Einfluss der Proteine der Basenfehlpaarungsreparatur auf die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen in Säugern

Dissertation
zur Erlangung des Grades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von
Simone Yasmin Siehler
aus Geislingen an der Steige

Ulm, 2009

Dekan
Prof. Dr. Axel Groß

Erstgutachter
HD Dr. Ulrike Gerischer

Zweitgutachter
Prof. Dr. Anita Marchfelder

Tag der Promotion
18. Dezember 2009

1 Einleitung 1

1.1 DNA Reparatur Mechanismen 1
1.1.1 Die DNA Doppelstrangbruch (DSB) Reparatur 2
1.1.1.1 Non-homologous endjoining (NHEJ) 4
1.1.1.2 Single-strand annealing (SSA) 6
1.1.1.3 Homologe Rekombination (HR) 9
1.1.2 Das Mismatch Reparatur (MMR) System 14
1.1.2.1 Komponenten und Wirkungsweise des MMR Systems 14
1.1.2.2 Das MMR System bei der DSB Reparatur 16

1.2 Das auf „Enhanced Green Fluorescent Protein" (EGFP) basierende Testsystem zum Nachweis der DSB Reparatur (Akyüz et al., 2002) 17

1.3 RNA Interferenz (RNAi) Technologie 22
1.3.1 Transiente RNAi 23
1.3.2 Stabile RNAi 24

1.4 Fragestellung 26

2 Material und Methoden 28

2.1 Eukaryotische Zelllinien und Bakterienstämme 28

2.2 Plasmide und Oligoribonukleotide 31
2.2.1 Plasmide 31
2.2.2 Oligoribonukleotide 35

2.3 Antikörper 37
2.3.1 Primärantikörper 37
2.3.2 Sekundärantikörper 38

2.4 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden 39
2.4.1 Zellanzucht 39
2.4.1.1 Nährmedien 39
2.4.1.2 Anzuchtbedingungen 40
2.4.1.3 Trübungsmessung 40
2.4.1.4 Stammhaltung 41
2.4.1.5 Transformation von *E.coli* nach der SEM-Methode (Simple and Efficient Method (Inoue *et al.*, 1990) modifiziert) 41
2.4.2 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren 42
2.4.2.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen 42
2.4.2.2 Reinigung und Konzentrierung von DNA 42
2.4.2.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion 42
2.4.2.2.2 Ethanolfällung 43
2.4.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 43
2.4.2.4 Agarose-Gelelektrophorese 43
2.4.2.5 Größenbestimmung von Nukleinsäuren 45
2.4.2.6 Isolierung von Nukleinsäuren 45
2.4.2.6.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli 45
2.4.2.6.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli 45
2.4.2.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 46
2.4.2.7 Enzymatische Modifikation von DNA 46
2.4.2.7.1 Restriktionsspaltung von DNA 46
2.4.2.7.2 Ligation von DNA-Fragmenten 46

2.5 Proteinbiochemische Methoden 47
2.5.1 Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) 47
2.5.1.1 Herstellung eines Totalhomogenates 47
2.5.1.2 Herstellung eines Zelllysates 47
2.5.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration 48
2.5.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) 48
2.5.1.5 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot) (Towbin *et al.*, 1992) 50
2.5.1.6 Immundetektion der Proteine im Western-Blot mit Chemilumineszenzreaktion 51

2.6 Zellkulturtechniken 52
2.6.1 Kultivierung von adhärenten Zellen 52
2.6.2 Kultivierung von Suspensionskulturzellen 52
2.6.3 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen 53
2.6.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen 53
2.6.4.1 Transfektion durch Elektroporation 53
2.6.4.2 Transfektion durch Lipofektion 54
2.6.4.2.1 Lipofektion mittels FuGENE 55
2.6.4.2.2 Lipofektion mittels HiPerFect 56
2.6.4.2.3 Lipofektion mittels XtremeGENE 57
2.6.4.3 Transfektion durch *Nucleofection* (Amaxa) 57

2.7 Bestimmung der Generationszeit 58

2.8 Durchflusszytometrie 59
2.8.1 Rekombinationsfrequenzmessung (Akyüz *et al.*, 2001) 59
2.8.2 Einparametrische Zellzyklusanalyse (Propidiumiodidfärbung) 60

2.9 Chemikalien, Enzyme, Geräte, Software und andere Produkte 63
2.9.1 Geräte 63
2.9.2 Chemikalien, Enzyme und andere Produkte 65
2.9.3 Software 68

3 Ergebnisse 69

3.1 Effekt der humanen MutL Homologen auf die DSB Reparaturmechanismen 69
3.1.1 Untersuchung der DSB Reparatur in isogenen zellulären Systemen mit und ohne hMLH1 70
3.1.1.1 Untersuchung der DSB Reparatur in 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen 70
3.1.1.2 Untersuchung der DSB Reparatur in HCT116 +/- Chromosom 3. 73
3.1.2 Der Einfluss von hMLH1 auf die DSB Reparatur im chromosomalen Kontext 75
3.1.3 Die hMLH1-vermittelte HR-Regulation bei Fehlen des MMR Proteines hMSH2 78
3.1.3.1 Untersuchung der DSB Reparatur in der hMSH2 negativen Zelllinie Lovo 79
3.1.3.2 Untersuchung der DSB Reparatur nach Doppel-Knockdown von hMSH2 und hMLH1 im chromosomalen Umfeld 83
3.1.4 Die hMutL-vermittelte HR-Regulation bei Fehlen von ATM, BLM oder BACH1 85

3.1.4.1 Untersuchung der DSB Reparatur bei Knockdown von hMLH1 in ATM negativen Zelllinien 85
3.1.4.2 Untersuchung der DSB Reparatur nach Doppel-Knockdown der Kinasen ATM und ATR in 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen 86
3.1.4.3 Untersuchung der DSB Reparatur bei Knockdown von hMLH1 in BLM negativen Zelllinien 88
3.1.4.4 Untersuchung der DSB Reparatur nach Knockdown von BACH1 in 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen 90
3.1.4.5 Untersuchung der DSB Reparatur bei Knockdown von hMLH1 in BACH1 negativen Zelllinien 92

3.2 Einfluss des hMSH2 Proteins auf die DSB Reparaturmechanismen 93
3.2.1 Einfluss des hMSH2 Proteines auf die DSB Reparatur in Zellklonen mit induzierbarer Expression 94
3.2.2 Einfluss des hMSH2 Proteines auf die DSB Reparatur nach transienter Expression 97
3.2.2.1 Herstellung der Plasmide pcDNA3wtMSH2 und pcDNA3mutMSH2 97
3.2.2.2 DSB Reparatur nach transienter hMSH2 Expression 98
3.2.3 Der Einfluss der MutS Homologen auf die DSB Reparatur im chromosomalen Kontext 101
3.2.3.1 Untersuchung der DSB Reparatur Regulation durch hMSH2 bei Knockdown von hRad52 und Überexpression von dominant negativem Rad51 Protein 103

4 Diskussion 107

4.1 hMLH1 moduliert DSB Reparaturmechanismen 107
4.1.1 Fehlende Effekte des hMLH1 Proteins auf das NHEJ 107
4.1.2 hMLH1 reguliert HR-Prozesse insbesondere für kurze Homologie-Bereiche 108
4.1.3 Die hMutL-vermittelte Regulation der HR ist nicht vollständig aber möglicherweise teilweise abhängig von ATM, BLM oder BACH1 111

4.2 Involvierung des hMSH2 Proteins beim SSA 115

5 Zusammenfassung 121

6 Summary 123

7 Literaturangaben 125

8 Abkürzungsverzeichnis 145

9 Anhang 148

9.1 Publikationsliste und wissenschaftliche Veröffentlichungen 148

9.2 Lebenslauf 150

9.3 Danksagung 151

Tabelle 1: Eukaryotische Zelllinien 28
Tabelle 2: Bakterienstämme 31
Tabelle 3: Plasmide 31
Tabelle 4: shRNA Vektoren 34
Tabelle 5: Oligoribonukleotide 35
Tabelle 6: Primärantikörper 37
Tabelle 7: Sekundärantikörper 38
Tabelle 8: LB-Medium (Luria-Bertani, SAMBROOK et al., 2001) 39
Tabelle 9: SOB-Medium 39
Tabelle 10: SOC-Medium 40
Tabelle 11: Antibiotika 40
Tabelle 12: Pipettierschema für SDS-PAGE Gele 49
Tabelle 13: Zellen, welche durch Elektroporation transfiziert wurden. 54
Tabelle 14: Zellen, transfiziert mit FuGENE 55
Tabelle 15: Amaxa Transfektionen, Zellen, DNA-Mixe, Kits und Programme 58
Tabelle 16: Generationszeiten von Lovo und abgeleiteten hMSH2 exprimierenden Klonen. 94

