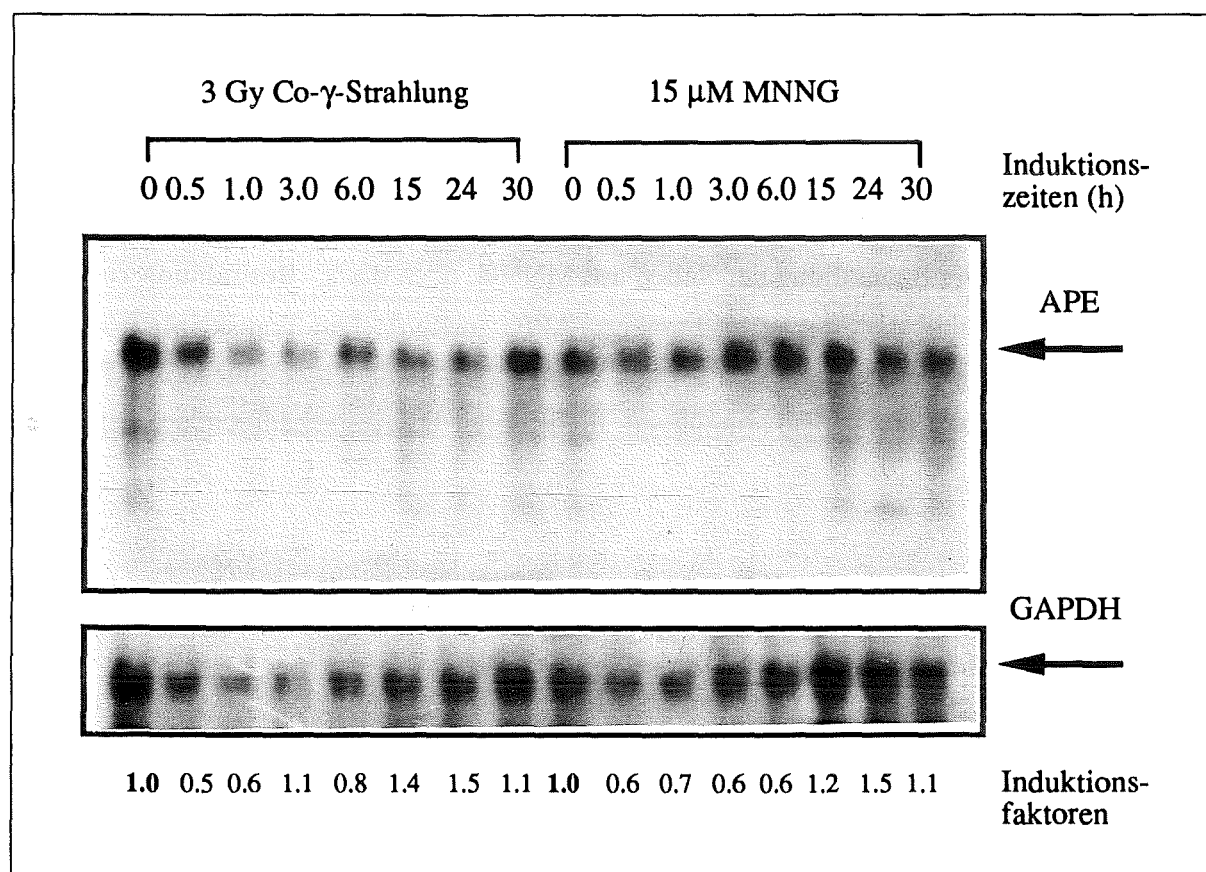


Abb. 12 Autoradiogramm gelelektrophoretisch aufgetrennter Gesamt - RNA aus humanen HeLaMR - Zellen, die mit MNNG und γ - Strahlen behandelt wurden, nach Hybridisierung mit der APE - cDNA: Die Behandlung mit Alkylantien und ionisierenden Strahlen führt nicht zu einer Erhöhung der mRNA - Menge der endogenen APE in der humanen Zelllinie.

Zellkulturen der HeLaMR - Zelllinie wurden entweder mit 3 Gy ^{60}Co - γ - Strahlen oder mit 15 μM MNNG behandelt und zu den angegebenen Induktionszeiten deren Gesamt - RNA präpariert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel wurde diese auf eine Nylonmembran übertragen und mit der radioaktiv markierten APE - cDNA hybridisiert. Nach stringentem Waschen (1 x SSC) wurde die Autoradiographie durchgeführt. Zum Quantifizieren der aufgetragenen RNA - Menge wurde analog mit einer GAPDH - Sonde hybridisiert. Zur Berechnung der angegebenen Induktionsfaktoren wurden die Signale beider Autoradiogramme mit Hilfe eines *Scanners* gelesen und quantifiziert.

Zur Überprüfung dieser Frage wurde die humane Zelllinie HeLaMR in einer Versuchsreihe mit 15 µM der alkylierenden Substanz MNNG und, in einem analogen experimentellen Ansatz, mit 3 Gy ionisierenden Strahlen einer ^{60}Co - γ - Quelle behandelt. Die eingesetzte MNNG - Konzentration und die verwendete Röntgendosis entsprechen den Dosierungen, die die transkriptionelle Aktivierung des MGMT - Gens bewirken (Fritz et al., 1992). Nach verschiedenen Inkubationszeiten (0 - 30 h) wurden die Zellen geerntet und ihre Gesamt - RNA präpariert. Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel wurde die RNA im *Northern Blot* - Verfahren auf eine Nylonmembran übertragen. Als Sonde für die Hybridisierung der fixierten RNA diente die in dieser Arbeit durch PCR klonierte cDNA der humanen APE. Zum Quantifizieren der eingesetzten RNA - Menge wurde anschließend mit der cDNA der Glycerinaldehydphosphat - Dehydrogenase (GAPDH) der Ratte hybridisiert. Wie die Abb. 12 zeigt, führte weder die Behandlung der Zellen mit MNNG, noch die γ - Bestrahlung zu einer signifikanten Erhöhung der Menge an humaner APE - mRNA. Die Transkription dieses Reparaturgens ist offenbar, zumindest in der hier verwendeten humanen Zelllinie HeLaMR und unter den verwendeten Versuchsbedingungen, nicht durch DNA - schädigende Ereignisse induzierbar.

Teil II

Komplementation der Röntgenstrahlen - Hypersensitivität von Scid - Zellen durch Transfektion mit menschlicher cDNA

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit bestand darin, die Röntgenstrahlen - Hypersensitivität von Scid - Zellen des Mausstammes C.B-17 durch Transfektion mit humaner cDNA zu korrigieren und die komplementierende cDNA zu isolieren. Von der Klonierung des Scid - Gens sind nicht nur Einblicke in den spezifischen Mechanismus der V(D)J - Rekombination, sondern auch in die Funktionsweise der DNA - Doppelstrangbruch - Reparatur zu erwarten (s. Einleitung). Um den strahlensensitiven Scid - Phänotyp durch Gentransfer zu komplementieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Selektionssystem entwickelt, mit dem die Röntgenstrahlen - Hypersensitivität von Scid - Zellen für die Selektion von resistenten Transfektantenklonen genutzt werden kann, die mit einer humanen Expressions - cDNA - Bank stabil transfiziert worden sind.

1. Entwicklung eines Röntgenselektionssystems

Für die effektive Röntgenselektion von strahlenresistenten Zellklonen aus einer Überzahl von nicht resistenten Zellen mußte zunächst ein geeigneter Bestrahlungsmodus experimentell ermittelt werden. Abb. 13 zeigt die Dosis - Effekt - Kurven der strahlensensitiven Scid - Zelllinie Sc3T3/w (Fibroblastenzelllinie der Scid - Maus C.B-17) und der strahlenresistenten Zelllinie Balb/c (syngene Fibroblastenzelllinie der Balb/c - Maus) im Vergleich.

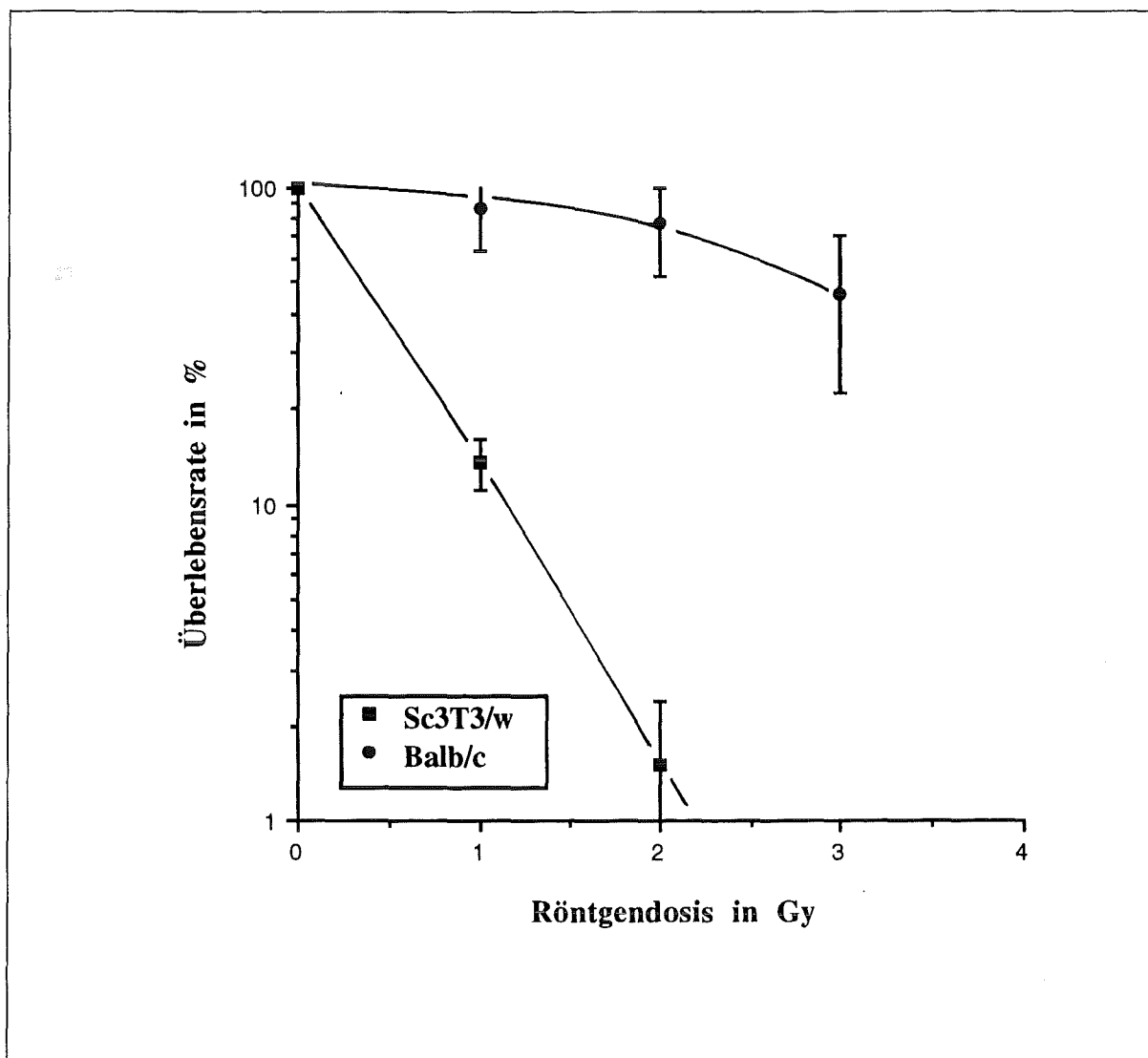


Abb. 13 Dosis - Effekt - Kurven der Röntgenstrahlen - resistenten Balb/c - Zelllinie und der Röntgenstrahlen - sensitiven Scid - Zelllinie Sc3T3/w; es wird die Strahlenhypersensitivität der Scid - Zelllinie deutlich. Es wurden definierte Zellzahlen jeder Zelllinie eingesät und nach 6 h mit den angegebenen Röntgendosen bestrahlt. Nach 6 - 8 Tagen waren die Zellkolonien makroskopisch sichtbar und konnten fixiert, gefärbt und gezählt werden. Die Werte sind Mittelwerte aus 6 - 8 unabhängigen Versuchen und geben die prozentuale Überlebensrate der Zellen verglichen mit unbestrahlten Zellen an.

Es wird deutlich, daß bei einer Röntgendosis von 2 Gy nur ca. 1 - 2% der Scid - Zellen überleben, während von der Zelllinie Balb/c ca. 80% die Bestrahlung überleben. Eine Dosis von 2 Gy war somit geeignet, um effizient zwischen strahlensensitiven und -resistenten Zellen während der Selektion zu unterscheiden. Um aus einer großen Zahl Röntgenstrahlen - sensitiver Scid - Zellen strahlenresistente Zellklone zu isolieren, wurde experimentell ermittelt, wieviele Einzeldosen von 2 Gy mit einem zeitlichen Abstand von 8 Stunden appliziert werden müssen, um alle strahlensensitiven Scid - Zellen einer konfluenten Zellkultur abzutöten. Diese Selektion durch fraktionierte Bestrahlung basiert auf folgender Überlegung:

Durch die einzelnen Bestrahlungen werden DNA - Doppelstrangbrüche im Genom der stationären Zellen erzeugt. Diese können von den Reparatur - kompetenten Zellen zwischen den einzelnen Bestrahlungen repariert werden, während die DNA - Schäden in den Reparatur - defekten Zellen akkumulieren. Das bedeutet, daß die Zelllinie Balb/c nach mehreren Einzeldosen von 2 Gy nahezu dieselbe Überlebensrate zeigt, wie nach einer einzelnen Dosis von 2 Gy. Im Gegensatz dazu, addieren sich bei der Röntgenstrahlen - sensitiven Scid - Zelllinie die Effekte der einzelnen Bestrahlungen. Durch die fraktioniert verabreichten Röntgendosen wird daher der Unterschied in der Überlebensrate der beiden Zelllinien verstärkt, wodurch bevorzugt Strahlen - sensitive Zellen vor Strahlen - resistenten Zellen abgetötet werden. Die genotoxischen Effekte der Bestrahlung wirken sich aber erst dann aus, wenn die Zellen die Möglichkeit erhalten, sich zu teilen. Nach dem Passagieren der bestrahlten Zellkulturen sterben die Zellen ab, die ihre DNA - Schäden nicht reparieren konnten und es überleben nur diejenigen, die ihre genomische Integrität wiederherstellen konnten.

In der Praxis wurden konfluente Zellkulturen der Sc3T3/w - und der Balb/c - Zelllinien in 10 cm - Kulturschalen über mehrere Tage mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt, wobei der zeitliche Abstand zwischen zwei Bestrahlungen mindestens 8 Stunden betrug. Die Anzahl der Bestrahlungen war variabel. Nach der jeweils letzten Bestrahlung wurden die Zellen geerntet und nach 1 : 4 - Verdünnung der Zellsuspension erneut in Kulturmedium eingesät. Nach 10 Tagen konnte die Zahl der überlebenden Zellkolonien ermittelt werden. Es zeigte sich, daß bei fraktionierter Bestrahlung mit je 2 Gy sechs Einzeldosen ausreichen, um alle Scid - Zellen der konfluenten Zellkultur abzutöten. Die mit der gleichen fraktioniert verabreichten Gesamt - Dosis behandelten Reparatur - kompetenten Balb/c - Zellen bildeten nach dem Passagieren erneut einen konfluenten Zellrasen. Durch die Etablierung dieses Bestrahlungs - Protokolls auf der Basis fraktioniert verabreichter Röntgendosen stand somit ein effizientes Röntgenselektionssystem für die Isolierung Röntgenstrahlen - resistenter Scid - Zellklone zur Verfügung.

2. Etablieren einer geeigneten Transfektionsmethode

Zur Komplementation der Strahlensensitivität der Scid - Zellen wurde beabsichtigt humane cDNA aus der pcD2-cDNA - Bank (Chen et al., 1987) stabil in die Zelllinie Sc3T3/w zu transfizieren. Um zu gewährleisten, daß die cDNA - Bank vollständig in die Scid - Zelllinie übertragen wird, mußte eine effiziente Transfektionsmethode für den Transfer von Plasmid - DNA in die Scid - Zelllinie ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pSV2neo, das das Neomycin - Resistenzgen enthält, durch Verwendung verschiedener Methoden in Scid - Zellen transfiziert und anschließend auf stabile G 418 - resistente Zellklone selektioniert. Von den getesteten Protokollen erwies sich die Polybren vermittelte Transfektion als effektivste Methode. Von den transfizierten Zellen wuchsen 0.6% zu stabil G 418 - resistenten Zellklonen aus. Die Elektroporation ergab mit 0.5% Transfektionseffizienz ein vergleichbar gutes Ergebnis, während sich die Kalziumphosphat - Kopräzipitation (0.04%) und die nach Chen & Okayama modifizierte Form dieser Methode (Chen et al., 1987) (0.01%) als weniger effizient herausstellten. Aufgrund der einfacheren Handhabung wurde der Polybren vermittelten Transfektion (s. Methoden 1.1.2.) der Vorzug gegenüber der Elektroporation gegeben. Für die Selektion auf stabile Neomycin - resistente Zellklone erwies sich eine G 418 - Konzentration von 0.6 mg/ml über einen Inkubationszeitraum von 10 Tagen als optimal.

3. Transfektion der Scid - Zelllinie Sc3T3/w mit der humanen pcD2-cDNA - Bank

Nachdem eine geeignete Methode zum Transfer von Plasmid - DNA experimentell ermittelt worden war, konnte die pcD2-cDNA- Bank in die strahlensensitive Scid - Zelllinie Sc3T3/w transfiziert werden. Die pcD2 - Genbank (Chen et al., 1987) enthält cDNA, die aus mRNA primärer menschlicher Fibroblasten synthetisiert wurde. Außer der cDNA befindet sich auch das Neomycin - Resistenzgen auf dem Plasmid (s. Abb. 14). Beide Gene werden von den frühen SV40 - Promotorsequenzen (SV40 = Simian Virus 40) gesteuert und ermöglichen eine starke Genexpression in murinen Zelllinien. Nach der Transfektion integrieren die pcD2 - Plasmide in die Chromosomen der Empfängerzelle. Insgesamt wurden 70 Transfektionen mit je 5×10^5 Sc3T3/w - Zellen mit der Polybrenmethode durchgeführt, wobei insgesamt etwa 1×10^5 unabhängige G 418 - resistente Transfektantenklone erhalten wurden. Diese konnten nun mit dem in dieser Arbeit etablierten Röntgenselektionssystem auf strahlenresistente Zellklone untersucht werden.

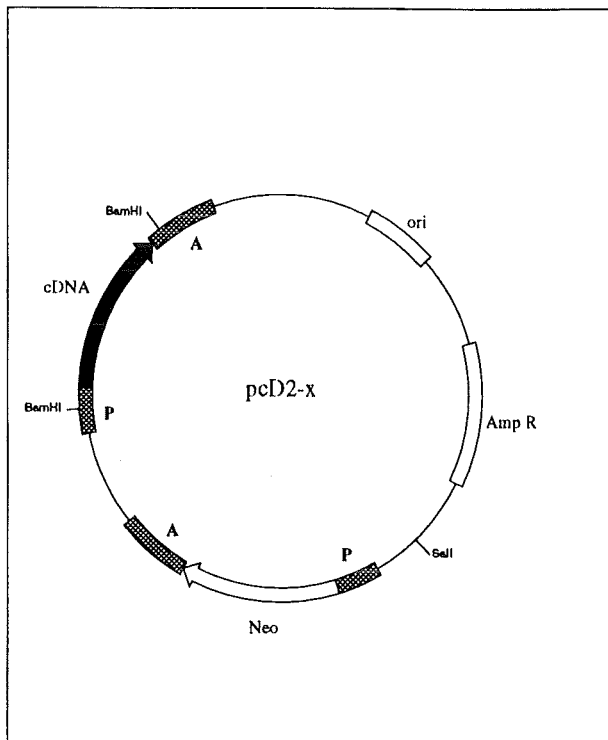


Abb. 14 Schematische Darstellung des pcD2 - Vektorsystems (Chen et al., 1987). Der pcD2 - Vektor enthält die humane cDNA und das Neomycin - Resistenzgen (Neo) unter der Transkriptionskontrolle des frühen viralen SV40 - Promotors (P). Dem SV40 - Genom sind außerdem die Polyadenylierungssignale (A), die die 3'- Enden dieser Gene flankieren, entnommen. ori = Replikationsursprung, Amp R = Ampicillin - Resistenzgen.

3.1. Röntgenselektion der stabilen Scid - Transfektantenklone liefert strahlenresistente Zelllinien

Für die Röntgenselektion wurden die stabil G 418 - resistenten Scid - Zellklone von je 10 Transfektionsansätzen (ca 1.5×10^4 unabhängige Einzelklone pro Ansatz) geerntet und als gemischte Zellpopulation mit einer Zellzahl von 1×10^6 pro 10 cm Kulturschale eingesät. Nachdem sich nach zwei bis drei Tagen konfluente Zellrasen gebildet hatten, wurden die Zellen wie beschrieben der Röntgenselektion unterzogen und nach dem Passagieren für weitere 10 Tage bei 37 °C kultiviert.

Von den 1×10^5 unabhängigen G 418 - resistenten Scid - Zellklonen aus den Transfektionen mit der pcD2 - Genbank konnten insgesamt 8 Einzelklone isoliert werden, die die Röntgenselektion überlebt hatten. Da bei der Röntgenselektion nicht transfizierter Scid - Zellen keine Revertanten beobachtet wurden, konnte davon ausgegangen werden, daß die isolierten Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Transfektantenklone durch die Aufnahme der pcD2 - Plasmid - DNA strahlenresistent geworden sind.

Da es Hinweise in der Literatur gibt, daß die Transformation mit dem Neomycin - Resistenzgen zur erhöhten Strahlenresistenz führen kann (Pardo et al., 1991), wurden Scid - Zellen, die stabil mit dem pSV2neo - Plasmid transfiziert worden waren, in der Röntgenselektion untersucht. Einige der Neomycin - resistenten Zellklone überlebten die Röntgenselektion,

zeigten aber in den Dosis - Effekt - Versuchen die gleiche Sensitivität gegenüber Röntgenstrahlen, wie die nicht transfizierte Scid - Zelllinie (Die Daten sind hier nicht aufgeführt). Auch das spricht dafür, daß die durch Transfektion mit der pcD2-cDNA - Bank erhaltenen und durch anschließende Röntgenselektion isolierten Scid - Zelllinien durch spezifische Komplementation der Scid - Mutation resistent geworden sind.