Abbildung 1: Übersicht über DSB-Reparatur-Wege 3
Abbildung 2: Schema des Artemis beteiligten Modells des NHEJ 5
Abbildung 3: SSA mit den beteiligten Proteinen. 7
Abbildung 4: HR mit den beteiligten Proteinen. 10
Abbildung 5: Funktionsweise der humanen MMR Komponenten und weiterer beteiligter Proteine 15
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Rekombinationsakzeptoren Δ-, *HR*- und *EJ-EGFP*. 20
Abbildung 7: Design der Reparatur Substrate zur Analyse der verschiedenen DSB Reparatur Mechanismen. 21
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Wirkweise der RNAi 23
Abbildung 9: Schematische Darstellung eines shRNA Vektors 25
Abbildung 10: Meßdokumente zur Detektion grün fluoreszierender Zellen. 60
Abbildung 11: Histogramm zur Verteilung des DNA-Gehaltes in einer Zellpopulation mit normalem Zellzyklus 62
Abbildung 12: Western Blot und Zellzyklusanalyse, 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen mit und ohne Doxycyclin. 71
Abbildung 13: DSB Reparatur Analyse von 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen mit und ohne Doxycyclin. 72
Abbildung 14: Western Blot und Zellzyklusanalyse HCT116 und HCT116 +chr3 73

Abbildung 15: DSB Reparatur Analyse HCT116 und HCT116 +chr3 Zellen. 74

Abbildung 16: Western Blot und Zellzyklusanalyse von Zellen mit chromosomal integriertem DSB Reparatursubstrat..... 76

Abbildung 17: Homologie gerichtete DSB Reparaturanalyse mit chromosomal integrierten Reparatursubstraten. 77

Abbildung 18: DSB Reparatur und Western Blot nach Knockdown von hMLH1 in *XRCC4* mutierten HA290 Zellen. 78

Abbildung 19: Western Blot Analyse von HCT116 und Lovo Zellen zur Überprüfung des hMSH2 Status..... 79

Abbildung 20: DSB Reparatur in hMSH2-negativen Lovo Zellen..... 80

Abbildung 21: Protein Expressions- und Zellzyklus Analysen an Lovo Zellen nach siRNA Transfektion..... 81

Abbildung 22: DSB Reparatur bei Knockdown von hMLH1 in Lovo Zellen und abnehmender I-*Sce*I Menge. 82

Abbildung 23: Einfluss von hMLH1 Knockdown in 293T-Tel-Off-hMLH1 Zellen mit und ohne hMLH1. 83

Abbildung 24: Protein Expressionsanalyse mit KMV(Δ-EGFP/3'EGFP) Zellen für hMSH2 und hMLH1 nach Doppel-Knockdown. 84

Abbildung 25: DSB Reparatur in hMSH2-defizienten KMV(Δ-EGFP/3'EGFP) Zellen. 84

Abbildung 26: DSB Reparatur Frequenz von A-T Zellen nach hMLH1 Knockdown. 86

Abbildung 27: HR nach ATM und ATR Knockdown in 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen. 87

Abbildung 28: HR nach hMLH1 Knockdown in Bloom-Syndrom Zellen GM03403. .. 88

Abbildung 29: HR in GM08505 Flg5 und der rekonstitutierter BLM positiven Zelllinie GM08505 Gal13. 89

Abbildung 30: HR nach BACH1 Knockdown in 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen. 91

Abbildung 31: HR nach Knockdown von hMLH1 in Zellen mit mutiertem *FANCJ*. ... 92

Abbildung 32: Protein Expressions- und Zellzyklus Analysen an stabilen hMSH2 Lovo Klonen. 95

Abbildung 33: DSB Reparatur in Lovo Klonen nach induzierter hMSH2 Expression. 96

Abbildung 34: Schematische Darstellung der Klonierung der Plasmide pcDNA3wtMSH2 und pcDNA3mutMSH2. 98

Abbildung 35: Protein Expressions- und Zellzyklus Analysen an Lovo Zellen nach transienter hMSH2 Expression. 99

Abbildung 36: DSB Reparatur in Lovo Zellen nach transienter Expression des hMSH2 Proteines. 100

Abbildung 37: Western Blot Analyse an Zellen mit chromosomal integriertem DSB Reparatursubstrat nach Knockdown der MutS Homologen. 102

Abbildung 38: HDR Analyse nach Knockdown der MutS Homologen in KMV(HR-EGFP/3´EGFP) 103

Abbildung 39: Zellzyklusanalyse an Zellen mit chromosomal integriertem DSB Reparatursubstrat.....104

Abbildung 40: Western Blot von Zellen mit chromosomal integriertem DSB Reparatursubstrat nach Knockdown von hMSH2 und hRad52 oder Überexpression von dominant negativem Rad51 SM. 105

Abbildung 41: DSB Reparatur Analyse an Zellen mit chromosomal integriertem DSB Reparatursubstrat nach Knockdown von hMSH2 und hRad52 oder Überexpression von dominant negativem Rad51 SM. 106

1 Einleitung

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA), ist ein in allen Lebewesen vorkommendes Biomolekül. Alle Erbinformationen werden in der Zelle durch die DNA konserviert. Um die Informationen im Erbgut zu erhalten, müssen schadhafte Veränderungen der DNA-Struktur beseitigt werden. Dies geschieht in den Zellen durch DNA-Reparaturmechanismen. DNA Schäden entstehen z. B durch ionisierende Strahlung (IR), extreme Wärme oder durch die Einwirkung mutagener Substanzen. Auch während der DNA-Replikation entstehen in einer Zelle bis zu 10 spontane DNA Doppelstrangbrüche (DSB) pro Tag. Schäden in der DNA Struktur führen unter Anderem zu einer fehlenden oder unkorrekten Proteinsynthese, verursachen eine fehlerbehaftete Zellteilung oder zum Verlust wichtiger Chromosomenbereiche.
Falls sich in den Zellen durch eine fehlgeschlagene oder nicht erfolgte Reparatur DNA Schäden anreichern, werden Kontrollproteine aktiv, welche einen Zellzyklusarrest hervorrufen. Während des Arrestes werden DNA Schäden beseitigt. Sollten Schäden irreparabel sein, wird als letzte verbleibende Möglichkeit zur Verhinderung einer Tumorgenese der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet (Roos und Kaina, 2006).

1.1 DNA Reparatur Mechanismen

Zur Erhaltung der Genomstabilität stehen Zellen einige DNA Reparaturmechanismen zur Verfügung, wie die *direct reversal* Reparatur, die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (*Nucleotide excision repair*, NER), die Basen Exzisions-Reparatur (*Base excision repair*, BER), die Basen-Fehlpaarungs-Reparatur (*Mismatch repair*, MMR) und die DSB Reparatur.
Im folgenden Abschnitt sollen die BER, die NER und die *direct reversal* Reparatur erläutert werden.

Die *direct reversal* Reparatur

Bei der *direct reversal* Reparatur werden Alkylgruppen von Basen entfernt, welche sich durch alkylierende Substanzen (z. B. Cyclophosphamid) anlagern konnten.
In *E. coli* sind Alkyltransferasen wie Ada oder Ogt beteiligte Proteine. In Säugetierzellen übernimmt die *O6*-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT)

diese Funktion. Hierbei wird die Alkylgruppe, welche an das Sauerstoffatom der DNA-Base gebunden ist, auf einen Cytosin-Rest im aktiven Zentrum des Proteins übertragen. Alkyliertes MGMT ist nicht mehr funktionell. Um den proteasomalen Abbau des Proteins einzuleiten wird es daher ubiquitiniert (Hakem, 2008; Sedgwick *et al.*, 2007).

BER

Beim BER werden beschädigte Basen aus der DNA entfernt. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat bleibt unangetastet. Sie wird eingeteilt in die *short-patch* (Reparatur betrifft nur 1 Base) und die *long-patch* BER, bei welcher 2 – 13 Basen beteiligt sind. Die Entfernung der beschädigten Basen wird durch die Glykosylasen OGG1 und MUTYH initiiert (Mol *et al.*, 1995a; Mol *et al.*, 1995b; Pearl, 2000)

NER

Die NER beseitigt größere DNA-Addukte. Bei dieser Reparaturform werden längere Oligonukleotide (24 – 32 Nukteotide) aus der DNA Struktur entfernt.
In *E. coli* sind die Proteine UvrA, UvrB, UvrC und DNA Helikase II (UvrD) für diese Reparaturform verantwortlich. In Säugetierzellen sind über 30 verschiedene Proteine an der NER beteiligt. Die zentralen Gene XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, XPG und CSA, CSB wurden aufgrund von Mutationen bei Patienten mit Xeroderma pigmentosum (XP) bzw. Cockayne Syndrom (CS) identifiziert. Es werden 2 Formen der NER unterschieden, die Global-Genom-NER (GG-NER) und die transkriptionsgebundene-NER (*transcription-coupled*, TC-NER). Im ersten Fall werden Schäden im gesamten Genom erkannt und entfernt, wohingegen bei der TC-NER nur aktiv transkribierte Gene der Reparatur zugänglich sind (Fousteri und Mullenders, 2008; Hakem, 2008).

1.1.1 Die DNA Doppelstrangbruch (DSB) Reparatur

Doppelstrangbrüche sind die schädlichsten DNA Läsionen einer Zelle. Sie entstehen durch ionisierende Strahlung (IR), radiomimetische Substanzen, Kollaps der Replikationsgabel bei bereits bestehendem Einzelstrangbruch oder durch spezifische Endonukleasen während der meiotischen Rekombination und bei der Neuanordnung der Immunglobulin Gene (Bassing *et al.*, 2002; Haber, 2000; Karran, 2000; Norbury und Hickson, 2001). Fehlerhafte DNA Reparatur kann zu Insertions-

/Deletionsmutationen am DSB, Chromosomen-Translokationen, genomischen Instabilität führen und damit maligne Tumoren generieren (Elliott und Jasin, 2002; Thompson und Schild, 2002). DSB können zudem Zellzyklus Arrest und Apoptose auslösen (Jackson, 2001; Norbury und Hickson, 2001). Spezifische *surveillance* Proteine, wie ATM (mutiert in Ataxia Telangiectasia) und ATR (ATM und Rad3-related Protein), kontrollieren die Balance zwischen Zellzyklus Arrest, DNA Reparatur und Apoptose (Abraham, 2001; Bernstein *et al.*, 2002; Dasika *et al.*, 1999; Durocher und Jackson, 2001).

Die DSB Reparatur wird in zwei Hauptwege unterteilt (siehe Abbildung 1), die Homologie gerichtete Reparatur (*homology directed repair*, HDR) und das non-homologe *End-joining* (*non-homologous end joining*, NHEJ). Die HDR wiederum unterteilt sich in das *single strand annealing* (SSA) und die Homologe Rekombination (HR) mit oder ohne *crossover* (Haber, 2000; Kanaar *et al.*, 1998). Das SSA beinhaltet Komponenten des NHEJ und der HDR.

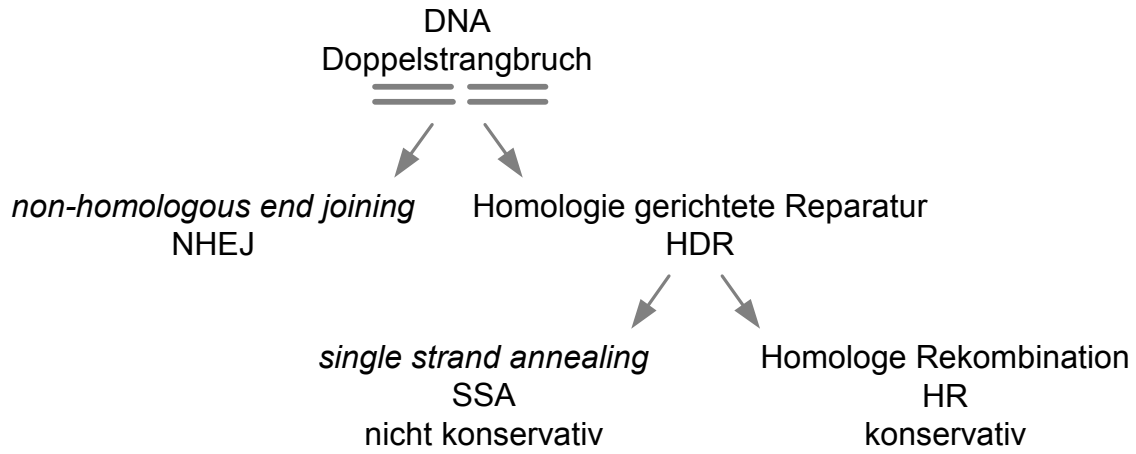

Abbildung 1: Übersicht über DSB-Reparatur-Wege
Das NHEJ ist von homologen Sequenzen unabhängig. Die HDR wird eingeteilt in einen konservativen Weg, die HR und in einen nicht konservativen Weg, das SSA.

Der grundsätzliche Unterschied zwischen HDR und NHEJ ist die Notwendigkeit von homologen DNA Bereichen für die HDR. NHEJ benötigt nur kleine oder gar keine Homologiebereiche, wodurch die Reparatur fehlerbehaftet sein kann. Der jeweilige Beitrag der unterschiedlichen Mechanismen zur DSB Reparatur ist bisher umstritten (Haber, 2000; Johnson und Jasin, 2001; Kanaar *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass das NHEJ in mitotisch replizierenden Zellen und während der G1 und frühen S-Phase des Zellzyklus, eine größere Rolle spielt; die HDR hingegen während der Meiose und bei vorhandenen Schwesterchromatiden (späte S- und G2-Phase)

vermehrt zum Tragen kommt (Jackson und Jeggo, 1995; Lee *et al.*, 1997; Takata *et al.*, 1998).

1.1.1.1 *Non-homologous endjoining* (NHEJ)

Die Gewichtung von NHEJ und HDR in menschlichen Zellen gibt bis zum heutigen Tage Anlass zur Diskussion. Unstrittig ist jedoch, dass der Großteil der DSB in der G1/G0-Phase durch das NHEJ repariert werden (Lee *et al.*, 1997; Takata *et al.*, 1998).

In Zellen wird vermehrt fehlerbehaftetes NHEJ anstelle der HDR durchgeführt. Dies liegt vermutlich an der Problematik, die unbeschädigte Kopie auf dem homologen Chromosom im Nukleus zu finden und homologen DNA Bereichen zu nähern.

Für NHEJ wird eine Beteiligung der Proteine Ku70, Ku80, DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*), DNA Ligase IV und deren Co-Faktor XRCC4 beschrieben (Calsou *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001; Chu, 1997; Karran, 2000). Ku70/Ku80 rekrutiert die DNA-abhängige Protein Kinase Untereinheit DNA-PKcs. Eventuell sind auch die DNA Polymerase μ (Mahajan *et al.*, 2002) und die Polynukleotid Kinase/Phosphatase (PNKP) (Chappell *et al.*, 2002) beteiligt. Weitere Kandidaten sind das Protein Artemis (Ma *et al.*, 2002) der MRN-Komplex (MRE11/RAD50/NBS1) (Huang und Dynan, 2002), BRCA1 (Zhong *et al.*, 2002), APE1 (Demple und Harrison, 1994; Suh *et al.*, 1997), XLF/Cernunnos (Buck *et al.*, 2006) und Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase (TDP1) (Inamdar *et al.*, 2002). TDP1 wird beim NHEJ nur nach Modifikation der DNA-Enden, z. B. nach Bestrahlung nötig. Das Protein Artemis wird von DNA-PKcs phosphoryliert und aktiviert (Ma *et al.*, 2005). Es ist hauptsächlich bei der Reparatur von DSBen nach ionisierender Bestrahlung beteiligt. Für den MRN-Komplex wird dies beim NHEJ ebenfalls beschrieben. MRN bindet an DSBe und hält die DNA-Stränge räumlich zusammen. Die genaue Funktion des MRN Komplexes bei der Reparatur der DSB durch NHEJ nach ionisierender Bestrahlung ist bisher nicht geklärt (Riballo *et al.*, 2004).