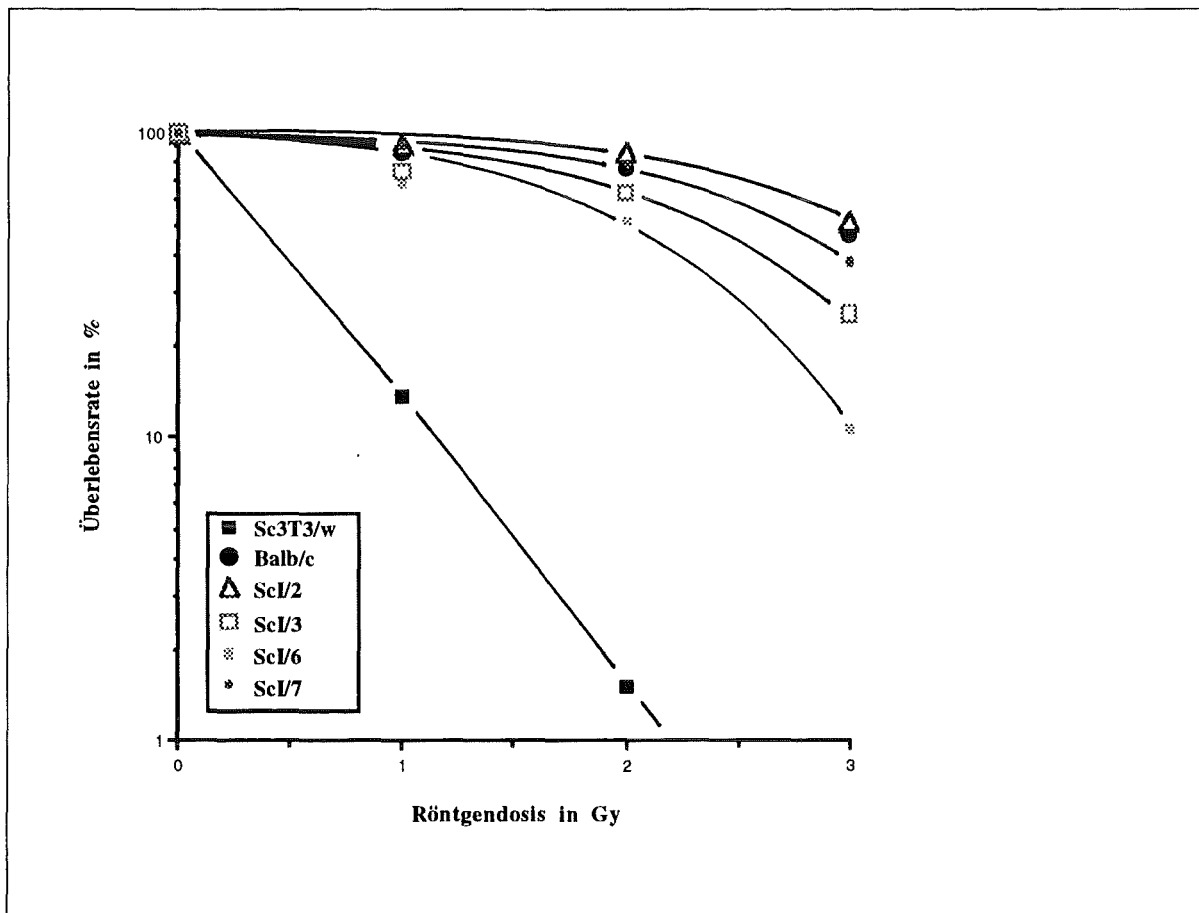


Abb. 15 Dosis - Effekt - Kurven der primären Scid - Transfektantenklone, die nach Transfektion mit der humanen pcD2 - Expressionsgenbank durch Röntgenselektion isoliert worden waren: Die vier gezeigten Zellklone zeigen eine signifikant erhöhte Strahlenresistenz verglichen mit der sensitiven Ausgangszelllinie Sc3T3/w.

Es wurden definierte Zellzahlen der einzelnen Zelllinien in Kulturschalen eingesät und nach 6 h mit den angegebenen Röntgendosen bestrahlt. Nach 6 - 8 Tagen konnten die Zellkolonien fixiert, gefärbt und gezählt werden. Die Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen. ScI/2, 3, 6 und 7 = primäre Röntgenstrahlen - resistente Scid - Transfektanten

3.2. Analyse der Röntgenselektionierten Scid - Einzelklone in Dosis - Effekt - Versuchen

Um zu überprüfen, ob die Zellklone, die die Röntgenselektion überlebt haben, stabil Röntgen - resistent sind, wurden sie in Dosis - Effekt - Versuchen gegenüber Röntgenbestrahlung getestet (s. Abb. 15).

Es zeigte sich, daß vier von den acht Zellklonen aus der Röntgenselektion im Vergleich zur parentalen Scid - Zelllinie deutlich strahlenresistenter geworden sind. Die Transfektanten ScI/2 und ScI/7 sind genauso resistent, wie die strahlenresistente Balb/c - Kontrollzelllinie. Die Zellklone ScI/3 und ScI/6 sind im höheren Strahlendosisbereich etwas empfindlicher als die Balb/c - Zellen, aber signifikant resistenter als Scid - Zellen (s. Abb. 15). Die übrigen vier Scid - Zellklone aus der Strahlenselektion zeigten die gleiche Strahlenhypersensitivität wie die parentale Scid - Zelllinie Sc3T3/w (deren Dosis - Effekt - Kurven sind hier nicht dargestellt).

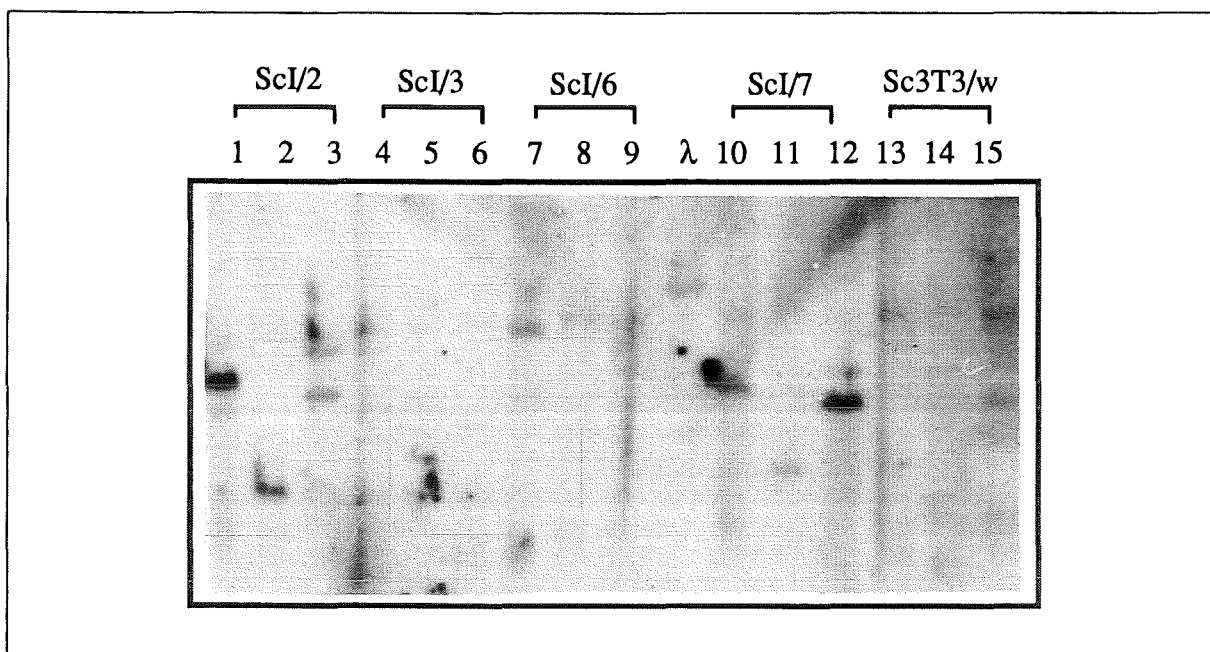


Abb. 16 Autoradiogramm gelelektrophoretisch aufgetrennter, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdauter, genomischer DNA der primären Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Transfektanten und der Scid - Zelllinie Sc3T3/w, nach Hybridisieren mit einer pcD2 - Vektorsequenz: Die transfizierte pcD2 - cDNA integrierte nur an wenigen unterschiedlichen Stellen der genomischen DNA der primären Transfektanten.

Nach Präparation, Restriktionsverdau und gelelektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel wurde die genomische DNA auf eine Nylonmembran übertragen. Als Sonde wurde eine radioaktiv markierte Sequenz des pcD2 - Vektors ohne cDNA - Anteil verwendet. Nach dem Hybridisieren wurde stringent ($1 \times \text{SSC}$) gewaschen und die Autoradiographie durchgeführt. ScI/2, 3, 6 und 7 = primäre Röntgenstrahlen - resistente Scid - Zellklone, Sc3T3/w = Fibroblasten - Zelllinie der Scid - Maus C.B-17. Die genomische DNA wurde mit den folgenden Restriktionsenzymen verdaut: 1, 4, 7, 10, 13 = EcoRI, 2, 5, 8, 11, 14 = BamHI, 3, 6, 9, 12, 15 = HindIII.

3.3. Analyse der genomischen DNA der Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Transfektanten

Der pcD2 - Vektor muß stabil in das Genom der Empfängerzelle integriert werden, um seine genetische Information (G418 - Resistenz und Information der cDNA) während der Zellteilung an die Tochterzellen weiterzuleiten. Um abschätzen zu können, wie viele unterschiedliche Integrationen in das Genom der einzelnen Scid - Transfektanten stattgefunden haben, wurde deren genomische DNA isoliert und mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut. Die fragmentierte DNA wurde anschließend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und im *Southern Blot* - Verfahren auf eine Nylonmembran übertragen. Zur Unterscheidung spezifischer und unspezifischer Hybridisierungssignale wurde genomische DNA aus nicht transfizierten Scid - Zellen ebenfalls untersucht. Für die Hybridisierung der genomischen DNA wurde ein radioaktiv markiertes, 4.0 kb großes BamHI - Fragment des pcD2 - Vektors (ohne cDNA - Anteil) als Sonde eingesetzt. Wie das Autoradiogramm in der Abb. 16 zeigt, haben nur an wenigen Stellen Integrationen der transfizierten Plasmid - DNA in das Genom der Empfängerzelllinien stattgefunden. Das bedeutet, daß das gesuchte Gen aus einer geringen Anzahl von integrierten cDNAs isoliert werden kann.

Da gleiche Mengen genomischer DNA analysiert wurden und die Signalstärke der Banden vergleichbarer Größe, im Autoradiogramm, ein Maß für die Anzahl der integrierten Plasmid - Kopien ist, fällt auf, daß die beiden Zelllinien ScI/2 und ScI/7 deutlich mehr Kopien der transfizierten DNA aufgenommen haben, als die Zelllinien ScI/3 und ScI/6. Die DNA der nicht transfizierten Scid - Zelllinie Sc3T3/w zeigt im Vergleich zur DNA der transfizierten Zelllinien nur eine unspezifische Hybridisierung mit der Vektorbande des pcD2 - Plasmides. Nachdem gezeigt worden war, daß die resistenten Scid - Zelllinien pcD2 - Plasmid - DNA enthalten, konnte nun die humane cDNA isoliert werden.

3.4. Klonierung humaner cDNA aus den Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Transfektanten

Zur Klonierung der genomisch integrierten humanen cDNA wurde die Polymerase - Ketten - Reaktion (PCR) eingesetzt. Als Startermoleküle für die spezifische Synthese und Amplifikation der cDNA wurden Oligonukleotide verwendet, die komplementär zu den die cDNA flankierenden Sequenzen des pcD2 - Vektors sind und jeweils eine BamHI - Schnittstelle enthalten (s. Abb. 17 A). Die geeigneten Reaktionsbedingungen für die PCR wurden mit Hilfe einer bekannten pcD2 - Plasmid - DNA (pcD2-mpg1.2) experimentell ermittelt: Es wurden insgesamt 35 Amplifikationszyklen durchgeführt, wobei die DNA je 1 min bei 95 °C denaturiert wurde. Nach je 1 min Hybridisierungsdauer bei 55 °C, wobei sich die Oligonukleotide an die komplementären Sequenzen der DNA - Matrize anlagern, fand die DNA

- Synthese jeweils für 2 min bei 72 °C statt. Die PCR - Reaktion wurde in einem 20 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Unter diesen Bedingungen lieferte die pcD2-mpg1.2 - Plasmid - DNA ein PCR - Produkt mit einer Länge von 1.2 kb (s. Abb. 17 B, Bahn K).

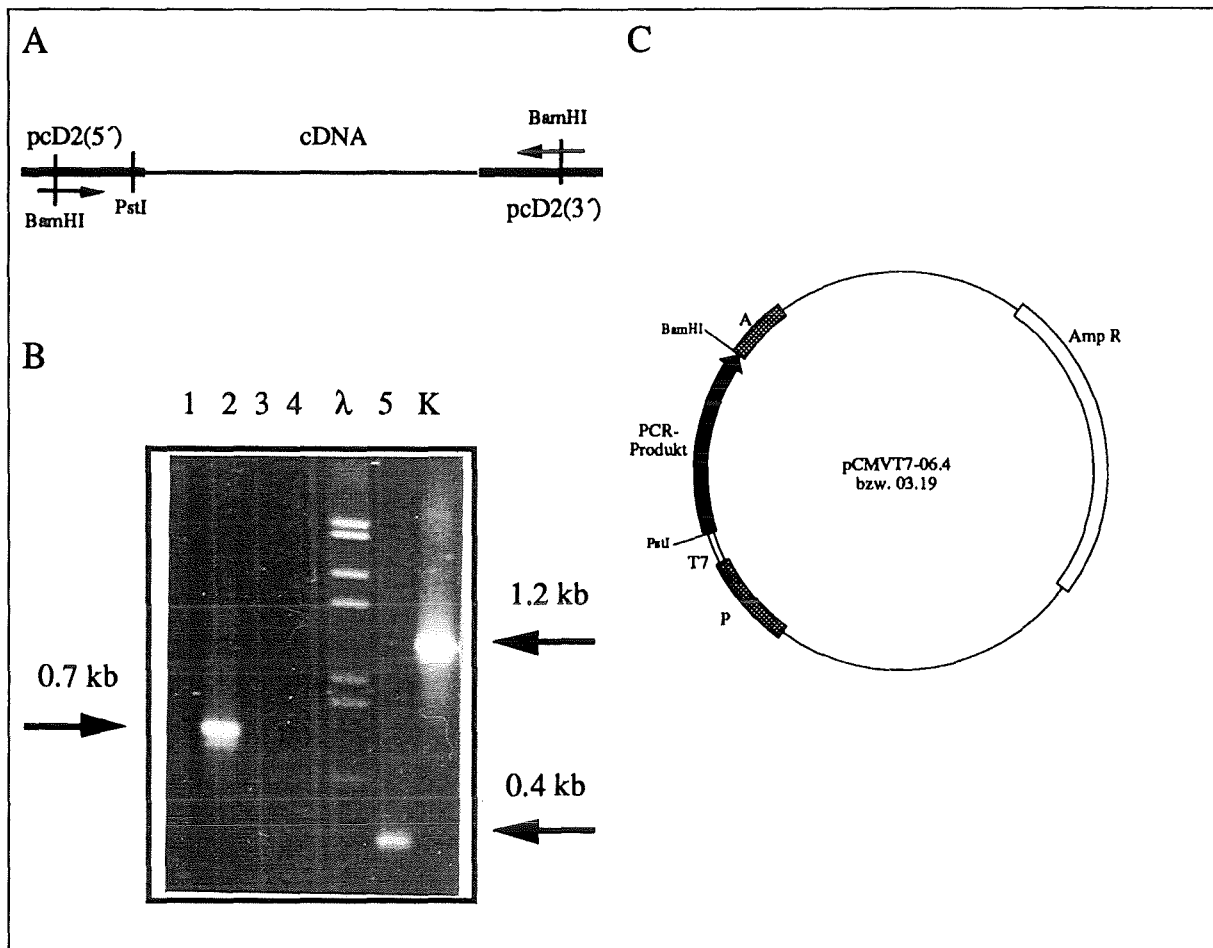


Abb. 17 PCR - Klonierung der genomisch integrierten humanen cDNA: aus der genomischen DNA von zwei primären Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Zellklonen können PCR - Produkte isoliert werden.

Abb.17 A zeigt schematisch die komplementäre Bindung der pcD2 - Oligonukleotide an die Vektorsequenzen (fette Linien), die die humane cDNA (dünne Linie) flankieren. Die Oligonukleotide enthalten BamHI - Schnittstellen. Die genaue Sequenz der Oligonukleotide ist im Material - und Methoden - Teil aufgeführt.

Abb. 17 B zeigt die Fotografie der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR - Reaktionen, die mit diesen Oligonukleotiden an der genomischen DNA der primären Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Transfektanten und der Ausgangszelllinie Sc3T3/w durchgeführt wurden. Es konnte ein 0.7 kb PCR - Produkt aus der genomischen DNA der Zelllinien Sc1/2 und ein 0.4 kb PCR - Produkt aus der Zelllinie Sc1/7 amplifiziert werden. In den einzelnen Bahnen wurde PCR - analysierte genomische DNA der folgenden Zelllinien aufgetrennt: 1 = Sc3T3/w, 2 = Sc1/2, 3 = Sc1/3, 4 = Sc1/6, 5 = Sc1/7. K = PCR - Positivkontrolle (Plasmid pcD2-mpg1.2), λ = DNA - Größenmarker

Abb. 17 C zeigt schematisch den eukaryontischen Expressionsvektor pCMVT7 mit den gerichtet einklonierten PCR - Produkten. Das rekombinante Plasmid erhielt die Bezeichnung pCMVT7-06.4 bzw. - 03.19. P = CMV - Promotor, A = SV40 - Polyadenylierungssignal, T7 = T7 - Promotor, Amp R = Ampicillin - Resistenzgen.

Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Wie die Abb. 17 B zeigt, lieferten die genomischen DNAs der Zelllinien ScI/2 und ScI/7 ein 0.7 kb bzw. ein 0.4 kb PCR - Produkt. Die Zelllinien ScI/3 und ScI/6 lieferten auch nach weiterem Variieren der PCR - Bedingungen (s. Methoden 7.1) keine PCR - Produkte. Die genomische DNA der nicht transfizierten Scid - Zelllinie Sc3T3/w führt ebenfalls nicht zur Synthese eines PCR - Produktes. Beide PCR -Produkte wurden anschließend durch Elektroelution aus dem Agarosegel isoliert und konnten nach Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und PstI gerichtet in den eukaryontischen Expressionsvektor pCMVT7 kloniert werden. Die PstI - Schnittstelle befindet sich zwischen der Bindestelle des Oligonukleotides pcD2(5') und dem 5'- Ende der cDNA. Die Schnittstelle für das Restriktionsenzym ist in beiden Oligonukleotiden enthalten (s. Abb. 17 A). Die rekombinanten Plasmide erhielten die Bezeichnungen pCMVT7-06.4 und pCMVT7-03.19 (s. Abb. 17 C).

3.5. Die klonierten PCR - Produkte zeigen untereinander keine Kreuzhybridisierung

Um zu prüfen, ob die klonierten PCR - Fragmente Sequenzhomologien besitzen und damit möglicherweise von einer identischen cDNA stammen, die für die Vermittlung der Röntgenstrahlen - Resistenz verantwortlich ist, wurde deren Fähigkeit zur Kreuzhybridisierung untersucht. Die Plasmide pCMVT7-06.4 und pCMVT7-03.19 wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen BamHI und PstI verdaut, um die klonierte cDNA - Insertion freizusetzen, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend im *Southern Blot* - Verfahren auf eine Nylonmembran übertragen. Als Sonde dienten die 0.7 und 0.4 kb PCR - Produkte. Die membrangebundene Plasmid - DNA wurde mit je einem radioaktiv markierten PCR - Produkt hybridisiert. Das Ergebnis dieser Experimente war, daß jedes PCR - Produkt nur mit seiner eigenen Sequenz hybridisiert. Eine Sequenzhomologie zwischen den beiden klonierten PCR - Fragmenten liegt also offensichtlich nicht vor (Die Hybridisierungsdaten sind hier nicht gezeigt).

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die genomische DNA der Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Zelllinien ScI/3 und ScI/6, aus der keine PCR - Fragmente amplifiziert werden konnten, Sequenzen enthalten, die mit einem der klonierten PCR - Produkte kreuzhybridisieren. Es ist denkbar, daß durch die Integration der pcD2 - Plasmide in das Genom dieser Zelllinien Sequenzen verloren gegangen oder umgelagert worden sind, die für die komplementäre Bindung der spezifischen Oligonukleotide in der PCR notwendig sind. Das hätte zur Folge, daß integrierte cDNA - Fragmente nicht amplifiziert werden. Für die *Southern Blot* - Analyse wurde dieselbe Membran, die bereits das in Abb. 16 gezeigte Autoradiogramm geliefert hatte und die genomische DNA der nicht transfizierten Scid - Zelllinien und der

Röntgenstrahlen - resistenten Zelllinien ScI/2, ScI/3, ScI/6 und ScI/7 enthält, mit dem 0.7 und dem 0.4 kb PCR - Produkt rehybridisiert. Das in Abb. 18 gezeigte Autoradiogramm zeigt das Ergebnis der Hybridisierung mit dem 0.7 kb PCR - Produkt.

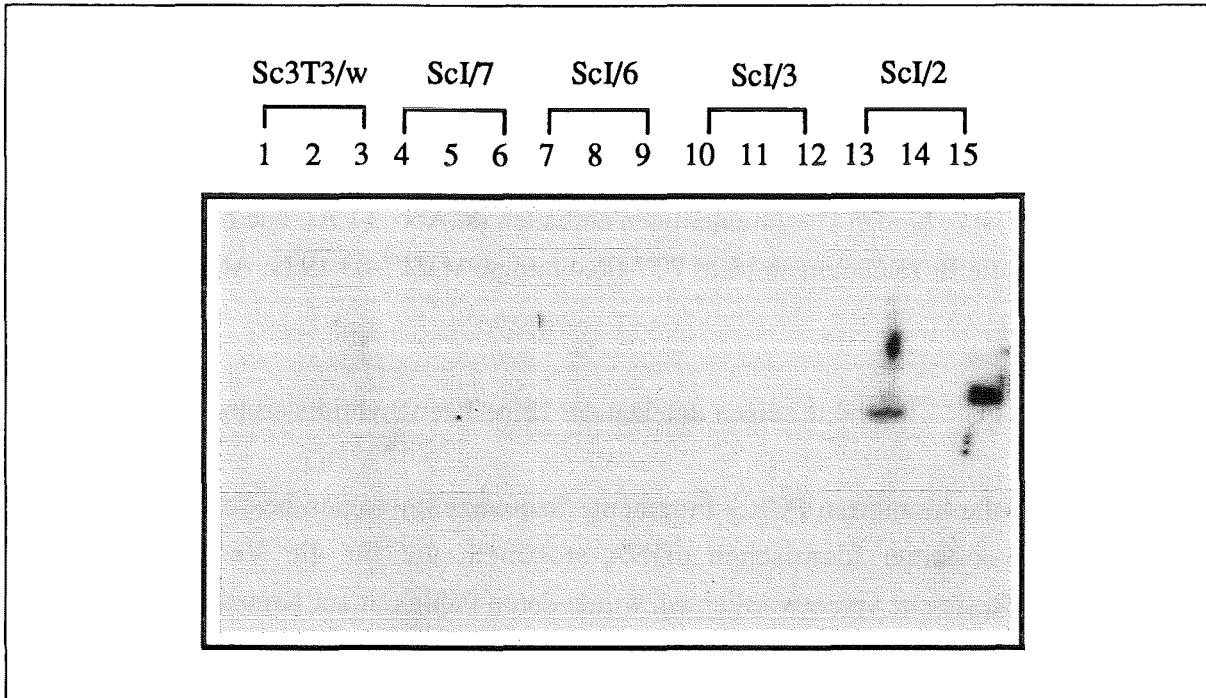


Abb. 18 Autoradiogramm gelelektrophoretisch aufgetrennter, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdauter, genomischer DNA der primären Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Transfektanten, nach Hybridisieren mit dem 0.7 kb PCR - Produkt: Das 0.7 kb PCR - Produkt hybridisiert nur mit der genomischen DNA der Zelllinie ScI/2, aus der es isoliert worden war.