Das Protein XLF, auch Cernunnos genannt, interagiert beim NHEJ mit dem XRCC4/DNA Ligase IV Komplex (Callebaut *et al.*, 2006). Dies lässt eine Beteiligung des Proteines bei der Ligation der DNA-Enden vermuten. Neueste Untersuchungen deuten auf eine Readenylierung der DNA Ligase IV nach erfolgter Ligation, wodurch die Ligase weitere Ligationen durchführen kann (Riballo *et al.*, 2009).

In Abbildung 2 ist beispielhaft der Mechanismus für NHEJ unter Artemis -Beteiligung dargestellt, folgender Absatz beschreibt die Abläufe.

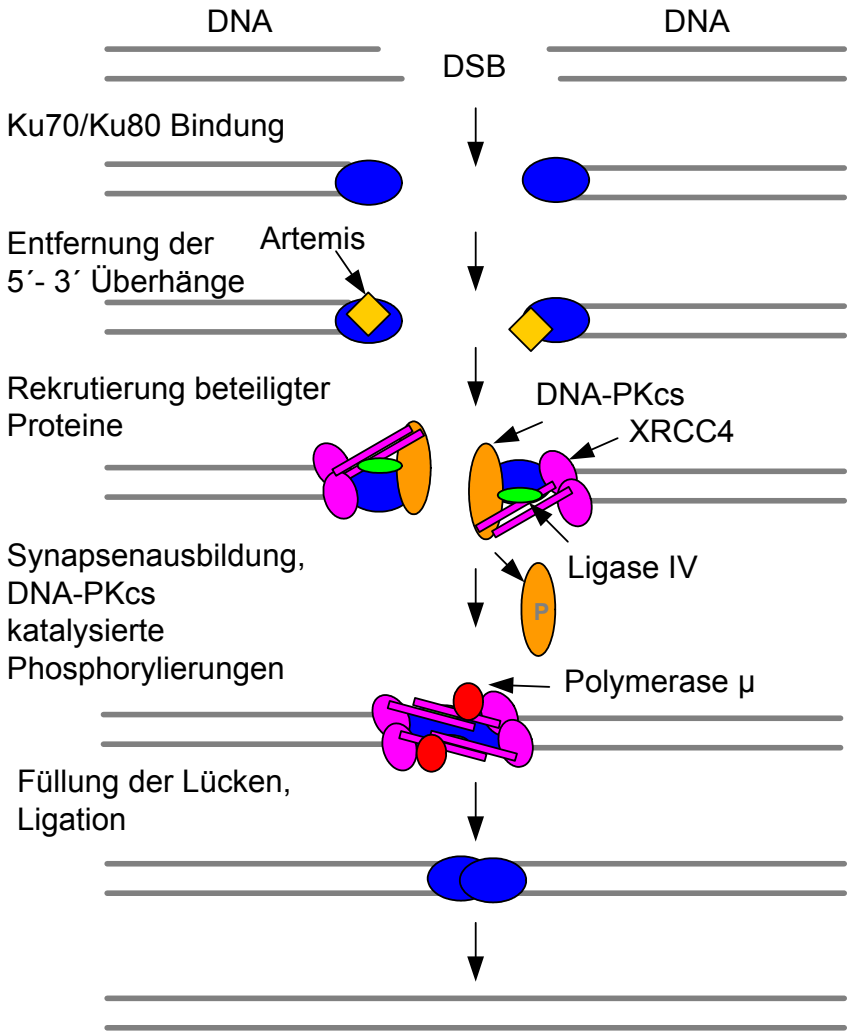

Abbildung 2: Schema des Artemis beteiligten Modells des NHEJ
Nach Bindung der DNA durch Ku70/Ku80, erfolgt zunächst die Prozessierung der DNA Enden, durch Artemis. Aktiviertes DNA-PKcs phosphoryliert Proteine und dissoziiert nach seiner Autophosphorylierung von der DNA. XRCC4, DNA Ligase IV und DNA Polymerase µ überbrücken die Lücke zwischen DNA Stücken, katalysieren die Zusammenführung und Lücken Füllung mit abschließender Ligation beider DNA Stränge (Valerie und Povirk, 2003).

Das Ku70/Ku80 Heterodimer besteht aus Ku70 und Ku80 und formt eine Ringstruktur, welche freie DNA Enden auffädelt (Walker *et al.*, 2001). Es lagert sich an DNA, wandert weiter in den Strang und ermöglicht auf diese Weise weiteren Ku70/Ku80 Molekülen die Anlagerung (Cary *et al.*, 1997; Mimori und Hardin, 1986; Paillard und Strauss, 1991; Pang *et al.*, 1997; Yaneva *et al.*, 1997). Ku70/Ku80 rekrutiert DNA-PKcs und erhöht deren DNA Bindungsaffinität. DNA-PKcs belegt die DNA-Enden und verdrängt Ku70/Ku80 weiter ins Innere des Stranges (Yoo und Dynan, 1999). Die Ausbildung des DNA-PKcs- Ku70/Ku80 Komplexes aktiviert die

Kinaseaktivität von DNA-PKcs (Smith und Jackson, 1999). Aktiviertes DNA-PKcs phosphoryliert eine Anzahl von DNA bindenden Proteinen (Anderson und Lees-Miller, 1992), mit bereits bekannten oder vermuteten Aufgaben beim NHEJ, wie XRCC4 (Leber *et al.*, 1998), WRN (eine RecQ Helikase, identifiziert bei Werner Syndrom Patienten) (Yannone *et al.*, 2001) und die Nuklease Artemis (Ma *et al.*, 2002). Nach seiner Aktivierung autophosphoryliert DNA-PKcs sich selbst und bewirkt damit seine Dissoziation von der DNA (Chan und Lees-Miller, 1996). Die Nuklease Artemis besitzt eine 5´ - 3´ Exonukleaseaktivität. Liegt es phosphoryliert vor, bildet es mit Ku70/Ku80 einen Komplex. Dieser Komplex schneidet als Endonuklease überhängende 5`- und 3`-Enden in der DNA (Chappell *et al.*, 2002). Gleichzeitig rekrutiert Ku70/Ku80 die Polymerase µ, welche vorhandene Lücken auffüllt. Hierbei ligiert der XRCC4/DNA-Ligase IV Komplex die DNA Enden, XRCC4 steigert gleichzeitig die Ligaseaktivität der DNA-Ligase IV (Karagiannis und El-Osta, 2004).

1.1.1.2 *Single-strand annealing* (SSA)

Neben dem NHEJ gibt es einen weiteren nicht konservativen Prozess der DSB Reparatur, das SSA. Kennzeichen des SSA ist das zusammenführen durch Hybridisierung von zwei DNA Enden an direkten Sequenzwiederholungen in doppelsträngigen Regionen, nachdem diese durch Nukleasen oder Helikasen in einzelsträngige DNA-Überhänge überführt wurden. Diese befinden sich in einiger Entfernung vomDSB. Unter Beibehaltung einer Kopie der Sequenzwiederholung und Deletion der dazwischenliegenden Sequenzen, wird der DSB beseitigt (siehe Abbildung 3) (Valerie und Povirk, 2003).

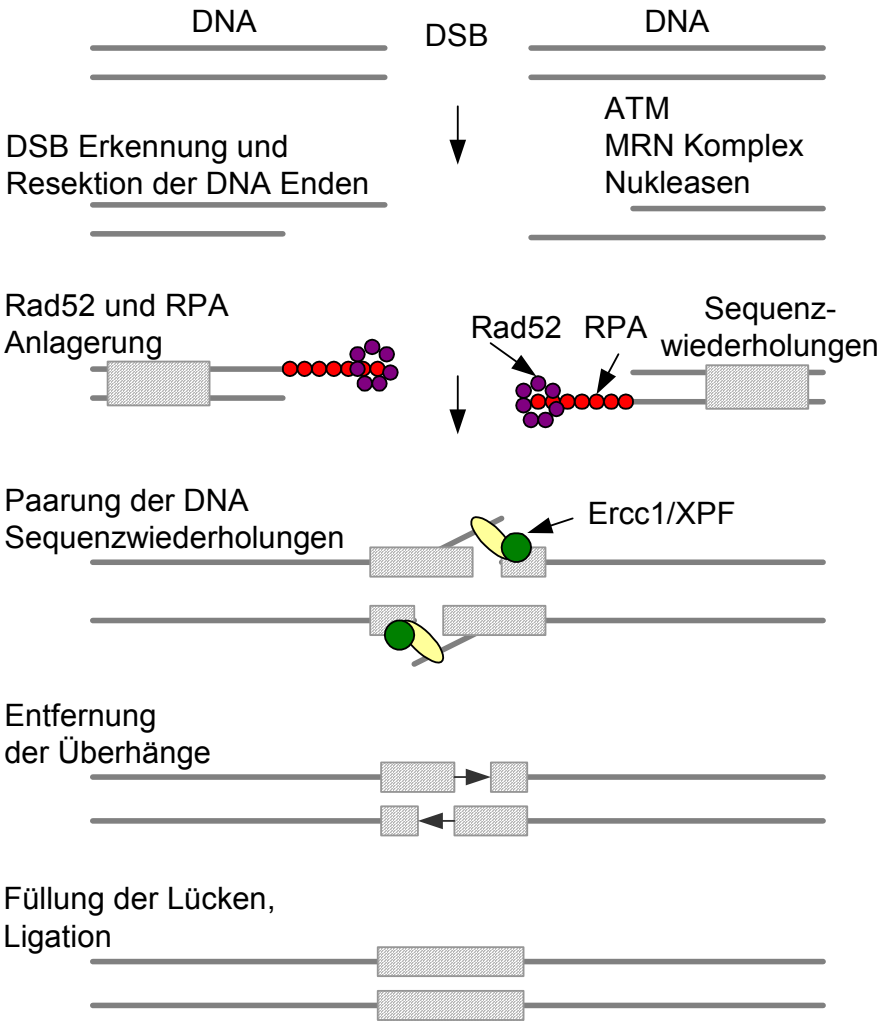

Abbildung 3: SSA mit den beteiligten Proteinen.
Nach Ausbildung von Einzelstrang DNA Enden durch Nukleasen möglicherweise unter Beteiligung von MRE11, kann das SSA stattfinden. Die Länge der Überhänge und Ausdehnung der Homologien reichen von Mikrohomologien bis zu mehreren hundert Basen. Dies bestimmt die Art des SSA. Bei langen Homologien zwischen direkten Sequenzwiederholungen an den Überhängen erleichtern RPA und RAD52 die DNA Paarung. Die Nuklease ERCC1/XPF entfernt die Überhänge, zur Lücken Füllung werden DNA Polymerasen und abschließend Ligasen herangezogen. Proteine wie ATM rekrutieren möglicherweise Nukleasen an den DSB. Am prinzipiell ähnlichen *microhomology-based* SSA sind andere Proteine beteiligt (nach Valerie und Povirk, 2003).

Der Ablauf des SSA ist noch nicht bis in alle Details aufgeklärt, soll aber im Folgenden schematisch beschrieben werden. Das SSA beginnt mit der Generierung eines Einzelstrangüberhanges an den DNA Enden durch eine Exonuklease oder Helikase, gefolgt von der Anlagerung freiliegender homologer Bereiche. Nach Entfernung der Überhänge erfolgt abschließend die Ligation (Thacker *et al.*, 1992). Sowohl die Länge der Einzelstränge als auch die zusammengelagerten Homologiebereiche können von einigen wenigen bis zu über hundert Basen reichen. Noch gibt es Widersprüche bzgl. der enzymatischen Vorgänge des SSA, man

vermutet dass gänzlich oder teilweise voneinander unabhängige Reparaturwege existieren.

Ein möglicher Mechanismus ist das *long-homology* SSA (in Abbildung 3 gezeigt), die DNA Enden werden zunächst durch eine Exonuklease prozessiert, möglicherweise unter Beteiligung des MRN-Komplex, um lange einzelsträngige Überhänge zu erhalten. Wenn ein homologer Bereich gefunden wurde, erfolgt die Stranganlagerung, überstehende Enden werden durch die ERCC1/XPF Nuklease entfernt (Adair *et al.*, 2000; Sargent *et al.*, 2000). In Hefen übernimmt der RAD1/Rad10 Komplex eine ähnliche Funktion (Ivanov und Haber, 1995). Beim SSA wird hRad52 benötigt, bei der HR zudem hRad51 (Van Dyck *et al.*, 2001). hRad52 bindet die DNA Enden als Ringstruktur, bestehend aus sieben Einzelmolekülen und unterstützt die Assoziation zwischen komplementären DNA Termini.

Ein weiterer Mechanismus, das *microhomology-based* SSA ist weniger gut beschrieben. *In vitro* Studien zeigen, dass diese Reparaturform durch eine 3´- 5´ Resektion gestartet wird, gefolgt von einer Stranganlagerung, Entfernung der DNA Überhänge und abschließender Ligation. MRE11 spielt auch hier vermutlich eine Rolle während des Resektionsschritts. Es lagert die DNA Enden aneinander und baut den 3´- 5´ Strang ab, bis ein Bereich mit Mikrohomologien erkannt wird. *In vitro* führt die Anwesenheit der DNA Ligase I zur Ligation des 5´ Überhanges mit dem geschnittenen 3´ Terminus (Paull und Gellert, 2000). Auch für die Helikase/Exonuklease WRN wurde eine Rolle beschrieben. Nach Interaktion mit dem Ku70/Ku80 Heterodimer wird dessen Exonuklaeseaktivität stimuliert (Cooper *et al.*, 2000; Li und Comai, 2001). Die 3´- 5´ Exonuklease Dnase III ist möglicherweise ebenfalls beim SSA involviert, da sie 3´ Überhänge abbauen kann (Hoss *et al.*, 1999; Mazur und Perrino, 1999), welche von WRN und MRE11 nicht angegriffen werden (Cooper *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000; Kamath-Loeb *et al.*, 1998; Li und Comai, 2001). *In vitro* und *in vivo* Studien zeigten bemerkenswerter Weise, dass *microhomology-based* SSA anders als bei dem akkuraten NHEJ, auch ohne Ku70/Ku80 stattfinden kann (Chen *et al.*, 2001; Gottlich *et al.*, 1998; Kabotyanski *et al.*, 1998). In einer anderen Studie wurde jedoch demonstriert, dass nach Integration einer I-*Sce*I Schnittstelle Ku70/Ku80 notwendig ist (Liang *et al.*, 1996). Dies lässt vermuten, dass auch das *microhomology-based* SSA weiter unterteilt werden kann, je nach Beteiligung von Ku70/Ku80. Ob hRad52 oder ERCC1/XPF beim *microhomology-based* SSA involviert sind, konnte bisher nicht geklärt werden. Zur

Zeit gibt es noch keine generelle Einteilung des SSA. Das *long-homology* SSA wird zur HDR gezählt, wohingegen das *microhomology-based* SSA eher dem NHEJ ähnlich ist und auch *microhomology-mediated* NHEJ genannt wird.
Beim *microhomology-based* SSA handelt es sich um einen alternativen *end-joining* Mechanismus, welcher auch bei Translokationen, *class-switch* Rekombinationen (CSR) und V(D)J Rekombinationen stattfindet (Corneo *et al.*, 2007; Soulas-Sprauel *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007). Die DNA Enden werden durch Exonukleasen substanziell abgebaut, um einzelsträngige Überhänge zu erzeugen. Während der Suche nach homologen DNA Bereichen zwischen den einzelsträngigen Überhängen werden nicht homologe Nukleotide entfernt und die entstandenen komplementären Enden zusammengefügt. Eine Beteiligung der Ligasen I oder III wird vermutet. Ligase I verbindet die Okazaki Fragmente während der Replikation, der ER und der homologen Rekombination. Die Ligase III hat Funktionen bei der BER und der DNA Einzelstrang-Bruch-Reparatur. Zudem wurde der Ligase III, in Verbindung mit XRCC1 und dem Protein Poly(ADP-Ribose) Polymerase, die Beteiligung bei einem *Backup* Reparaturweg zum klassischen NHEJ zugeschrieben (Audebert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006a). Dieser Mikrohomologie vermittelte *end-joining* Mechanismus ist unabhängig von Ku70/Ku80, der Ligase IV und aktiv während der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus.