Das Autoradiogramm wurde analog zu dem in Abb. 16 gezeigten Autoradiogramm hergestellt. Sc3T3/w = Fibroblastenzelllinie der Scid - Maus C.B-17, ScI/2, 3, 6 und 7 = primäre Röntgenstrahlen - resistente Scid - Zelllinien. Die genomische DNA wurde mit den folgenden Restriktionsenzymen verdaut: 1, 4, 7, 10, 13 = HindIII, 2, 5, 8, 11, 14 = BamHI, 3, 6, 9, 12, 15 = EcoRI.

Das durch PCR aus der Zelllinie ScI/2 isolierte 0.7 kb Fragment hybridisiert nur mit der genomischen DNA aus dieser Zelllinie und zeigt keine Kreuzhybridisierung zur DNA aus den anderen Zelllinien. Das 0.4 kb PCR - Fragment verhält sich analog, indem es nur mit der genomischen DNA aus der Zelllinie ScI/7, aus der es isoliert worden war, hybridisiert (Die Hybridisierungsdaten sind hier nicht dargestellt). Da die klonierten PCR - Produkte offensichtlich von verschiedenen DNA - Sequenzen stammen, wurden sie in weiteren Versuchen hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität in humanen und murinen Zellen untersucht.

3.6. Das 0.7 kb PCR - Produkt hybridisiert mit einer 1.4 kb mRNA

Es war zunächst von Interesse, ob die klonierten PCR - Produkte auf humane cDNA - Sequenzen der pcD2 - Plasmide zurückzuführen sind. Wenn dies der Fall ist, sollten diese in *Northern Blot* - Analysen mit einer entsprechenden mRNA aus humanen Zellen hybridisieren. Es wurde daher Poly-A⁺ - mRNA aus den Zelllinien Sc3T3/w, Balb/c und der humanen Fibroblasten - Zelllinie SL88 präpariert, in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die anschließende Hybridisierung mit dem kleineren 0.4 kb PCR - Produkt ergab keine distinkte Bande im Autoradiogramm. Im Gegensatz dazu hybridisierte das 0.7 kb PCR - Fragment in den RNA - Präparationen der genannten Zelllinien mit einer 1.4 kb langen mRNA (s. Abb. 19).

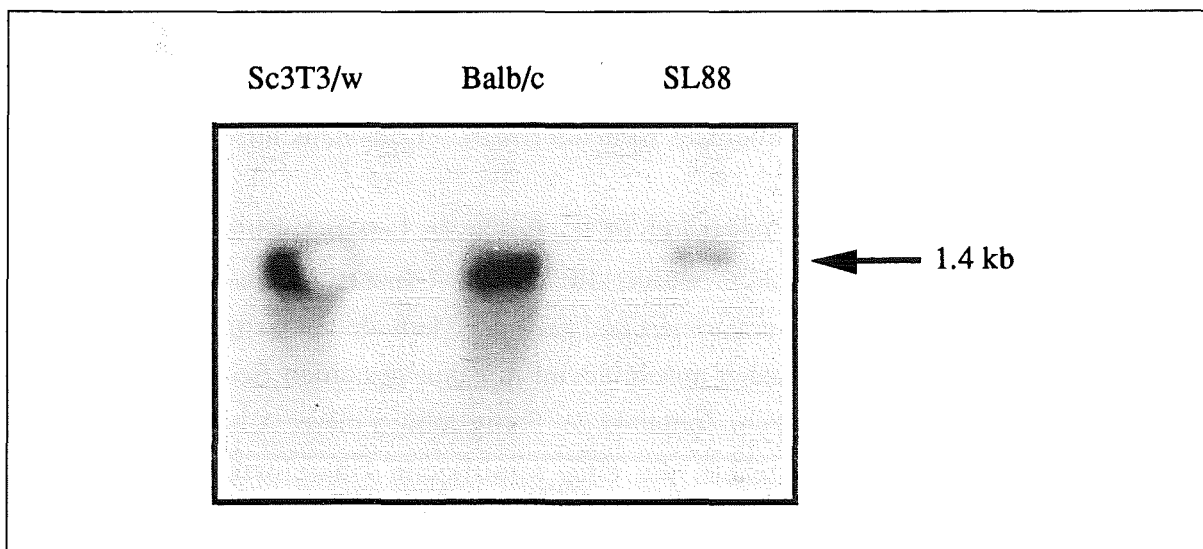


Abb. 19 Autoradiogramm geelektrophoretisch aufgetrennter Poly - A⁺ - mRNA nach Hybridisieren mit dem 0.7 kb PCR - Produkt: Alle RNA - Präparationen enthalten ein 1.4 kb mRNA - Transkript, das mit dem PCR - Produkt hybridisiert.

Nach Präparation, Auftrennung im Agarosegel und Übertragen auf eine Nylonmembran wurde mit dem radioaktiv markierten 0.7 kb PCR - Produkt hybridisiert. Nach Waschen mit hoher Stringenz (0.5 x SSC) wurde die Autoradiographie durchgeführt. Das schwächere Hybridisierungssignal der RNA - Präparation aus der humanen Zelllinie SL88 ist auf eine 5 x geringere Menge an aufgetragener RNA zurückzuführen. Sc3T3/w = Fibroblasten - Zelllinie aus der Scid - Maus C.B-17, Balb/c = Fibroblasten - Zelllinien aus der Balb/c - Maus, SL88 = primäre humane Fibroblasten - Zelllinie

Die Tatsache, daß ein mRNA - Transkript in der RNA - Präparation der humanen Zelllinie erkannt wird, weist darauf hin, daß die Sequenz des klonierten 0.7 kb PCR - Produktes einer

humanen cDNA entspricht. Da diese cDNA darüberhinaus mit einer mRNA gleicher Länge aus den RNA - Präparationen der Mauszelllinien kreuzhybridisieren, müssen die zugehörigen Gene beider Spezies homologe Sequenzbereiche besitzen. Homologe Gensequenzen in verschiedenen Arten deuten auf die Konservierung wichtiger Genfunktionen hin.

Auf die Bedeutung einer Genfunktion kann auch die Menge der in einer Zelle vorhandenen mRNA hinweisen. Diese ist in den untersuchten murinen und humanen Zellen sehr wahrscheinlich groß, da das Hybridisierungssignal im Autoradiogramm der Abb. 19, nach Waschen der Membran mit hoher Stringenz (s. Methoden 9.), bereits nach dreistündiger Exposition des Films bei Raumtemperatur entstand.

Die Tatsache, daß eine 1.4 kb große mRNA von dem 0.7 kb großen PCR - Produkt im *Northern Blot* erkannt wird, bedeutet, daß nicht die vollständige cDNA kloniert worden ist. Dies könnte daran liegen, daß die Zelllinie Sc1/2, aus der das PCR - Produkt isoliert wurde, nicht die vollständige cDNA enthält, oder daß durch Verwendung der PCR - Methode nicht die vollständige cDNA kloniert worden ist.

3.7. Die Sequenz des 0.7 kb PCR - Produktes ist in der EMBL - Datenbank unbekannt

Um herauszufinden, ob die Sequenz des 0.7 kb PCR - Produktes bereits bekannt ist oder ob es sich um eine neue Sequenz handelt, wurde die cDNA - Insertion aus dem Plasmid pCMVT7-06.4 in den Vektor pUC9 umklont und nach der Methode von Sanger et al. (1977) sequenziert. Die Sequenzdaten wurden anschließend mit den gesamten Sequenzdaten der EMBL - Datenbank verglichen. Bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit (April 1994) waren jedoch keine Daten gespeichert, die eine signifikante Übereinstimmung in der Nukleinsäure- oder der Aminosäuresequenz mit der klonierten Sequenz aufwiesen. Die Sequenz wurde außerdem auf die Existenz von offenen Leserastern untersucht. Da jedoch in allen sechs möglichen Leserastern Stopp - Kodons auftreten, ließ sich keine durchgehende kodierende Sequenz ermitteln. Das steht im Gegensatz zu dem Ergebnis der *Northern Blot* - Analyse, in der ein 1.4 kb Transkript nachgewiesen worden war. Eine mögliche Erklärung ist, daß die klonierte PCR - Sequenz den 3' - Bereich mit einem nicht translatierten Bereich darstellt.

3.8. Das retransfizierte 0.7 kb PCR - Produkt führt in einigen Röntgenselektions - Versuchen zur erhöhten Strahlenresistenz der Scid - Zelllinie Sc3T3/w

Da es Hinweise in der Literatur dafür gibt, daß durch Deletionen ihrer kodierenden Sequenz verkleinerte Proteine biologisch durchaus aktiv sein können (Pierre et al., 1981, Angel et al.,

1989), wurde überprüft, ob die klonierte cDNA des 0.7 kb PCR - Fragmentes zur Komplementation der Strahlensensitivität der Scid - Zelllinie Sc3T3/w ausreicht. Dazu wurden mehrere Transfektionen mit dem Plasmid pCMVT7-06.4 durchgeführt, wobei das Plasmid pSV2neo, das die kodierende Sequenz des Neomycin - Resistenzgens enthält, kotransfiziert wurde. In Kontroll - Transfektionsansätzen wurde der Vektor pCMVT7 mit pSV2neo kotransfiziert. Stabil G 418 - resistente Zellklone eines Transfektionsansatzes wurden geerntet, vereinigt und jeweils 1×10^5 Zellen pro 10 cm - Kulturschale für die Röntgenselektion mit einer einmaligen Dosis von 5 Gy (s. Methoden 1.2.2.) eingesät. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse von fünf unabhängigen Selektionsversuchen, die mit stabilen G 418 - resistenten Zellklonen unabhängiger Transfektionsansätze erhalten wurden.

Versuch Nr. -->	I	II	III	IV	V
Sc3T3/w	67	5	0	12	0
Balb/c	K	K	K	K	K
Sc pCMVT7	61	116	0	47	n. b.
Sc pCMVT7-06.4	696	888	0	43	500

Tab. 3 Überlebende Zellklone nach Bestrahlen mit einer Röntgendosis von 5 Gy: Die mit dem PCR - Produkt transfizierten Scid - Zellen zeigen in einigen Versuchen eine deutlich erhöhte Überlebensfähigkeit. Für die Transfektionen der Scid - Zelllinie mit der Polybrenmethode wurden jeweils 20 µg Gesamt - Plasmid - DNA eingesetzt, wobei pSV2neo zu 10% enthalten war. Stabile G 418 - resistente Transfektanten jedes Ansatzes wurden geerntet und jeweils vereinigt. Für die Röntgenselektion wurden je 1×10^5 Zellen pro 10 cm - Kulturschale eingesät. Nach 6 h wurde mit 5 Gy bestrahlt und die Zellen anschließend für 10 Tage bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellkolonien fixiert, gefärbt und gezählt. Die Werte geben die Anzahl der überlebenden Zellkolonien an und sind Mittelwerte von je 2 Platten. Die Plattierungseffizienz betrug 20 - 30%. Die Anzahl der vereinigten G418 resistenten Transfektanten lag zwischen 50 und 200 unabhängigen Klonen. Sc pCMVT7 = Sc3T3/w mit pCMVT7 + pSV2neo transfiziert, Sc pCMVT7-06.4 = Sc3T3/w mit pCMVT7-06.4 + pSV2neo transfiziert. K = konfluente Zellkultur, n. b. = nicht bestimmt.

In drei Selektionsversuchen (Versuche I, II, V) zeigten die mit dem PCR - Produkt retransfizierten Scid - Zellen deutlich mehr überlebende Zellkolonien als die Kontrollzellen, die nur mit dem Vektor pCMVT7 transfiziert worden waren. In den beiden anderen Versuchen ist dagegen kein Unterschied zwischen den PCR - und Kontroll - Transfektanten zu erkennen.

Von den überlebenden Zellklonen der Röntgenselektion des Versuches I (Abb. 20 zeigt fixierte Zellkolonien aus diesem Versuch), die aus der Transformation mit dem Plasmid pCMVT7-06.4 stammen, wurden 12 Einzelklone isoliert und in Dosis - Effekt - Versuchen mit

Röntgenstrahlen getestet. Keiner der Einzelklone wies jedoch, verglichen mit der Scid - Zelllinie Sc3T3/w, eine Zunahme in der Röntgenstrahlen - Resistenz auf (Die Überlebenskurven sind hier nicht gezeigt).

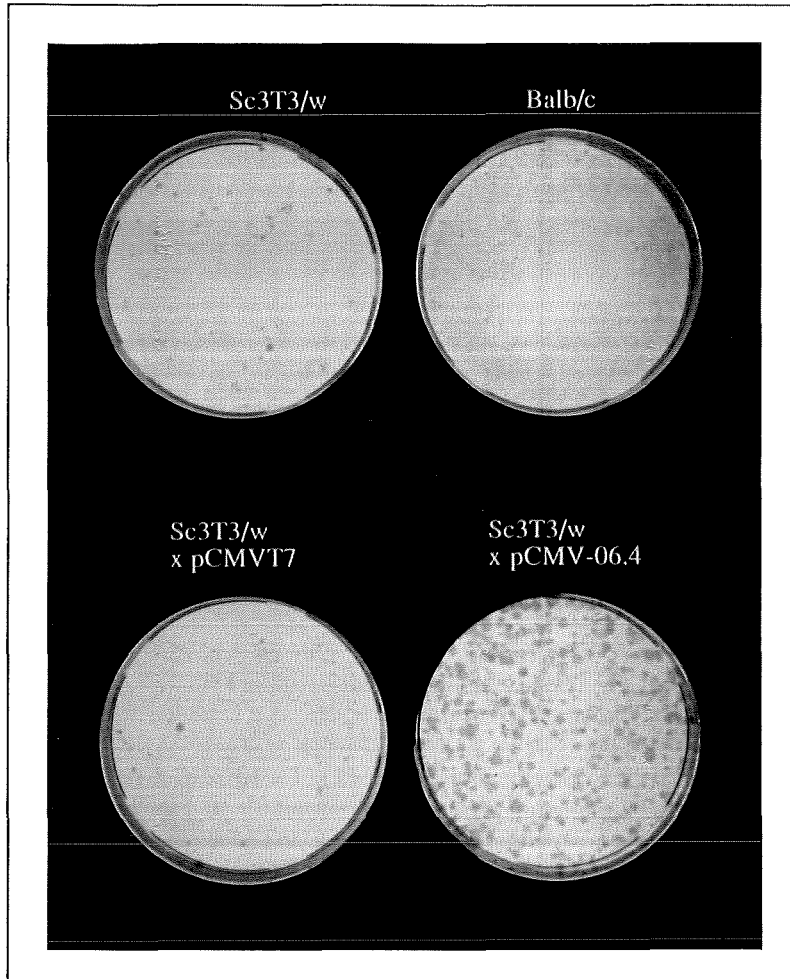


Abb. 20 Fotografie fixierter und gefärbter Zellkulturen aus einer Röntgenselektion: Die mit dem klonierten PCR - Produkt stabil transfizierten Sc3T3/w - Zellen zeigen in dieser Röntgenselektion eine signifikant erhöhte Überlebensrate.

Es wurden 1×10^5 Zellen jeder Zelllinie eingesät und nach 6 h mit einer Röntgendosis von 5 Gy bestrahlt. Nach 10 - 14 Tagen wurden die überlebenden Zellkolonien fixiert, gefärbt und gezählt. Balb/c bildet nach dieser Zeit einen konfluenten Zellrasen.

Sc3T3/w = Fibroblasten - Zelllinie der Scid - Maus C.B-17, Balb/c = Fibroblasten - Zelllinie der Balb/c - Maus, Sc3T3/w x pCMVT7 = stabil mit dem Vektor pCMVT7 und pSV2neo transfizierte Scid - Zellen, Sc3T3/w x pCMV-06.4 = stabil mit pCMVT7-06.4 und pSV2neo transfizierte Scid - Zellen. Die transfizierten Scid - Zellen wurden als gemischte Zellpopulation selektioniert.

Die Röntgenselektionsexperimente führten zu keinem eindeutigen Ergebnis. Um die Möglichkeit zu prüfen, ob die Unvollständigkeit der verwendeten cDNA - Sequenz dafür verantwortlich ist, daß keine Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Einzelklone isoliert werden konnten, bestand als nächstes die Aufgabe darin, die vollständige humane cDNA zu klonieren.

3.9. Durch Kolonie - Hybridisierung der pcD2 - Bank mit dem 0.7 kb PCR - Produkt werden *E. coli* - Klone mit größerer cDNA isoliert

Da durch *Northern Blot* - Analyse gezeigt worden war, daß die klonierte cDNA des 0.7 kb PCR - Produktes nicht die vollständige kodierende Sequenz enthält, wurde beabsichtigt, diese mit Hilfe der Kolonie - Hybridisierung in der pcD2-cDNA - Bank zu suchen. Als Sonde diente ein 0.35 kb großes internes *XmnI/PstI* - Fragment des 0.7 kb PCR - Produktes. Durch den Doppelverdau wurden pcD2 - Vektorsequenzen abgetrennt, die sonst zur Hybridisierung mit allen plasmidhaltigen *E. coli* - Klonen der pcD2 - Bank geführt hätten. Nach mehreren Hybridisierungszyklen (s. Methoden 10.) konnten positive *E. coli* - Klone angereichert und schließlich 15 unabhängige Einzelklone isoliert werden. Die Restriktionsanalyse ihrer Plasmid - DNA zeigte, daß insgesamt vier unterschiedliche *E. coli* - Klone isoliert worden waren. Die Abb. 21 zeigt die mit *BamHI* verdauten Plasmid - DNA dieser vier *E. coli* - Klone. Durch diesen Verdau werden cDNA - Fragmente von 1.0, 1.5, 1.8 und 2.1 kb ausgeschnitten. Die Plasmide erhielten die Bezeichnungen pcD2-Sc1.0, pcD2-Sc1.5, pcD2-Sc1.8 und pcD2-Sc2.1.



Abb. 21 Fotografie gelelektrophoretisch aufgetrennter und mit *BamHI* verdauter Plasmid - DNA aus *E. coli* - Klonen, die durch Kolonie - Hybridisierung mit dem 0.7 kb PCR - Fragment als Sonde aus der pcD2 - Genbank isoliert worden waren: die drei größeren cDNA - Fragmente enthalten je ein 1.1 kb Fragment, das mit dem 0.7 kb PCR - Produkt hybridisiert und dem 3' - Bereich der cDNA entspricht.

1 = pcD2-Sc1.0, 2 = pcD2-Sc1.5, 3 = pcD2-Sc1.8, 4 = pcD2-Sc2.1, K = Kontroll - DNA (pcD2-mpg1.2), λ = DNA - Größenmarker.

Die größeren cDNA - Fragmente enthalten eine interne *BamHI* - Schnittstelle, die die jeweilige cDNA in ein 1.1 kb - Fragment und ein Restfragment teilt. In der *Southern Blot* - Analyse hybridisierte nur der 1.1 kb - Anteil mit dem internen Fragment aus dem 0.7 kb PCR - Produkt (Die Hybridisierungsdaten sind hier nicht dargestellt). Aus der Sequenzanalyse war bekannt,

daß das 0.7 kb PCR - Fragment einen 40 Nukleotide langen Poly - A - Schwanz besitzt. Das bedeutet, daß dieses Fragment dem 3' - Ende der gesuchten cDNA entspricht. Damit stellt der 1.1 kb - Anteil der neu isolierten cDNAs den 3' - Bereich und die Restfragmente jeweils verschieden große 5' - Bereiche der gesuchten cDNA dar.

3.10. Retransfektion der Plasmide aus der Kolonie - Hybridisierung in die Zelllinie Sc3T3/w

Um zu testen, ob die durch Kolonie - Hybridisierung aus der pcD2-cDNA - Bank isolierten Plasmide cDNAs enthalten, die Resistenz gegenüber Röntgenbestrahlung verleihen, wurden diese einzeln in die strahlensensitive Scid - Zelllinie Sc3T3/w transfiziert.

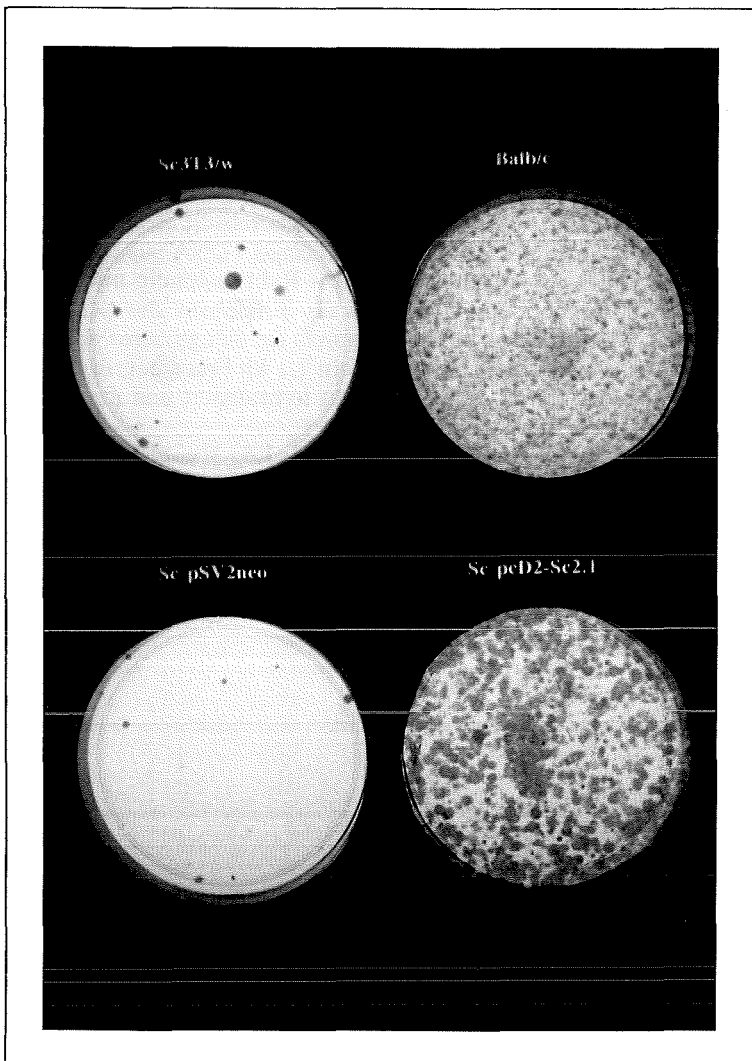


Abb. 22 Fotografie fixierter und gefärbter Zellkulturen aus einer Röntgenselektion: mit dem Plasmid pcD2-Sc2.1 stabil transfizierte Scid - Zellen zeigen in diesem Versuch eine deutlich erhöhte Überlebensrate.

Die Selektionsversuche wurden analog zur Beschreibung in der Abb. 20 durchgeführt.