1.1.1.3 Homologe Rekombination (HR)

Für diese DSB Reparaturform werden homologe Sequenzen in Form von Schwester Chromatiden, homologen Chromosomen oder Sequenzwiederholungen benötigt. HR Ereignisse können in Reparatur mit oder ohne *crossing over* zwischen den homologen Sequenzen eingeteilt werden (siehe Abbildung 4). HR findet während der späten S/G2 Phase statt und ist der am geringsten fehlerbehaftete Reparaturprozess (Takata *et al.*, 1998). An der HR sind zahlreiche Proteine beteiligt, wie hRad51, hRad52, hRad54, BRCA1 und BRCA2, die hRad51 Paraloge hRad51b, c, d, XRCC2, XRCC3 und der MRN Komplex (Abraham, 2001; Durocher und Jackson, 2001; Karran, 2000; Thompson und Schild, 2001). Diese Proteine sind direkt beteiligt, aber es existiert auch eine Reihe von Proteinen, welche eine DNA Schaden Stress Reaktion auslösen können, also eine indirekte Beteiligung haben. Solche Stress-Sensoren sind ATM und ATR. (Abraham, 2001; Durocher und Jackson, 2001).

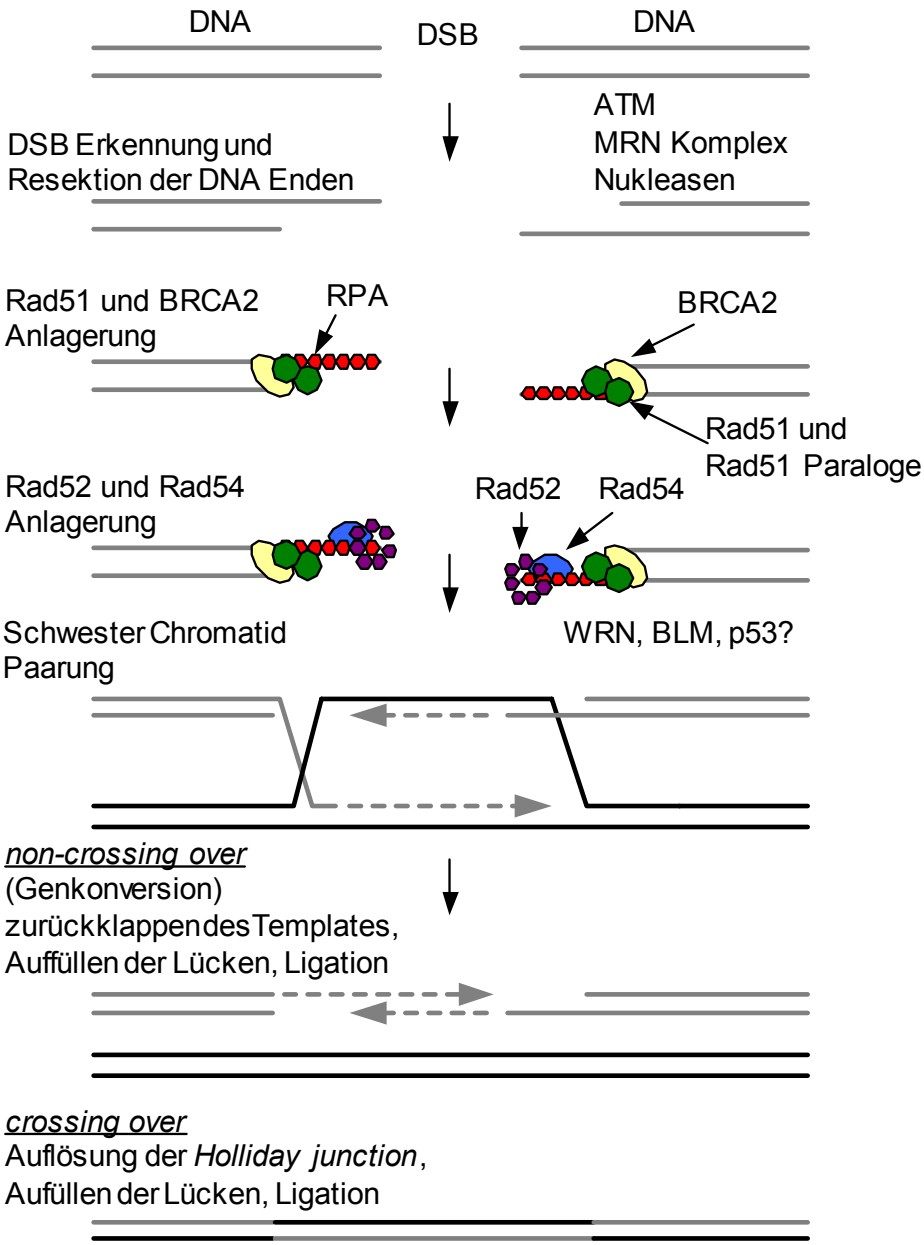

Abbildung 4: HR mit den beteiligten Proteinen.
ATM detektiert und bindet an den DSB. Es phosphoryliert H2AX, welches BRCA1 und NBS1 (ebenfalls von ATM phosphoryliert) rekrutiert. BRCA1 koordiniert die Reparatur. Der MRN Komplex und/oder weitere Nukleasen prozessieren die DNA Enden, um einzelsträngige Überhänge für die DNA Paarung und den Austausch zu erhalten. Die hier gezeigte 5´- 3´ Resektion basiert aus Daten in Hefen, wo 3´ Überhänge essentielle Intermediate darstellen. BRCA2, rekrutiert von BRCA1, unterstützt die Anlagerung von hRad51, an RPA ummantelte DNA Überhänge. Dies geschieht mit der Unterstützung durch die hRad51 Paraloge, welche wiederum hRad54 und hRad52 aktivieren, eventuell mit Hilfe der Helikasen BLM und/oder WRN. Der Tumorsuppressor p53, Interaktionspartner von BRCA1, hRad51, BLM und WRN, ist ebenfalls Bestandteil dieses DNA–Protein–Komplexes. BLM und WRN interagieren mit Holliday *junctions*. Es bestehen zwei Möglichkeiten die HR abzuschließen, nämlich mittels *non-crossing over* oder *crossing over*. Die beteiligten Polymerasen und Ligasen sind bisher noch nicht identifiziert. (Nach Valerie und Povirk, 2003).

Zu Beginn der HR wird an den DNA Enden ein Einzelstrangüberhang generiert. Basierend auf Modellen aus der Hefe wird angenommen, dass die Resektion in