Sc3T3/w = Fibroblasten - Zelllinie der Scid - Maus C.B-17, Balb/c = Fibroblasten - Zelllinie der Balb/c - Maus, Sc pSV2neo = stabil mit pSV2neo transfizierte Sc3T3/w - Zellen, Sc pcD2-Sc2.1 = stabil mit pcD2-Sc2.1 transfizierte Sc3T3/w - Zellen

Die G 418 - resistenten Zellklone jedes Transfektionsansatzes wurden vereinigt, und als gemischte Zellpopulation für die Röntgenselektion (s. Methoden 1.2.2.) eingesetzt. Insgesamt wurden drei Selektionsexperimente mit jeweils unabhängigen Transfektionsansätzen durchgeführt. Von diesen führte nur ein Selektionsexperiment, das mit stabilen G 418 - resistenten Zellklonen aus der Transfektion mit dem Plasmid pcD2-Sc2.1 durchgeführt worden war, zu einer deutlich höheren Anzahl überlebender Zellklone, als bei Scid - Transfektantenklonen, die mit pSV2neo transfiziert worden waren. Das Ergebnis ist in der Abb. 22 anhand der fixierten und gefärbten Zellkolonien dargestellt. Sechs überlebende Einzelklone aus diesem Versuch wurden außerdem in Dosis - Effekt - Versuchen mit Röntgenstrahlen getestet. Sie zeigten jedoch keine erhöhte Resistenz im Vergleich zu der Ausgangszelllinie Sc3T3/w.

4. Konstruktion einer BPV-cDNA - Bank

Da die aus der pcD2 - Bank isolierten cDNAs nach Retransfektion nicht eindeutig zur Erhöhung der Röntgenstrahlen - Resistenz der Sc3T3/w - Zellen führten, wurde ein zweiter experimenteller Ansatz zur Klonierung des komplementierenden Gens unternommen. Dabei wurden zwei wesentliche Parameter geändert, nämlich die Transfektionsmethode und die Art der cDNA - Bank.

Als Transfektionsmethode sollte diesmal die Elektroporation zur Anwendung kommen. Wie die Analyse der genomischen DNA der resistenten Scid - Zelllinie (s. Abb. 16) gezeigt hat, führte die Transfektion mit Hilfe des Polykations Polybren nur zu wenigen unterschiedlichen Integrationen der Plasmid - DNA in das Genom der Empfängerzellen. Von der Elektroporation, die sich in den vorab durchgeführten Versuchen neben der Polybrentransfektion als vergleichbar effizient erwiesen hatte, ist dagegen bekannt, daß sie die Aufnahme von größeren DNA - Mengen in die Zelle ermöglicht. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß das gewünschte Gen in die Scid - Zellen aufgenommen wird.

Die Plasmid - DNA der im ersten Klonierungsansatz verwendeten pcD2-cDNA - Bank muß in das Genom der Empfängerzelle integrieren, um stabil an die Tochterzellgenerationen weitervererbt zu werden. Diese Integration geschieht sehr wahrscheinlich zufallsgemäß an beliebiger Stelle in den Chromosomen und kann im ungünstigen Fall dazu führen, daß die transfizierte cDNA inaktiviert wird. Das könnte vermieden werden, wenn die eingeführte Plasmid - DNA replikationsfähig im episomalen Zustand in der Zelle vorliegen würde.

Einige eukaryontische Viren, wie das Epstein Barr Virus (EBV) und das Rinder Papillom Virus (BPV) besitzen einen eigenen Replikationsursprung in ihrem Genom und sind in der Lage, sich autonom zu vermehren, ohne in die chromosomale DNA ihrer Wirtszelle integrieren zu müssen

(Law et al., 1981, Margolskee et al., 1988). Es wurde daher beabsichtigt, ein Vektorsystem zu konstruieren, das die Information zur autonomen Replikation der Virus - DNA mit den Qualitäten der pcD2-cDNA - Bank vereinigt. Margolskee et al. (1988) beschreiben eine cDNA - Bank, die durch Modifikation einer pcD-cDNA - Bank mit EBV-DNA erstellt worden war. Dieses System arbeitet jedoch, aufgrund der Wirtsspezifität von EBV, nur in humanen Zellsystemen.

Da die Funktionalität rekombinanter BPV - Plasmide in Maus - Zelllinien mehrfach gezeigt worden war (Sarver et al., 1981, Pavlakis et al., 1983, Karin et al., 1983), wurde für die Transfektion der Mauszelllinie Sc3T3/w in dieser Arbeit eine analoge Konstruktion auf der Basis des BPV - Genoms erstellt. Eine BPV-cDNA - Bank ist in der Literatur bis jetzt noch nicht beschrieben worden.

Die BPV - Genbank hat gegenüber einer Genbank mit integrierenden Plasmiden mehrere Vorteile. Da die Plasmide autonom replizieren, können in der Zelle mehrere Kopien eines transfizierten Gens vorliegen, was die ausreichende Expression des Gens gewährleistet. Die Inaktivierung einer cDNA, die während der Integration eines transfizierten Plasmides erfolgen kann, ist ebenfalls nahezu ausgeschlossen. Ein weiterer Vorteil der BPV - Genbank liegt darin, daß transfizierte Plasmide sehr einfach und schnell durch Hirtextraktion aus eukaryontischen Zellen isoliert werden können. Mutationen, wie sie bei der Klonierung von genomisch integrierter cDNA durch PCR entstehen können, sind unwahrscheinlich, da die extrahierte Plasmid - DNA direkt zur Transformation von *E. coli* eingesetzt und in beliebiger Menge präpariert werden kann (Binétruy et al., 1982, Sarver et al., 1982, DiMaio et al., 1982, Sekiguchi et al., 1983).

4.1. Konstruktion des Plasmides pSB100

In diesem Abschnitt wird die Strategie für die Konstruktion der BPV-cDNA - Bank beschrieben. Genauere experimentelle Details hierzu sind im Methodenteil aufgeführt (s. Methoden 12.). Zunächst wurde ein Test - Plasmid konstruiert, mit dem geprüft werden konnte, ob rekombinante BPV - Plasmide in Scid - Zellen episomal replizieren und durch Hirtextraktion aus diesen Zellen isoliert werden können. Es sollte außerdem als Zwischenprodukt für die Herstellung der BPV-cDNA - Bank fungieren. Für die Konstruktion wurden die Plasmide pdBPV-MMTneo (Law et al., 1983) und das in dieser Arbeit isolierte Plasmid pcD2-Sc2.1 (s. Ergebnisse 3.9.) verwendet. Aus dem Plasmid pdBPV-MMTneo wurde das komplette BPV - Genom als BamHI - Fragment isoliert und über einen Adapter (Haymerle et al., 1986) in eine singuläre Sall - Schnittstelle des pcD2 - Plasmides inseriert.

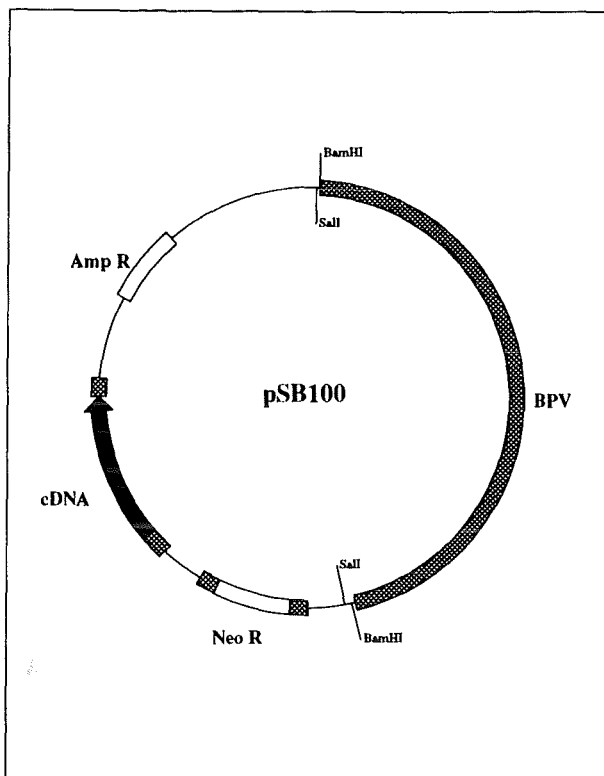


Abb. 23 Schematische Darstellung des BPV - Testplasmids pSB100: In die singuläre SalI - Schnittstelle des in dieser Arbeit isolierten Plasmids pCD2-Sc2.1 wurde das komplette BPV - Genom mit Hilfe von Adapter - Oligonukleotiden inkloniert.

Amp R = Ampicillin - Resistenzgen, Neo R = Neomycin - Resistenzgen, BPV = Genom des Rinder Papillom Virus, cDNA = Insertion des pCD2-Sc2.1 - Plasmids

Das so entstandene Plasmid pSB100 (s. Abb. 23) wurde anschließend zur Transfektion der Zelllinie Sc3T3/w eingesetzt. Als Kontrolle wurde das Plasmid pdBPV-MMTneo in die Scid - Zelllinie transfiziert.

Es wurden je sechs stabil G 418 - resistente Zellklone aus den Transfektionen mit den BPV - Plasmiden isoliert und vermehrt. Anschließend wurden von ihnen Hirtextrakte hergestellt. Nach BamHI - Verdau, wodurch das BPV - Genom aus der Plasmid - DNA freigesetzt wird, und elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel wurde die DNA im *Southern Blot* - Verfahren auf eine Nylonmembran übertragen. In der anschließenden Hybridisierung mit dem kompletten BPV - Genom als Sonde konnte sowohl das Testplasmid pdBPV-MMTneo also auch das neu konstruierte Plasmid pSB100 in den Zellextrakten der transfizierten Zellen nachgewiesen werden (die Daten sind hier nicht dargestellt).

4.2. Konstruktion der BPV-cDNA - Bank

Nachdem feststand, daß rekombinierte pcD2-BPV - Plasmide episomal in der Scid - Zelllinie Sc3T3/w replizieren können, wurde eine BPV-cDNA - Bank hergestellt. Dies erfolgte durch Umkonstruktion der vorhandenen pcD2-cDNA - Bank. Dazu wurde das BPV - Genom als Sall - Fragment aus dem Plasmid pSB100 isoliert und mit der ebenfalls Sall - geschnittenen pcD2 - cDNA ligiert. Der Verdau mit dem Restriktionsenzym Sall führt zur Linearisierung des pcD2 - Vektors. Sall hat außerdem den Vorteil, daß es nur selten in humaner DNA schneidet. Aliquots des Ligationsansatzes (1/50 Volumen) wurden anschließend zur Transformation kompetenter *E. coli* - Zellen eingesetzt. Von verschiedenen ausgetesteten Transformationsprotokollen lieferte schließlich die Elektroporation von *E. coli* DH5 α mit der ligierten Plasmid - DNA die notwendige Anzahl von unabhängigen *E. coli* - Klonen, die eine vollständige humane cDNA - Bank repräsentieren. Insgesamt wurden 3.3×10^6 Ampicillin - resistente *E. coli* - Klone erhalten, aus denen Plasmid - DNA für die Transfektion der Scid - Zelllinie Sc3T3/w präpariert wurde.

5. Transfektion der Scid - Zelllinie mit der BPV-cDNA - Bank

Wie bereits erwähnt, wurde diesmal die Elektroporationsmethode zur Transfektion der Scid - Zelllinie Sc3T3/w mit der neu konstruierten BPV-cDNA - Bank eingesetzt. Insgesamt wurden mit 40 Elektroporationen von je 2×10^6 Zellen 5×10^4 unabhängige, G418 - resistente Scid - Zellklone erhalten.

5.1. Die Röntgenselektion der Scid - Zellklone, die durch Transfektion mit der BPV-cDNA - Bank erhalten worden waren, liefert resistente Zelllinien

Die stabil Neomycin - resistenten Zellklone, die durch Transfektion mit der BPV-cDNA - Bank erhalten worden waren, wurden vereinigt und je 1×10^6 Zellen auf insgesamt 40 Kulturschalen (10 cm - Schalen) eingesät. Nach 2 Tagen wurden die konfluenten Zellkulturen der fraktionierten Röntgenbestrahlung unterzogen (s. Methoden 1.2.1.). Am Ende der Selektion konnten von insgesamt 160 Kulturschalen (10 cm - Schalen) 50 überlebende Einzelklone isoliert werden. Diese wurden, analog zum ersten Klonierungsansatz zunächst phänotypisch in Dosis - Effekt - Versuchen mit Röntgenbestrahlung charakterisiert und anschließend molekulargenetisch analysiert.

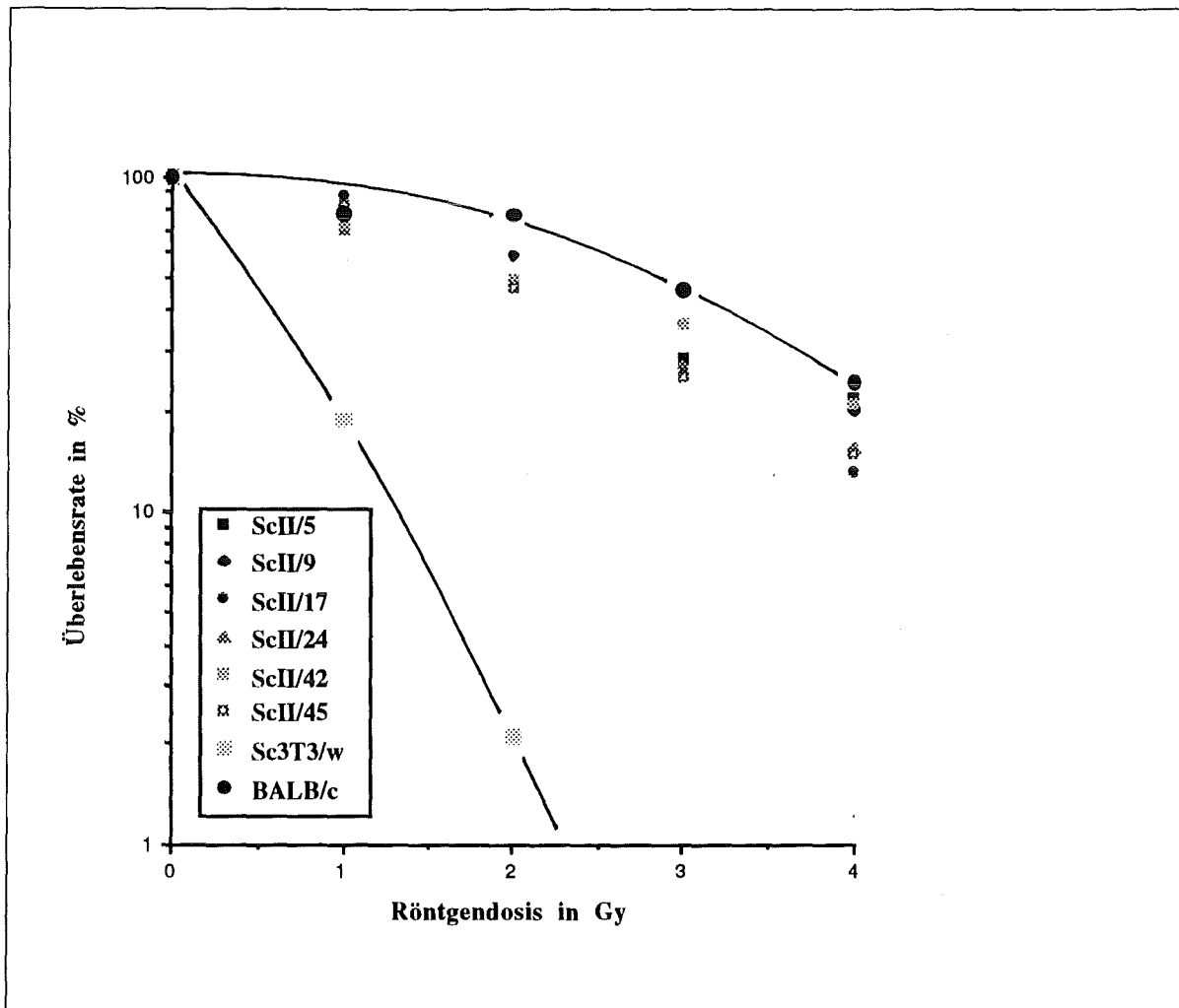


Abb. 24 Dosis - Effekt - Kurven von Scid - Zellklonen, die nach Transfektion mit der neu konstruierten BPV - cDNA - Bank durch Röntgenselektion isoliert worden waren: Die sechs gezeigten transgenen Scid - Zelllinien zeigen vollständige Komplementation ihrer Röntgenstrahlen - Hypersensitivität.

Es wurden definierte Zellzahlen in Kulturschalen eingesät und nach 6 h mit den angegebenen Röntgendosen bestrahlt. Nach 8 - 10 Tagen konnten überlebende Zellkolonien fixiert, gefärbt und gezählt werden. Die Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen. Sc3T3/w = Fibroblasten - Zelllinie der Scid - Maus C.B-17, Balb/c = Fibroblasten - Zelllinie der Balb/c - Maus, ScII/5, 9, 17, 24, 42 und 45 = primäre Scid - Zellklone aus der Röntgenselektion.

5.2. Dosis - Effekt - Versuche mit Röntgenstrahlung

Alle 50 überlebenden Zellklone aus der Röntgenselektion wurden in Dosis - Effekt - Versuchen auf ihre zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Röntgenbestrahlung getestet. 35 Klone waren, obwohl sie die Röntgenselektion überlebt hatten, genauso sensitiv wie die Scid - Zelllinie Sc3T3/w, beziehungsweise wie die Kontrolltransfektante, die mit pdBPV-MMTneo transfiziert worden war. Neun weitere Klone lagen bezüglich ihrer Resistenzeigenschaften zwischen der

sensitiven Scid - Zelllinie und der resistenten Balb/c - Zelllinie. Sechs der 50 Einzelklone erwiesen sich jedoch vergleichbar resistent wie Balb/c - Zellen. Die Dosis - Effekt - Kurven dieser sechs Zellklone sind in der Abb. 24 dargestellt. Alle sechs Einzelklone zeigen nahezu vollständige Komplementation ihrer Strahlensensitivität.

5.3. Die sechs unabhängig voneinander isolierten röntgenresistenten Scid - Zellklone enthalten Plasmide mit gleichem Restriktionsmuster und gleich großen cDNA - Insertionen

Um die Resistenz - vermittelnden Plasmide zu isolieren, wurden von den sechs Scid - Zellklonen Hirtextrakte hergestellt (s. Methoden 5.1.3.). Diese enthalten nur sehr geringe Mengen an Plasmid - DNA. Daher mußte eine besonders effektive Methode für die Transformation von *E. coli* eingesetzt werden, um plasmidhaltige *E. coli* - Klone zu erhalten, aus denen dann anschließend die ursprünglich aus den Hirtextrakten stammende Plasmid - DNA re - isoliert werden konnte. Von allen getesteten Methoden führte nur die Elektroporation zu plasmidhaltigen *E. coli* - Klonen. Nach Isolierung ihrer Plasmid - DNA wurde diese mit dem Restriktionsenzym BamHI, sowie mit BamHI + HindIII verdaut. Alle Plasmide zeigen nach Restriktionsverdau das gleiche Fragmentmuster. Lediglich eine der Vektorbanden zeigt eine kleine Größenveränderung (s. Abb. 25). Die Plasmide erhielten die Bezeichnungen pBPV-Sc1.5 (ScII/5), pBPV-Sc1.5 (ScII/9), pBPV-Sc1.5 (ScII/17), pBPV-Sc1.5 (ScII/24), pBPV-Sc1.5 (ScII/42) und pBPV-Sc1.5 (ScII/45).

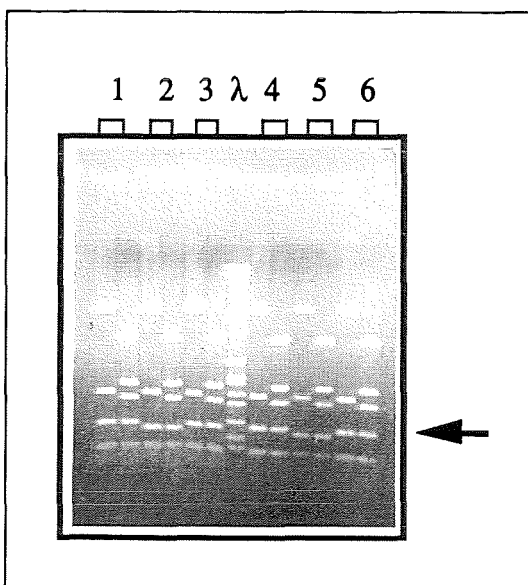


Abb. 25 Fotografie gelelektrophoretisch aufgetrennter und mit Restriktionsenzymen verdauter Plasmid - DNA, die aus *E. coli* nach Elektroporation mit Hirtextrakten aus den Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Zellklonen isoliert worden war: Alle Plasmide zeigen nach Verdau mit BamHI sowie BamHI/HindIII - Doppelverdau das gleiche Restriktionsmuster. Lediglich eine der Vektorbanden kommt in zwei verschiedenen Fragmentgrößen vor (s. Pfeil). In den einzelnen Bahnen wurden die folgenden Plasmid - DNAs aufgetrennt: 1 = pBPV-ScII/5, 2 = pBPV-ScII/9, 3 = pBPV-ScII/17, 4 = pBPV-ScII/24, 5 = pBPV-ScII/42, 6 = pBPV-ScII/45. Die jeweils linke Spur zeigt die BamHI - verdauter Plasmid - DNA, die rechte Spur zeigt die mit BamHI und HindIII verdauter Plasmid - DNA.

Mit Hilfe der PCR war es möglich, den cDNA - Anteil der Plasmide zu amplifizieren und dessen Größe zu bestimmen. Dazu wurden dieselben Oligonukleotide und Versuchsbedingungen verwendet, wie bei der Klonierung der PCR - Produkte aus der genomischen DNA der resistenten Scid - Zelllinien aus dem ersten Klonierungsansatz (s. Ergebnisse 3.4. und Abb. 17 A). Wie die Abb. 26 zeigt, führte die PCR mit der BPV - Plasmid - DNA in allen Fällen zur Amplifikation eines 1.5 kb - Fragmentes.

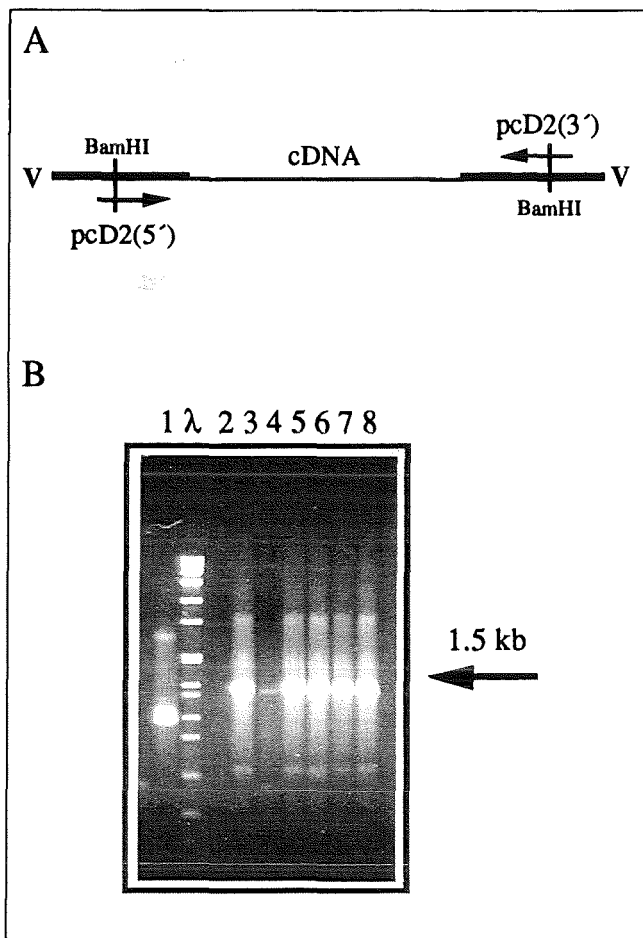


Abb. 26 Nachweis der cDNA in den durch Hirtextraktion aus den Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Zellklonen isolierten BPV - Plasmiden durch PCR: alle Plasmide enthalten eine gleich große cDNA mit einer Länge von 1.5 kb.

Abb. 26 A zeigt schematisch die komplementären Bindestellen der pcD2 - Oligonukleotide pcD2(5') und pcD2(3') an die Vektor - Sequenzen (V) der BPV - Plasmide, die die cDNA flankieren. Die genaue Sequenz der Oligonukleotide befindet sich im Material - und Methoden - Teil

Abb. 26 B zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA aus den einzelnen PCR - Ansätzen, die mit diesen Oligonukleotiden durchgeführt wurden: 1 = PCR - Positivkontrolle, 2 = PCR - Negativkontrolle, 3 - 8 = BPV - Plasmide aus den Röntgenstrahlen resistenten Scid - Zellklonen ScII/5, 9, 17, 24, 42 und 45 (Das schwache PCR - Signal in Bahn 4 ist auf die geringe DNA - Konzentration in diesem Reaktionsansatz zurückzuführen), λ = DNA - Größenstandard.

5.4. Kreuzhybridisierung der PCR - Produkte aus den resistenten Scid - Zelllinien des ersten und zweiten Klonierungsansatzes

Um herauszufinden, ob im zweiten Klonierungsansatz neue cDNA - Sequenzen kloniert worden waren, wurden diese mit dem bereits im ersten Klonierungsansatz klonierten 0.7 kb PCR - Produkt hybridisiert. Hierzu wurde, wie für die Kolonie - Hybridisierung (s. Ergebnisse

3.9.), das interne 0.35 kb XmnI/PstI - Fragment des 0.7 kb PCR - Produktes verwendet. Das Autoradiogramm in der Abb. 27 zeigt das überraschende Ergebnis: Das interne Fragment des 0.7 kb PCR - Produktes aus der Zelllinie ScI/2 hybridisiert mit allen PCR - Produkten der neu isolierten Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Zelllinien. Die Spezifität der Hybridisierung zeigt sich darin, daß keine Hybridisierung mit einer anderen durch PCR amplifizierten Kontroll! cDNA (pcD2-mpg1.2) stattfand, die von den gleichen Vektorsequenzen flankiert wird (Abb. 27, Bahn 1).

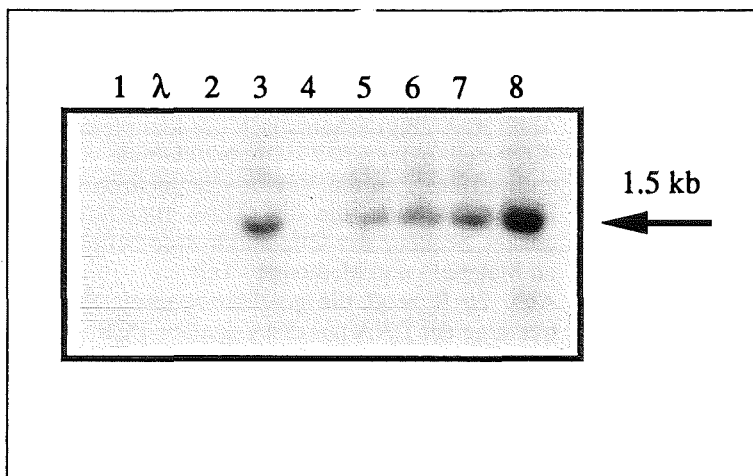


Abb. 27 Autoradiogramm der in Abb. 26 gelelektrophoretisch aufgetrennten Plasmid - DNA nach Hybridisierung mit dem 0.7 kb PCR - Produkt, welches aus der Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Zelllinie ScI/2 kloniert worden war: dieses PCR - Produkt hybridisiert mit allen durch PCR amplifizierten 1.5 kb cDNAs der BPV - Plasmide.

1 = PCR - Positivkontrolle (pcD2-mpg1.2), 2 = PCR - Negativkontrolle, 3 - 8 = BPV - Plasmide der ScII/5, 9, 17, 24, 42 und 45 - Zellklone.

5.5. Die neu isolierten 1.5 kb PCR - Produkte und das 0.7 kb PCR - Produkt zeigen 100%ige Sequenzhomologie

Um die durch die Kreuzhybridisierung wahrscheinlich gemachte Sequenzhomologie des 0.7 kb PCR - Produktes mit den neu isolierten BPV - Plasmiden zu überprüfen, wurde eine PCR mit Oligonukleotiden durchgeführt, die spezifisch an interne Sequenzen des 0.7 kb PCR - Produktes binden (s. Abb. 28 A). In dieser PCR wurde Plasmid - DNA des 0.7 kb PCR - Produktes, die pcD2 - Plasmide aus der Kolonie - Hybridisierung (s. Ergebnisse 3.9.) und die neu isolierten Plasmide aus der Hirtextraktion eingesetzt. Wie die Abb 28 (B) zeigt, wird in allen Fällen ein gleich großes Produkt von 0.35 kb gebildet. Das bedeutet, daß die Oligonukleotide an komplementäre Sequenzen der eingesetzten Plasmid - DNAs binden und dadurch den von ihnen eingegrenzten Sequenzbereiches amplifizieren können. Das wäre nicht der Fall, wenn keine Sequenzhomologie zwischen dem 0.7 kb PCR - Produkt und den neu isolierten Plasmiden aus der Hirtextraktion vorliegen würden.

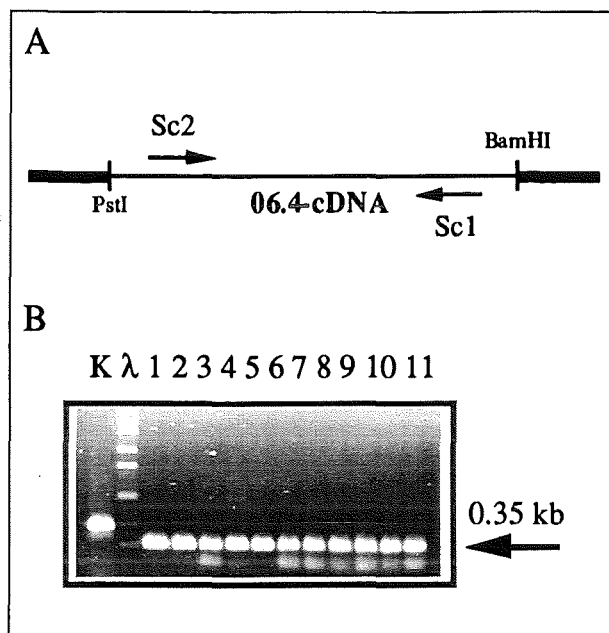


Abb. 28 Vergleichende PCR - Analyse der pcD2 - Plasmide aus dem ersten Klonierungsexperiment und der BPV - Plasmide aus dem zweiten Klonierungsansatz.

Abb. 28 A zeigt die verwendeten Oligonukleotide (Sc1 und Sc2), die komplementär an interne Sequenzen des 0.7 kb PCR - Produktes binden, das als PstI/BamHI - Fragment im Vektor pCMVT7 einkloniert wurde (s. Abb. 17 C). Abb. 28 B zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der verschiedenen PCR - Ansätze: In allen Fällen wird ein 0.35 kb großes Fragment amplifiziert. 1 = pCMVT7-06.4, 2 - 5 = pcD2-Sc1.0, 1.5, 1.8 und 2.1, 6 - 11 = pBPV(ScII/5, 9, 17, 24, 42, 45), K = PCR - Kontrolle, λ = Größenstandard

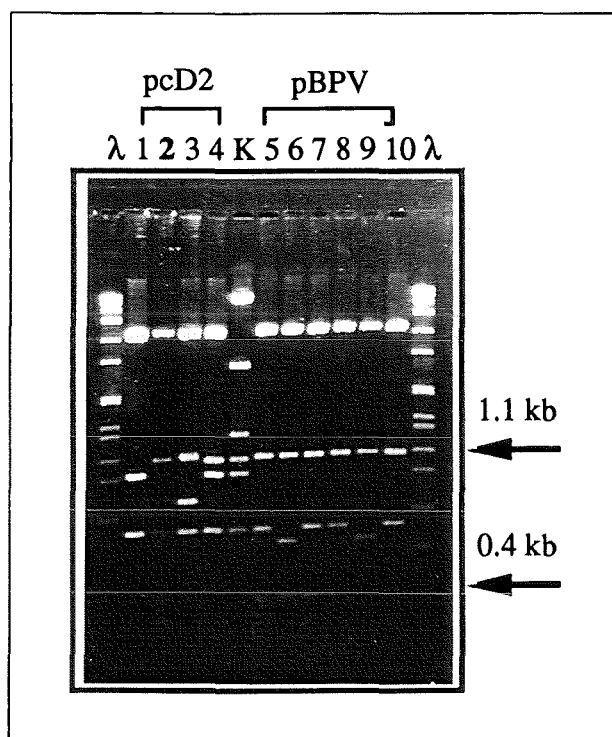


Abb. 29 Gelelektrophoretische Auftrennung BamHI verdauter Plasmid - DNA aus den *E. coli* - Klonen, die durch Kolonie - Hybridisierung mit dem 0.7 kb PCR - Produkt isoliert worden waren und aus *E. coli* - Klonen, die mit den Hirtextrakten der Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Klone aus dem zweiten Klonierungsansatz transformiert worden waren: auch die BPV - Plasmide zeigen nach BamHI - Verdau das für die cDNA der pcD2 - Plasmide charakteristische 1.1 kb - Fragment.

1 - 4 = pcD2-Sc1.0, 1.5, 1.8 und 2.1, 5 - 10 = pBPV(ScII/5, 9, 17, 24, 42, 45), K und λ = DNA - Längenstandards

In Restriktionsanalysen, die mit den Restriktionsendonukleasen EcoRV, HincII und BamHI durchgeführt worden waren, konnten die entsprechenden Schnittstellen in allen cDNAs nachgewiesen werden. Abb. 29 zeigt den BamHI - Verdau der Plasmide, die durch Kolonie -

Hybridisierung mit dem 0.7 kb PCR - Produkt isoliert worden waren, und der durch Hirtextraktion aus den resistenten Scid - Zelllinien des zweiten Klonierungsansatzes isolierten Plasmide im Vergleich. Es fällt auf, daß auch bei den durch Hirtextraktion isolierten Plasmiden eine 1.1 kb - Bande entsteht und ein Restfragment, dessen Größe dem Restfragment des durch Kolonie - Hybridisierung isolierten Plasmides pcD2-Sc1.5 entspricht.

Die folgende Abb. 30 zeigt die Restriktionskarten der Plasmide pcD2-Sc2.1, mit der größten cDNA - Insertion und stellvertretend eins der pBPV-Sc1.5 - Plasmide, das durch Hirtextraktion aus den Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Zellklonen (ScII/x) kloniert worden war.

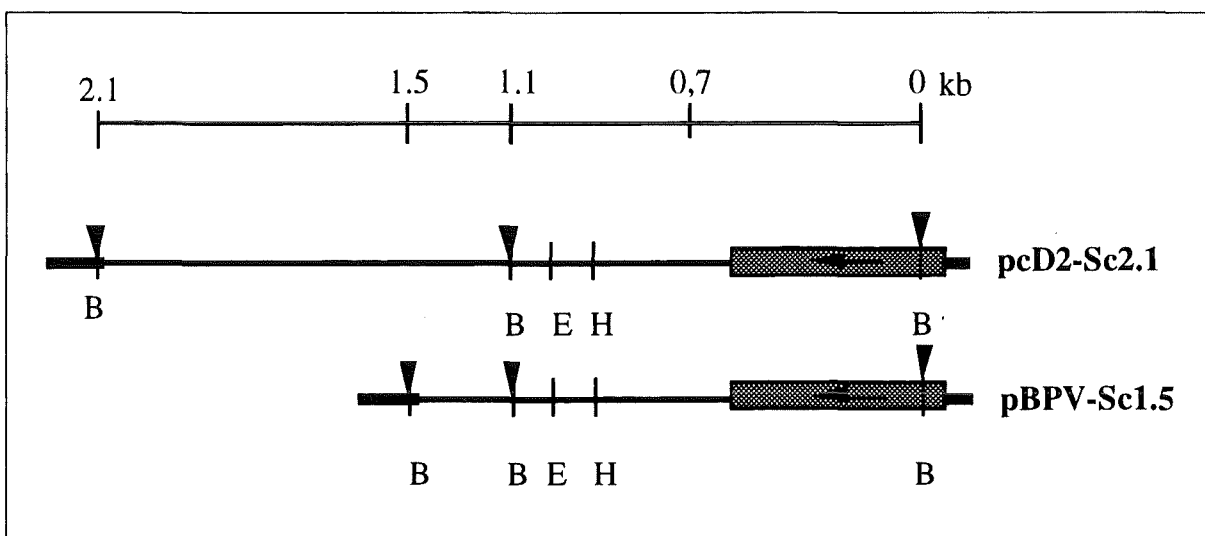


Abb. 30 Vergleichende Restriktionskarte der cDNA - Insertionen der Plasmide pcD2-Sc2.1 und pBPV-Sc1.5. Gekennzeichnet ist die Lokalisation des 0.7 kb PCR - Produktes (graue Boxen) innerhalb der cDNA - Sequenzen der beiden Plasmide und die analysierten Restriktionschnittstellen. Die halbfetten Linien stellen die flankierenden Vektorsequenzen dar. Die Pfeile innerhalb der grauen Boxen beschreiben den ansequenzierten Bereich von 100 Nukleotiden. Die Pfeilspitzen markieren BamHI - Schnittstellen in den flankierenden pcD2 - Vektorsequenzen und innerhalb der cDNA - Sequenzen. B = BamHI, E = EcoRV, H = Hinc II.

Der endgültige Beweis dafür, daß die 0.7 kb cDNA aus der Zelllinie ScI/2 und die 1.5 kb cDNAs aus den resistenten Scid - Zelllinien des zweiten Klonierungsansatzes auf die gleiche cDNA zurückzuführen sind, wurde durch den Vergleich ihrer Sequenzen erbracht. Für die Sequenzierung wurde ein Oligonukleotid verwendet, das spezifisch an eine interne Sequenz des 0.7 kb PCR - Produktes bindet. In beiden Fällen wurden im ansequenzierten Bereich von 100 Nukleotiden identische Sequenzen erhalten.

5.6. Retransfektion der durch Hirtextraktion isolierten Plasmide in die Scid - Zelllinie Sc3T3/w

Durch Sequenzanalyse, PCR und Restriktionsanalyse war eindeutig nachgewiesen worden, daß auch im zweiten experimentellen Ansatz zur Klonierung des Gens, das die Scid - Mutation komplementiert, die gleiche cDNA - Sequenz wie im ersten Klonierungsansatz isoliert worden war. Diese Sequenz führte sowohl als kloniertes PCR - Produkt in pCMVT7-06.4, als auch in den pcD2 -Expressionsplasmiden, die durch Kolonie - Hybridisierung mit dem 0.7 kb PCR - Produkt isoliert worden waren, nach Retransfektion in die Röntgenstrahlen - sensitive Zelllinie Sc3T3/w nicht zu einer eindeutigen Erhöhung der Strahlenresistenz. Da aber die Möglichkeit bestand, daß diese cDNA - Sequenzen aufgrund von während der Klonierung eingeführten Mutationen biologisch inaktiv geworden waren, wurden auch die im zweiten Klonierungsexperiment durch Hirtextraktion isolierten Plasmide stabil in die Scid - Zelllinie retransfiziert. G418 resistente Zellklone wurden wiederum vereinigt und als gemischte Zellpopulation der Röntgenselektion mit 5 Gy in der beschriebenen Weise (s. Ergebnisse 3.8. sowie Methoden 1.2.2.) unterzogen. In den Kontrollselektionen wurden Scid - Zellen, die stabil mit dem Plasmid pdBPV-MMTneo transfiziert worden waren, untersucht. In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Selektionen wurden weder in den Kontrollansätzen, noch in den Ansätzen mit Scid - Zellen, die mit den Hirtplasmiden stabil transfiziert worden waren, überlebende Klone erhalten.

6. Die Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Zelllinien reparieren durch ionisierende Strahlen verursachte DNA - Doppelstrangbrüche

Zur weiteren phänotypischen Charakterisierung der isolierten Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Zelllinien wurde deren Fähigkeit zur Reparatur von DNA - Doppelstrangbrüchen (DSB) analysiert. Dazu wurde die von Oestling et al. (1984) entwickelte neutrale Einzelzell - Gelelektrophorese (*Comet assay*) nach einer Modifikation von Olive et al. (1991) eingesetzt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß die Induktion von DSBs in der DNA an einzelnen Zellen sichtbar und meßbar gemacht wird. Bestrahlte Zellen werden in Agarose eingebettet, auf einen Objektträger aufgetragen, lysiert und anschließend einem elektrischen Feld ausgesetzt (s. Methoden 2.). Durch DSBs fragmentierte DNA wandert in Richtung Anode. Auf diese Weise entsteht das Bild eines Kometen, dessen Schweiflänge ein Maß für die vorhandenen DNA - Schäden ist. Sie ist aber auch ein Maß für die Fähigkeit der Zellen zur Reparatur von DNA - DSBs, wenn man die Zellen nach der Bestrahlung analysiert, nachdem

ihnen Zeit zur Reparatur ihrer DNA - Schäden gegeben wurde. In den vorliegenden Versuchen wurde die Fähigkeit der Röntgenstrahlen - resistenten Zelllinien ScI/2 (aus dem ersten Klonierungsansatz) und ScII/5 (aus dem zweiten Klonierungsansatz) zur DNA - DSB - Reparatur mit der der reparaturkompetenten Balb/c - und der reparaturdefekten ScId - Zelllinie verglichen. Von jeder Zelllinie wurden Kometen von unbestrahlten Zellen und von Zellen, die mit 50 Gy in der ^{60}Co - γ - Quelle bestrahlt worden waren, gemessen. Die Länge der Kometen von Zellen, die nach der Bestrahlung mit der Dosis von 50 Gy für 2 h bei 37 °C inkubiert worden waren, war ein Maß für DNA - DSB - Reparaturaktivität der jeweiligen Zelllinie.

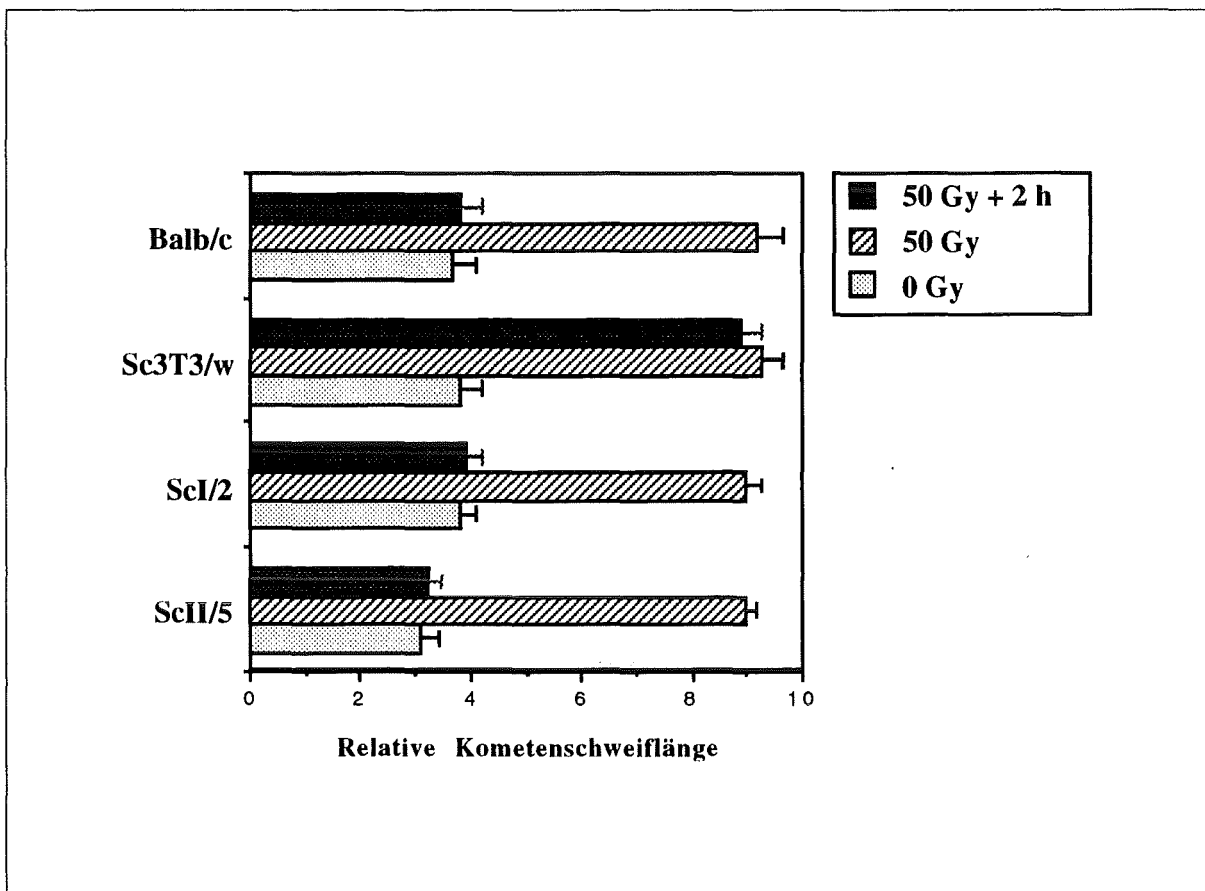


Abb. 31 Die "Kometenschweif" - Länge als Maß für DNA - Doppelstrangbruch - Reparaturaktivität: Die transgenen ScId - Zelllinien zeigen die gleiche Reparaturaktivität wie die Reparatur - kompetente Balb/c - Zelllinie.

2 Tage vor der Bestrahlung wurden je 5×10^5 Zellen pro 5 cm - Kulturschale eingesät. Unbestrahlte Zellen (0 Gy), bestrahlte Zellen (50 Gy) und bestrahlte Zellen, die 2 h bei 37 °C inkubiert wurden (50 Gy + 2 h), wurden in der Einzelzellgelelektrophorese analysiert. Dazu wurden sie auf eine Zellzahl von 10^4 Zellen/ml eingestellt. 0,35 ml dieser Zellsuspension wurden mit 1,0 ml 1%iger LMP - Agarose gemischt und auf einen Objektträger pipettiert. Nach der Lyse der Zellen wurden diese einer Gelelektrophorese unterzogen und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop mit einem Okular mit Maßskala. Die dargestellten Werte geben Einheiten der verwendeten Okularskala an und sind Mittelwerte aus je 100 ausgemessenen Kometen mit ihren Standardabweichungen.