5´ - 3´ Richtung unter Beteiligung des MRN Komplexes erfolgt. Ist dies der Fall, müssen weitere Faktoren beteiligt sein, da MRE11 nur eine Einzelstrang DNA Endonuklease und eine 3´ - 5´ Exonuklease Aktivität aufweist (Paull und Gellert, 1998; Trujillo *et al.*, 1998). Da NBS1 ein Bestandteil des MRN Komplexes und Phosphorylierungssubstrat von ATM ist, kann dieser Schritt durch ATM reguliert werden (Lim *et al.*, 2000). Die Rad50 Untereinheit des Komplexes zeigt eine ATPase Aktivität, dies könnte die DNA Entwindung erleichtern (Paull und Gellert, 1999). NBS1 hingegen scheint für den nukleären Transport und die Signalübertragung, der Stress Sensoren zu MRN bedeutend zu sein (Desai-Mehta *et al.*, 2001; Gatei *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000). Rad51, das humane Äquivalent zum bakteriellen RecA Protein (Shinohara und Ogawa, 1999) und seine Paraloge unterstützen zusammen mit RPA (dem humanen *single strand binding* Protein), Rad52 und Rad54 die ATP abhängige homologe DNA Paarung und den Strang Austausch (Baumann *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 1997). Das Rad51 Protein bildet Nukleoprotein-Komplexe an einzelsträngigen DNA Bereichen, welche zunächst von RPA ummantelt sind und initiiert so den Strangaustausch. Die Paraloge unterstützen Rad51 in dessen Funktion, dies konnte mit Hefen an den entsprechenden Proteinen Rad55 und Rad57 nachgewiesen werden (Sung, 1997). Rad52 und Rad54 fungieren zu einem frühen Zeitpunkt während der HR (Thompson und Schild, 2001). In Säuger Zellen stimuliert BRCA2 die Rad51-vermittelte HR. Bei Verlust von BRCA2 wird die HR vermindert und DSBe werden vermehrt über fehlerbehaftete DSB Reparaturmechanismen wie SSA oder NHEJ beseitigt (Moynahan *et al.*, 2001b; Pierce *et al.*, 2001; Tutt *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002). In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass Rad52 Ringstrukturen aus sieben Monomeren bildet. Diese Ringstruktur interagiert mit einzel- oder doppelsträngiger DNA (Swagemakers *et al.*, 1998; Van Dyck *et al.*, 1998; Van Dyck *et al.*, 1999). Alternative Modelle beschreiben Rad52 als Mediator von Rad51. Rad52 untersützt die Anlagerung von Rad51 an einzelsträngige DNA, indem es die Anlagerung von Rad51 fördert und die Bindung von RPA verringert (Singleton *et al.*, 2002; Sung *et al.*, 2003). Das Helikasen verwandte Rad54 Protein besitzt eine ATPase Aktivität. In *in vitro* Studien konnte bisher jedoch noch keine Helikasen Aktivität nachgewiesen werden (Swagemakers *et al.*, 1998). Rad54 verändert jedoch den topologischen Status von Plasmid DNA, bei vorhandenem Einzelstrangbruch und zeigt so eine negative *super-coiling* Aktivität (Tan *et al.*, 1999). Somit ist

vorstellbar, dass Rad54 und Rad51 bei der Stranginvasion und Homologiesuche unterstützt und damit den Zugang weiterer Reparatur Proteine erleichtert. Rad54 könnte als Wegweiser zwischen der HR und dem Homologie gerichteten SSA dienen, indem es die Wahl des Reparaturmechanismus durch Hemmung des SSA oder Förderung der HR beeinflusst (Dronkert *et al.*, 2000).

Die Proteine BRCA1 und BRCA2, welche häufig in vererbten Brustkrebs Formen mutiert sind, beteiligen sich ebenfalls an der DSB Reparatur. BRCA2 interagiert mit RPA und Rad51 und unterstützt die Beladung der DNA mit Rad51 oder die Ausbildung von dessen Filamenten (Yang *et al.*, 2002). Immunpräzipitationsstudien zeigen, dass BRCA2 und indirekt BRCA1 auch *in vivo* mit Rad51 interagieren. Zusammen mit Rad51 und PCNA sammeln sie sich an den sogenannten DSB Reparatur Foci, fokalen Strukturen im Nukleus, in welchen DSB-Reparatur-Faktoren assemblieren (Chen *et al.*, 1998; Moynahan *et al.*, 1999; Moynahan *et al.*, 2001a; Scully *et al.*, 1997; Sharan *et al.*, 1997). Ähnlich wie ATM, bindet BRCA1 *in vitro* an DNA (Paull *et al.*, 2001). ATM phosphoryliert BRCA1 und c-ABL. Dieses phosphorylierte BRCA1 und c-ABL aktivieren anschließend Rad51, cABL durch Phosphorylierung von Rad51, an verschiedenen Phosphorylierungsstellen (Chen *et al.*, 1999; Cortez *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 1998). Die Interaktionen von BRCA1 und BRCA2 mit Rad51 verbinden die Proteine mit der HR (Jasin, 2002).

Die 3´- 5´ RecQ Helikasen BLM und WRN, nach Mutation der kodierenden Gene verantwortlich für das Bloom-Syndrom (BS) und Werner´s Syndrom (WS), sind ebenfalls an der HR beteiligt (Hickson *et al.*, 2001). BS und WS sind rezessive Funktionsstörungen, welche mit erhöhter Krebsentstehung und frühzeitiger Alterung assoziiert sind. Es gilt als erwiesen, dass die Helikase BLM bei der HR beteiligt ist, da das Protein mit *Holliday Junctions* interagiert (Mohaghegh *et al.*, 2001). Es wird zudem von ATM phosphoryliert (Ababou *et al.*, 2000; Franchitto und Pichierri, 2002) und nach ionisierender Bestrahlung bildet es Foci mit Rad51 (Wu *et al.*, 2001). Die BLM Helikase ist zudem Bestandteil von BASC (*BRCA1-associated genome surveillance complex*) und stabilisiert die Interaktion von p53 mit Rad51 Foci (Sengupta *et al.*, 2003). BLM antagonisiert die von Rad51 abhängige Strangaustauschaktivität und wird als Faktor diskutiert, der insbesondere bei der Replikations gekoppelten HR angehaltene Replikationsgabeln auflöst und dadurch

effiziente und fehlerfreie DNA-Synthese vermittelt (Adams *et al.*, 2003; Karow *et al.*, 2000; Pedrazzi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2000).

Die Helikase WRN verfügt über eine 3´- 5´ Exonuklease Aktivität (Huang *et al.*, 1998), ähnlich wie BLM erkennt WRN *Holliday junctions* als Substrat (Constantinou *et al.*, 2000), WS Zellen zeigen zudem einen Defekt beim Auflösungsschritt der HR (Saintigny *et al.*, 2002). Das WRN Protein interagiert mit einer Anzahl anderer Proteine, welche bei der DSB Reparatur beteiligt sind, wie RPA, Ku70/Ku80 und p53. WRN wird durch DNA-PKcs phosphoryliert (Yannone *et al.*, 2001), ein Verlust von WRN führt zu Deletionen an DNA Enden, welche durch das NHEJ repariert werden (Oshima *et al.*, 2002), was eine Beteiligung des WRN Proteins am NHEJ vermuten lässt.

Das Protein p53, ein Regulator der HR, verfügt wie MSH2 die Fähigkeit Basenfehlpaarungen zu erkennen. In Gegensatz zu MSH2, welches die Präverenz für G-T Fehlpaarungen verfügt, erkennt p53 bevorzugt A-G und C-C Fehlpaarungen. Desweiteren wird die Bindung von p53 an *Holliday junctions* durch MSH2 stimuliert. Diese Beobachtungen führen zu der Modellvorstellung, dass p53 und MSH2 synergistische Aufgaben bei der Genauigkeitkontrolle der HR haben (Gatz und Wiesmüller, 2006; Subramanian und Griffith, 2002).

Nach der Schwester-Chromatid Paarung und Strang Invasion der DNA Überhänge, kann die HR auf zwei Arten fortgesetzt werden. Im ersten Fall verläuft die Reparatur ohne *Crossing over* (Genkonversion). Hier löst sich die *Template* DNA vom Schwester Strang ab und klappt zurück. Vorhandene Lücken im schadhaften Strang werden aufgefüllt und die Reparatur durch die Ligation abgeschlossen. In Säugetierzellen scheint dies der bevorzugte Mechanismus der HR zu sein (Johnson und Jasin, 2000). Desweiteren können die *Holliday junctions* durch endonukleolytische Spaltung gelöst werden, wobei sich je nach Ansatzstelle der Spaltung ein *crossing over* oder *non-crossing over* der beteiligten DNA-Stränge ergeben kann. Auch hier werden abschließend die Lücken durch eine DNA Polymerase gefüllt und Brüche durch eine Ligase geschlossen. Die hierfür notwendige Polymerase und Ligase wurde bisher noch nicht identifiziert. Ereignen sich die DSB aufgrund von Strahlung, müssen die blockierten 3´ Termini, vor Auffüllung der Lücken, entfernt werden. Zeitpunkt und Protein, dieses Schrittes bei der HR wurden noch nicht nachgewiesen.

1.1.2 Das Mismatch Reparatur (MMR) System

Der Einfluss des MMR Systems auf die DSB Reparatur wurde in dieser Arbeit untersucht. In den folgenden Abschnitten werden Komponenten des Systems erläutert und bisher bekannte Funktionen beschrieben.