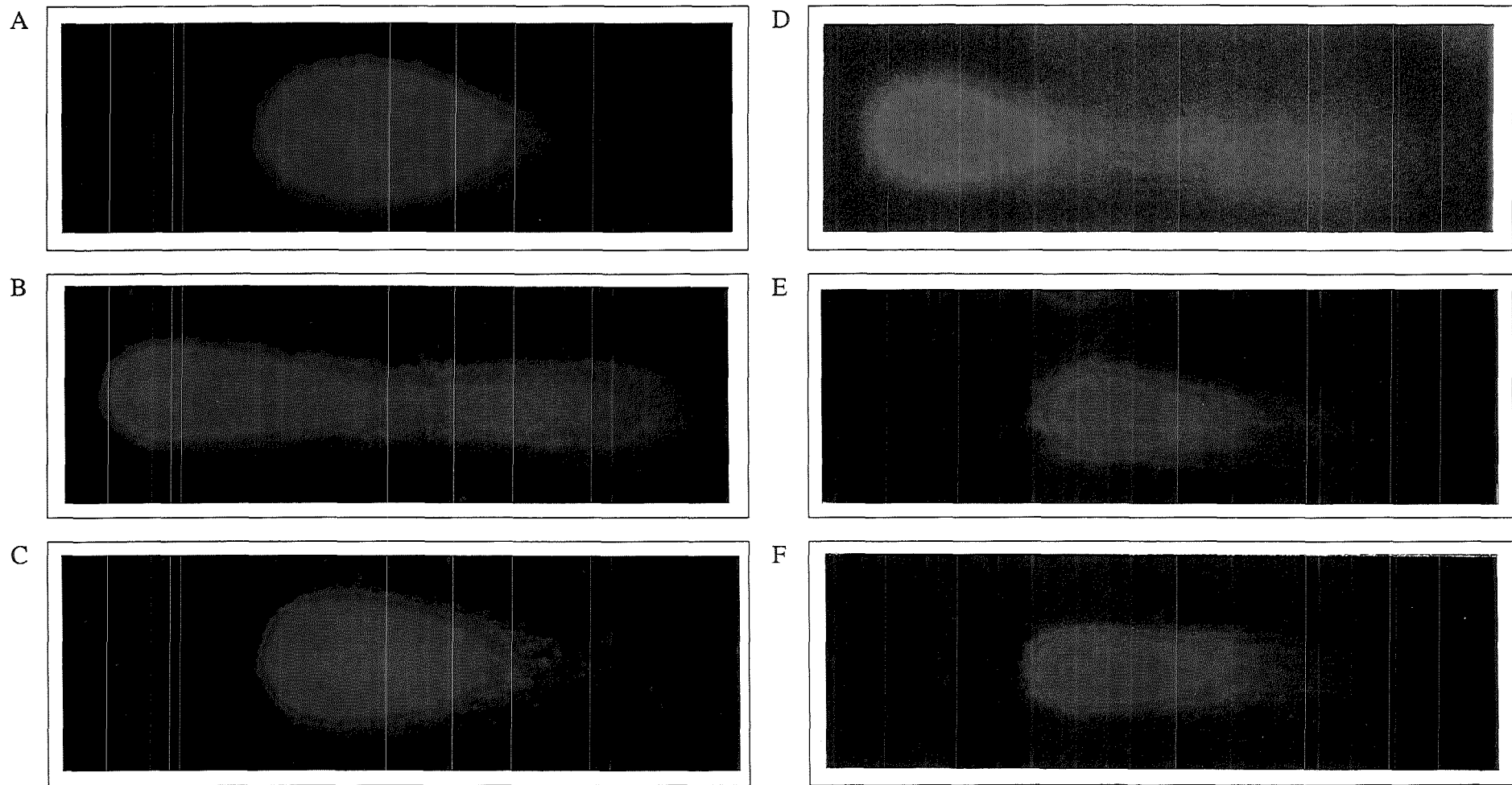


Abb. 32 Fotografien von Kometen, die durch die Einzelzell - Gelelektrophorese erhalten wurden: Die Scid - Transfektanten reparieren nach 2 Stunden die durch Bestrahlung mit 50 Gy erzeugten DNA - Schäden. Die Experimente wurden wie in Abb. 31 beschrieben durchgeführt (s. auch Methoden 2.).

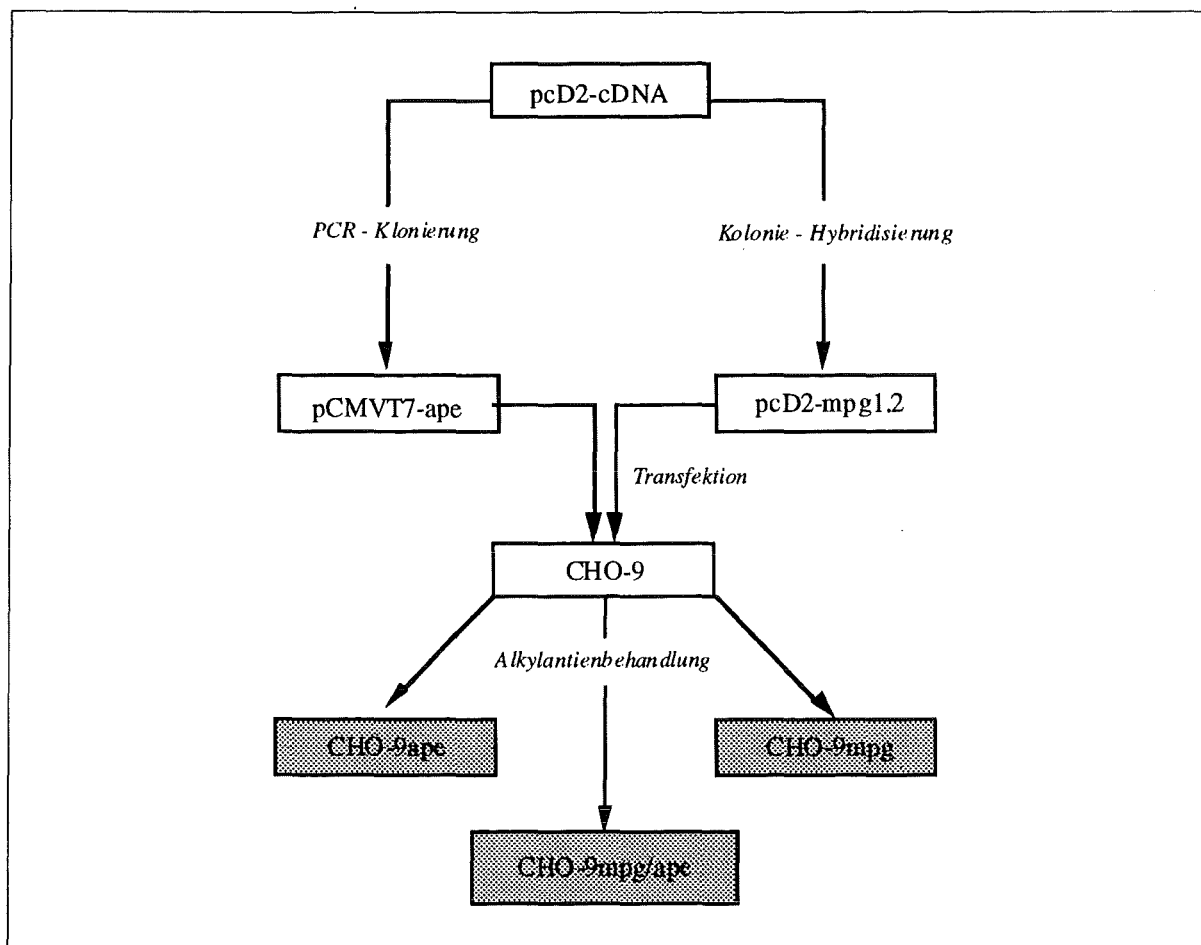
A - C = Balb/c - Zellen: A = unbestrahlte Kontrolle, B = mit 50 Gy bestrahlte Zelle, C = mit 50 Gy bestrahlte Zelle, nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C. D - F = mit 50 Gy bestrahlte Zellen nach zweistündiger Inkubation: D = Sc3T3/w, E = ScI/2, F = ScII/5. Die Fotografien wurden bei 200facher Vergrößerung aufgenommen.

In Abb. 31 ist die Fähigkeit der einzelnen Zelllinien zur Reparatur von DNA - DSBs im Vergleich dargestellt. Die Abb. 32 zeigt repräsentative Kometenbilder der einzelnen Zelllinien. Aus beiden Abbildungen wird deutlich, daß sowohl die Röntgenstrahlen - resistente Zelllinie ScI/2 aus dem ersten Klonierungsansatz, als auch die Röntgenstrahlen - resistente Zelllinie ScII/5 aus dem zweiten Klonierungsansatz, vollständig die Fähigkeit zur DNA - DSB - Reparatur wiedererlangt haben. Sie reparieren die durch ionisierende Strahlen verursachten Schäden genauso effizient, wie die reparaturkompetente Zelllinie Balb/c. Im Gegensatz dazu zeigt die reparaturdefekte Scid - Zelllinie nur sehr geringe Reparaturaktivität. Die Wiederherstellung der DNA - DSB - Reparaturfähigkeit zeigt somit, daß in den durch Transfektion mit humaner cDNA entstandenen Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Zelllinien ein zweiter Phänotyp der Scid - Zelllinie Sc3T3/w komplementiert werden konnte.

Diskussion

Teil I

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschreibt die mit verschiedenen methodischen Ansätzen angestrebte Klonierung der humanen cDNAs, die für die Apurine Endonuklease (APE) und die N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) kodieren. Mit Hilfe von Expressionsplasmiden, die die klonierten cDNAs enthalten, wurden anschließend transgene CHO-9 - Zelllinien hergestellt, die die humanen DNA - Reparaturenzyme exprimieren. Die Behandlung dieser transgenen Zelllinien mit monofunktionellen Alkylantien ließ Rückschlüsse auf die Bedeutung der beiden Reparaturenzyme für das Resistenzverhalten der Zellen gegenüber DNA - schädigenden Agenzien zu. Die nachfolgende Abbildung faßt die experimentelle Vorgehensweise zum ersten Teil dieser Arbeit schematisch zusammen.



Klonierung der cDNA der humanen N-Methylpurin-DNA-Glykosylase und der Apurinen Endonuklease

Durch Verwendung einer unvollständigen MPG - cDNA (Chakravarti et al., 1991) als Hybridisierungssonde konnte in dieser Arbeit durch Kolonie - Hybridisierung die vollständige humane MPG - cDNA aus einer pcD2 - Expressionsbank (Chen et al., 1987) isoliert werden. Die pcD2 - Expressionsbank ist dadurch gekennzeichnet, daß sie cDNA aus menschlichen Zellen enthält, die gerichtet hinter dem frühen SV40 - Promotor kloniert ist. Die Plasmide sind somit zur Transfektion und Expression ihrer cDNA in Säugerzellen geeignet. Die cDNA des isolierten Plasmides pcD2-mpg1.2 zeigt im ansequenzierten 3'- Bereich 100%ige Homologie zur unvollständigen MPG - cDNA, die als Sonde für die Kolonie - Hybridisierung eingesetzt worden war. Der 5'- Bereich der neu klonierten Sequenz ist jedoch um 46 Bp länger und enthält ein Startkodon im korrekten Leseraster. Da das neu isolierte Plasmid pcD2-mpg1.2 aus einer Expressions - Genbank stammt und eine cDNA mit eigenem Startkodon enthält, sind die Voraussetzungen erfüllt, die notwendig sind, um die MPG - cDNA in CHO-9 - Zellen zu exprimieren.

Von den verschiedenen Möglichkeiten zur Klonierung menschlicher Reparaturgene ist die Methode der Komplementation von definierten *E. coli* - Mutanten mit menschlicher cDNA sicherlich die interessanteste. Die Klonierung der humanen O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) (Tano et al., 1990) und der humanen MPG (Chakravarti et al., 1991) beweisen, daß menschliche DNA -Reparaturproteine in *E. coli* biologisch aktiv sein können und in der Lage sind, die Funktion ausgefallener bzw. mutierter endogener Gene zu ersetzen. Ausgehend von dieser Erkenntnis wurde daher versucht, die humane Apurine Endonuklease (APE) durch einen analogen experimentellen Ansatz zu klonieren. Die Transformation der *E. coli* - Mutante BW 528 (xth⁻, nfo⁻) (Cunningham et al., 1986) mit humaner cDNA führte zur Isolierung von *E. coli* - Klonen, die deutliche Resistenz gegenüber dem alkylierenden Agens MMS und der Radikale bildenden Substanz Wasserstoffperoxid zeigten. Es wurde ein Plasmid, das den hypersensitiven Phänotyp der *E. coli* - Mutante komplementiert, kloniert (B. Kaina, nicht publiziert). Die von mir durchgeführte Sequenzanalyse ergab, daß es überraschenderweise keine unbekannt Sequenz als cDNA - Insertion enthielt, sondern einen Teil des 3'- Bereiches der Sequenz des humanen Elongationsfaktors 2. Die Ursache für die Resistenzvermittlung dieses Plasmides in *E. coli* gegenüber MMS und H₂O₂ ist unbekannt (die Daten sind nicht im Ergebnisteil enthalten). Die Komplementationsversuche mit der *E. coli* - Mutante wurden abgebrochen, da es zeitgleich mit diesen Arbeiten einer anderen Arbeitsgruppe (Demple et al., 1991) gelang, mit Hilfe von

spezifischen Antikörpern gegen die gereinigte humane APE die cDNA aus einer Expressions - cDNA - Bank zu klonieren. Ausgehend von der publizierten Sequenz wurde in der vorliegenden Arbeit die cDNA der humanen APE mit der Methode der Polymerase - Kettenreaktion aus der pcD2-cDNA - Bank amplifiziert. Nach Klonierung in den eukaryontischen Expressionsvektor pCMVT7, in dem die APE - cDNA unter der Transkriptionskontrolle des starken viralen CMV - Promotors steht, konnte auch dieses humane DNA - Reparaturgen in CHO-9 - Zellen transfiziert und exprimiert werden.

Die Überexpression des humanen MPG - Gens bewirkt keine Erhöhung der zellulären Resistenz von CHO-9 - Zellen gegenüber alkylierenden Agenzien

Stabil mit der MPG - cDNA des Plasmides pcD2-mpg1.2 transfizierte CHO-9 - Zellen zeigen in Selektionsversuchen mit den Alkylantien MMS (Methyl-Methan-Sulfonat) und MNNG (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitroso-Guanidin) keine erhöhte Überlebensrate. Die in diesen Experimenten erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Erhöhung der intrazellulären MPG - Konzentration keinen Einfluß auf die Resistenz der Zellen gegenüber der toxischen Wirkung von Alkylantien hat. Dieser Befund wurde durch die Charakterisierung von Einzelzellklonen erhärtet. Einige CHO-9mpg - Zellklone zeigten eine stark erhöhte Transkription des transfizierten humanen MPG - Gens und entfernten verstärkt 3-Methyladenin aus der DNA (Ibeanu et al., 1992). Trotz der erhöhten Expression des transfizierten humanen MPG - Gens zeigten diese Zellen keine Erhöhung ihrer Resistenz in Dosis - Effekt - Versuchen mit alkylierenden Agenzien. Im Gegensatz dazu beobachteten Klungland et al. (1992) bei Überexpression der vom tag - Gen kodierte 3-Methyladenin-DNA-Glykosylase von *E. coli* in der Chinesischen Hamsterzelllinie V79 einen leichten doch signifikanten Anstieg der Resistenz dieser Zelllinie gegenüber den Alkylantien MMS und MNU (Methyl-Nitroso-Harnstoff). Habraken und Laval (1993), die eine besonders sensitive Hamsterzelllinie (irs 1) mit der Alk A - Glykosylase von *E. coli* sowie mit der N-Methylpurin-DNA-Glykosylase der Ratte stabil transfiziert haben, berichten ebenfalls von einem Anstieg der Resistenz dieser mutierten Zelllinie gegenüber MMS. Die Transfektion derselben Gene in V79 - Wildtypzellen führte dagegen auch bei diesen Arbeiten nicht zur erhöhten Resistenz gegenüber Alkylantien. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse kann in den Zellen selbst liegen. Die von Habraken und Laval (1993) verwendete Hamsterzelllinie irs1 ist zehnmal sensitiver, als die parentale V79 - Zelllinie gegenüber den Alkylantien MMS und EMS (Äthyl - Methan - Sulfonat). Man vermutet bei dieser Zelllinie eine deutlich reduzierte Glykosylaseaktivität (Habraken und Laval, 1993). Eine Erhöhung der Glykosylaseaktivität durch Transfektion mit den genannten Genen könnte sich daher positiv auf die Resistenzentwicklung der Zelllinie auswirken. Eine weitere mögliche

Ursache für die abweichenden Ergebnisse kann in der Substratspezifität der einzelnen Glykosylasen liegen. Von der Tag - Glykosylase aus *E. coli* ist bekannt, daß sie sehr spezifisch 3-Methyladenin entfernt, aber keine anderen Alkylierungsschäden (Klungland et al., 1992). Die menschliche MPG hat ein größeres Substratspektrum: Sie entfernt neben 3-Methyladenin auch 7-Methylguanin sowie geringe Mengen 3-Methylguanin (Chakravarti et al., 1991). Es könnte sein, daß durch die Überexpression von Glykosylasen mit größerem Substratspektrum zu viele apurine/apyrimidinische (AP) Stellen entstehen, die von den nachfolgenden enzymatischen Schritten der Exzisionsreparatur nicht schnell genug weiter bearbeitet werden können und dann selbst toxisch auf die Zelle wirken (Kaina et al., 1993). Das Ergebnis weist außerdem darauf hin, daß die MPG in CHO-9 - Zellen nicht limitierend in ihrer Menge ist und somit nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Exzisionsreparatur darstellt, sondern daß dieser von einem nachfolgenden Enzym bestimmt wird, das an der Entfernung der AP - Stellen beteiligt ist.

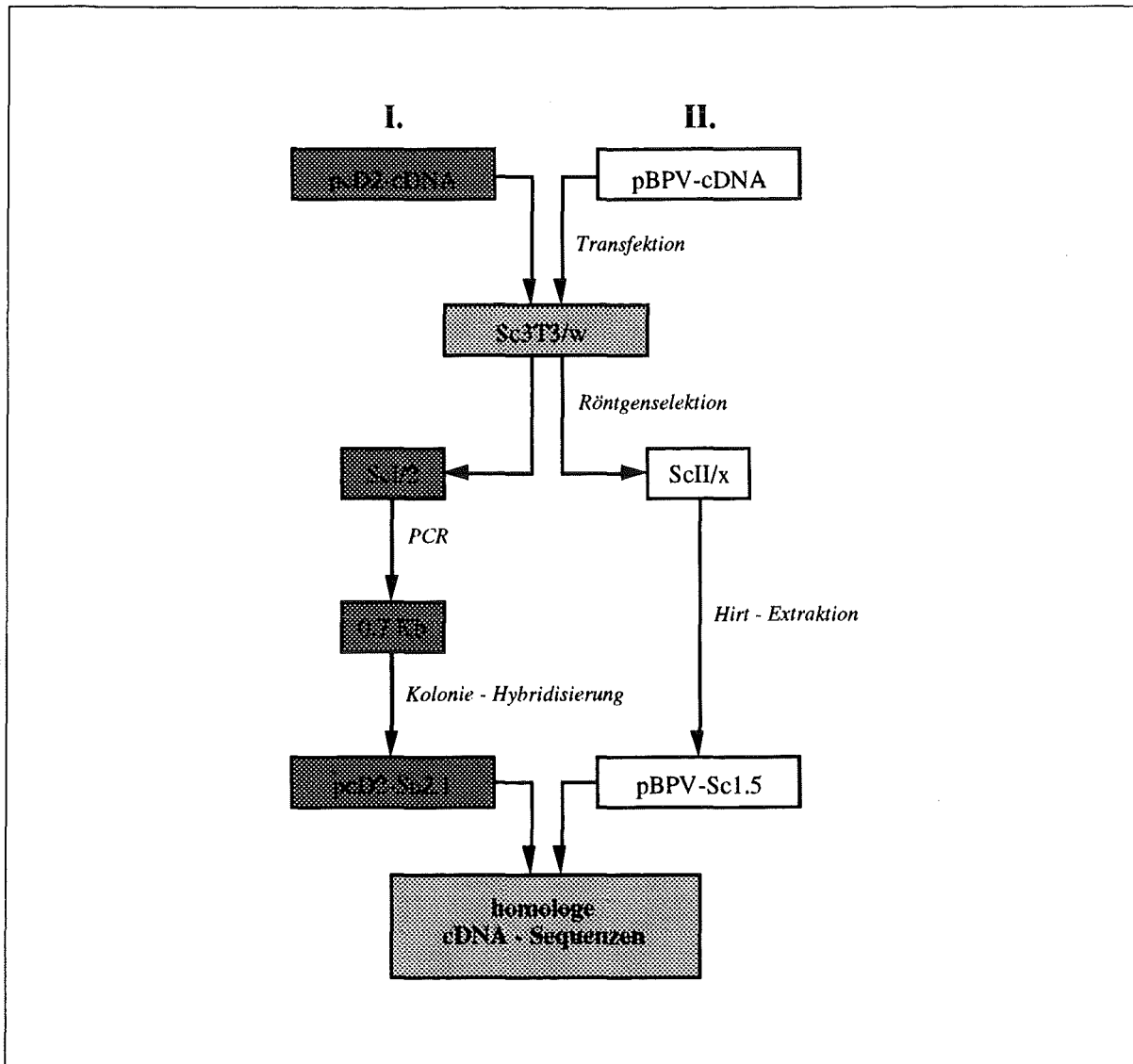
CHO-9 - Zellen, die sowohl das humane MPG - als auch das humane APE - Gen exprimieren, zeigen deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Alkylantien - Behandlung

Durch Transfektion der cDNA der humanen APE in CHO-9 - Zellen sollte geprüft werden, ob die verstärkte Expression der APE zur Erhöhung der zellulären Resistenz gegenüber monofunktionellen Alkylantien führt. Dabei wurde von der Arbeitshypothese ausgegangen, daß AP - Stellen, die durch die Exzisionsreparatur von Alkylierungsschäden gebildet werden, toxisch sind. Resistenzentwicklung würde auch bedeuten, daß die Menge an endogener APE limitierend für die Kapazität der Exzisionsreparatur ist. Erhöht sich die zelluläre Resistenz nicht, so ist dies als Hinweis dafür zu werten, daß die Menge der APE nicht limitierend auf die Exzisionsreparatur wirkt. Als Testzelle zur Prüfung dieser Frage diente wiederum die Chinesische Hamsterzelle CHO-9, die stabil mit der APE - cDNA des in dieser Arbeit konstruierten Plasmides pCMVT7-ape transfiziert wurde. Außerdem wurde eine CHO-9 - Zelle, die bereits das humane MPG - Gen überexprimiert (CHO-9mpg), zusätzlich mit dem ape - Gen transfiziert. Mit den Doppeltransfektanten konnte geprüft werden, ob eine Erhöhung der zellulären Resistenz durch die gleichzeitige Überexpression beider Gene (MPG und APE) möglich ist. Wie die Analyse der CHO-9mpg - Transfektanten gezeigt hat, führt die Überexpression der MPG alleine nicht zur Resistenzhöhung der CHO-9 - Zelle. Anhand der Doppeltransfektanten, die neben dem MPG - Gen zusätzlich die APE überexprimieren, sollte deshalb geprüft werden, ob eine beschleunigte "Weiterbearbeitung" der AP - Stellen während der Exzisionsreparatur zu erhöhter Resistenz gegenüber Alkylantienbehandlung führt.

In Dosis - Effekt - Versuchen zeigten von den CHO-9 - Zellklonen, die eine deutliche Transkription der humanen APE aufweisen, nur die CHO-9 - Doppeltransfektanten eine signifikante Resistenzerhöhung gegenüber MMS und MNNG. Die alleinige Expression der humanen APE führte dagegen nicht zur erhöhten zellulären Resistenz der transgenen CHO-9 - Zelllinien. Das Ergebnis kann dahingehend interpretiert werden, daß die Konzentration der Apurinen Endonuklease in der Zelle nicht limitierend für die Exzisionsreparatur - Kapazität der Zellen ist und eine Erhöhung keinen Einfluß auf die zelluläre Resistenz gegenüber alkylierenden Agenzien hat. Aufgrund der Tatsache, daß die CHO-9 - Doppeltransfektanten, die beide humane DNA - Reparaturgene enthalten, eine deutliche Resistenzerhöhung zeigen, wurde zunächst angenommen, daß die von der MPG gebildeten AP - Stellen durch gleichzeitige Überexpression der humanen APE "entschärft" werden und somit die Exzisionsreparatur in ihrer Gesamtheit effizienter abläuft. Allerdings zeigten die Doppeltransfektanten überraschenderweise O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) - Aktivität, die in der phänotypisch als Mex⁻ charakterisierten parentalen CHO-9 - Zelllinie nicht vorhanden ist. Die Resistenz dieser Zelllinien gegenüber den verwendeten Alkylantien ist daher sehr wahrscheinlich auf diese Enzymaktivität zurückzuführen. Nur die MGMT kann O⁶-Methylguanin - Schäden, die durch MNNG und, in deutlich geringerem Ausmaß, durch MMS (Beranek, 1990) verursacht werden, reparieren. Somit bleibt die Frage zu klären, wodurch die Reaktivierung der endogenen Hamster - MGMT bewirkt wird. Nach den vorliegenden Daten sieht es so aus, als ob das Phänomen nur in den CHO-9 - Doppeltransfektanten auftritt, nicht aber in CHO-9 - Zelllinien, die nur mit dem mpg - Gen oder nur mit dem ape - Gen stabil transfiziert wurden. Außerdem sind bisher keine Mex⁺ - Revertanten der Zelllinie CHO-9 beschrieben worden. Auch gibt es keine Hinweise dafür, daß in Säugerzellen Gene der Exzisionsreparatur und der MGMT koreguliert werden. Zukünftige Experimente werden zeigen, ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen den transfizierten, humanen Genen der Exzisionsreparatur und der Aktivierung der endogenen Hamster - MGMT gibt und welchen Beitrag beide Reparaturprozesse zur Vermittlung der beobachteten Resistenz der CHO-9 - Doppeltransfektanten leisten.

Teil II

Scid kennzeichnet einen schwerwiegenden Immundefekt des Menschen, der die zelluläre und humorale Immunantwort zum Erliegen bringt. Ein phänotypisch entsprechendes Tiermodell stellt der Maus - Stamm C.B-17 dar. Im Gegensatz zum Scid - Phänotyp des Menschen, dessen genetische Defekte zum Teil bekannt sind, ist die Mutation, die zum murinen Scid - Phänotyp führt, noch unbekannt. Molekulargenetische Untersuchungen der Scid - Maus haben ergeben, daß aufgrund der defekten V(D)J - Rekombination weder intakte Immunglobulin - Gene, noch T - Zell - Rezeptorgene gebildet werden. Dadurch wird die Entstehung funktioneller B - und T - Lymphozyten verhindert. Ein zweites phänotypisches Merkmal der Scid - Maus C.B-17 ist ihre Hypersensitivität gegenüber Röntgenstrahlen, die eine Folge der Defizienz in der Reparatur von DNA - Doppelstrangbrüchen ist (Fulop und Phillips, 1990, Biedermann et al., 1991, Hendrickson et al., 1991, Chang et al., 1993). Da auch während der V(D)J - Rekombination intermediär Doppelstrangbrüche auftreten, wurde postuliert, daß beide Defekte der Scid - Maus durch die Mutation eines Proteins verursacht werden, das an beiden Vorgängen beteiligt ist (Hendrickson et al., 1991). Die Klonierung des Scid - Gens würde damit zur Aufklärung von gleich zwei wichtigen zellulären Prozessen beitragen: Herstellung funktioneller Antigenrezeptorgene in der V(D)J - Rekombination und die Wiederherstellung der genomischen Integrität nach Erzeugung von DNA - DSB durch ionisierende Strahlen. Da auch in vitro kultivierte Fibroblasten der Scid - Maus C.B-17 hypersensitiv gegenüber Röntgenbestrahlung sind, stellen sie ein ideales System für die phänotypische Komplementation durch Transfer von humanen Genen dar. In der vorliegenden Arbeit wurden mit zwei unabhängigen Klonierungsansätzen phänotypisch vollständig komplementierte Scid - Zelllinien erhalten. Diese waren nach Transfektion von zwei verschiedenen cDNA - Bibliotheken in die Röntgenstrahlen - sensitive Scid - Zelllinie Sc3T3/w durch Selektion mit Röntgenstrahlung isoliert worden. Der Vergleich der aus unabhängigen Scid - Transfektantenklonen isolierten cDNAs zeigt Homologie ihrer DNA - Sequenzen. Im nachfolgenden Schema wird der Ursprung der in dieser Arbeit hergestellten transgenen Zelllinien sowie der daraus isolierten cDNA - Sequenzen verdeutlicht.



Beurteilung des verwendeten Klonierungssystems

Das in dieser Arbeit etablierte Röntgenselektionssystem, das auf fraktionierter Bestrahlung von nicht proliferierenden Zellen basiert, erlaubt die Selektion von resistenten Zellen aus einer Massenpopulation von strahlensensitiven Zellen. In den wiederholt durchgeführten Testselektionen mit der Röntgenstrahlen - sensitiven Scid - Zelllinie Sc3T3/w und der strahlenresistenten Zelllinie Balb/c wurde jeweils eine 100%ige Abtötung aller Scid - Zellen erreicht, während ca. 80% der Balb/c - Zellen die Selektion überlebten. Da keine Röntgenstrahlen - resistenten Scid - Revertanten selektioniert wurden, zeigt dies gleichzeitig den stabilen Charakter der Scid - Mutation. Röntgenselektionsversuche von Scid - Zellklonen,

die stabil mit dem Plasmid pSV2neo, welches die kodierende Sequenz für das Neomycin - Resistenzgen enthält, transfiziert worden waren, führten zu einer geringen Anzahl von überlebenden Zellklonen. Da sich diese in Dosis - Effekt - Versuchen nicht als resistenter gegenüber Röntgenstrahlen erwiesen als die Ausgangszelllinie Sc3T3/w, kann davon ausgegangen werden, daß Transfektion mit dem Neomycin - Resistenzgen alleine nicht zur Röntgenstrahlen - Resistenz der Scid - Zellen führt.

Die für die Transfektion verwendete humane pcD2-cDNA - Bank (Chen et al., 1987) wurde in einer anderen Arbeit (Fritz, 1994) auf die Anwesenheit von großen und seltenen cDNAs getestet. Dabei wurden cDNA - Fragmente bis zu 2.5 kb isoliert. Als seltene cDNA - Spezies wurde das c-jun - Gen, dessen Transkript schätzungsweise einmal pro 4×10^4 mRNA - Molekülen in nicht stimulierten Zellen auftritt (Fritz, 1994), nachgewiesen. Die Expression der cDNAs, die in den pcD2- Plasmiden unter der Transkriptionskontrolle des viralen SV40 - Promotors stehen, wurde in mehreren Arbeiten gezeigt (Chen et al., 1987, Ibeanu et al., 1992). Die Plasmide der pcD2 - Genbank müssen in die Chromosomen der Empfängerzelle integrieren, um stabil an die Tochterzellgeneration weitervererbt zu werden. Dies geschieht zufallsgemäß durch den Vorgang der illegitimen Rekombination. Dabei kann es vorkommen, daß Sequenzen der transfizierten Plasmid - DNA verlorengehen. Wenn diese Sequenzen von der humanen cDNA stammen, kann dies die Inaktivierung des Gens zur Folge haben. Wenn flankierende Vektorsequenzen deletiert werden, besteht die Möglichkeit, daß die integrierte humane cDNA nicht mit Hilfe der Polymerase - Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden kann, wodurch die Isolierung des Gens mit dieser Methode unmöglich wird. Der Verlust der flankierenden Vektorsequenzen kann bei den in dieser Arbeit isolierten resistenten Scid - Zelllinien ScI/3 und ScI/6 die Ursache dafür sein, daß aus dem Genom dieser Zellen keine cDNA durch PCR amplifiziert werden konnte. In der *Southern Blot* - Analyse wurde zwar integrierte pcD2 - DNA im Genom dieser Zelllinien nachgewiesen, diese konnte aber mit der PCR nicht amplifiziert werden (s. Ergebnisse 3.3.). Die Isolierung von genomisch integrierter cDNA mittels PCR birgt noch ein weiteres Risiko: Aufgrund der ineffektiven Korrekturlesefunktion der Taq - Polymerase können Mutationen auftreten, die zur Isolierung einer biologisch inaktiven cDNA führen können.

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal die Konstruktion einer BPV-cDNA - Bank beschrieben. Diese Genbank, die ebenfalls zur Transfektion der Röntgenstrahlen - sensitiven Zelllinie Sc3T3/w verwendet wurde, hat große Vorteile gegenüber einer Integrations - Genbank. Da das Genom des Rinderpapillom - Virus (BPV) die episomale Replikation der Plasmid - DNA in Maus - Zelllinien ermöglicht, ist die Gefahr von Integrationsartefakten deutlich verringert. Aus dem gleichen Grund kann die Plasmid - DNA einfach und schnell durch Hirtextraktion aus

resistenten Scid - Zellklonen isoliert werden. Damit besteht auch nicht, wie bei der Isolierung von integrierter cDNA durch PCR, die Gefahr, daß Mutationen in der cDNA - Sequenz erzeugt werden. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß ein BPV - Testplasmid (s. Ergebnisse 4.1.) stabil in die Scid - Zelllinie Sc3T3/w transfiziert und anschließend durch Hirtextraktion isoliert werden kann. Da die BPV-cDNA - Bank auf der Basis der pcD2 - Genbank konstruiert worden war, konnte davon ausgegangen werden, daß die Plasmid - kodierte cDNA exprimiert wird.

Vollständige phänotypische Komplementation der Scid - Zelllinie Sc3T3/w durch Transfektion mit humaner cDNA

In zwei unabhängigen Klonierungsexperimenten, in denen Sc3T3/w - Zellen mit humaner cDNA transfiziert worden waren, konnten Scid - Zelllinien mit stabil Röntgenstrahlen - resistentem Phänotyp isoliert werden. Die Zelllinien ScI/2 und ScI/7, die durch Transfektion mit der pcD2 - Genbank erhalten worden waren, sowie sechs Zellklone (ScII/x, x = 5, 9, 17, 24, 42, 45), die durch Transfektion mit der in dieser Arbeit konstruierten BPV-cDNA - Bank erhalten worden waren, zeigten eine nahezu vollständige bzw. vollständige Komplementation der Röntgenstrahlen - Hypersensitivität: in Dosis - Effekt - Versuchen erwiesen sich diese Zellklone als vergleichbar resistent gegenüber Röntgenstrahlung, wie die strahlenresistente Kontroll - Zelllinie Balb/c. Die Analyse der Zellklone ScI/2 und ScII/5 mit der Methode der Einzelzell - Gelelektrophorese (*Comet assay*) macht deutlich, daß auch das zweite phänotypische Merkmal der Scid - Zelllinie, ihre Defizienz in der Reparatur von DNA - DSBs, korrigiert worden war. Die in unterschiedlichen Klonierungsexperimenten isolierten Scid - Zelllinien zeigen beide DNA - Doppelstrangbruch - Reparaturaktivität. Diese entspricht der Aktivität der Reparatur - kompetenten Balb/c - Zelllinie und ist signifikant von der Reparatur - defekten Sc3T3/w - Zelllinie verschieden. Die Zelllinie ScI/2 wurde außerdem von einer anderen Arbeitsgruppe (B. Bühler, MPI Freiburg) auf ihre Fähigkeit zur V(D)J - Rekombination analysiert. Die dabei mit Plasmid - Substraten erhaltenen Rekombinationsdaten machen die Komplementation auch dieses dritten phänotypischen Merkmals in dieser Zelllinie wahrscheinlich (B. Bühler, persönliche Mitteilung). Damit wird deutlich, daß durch die Transfektion von humaner cDNA die spezifischen phänotypischen Merkmale der Scid - Zelllinie Sc3T3/w korrigiert worden sind. Es wäre denkbar, daß die Röntgenstrahlen - Resistenz der Scid - Transfektanten durch Transfektion mit einer cDNA bewirkt wird, die für ein Produkt kodiert, das nicht in direktem Zusammenhang mit dem Scid - Phänotyp steht (z. B. ein "Radikalfänger"). Die Tatsache, daß die Scid - Transfektanten nicht nur Röntgenstrahlen - resistent sind, sondern auch DNA - DSB - Reparatur zeigen, spricht dafür, daß in diesen

Zelllinien eine spezifische Komplementation des Defektes stattgefunden hat. Revertanten sind aufgrund der umfangreichen Kontrollexperimente, die im Zusammenhang mit der Etablierung des Röntgenselektionssystems durchgeführt worden sind, sehr unwahrscheinlich.

Analyse der in zwei unabhängigen Transfektionsserien klonierten cDNAs

Die Analyse der genomischen DNA der strahlenresistenten Scid - Zellklone aus der Transfektion mit der pcD2 - Genbank zeigte, daß insgesamt nur wenige unterschiedliche Integrationen in das Genom der Scid - Zellen stattgefunden haben. Die Tatsache, daß aus dem Genom von nur zwei Zelllinien die Isolierung von PCR - Produkten möglich war, könnte dafür sprechen, daß durch den Integrationsvorgang Sequenzen verloren gegangen sind, die für die spezifische Bindung der Oligonukleotide und der anschließenden Amplifikation der cDNA in der PCR erforderlich sind. Die mit der Integration von Plasmid - DNA zusammenhängenden Probleme sollten durch die Konstruktion und Transfektion einer BPV-cDNA - Genbank umgangen werden. Da BPV - Plasmide in der Regel nicht in die chromosomale DNA ihrer Empfängerzelle integrieren, konnte die humane cDNA aus den resistenten Zellklonen des zweiten Klonierungsansatzes durch einfache Hirtextraktion isoliert werden. Die Restriktions - und PCR - Analyse der Plasmid - DNA aus den sechs unabhängig voneinander isolierten Einzelzellklonen ScII/5, 9, 17, 24, 42 und 45 machte deutlich, daß alle Zellklone die gleiche cDNA enthielten. Die Kreuzhybridisierung des 0.7 kb PCR - Produktes aus der genomischen DNA der Zelllinie ScI/2 mit der cDNA aller klonierten BPV - Plasmide bestätigte nicht nur, daß die Insertionen der BPV - Plasmide identisch sind, sondern deutete außerdem auf die Homologie der in unabhängigen Klonierungsansätzen isolierten cDNAs hin. Dieser Befund konnte durch Restriktionsanalyse der BPV - Plasmide und der pcD2 - Plasmide, die durch Kolonie - Hybridisierung mit dem 0.7 kb PCR - Produkt isoliert worden waren, bestätigt werden. Der Beweis, daß tatsächlich Übereinstimmung zwischen den cDNAs auf Nukleinsäureebene besteht, wurde durch PCR - und Sequenzanalyse geführt. Die Tatsache, daß in den zwei voneinander unabhängigen, mit zwei unterschiedlichen cDNA - Bibliotheken durchgeführten Klonierungsexperimenten die gleiche humane cDNA aus resistenten Scid - Zellen isoliert worden war, macht einen kausalen Zusammenhang zwischen der transfizierten humanen cDNA und der phänotypischen Komplementation der Scid - Zelllinie Sc3T3/w sehr wahrscheinlich. Das Vorhandensein dieser cDNA in mehreren unabhängigen Scid - Zellklonen spricht außerdem dagegen, daß es sich bei den isolierten resistenten Scid - Zelllinien um einfache Revertanten handelt.

Die klonierte cDNA stammt von einem Gen, das in menschlichen Fibroblasten transkribiert wird

Die Sequenz des 0.7 kb PCR - Produktes ist nicht in der EMBL - Datenbank gespeichert (Stand April '94). Daraus kann gefolgert werden, daß die in dieser Arbeit isolierte cDNA für ein bisher unbekanntes Protein kodiert. In der Sequenz des 0.7 kb PCR - Produktes konnte kein offenes Leseraster ermittelt werden. In der *Northern Blot* - Analyse mit dieser Sequenz als Sonde wurde jedoch ein Transkript von 1.4 kb in einer mRNA - Präparation aus menschlichen Fibroblasten nachgewiesen. Das zeigt, daß das klonierte PCR - Fragment tatsächlich von einer cDNA abstammt. Das Fehlen eines offenen Leserasters im 0.7 kb PCR - Produkt könnte an DNA - Synthesefehlern während der PCR - Amplifikation liegen oder auch darauf zurückgeführt werden, daß ein 3' - nicht translaterter Bereich der cDNA kloniert worden war. Die starke Kreuzhybridisierung des PCR - Produktes mit einer gleich großen mRNA aus Maus - Zellen deutet auf eine hohe Homologie der Gene in den untersuchten humanen und murinen Zellen hin. Die Homologie von Genen verschiedener Spezies ist ihrerseits ein Zeichen für die Konservierung wichtiger Genfunktionen. Das 1.4 kb mRNA - Transkript konnte sowohl in Balb/c, als auch in Sc3T3/w - Zellen nachgewiesen werden. Die Präsenz einer mRNA sagt jedoch noch nichts über ihre Funktionalität aus, da ihre Sequenz mutiert sein und zu inaktiven Genprodukten führen kann. Diese Situation liegt im Fall aller klonierten ERCC - (*Excision repair cross complementing*) und XP - (*Xeroderma pigmentosum*) Gene vor (Weeda et al., 1990b).

Die Retransfektion der klonierten cDNA führt nicht zu stabilen strahlenresistenten Scid - Zellklonen

Die in den primären Scid - Transfektantenklonen (ScI/x und ScII/x) aus beiden Klonierungsexperimenten erzielte vollständige Korrektur der Strahlensensitivität konnte durch Retransfektion der isolierten cDNAs in die Zelllinie Sc3T3/w nicht erreicht werden. Die stabile Transfektion der Scid - Zelllinie mit dem klonierten 0.7 kb PCR - Produkt und dem Plasmid pcD2-Sc2.1, das durch Kolonie - Hybridisierung mit dem PCR - Produkt als Sonde aus der pcD2 - Genbank isoliert worden war, führte in einigen Selektionsversuchen zu einer deutlich erhöhten Überlebensrate. In Dosis - Effekt - Versuchen mit überlebenden Einzelklonen aus diesen Versuchen konnten jedoch keine Zellklone mit signifikant erhöhter Resistenz gegenüber Röntgenstrahlen isoliert werden. Dieser Befund steht den Ergebnissen gegenüber, die stark für einen Zusammenhang zwischen der klonierten cDNA und der phänotypischen Komplementation der

Zelllinie Sc3T3/w sprechen. Es sind mehrere Möglichkeiten denkbar, die das Ausbleiben der Komplementation nach Retransfektion der cDNA in die Scid - Zelllinie erklären können:

1. In der *Northern Blot* - Analyse wurde ein 1.4 kb mRNA - Transkript nachgewiesen. Wenn für die Korrektur des Scid - Defektes die Expression der vollständigen cDNA notwendig ist, so würde dies erklären, warum die unvollständige cDNA des 0.7 kb PCR - Produktes nicht zur Komplementation der Röntgenstrahlen - Sensitivität der Zelllinie Sc3T3/w in der Lage ist. Auch bei den größeren cDNA - Insertionen der Plasmide, die durch Hirtextraktion und durch Kolonie - Hybridisierung mit dem PCR - Produkt als Sonde aus der pcD2 - Genbank isoliert worden waren, besteht die Möglichkeit, daß der 5' - Bereich ihrer Sequenz unvollständig ist. Aufgrund der Klonierungsstrategie der pcD2 - Genbank können diese cDNA - Fragmente ausgedehnte, in der Größe variable Adaptersequenzen beinhalten (Chen et al., 1987), die keine exakte Größenbestimmung der cDNA erlauben. Die genaue Länge der klonierten cDNA - Fragmente und die Ermittlung ihrer offenen Leseraster kann nur durch die Analyse ihrer vollständigen Sequenz bestimmt werden. Dadurch können auch mögliche Mutationen in den cDNAs ermittelt werden, die ebenfalls eine erfolgreiche Komplementation verhindern würden.

2. Es besteht die Möglichkeit, daß die in den Scid - Zellen vermutlich verlorengegangene Enzymaktivität sehr genau auf andere zelluläre Funktionen abgestimmt sein muß. Eine solche Feinabstimmung in der Aktivität von kooperierenden Enzymen wäre durch Transfektion von Plasmid - DNA nur schwer zu erreichen, insbesondere wenn die cDNA unter der Transkriptionskontrolle eines starken viralen Promotors steht. Die daraus resultierende Überexpression des Genproduktes wirkt sich dann möglicherweise schädlich auf die Zelle aus.

3. Durch die Selektion mit Röntgenstrahlen werden DNA - Strangbrüche induziert, die zu unkalkulierbaren Rekombinationsereignissen der genomischen, zellulären DNA mit der BPV - Plasmid - DNA führen können. Es ist daher denkbar, daß eine vollständige Kopie der Strahlenresistenz - vermittelnden cDNA ins Genom der Zelle integriert und deren Resistenzphänotyp bewirkt, während das BPV - Plasmid nur eine deletierte, funktionsunfähige cDNA enthält. Ein solcher Fall lag z. B. bei der Klonierung des humanen O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase - Gens aus HeLaMR - Zellen vor, die mit einer EBV - cDNA - Bank transfiziert worden waren (B. Kaina, persönliche Mitteilung).

Durch Zellfusionsexperimente konnte erst kürzlich gezeigt werden (Kirchgessner et al., 1993, Itoh et al., 1993, Komatsu et al., 1993), daß die Komplementation des Scid - Defektes des Mausstammes C.B-17 durch die Übertragung des humanen Chromosoms Nr. 8 möglich ist. Die chromosomale Lokalisation im Genom des Menschen wird zeigen, ob die in dieser Arbeit klonierte cDNA dem Gen entspricht, dessen Mutation in der Scid - Maus C.B-17 gleichzeitig schwerwiegende immunologische Defekte und Röntgenstrahlen - Hypersensitivität verursacht.

Literaturverzeichnis

- Alt, F. W., Oltz, E. M., Young, F., Gorman, J., Taccioli, G., Chen, J. (1992). VDJ recombination. *Immunology Today* **13**: 306 - 314.
- 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.
- Beranek, D. T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Res.* **231**: 11-30.
- Biedermann, K. A., Sun, J., Giacca, A. J., Tosto, L. M., Brown, J. M. (1991). Scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proc. Acad. Sci. USA* **88**: 1394 - 1397.
- Binetruy, B., Meneguzzi, G., Breathnach, R., Cuzin, F. (1982). Recombinant DNA molecules comprising bovine papilloma virus type 1 DNA linked to plasmid DNA are maintained in a plasmidial state both in rodent fibroblasts and in bacterial cells. *The EMBO Journal* **1**: 621 - 628.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513 - 1523.
- Blaese, R. M. (1989). Genetic immunodeficiency syndromes with defects in both T- and B - lymphocyte functions. *The metabolic basis of inherited disease II. Charles R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle. McGraw Hill, Inc.*
- Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H. J. (1993). DNA repair: Engagement with transcription. *Nature* **363**: 114 - 115.
- Bordignon, C. (1993). Transfer of the ADA gene into bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes for the treatment of patients affected by ADA-deficient SCID. *Human Gene Therapy* **4**: 513 - 520.
- Bosma, G. C., Custer, R. P., Bosma, M. J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**: 527 - 530.
- Bosma, G. C., Davisson, M. T., Ruetsch, N. R., Sweet, H. O., Schultz, L. D., Bosma, M. J. (1989). The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16. *Immunogenetics* **29**: 54 - 57.
- Bosma, M. J., Carroll, A. M. (1991). The scid mouse mutant: Definition, characterization and potential uses. *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 323 - 350.
- Boulikas, T. (1992). Evolutionary Consequences of nonrandom damage and repair of chromatin domains. *J. Mol. Evol.* **35**: 156 - 180.
- Boveri, T. (1914). Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren. Jena: Gustav Fischer.

Braakman, E., van Beusechem, V. W., van Krimpen, B. A., Fischer, A., Bolhuis, R. L. H., Valerio, D. (1991). Expression of adenosine deaminase in genetically corrected T lymphocytes from an ADA⁻ SCID patient. *Human Gene Transfer* **219**: 113 - 120.

Carroll, A. M., Bosma, M. J. (1991). T - lymphocyte development in scid mice is arrested shortly after initiation of T - cell receptor gene recombination. *Genes & Development* **5**: 1357 - 1366.

Chakravarti, D., Ibeanu, G. C., Tano, K., Mitra, S. (1991). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a human cDNA encoding the DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* **24**: 15710 - 15715.

Chang, C., Biedermann, K. A., Mezzina, M., Brown, J. M. (1993). Characterization of the DNA double strand break repair defect in scid mice. *Carcinogenesis* **53**: 1244 - 1248.

Chen, C. und Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2745-2752.

Chu, C., Hayakawa, H., Berg, P. (1987). Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucl. Acids Res.* **15**: 1311 - 1326.

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E.coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2110 - 2115.

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. F. (1981). Rejoining of DNA double - strand breaks in human fibroblasts and its impairment in one AT and two Fanconi strains. *J. supramolec. Struct. Cell. Bioch.* **17**: 369 - 376.

Cunningham, R. P., Saporito, S. M., Spitzer, S. G., Weiss, B. (1986). Endonuclease IV (nfo) mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**: 1120 - 1127.

Demple, B., Herman, T., Chen, D. S. (1991). Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: Definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **88**: 11450 - 11454.

Denhardt, D. T. (1966). A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**: 641-646.

DiMaio, D., Treisman, R., Maniatis, T. (1982). Bovine papillomavirus vector that propagates as a plasmid in both mouse and bacterial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4030 - 4034.

Disney, J. E., Barth, A. L., Shultz, L. D. (1992). Defective repair of radiation induced chromosomal damage in scid/scid mice. *Cytogenet. Cell. Genet.* **59**: 39 - 44.

Emerit, I., Mechelson, A. M., Levy, A., Camus, J. P., Emerit, J. (1981). Clastogenic activity from Bloom's syndrome fibroblast cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 1868 - 1875.

Engelward, B. P., Boosalis, M. S., Chen, B. J., Deng, Z., Siciliano, M. J., Samson, L. D. (1993). Cloning and characterization of a mouse 3-methyladenine/7-methylguanine/3-methylguanine DNA glycosylase cDNA whose gene maps to chromosome 11. *Carcinogenesis* **14**: 175 - 181.

- Fornace, A. J., Zmudzka, B., Hollander M. C., Wilson, S. H. (1989). Induction of β - Polymerase mRNA by DNA - damaging agents in Chinese Hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 851 - 853.
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., Elsabrouty, S., Dani, C., Jeanteur, P. und Blanchard, J. M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* **13**: 1431-1442.
- Friedberg, E. C. (1985). DNA - Repair. W. H. Freeman and Company, USA.
- Fritz, E. (1994). Komplementation strahlensensitiver Ataxia telangiectasia - Zellen durch Transfektion von cDNA - Bibliotheken und Cosmidklonen aus Wildtyp - Zellen. *Dissertation*, Universität Karlsruhe (TH)
- Fritz, G., Tano, K., Mitra, S., Kaina, B. (1991). Inducibility of the DNA repair gene encoding O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA - damaging treatments. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4660 - 4668.
- Fritz, G. (1992). Charakterisierung zellulärer Schutzfunktionen gegenüber der genotoxischen Wirkung von alkylierenden Agenzien in Säugetierzellen. *Dissertation, Universität Karlsruhe (TH)*
- Fulop, G. M., Phillips, R. A. (1990). The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature* **347**: 479 - 482.
- Gassen, H. B., Martin, A., Bertram, S. (1987). Gentechnik. Einführung in die Prinzipien und Methoden.
- Graham, F. L., van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467.
- Grunstein, M., Hogness, D. S. (1975). Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Sci. USA* **72**: 3961 - 3965.
- Haars, R., Kronenberg, M., Gallatin, W. M., Weissman, I. L., Owen, F. L., Hood, L. (1986). Rearrangement and expression of T cell antigen receptor and genes during thymic development. *J. Exp. Med.* **164**: 1 - 24.
- Habraken, Y., Laval, F. (1993). Increased resistance of the Chinese hamster mutant irs1 cells to monofunctional alkylating agents by transfection of the E. coli or mammalian N³-methyladenine-DNA-glycosylase genes. *Mut. Res.* **293**: 187 - 195.
- Harrington, J., Hsieh, C.-L., Gerton, J., Bosma, G., Lieber, M. R. (1992). Analysis of the defect in DNA end joining in the murine scid mutation. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4758 - 4768.
- Harrison, L., Ascione, G., Menninger, J. C., Ward, D. C., Demple, B. (1992). Human apurinic endonuclease gene (APE): structure and genomic mapping (chromosome 12q11.2-12). *Hum.Mol.Gene.* **1**: 677 - 680.
- Hartenstein, B. (1992). Untersuchungen zur Veränderung der Expression der N-Methylpurin-DNA-Glykosylase von Säugerzellen nach Behandlung mit mutagenen Agenzien. *Diplomarbeit*, Universität Karlsruhe (TH)

Hayday, A. C., Saito, H., Gillies, S. D., Kranz, D. M., Tanigawa, G., Eisen, H. N., Tonegawa, S. (1985). Structure, organization and somatic rearrangement of T cell gamma genes. *Cell* **40**: 259 - 269.

Haymerle, H., Herz, J., Bressan, G. M., Frank, R., Stanley, K. K. (1986). Efficient construction of cDNA libraries in plasmid expression vectors using adaptor strategy. *Nucl. Acids Res.* **14**: 8615 - 8624.

Hendrickson, E. A., Schatz, D. G., Weaver, D. T. (1988). The scid gene encodes a trans-acting factor that mediates the rejoining event of Ig gene rearrangement. *Genes & Development* **2**: 817 - 829.

Hendrickson, E. A., Qin, X.-Q., Bump, E. A., Schatz, D. G., Oettinger, M., Weaver, D. T. (1991). A link between double - strand break - related repair and V(D)J recombination: The scid mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4061 - 4056.

Hirt, B. (1967). Selective extraction of Polyoma DNA infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* **26**: 365 - 369.

Hoeijmakers, J. H. J. (1993a). Nucleotide excision repair I: from E. coli to yeast. *TIG* **9**: 173 - 177.

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

Ibeanu, G., Hartenstein, B., Dunn, W. C., Chang, L. Y., Hofmann, E., Coquerelle, T., Mitra, S. und Kaina, B. (1992). Overexpression of human DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase results in the increased removal of N-methylpurines in DNA without a concomitant increase in resistance to alkylating agents in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* **13**: 1989-1995.

Itoh, M., Hamatani, K., Komatsu, K., Araki, R., Takayama, K., Abe, M. (1993). Human chromosome 8 (p12 --> q22) complements radiosensitivity in the severe combined immune deficiency (SCID) mouse. *Rad. Res.* **134**: 364 - 368.

Kaina, B., Fritz, G., Coquerelle, T. (1991a). Identification of human genes involved in repair and tolerance of DNA damage. *Radiat. Environ. biophys.* **30**: 1 - 19.

Kaina, B., Fritz, G., Mitra, S., Coquerelle, T. (1991b). Transfection and expression of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* **12**: 1857 - 1867.

Kaina, B., Fritz, G., Coquerelle, T. (1993). Contribution of O⁶-Alkylguanine and N-Alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations and gene mutations: new insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines. *Env. Mol. Mut.* **22**: 283 - 292.

Kane, C. M., Linn, S. (1981). Purification and characterization of an apurinic/aprimidinic endonuclease from HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **256**: 3405 - 3414.

Karin, M., Cathala, G. Nguyen - Huu, M. C. (1983). Expression and regulation of a human metallothionein gene carried on an autonomously replicating shuttle vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 4040 - 4044.

- Karran, P., Hjelmgren, T., Lindahl, T. (1982). Induction of a DNA - glycosylase for N-methylated purines is part of the adaptive response to alkylating agents. *Nature* **296**: 770 - 773.
- Kawai, S. und Nishizawa, M. (1984). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1172-1174.
- Kirchgessner, C. U., Tosto, L. M., Biedermann, K. A., Kovacs, M., Araujo, D., Stanbridge, E. J., Brown, J. M. (1993). Complementation of the radiosensitive phenotype in severe combined immunodeficient mice by human chromosome 8. *Cancer Res.* **53**: 6011 - 6016.
- Kittler, L., Löber, G. (1977). Photochemistry of the nucleic acids. *Photochem. Photobiol. Rev.* **2**: 39 - 44.
- Klungland, A., Fairbairn, L., Watson, A. J., Margison, G. P., Seeberg, E. (1992). Expression of the E. coli 3-methyladenine DNA glycosylase I gene in mammalian cells reduces the toxic and mutagenic effects of methylating agents. *EMBO J.* **11**: 4439 - 4444.
- 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.
- Komatsu, K., Ohta, T., Jinno, Y., Niikawa, N., Okumura, Y. (1993). Functional complementation in mouse - human radiation hybrids assigns the putative murine scid gene to the pericentric region of human chromosome 8. *Hum. Mol. Gen.* **2**: 1031 - 1034.
- Lambert, C., Schultz, R. A., Smith, M., Wager-McPherson, C., McDaniel, L. D., 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.
- Law, M.-F., Lowy, D. R., Dvoretzky, I., Howley, P. M. (1981). Mouse cells transformed by bovine papillomavirus contain only extrachromosomal viral DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2727 - 2731.
- Law, M.-F., Byrne, J. C., Howley, P. M. (1983). A stable Bovine Papillomavirus hybrid plasmid that expresses a dominant selective trait. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 2110 - 2115.
- Leadon, S. A., Cooper, P. K. (1993). Preferential repair of ionizing radiation - induced damage in the transcribed strand of an active human gene is defective in Cockayne syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10499 - 10503.
- Legerski, R., Peterson, C. (1992). Expression cloning of a human DNA repair gene involved in Xeroderma pigmentosum group C. *Nature* **359**: 70 - 73.
- Lewis, S., Gellert, M. (1989). The mechanism of antigen receptor gene assembly. *Cell* **59**: 585 - 588.
- Lieber, M. R., Hesse, J. E., Lewis, S., Bosma, G. C., Rosenberg, N., Mizuuchi, K., Bosma, M. J., Gellert, M. (1988). The defect in murine severe combined immune deficiency: Joining of signal sequences but not coding segments in V(D)J recombination. *Cell* **55**: 7 - 16.
- Lieber, M. R. (1992). The mechanism of V(D)J recombination: A balance of diversity, specificity and stability. *Cell* **70**: 873 - 876.

- Lindahl, T., Ljungquist, S. (1975). Apurinic and apyrimidinic sites in DNA. *Molecular Mechanisms for repair of DNA*. P. C. Hanawalt and R. B. Setlow, eds., New York: Plenum
- Lindahl, T. (1979). DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites and base excision repair. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **22**: 135 - 140.
- Lindahl, T. (1982). DNA repair enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **51**: 61 - 87.
- Lindahl, T., Sedgwick, B., Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y. (1988). Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 133 - 157.
- Margolskee, R. F., Kavathas, P., Berg, P. (1988). Epstein-Barr Virus shuttle vector for stable episomal replication of cDNA expression libraries in human cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2837 - 2847.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., Papaioannou, V., E. (1992). RAG-1-deficient mice have not mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**: 869 - 877.
- Mosbaugh, D. W., Linn, S. (1980). Further characterization of human fibroblast apurinic/apyrimidinic DNA endonucleases. *J. Biol. Chem.* **255**: 11743 - 11752.
- Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H. M., Filipovich, A. H., Adelstein, S., Modi, W. S., McBride, O. W., Leonard, W. J. (1993). Interleukin-2 receptor γ chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* **73**: 147 - 157.
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C., Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**: 1517 - 1523.
- Olive, P. L., Wloddek, D., Banath, J. P., (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res.* **51**: 4671 - 4676.
- Olsen, L. C., Aasland, R., Wittwer, C. U., Krokan, H. E., Helland, D. E. (1989). Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. *EMBO J.* **8**: 3121 - 3125.
- Östling, O., Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation - induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **123**: 291 - 298.
- O'Connor, T. R., Laval, F. (1990). Isolation and structure of a cDNA expressing a mammalian 3-methyladenine-DNA glycosylase. *EMBO J.* **9**: 3337 - 3342.
- Painter, R. B., Young, B. R. (1980). Radiosensitivity in Ataxia telangiectasia: a new explanation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7315 - 7323.
- 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.
- Pavlakakis, G. N., Hamer, D. H. (1983). Regulation of a metallothionein growth hormone hybrid gene in bovine papilloma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 397 - 401.
- Pennycook, J. L., Chang, Y., Celler, J., Phillips, R. A., Wu, G. E. (1993). High frequency of normal DJ_H - joints in B cell progenitors in severe combined immunodeficiency mice. *J. Exp. Med.* **178**: 1007 - 1016.

- Pierre, J., Laval, J. (1981). Specific nicking of DNA at apurinic sites by peptides containing aromatic residues. *J. Biol. Chem.* **256**: 10217 - 10220.
- Pla, M., Mahouy, G. (1991). The scid mouse. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **33**: 489 - 491.
- Popoff, S. C., Spira, A. I., Johnson, A. W., Demple, B. (1990). Yeast structural gene (APN1) for the major apurinic endonuclease: Homology to Escherichia coli endonuclease IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4193 - 4197.
- Potter, H. (1988). Electroporation in Biology: Methods, applications and instrumentation. *Anal. Biochem.* **174**: 361 - 373.
- Radford, I. R. (1986). Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **49**: 611 - 620.
- Rao, K. S. (1993). Genomic damage and its repair in young and aging brain. *Mol. Neurobiol.* **7**: 23 - 48.
- Roberts, J. J. (1978). The repair of DNA modified by cytotoxic, mutagenic and carcinogenic chemicals. *Adv. Rad. Biol.* **7**: 211 - 216.
- Ross, G., Brown, R. (1992). The Role of DNA repair processes in determining response to cancer therapy. *Eur. J. Cancer* **28**: 281 - 285.
- Roth, D. B., Menetski, J. P., Nakajima, P. B., Bosma, M. J., Gellert, M. (1992). V(D)J recombination: Broken DNA molecules with covalently sealed (hairpin) coding ends in scid mouse thymocytes. *Cell* **70**: 983 - 991.
- Rydberg, B., Spurr, N., Karran, P. (1990). cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. cDNA expression in Escherichia coli and gene expression in human cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 9563 - 9569.
- Sanford, K. K., Parshad, R. (1991). Deficient DNA repair, an early step in neoplastic transformation of human cells in culture. *Neoplastic Transformation in human cell culture. J. S. Rhim and A. Dritschilo, The Humana Press Inc., Totowa, NJ.*
- Sanford, K. K., Price, F. M. Rhim, J. S., Stampfer, M. R., Parshad, R. (1992). Role of DNA repair in malignant neoplastic transformation of human mammary epithelial cells in culture. *Carcinogenesis* **13**: 1137 - 1141.
- 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.
- Sarver, N., Gruss, P., Law, M.-F., Khoury, G., Howley, P. M. (1981). Bovine Papilloma Virus deoxyribonucleic acid: a novel eucaryotic cloning vector. *Mol. Cell. Biol.* **1**: 486 - 496.
- Sasaki, M. S., Tonomura, A. (1973). A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross - linking agents. *Cancer Res.* **33**: 1829 - 1837.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A., Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* **59**: 1035 - 1048.

Scherli, D., Nospikel, T., Corlet, J., Ucla, C., Bairoch, A., Clarkson, S. G. (1993). Complementation of the DNA repair defect in Xeroderma pigmentosum group G cells by a human cDNA related to yeast RAD2. *Nature* **363**: 182 - 188.

Schuler, W., Weiler, I. J., Schuler, A., Phillips, R. A., Rosenberg, N., Mak, T. W., Kearney, J. F., Perry, R. P., Bosma, M. J. (1986). Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency. *Cell* **46**: 963 - 972.

Seki, S., Akiyama, K., Watanabe, S., Hatsushika, M., Ikeda, S., Tsutsui, K. (1991). cDNA and deduced amino acid sequence of a mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) with significant homology to Escherichia coli exonuclease III. *J. Biol. Chem.* **266**: 20797 - 20802.

Seki, S., Hatsushika, M., Watanabe, S., Akiyama, K., Nagao, K. (1992). cDNA cloning, sequencing, expression and possible domain structure of human APEX nuclease homologous to Escherichia coli exonuclease III. *Biochim. Biophys. Acta* **1131**: 287 - 299.

Sekiguchi, T., Nishimoto, T., Kai, R., Sekiguchi, M. (1983). Recovery of a hybrid vector, derived from bovine papilloma virus DNA, pBR322 and the HSV tk gene, by bacterial transformation with extrachromosomal DNA from transfected rodent cells. *Gene* **21**: 267 - 272.

Setlow, R. B. (1966). Cyclobutane - type pyrimidine dimers in polynucleotides. *Science* **153**: 379 - 384.

Shapiro, R. (1981). Damage to DNA caused by hydrolysis. *Chromosome damage and repair*. E. Seeberg and K. Kleppe, eds.; New York: Plenum

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. - P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., Alt, F. W. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**: 855 - 867.

Slijepcevic, P. (1992). Xeroderma pigmentosum, Ataxia telangiectasia, Fanconi's anemia, Bloom's syndrome: DNA repair and proneness to cancer. *Periodicum biologorum* **94**: 83 - 94.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

Southern, P. J., Berg, P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under the control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genetics* **1**: 327 - 341.

Sutherland, B. M., Sancar, A. (1979). Multiple loci affecting photoreactivation in Escherichia coli. *J. Bacteriol* **138**: 333 - 338.

Tanaka, K., Satokata, I., Ogita, Z., Uchida, T., Okada, Y. (1989). Molecular cloning of a mouse DNA repair gene that complements the defect of group-A Xeroderma pigmentosum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5512 - 5516.

Tanaka, T., Yamagami, T., Oka, Y., Noura, T., Sugiyama, H. (1993). The scid mutation in mice causes defects in the repair system for both double-strand DNA breaks and DNA cross-links. *Mut. Res.* **288**: 277 - 280.

Taniguchi, T., Minami, Y. (1993). The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* **73**: 5 - 8.

- Tano, K., Shiota, S., Collier, J., Foote, R. S., Mitra, S. (1990). Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O⁶-Alkylguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 686 - 690.
- Volkert, M. R., Nguyen, D.C., Beard, K. C. (1986). Escherichia coli gene induction by alkylation treatment. *Env. Mol. Mut.* **112**: 11 - 26.
- Vollberg, T. M., Siegler, K. M., Cool, B. L., Sirover, M. A. (1989). Isolation and characterization of the human uracil DNA glycosylase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8693 - 8697.
- Ward, J. F. (1975). Molecular mechanisms of radiation - induced damage to nucleic acids. *Adv. Rad. Biol.* **5**: 181.
- Watson, J. D. (1976). Molecular biology of the gene. 3rd ed. Menlo Park, Calif.: W. A. Benjamin, Inc.
- Weber, C. A., Salazar, E. P., Stewart, S. A., Thompson, L. H. (1988). Molecular cloning and biological characterization of a human gene, ERCC2, that corrects the nucleotide excision repair defect in CHO UV5 cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 1137 - 1146.
- Weeda, G., van Ham, R. C. A., Masurel, R., Westerveld, A., Odijk, H. de Wit, J., Bootsma, D., van der Eb, A., Hoeijmakers, J. H. J. (1990a). Molecular cloning and biological characterization of the human excision repair gene ERCC-3. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 2570 - 2581.
- Weeda, G., van Ham, R. C. A., Vermeulen, W., Bootsma, D., van der Eb, A. J., Hoeijmakers, J. H. J. (1990b). A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders Xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrom. *Cell* **62**: 777 - 791.
- Westerveld, A., Hoeijmakers, J. H. J., van Duin, M., de Wit, J., Odijk, H., Pastink, A., Wood, R., Bootsma, D. (1984). Molecular cloning of a human DNA repair gene. *Nature* **310**: 425 - 429.
- Whitehead, I., Grigliatti, T. A. (1993). A correlation between DNA repair capacity and longevity in adult Drosophila melanogaster. *J. Gerontol.* **48**: 124 - 132.
- Wigler, M., Sweet, R., Sim, G. K., Wold, B., Pellicer, A., Lacy, E., Maniatis, T., Silverstein, S., Axel, R. (1979). Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes. **16**: 777 - 785.
- Wu, L., Whitlock, J. P. (1992). Mechanism of dioxin action: Ah receptor - mediated increase in promoter accessibility in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4811 - 4815.
- Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y. - C. E., Curran, T. (1992). Redox activation of Fos - Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.* **11**: 3323 - 3353.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. **33**: 108 - 110.
- Zhao, B. G., Grandy, D. K., Hagerup, J. M., Magenis, R. E., Smith, L., Chauhan, B. C., Henner, W. D. (1992). The human gene for apurinic/apyrimidinic endonuclease (HAP1): sequence and localization to chromosome 14 band q12. *Nucl. Acids. Res.* **20**: 4097 - 4098.