1.1.2.1 Komponenten und Wirkungsweise des MMR Systems

Die humanen MMR Proteine hMSH2 und hMLH1 sind die am häufigsten mutierten Gene, welche aus hereditären nicht-polypösen Kolon-Karzinomen (HNPCC) isoliert wurden. HNPCC ist gekennzeichnet durch eine hohe Mikrosatelliten Instabilität, welche als Folge des Fehlens der MMR während der DNA Replikation durch *frameshift* Mutationen hervorgerufen wird (Kolodner, 1995).
Ein großer Anteil der sogenannten sporadischen Krebsformen wird durch epigenetisches s*ilencing* des *hMLH1* Genes ausgelöst (Wheeler, 2005). Die humanen Proteine hMSH2 und hMLH1 sind Homologe der *E. coli* Proteine MutS und MutL, welche gemeinsam mit MutH die gut beschriebenen Funktionen der post-replikativen MMR ausführen. Die Vorstellung der Funktionsweise der MMR Komponenten in *E. coli* wird im Folgenden beschrieben:
Zunächst erkennt das MutS Homooligomer Nukleotide, welche vom Watson-Crick Basen-Paarungsmodell abweichen. Das Homooligomer MutL stellt das Verbindungsglied zwischen diesem Basenfehlpaarungserkennungskomplex und den nukleolytischen Komponenten (MutH) des MMR-Systems dar. Falls eine Basen Fehlpaarung erkannt wird, schneidet MutH den unmethylierten Strang. Zur vollständigen Entfernung der Basen-Fehlpaarung werden zudem Helikase II und eine Einzel-Strang Exonuklease benötigt (Modrich und Lahue, 1996).
In menschlichen Zellen bildet das hMSH2 Protein Heterodimere. Bei Komplexbildung mit hMSH6 wird MutSα generiert, Komplexe entstanden aus hMSH2 und hMSH3 werden als MutSβ Komplexe bezeichnet. Diese Komplexe unterscheiden sich in ihren Präferenzen bzgl. Der Erkennung von Basen-Fehlpaarungen.
hMutSα interagiert vorzugsweise mit Fehlpaarungen, bei denen eine oder zwei ungepaarte Basen involviert sind, wohingegen der MutSβ Komplex längere Fehlpaarungen (Beteiligung von zwei – zehn ungepaarten Basen) detektiert.
Das hMLH1 Protein bildet ebenfalls Heterodimere, vorzugsweise mit hPMS2, wodurch es den MutLα Komplex erzeugt. MutLα unterstützt die Reparatur, welche

durch MutSα oder MutSβ initiiert wird. Weiterhin bestehen MutL Heterodimere aus hMLH1 und hPMS1 (hMutLβ) und hMLH1 und hMLH3 (hMutLγ), jedoch in viel geringerer Menge als MutLα (Modrich, 2006). Das Zusammenspiel der MMR Komponenten ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

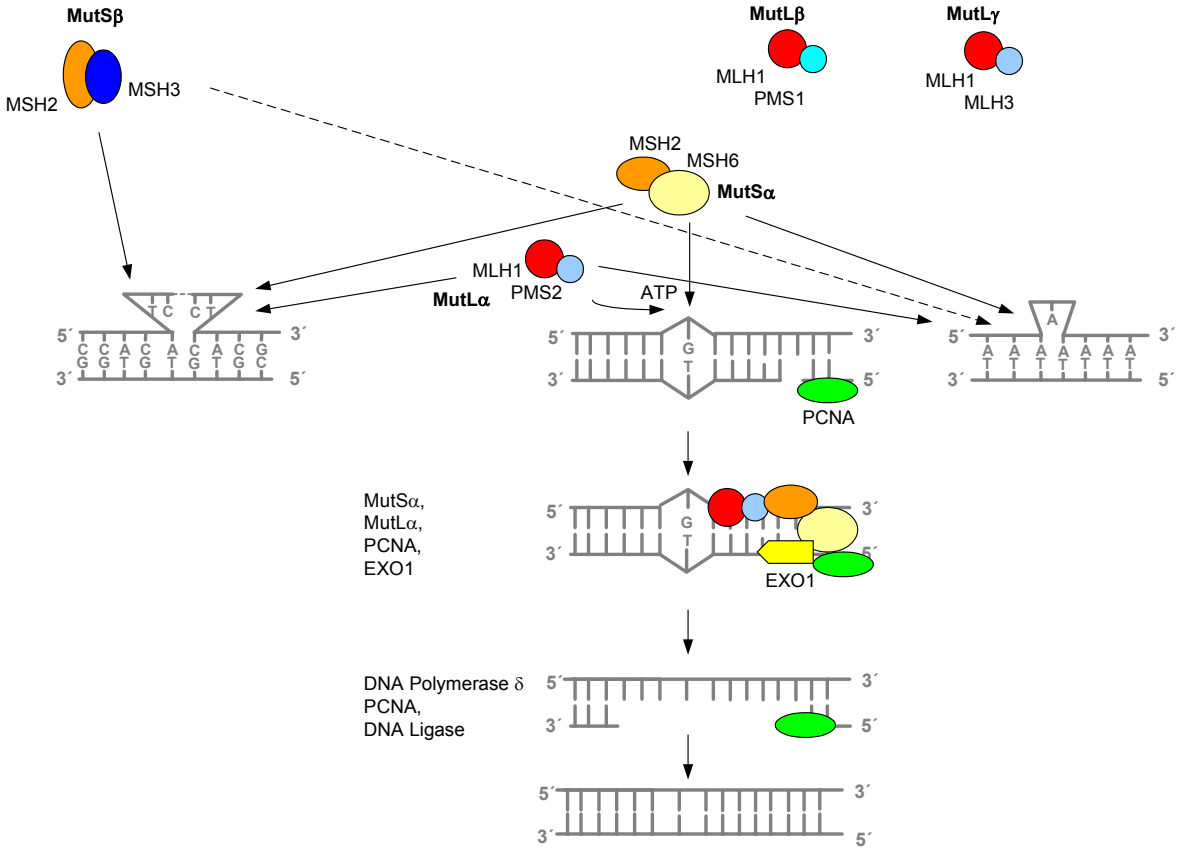

Abbildung 5: Funktionsweise der humanen MMR Komponenten und weiterer beteiligter Proteine.
Die MutS Komplexe gleiten am DNA Rückgrat entlang, der MutSα Komplex erkennt Basenfehlpaarungen und Insertions- bzw. Deletions-*loops* (IDL) unter Beteiligung von eine - zwei Basen. MutSβ detektiert ebenfalls kleine IDL, ist jedoch auch befähigt größere IDLs zu erkennen. Nach Detektion einer Fehlpaarung interagieren die MutS Komplexe mit MutLα, welches wiederum nachgeschaltete Proteine wie PCNA, EXO1, Polymerase δ, und eine DNA Ligase rekrutiert. Die Funktionen von MutLβ und MutLγ bei der MMR sind bisher noch nicht bekannt (verändert nach Schrauder, M., und Wiesmüller, L. (2006). DNA repair.

Interessanterweise konnte bisher durch *in vitro* Untersuchungen keine Rolle des hMutLβ Komplexes bei der MMR nachgewiesen werden (Raschle *et al.*, 1999).

Basen-Fehlpaarungen treten nicht nur nach der DNA Replikation auf, sondern auch bei der Paarung von voneinander abweichendender Sequenzen, z. B. während der homeologen Rekombination. Bei der homeologen Rekombination kommt es zu Paarungen von nicht perfekten komplementären DNA Bereichen. Dies kann zu

mutagenen Ereignissen führen, wie Translokationen und Deletionen, welche möglicherweise zu einer Krebserkrankung führen (Surtees *et al.*, 2004).
Diese Problematik wurde bereits in Bakterien beschrieben. Hier kommt es ebenfalls zu homeologen Rekombinationsereignissen, falls die durch RecA vermittelte Strang Austausch Aktivität durch Regionen unperfekter Homologien voranschreitet (Bianchi und Radding, 1983).
Auf die gleiche Weise erlaubt der Rad51 abhängige Strang Transfer den Einbau kurzer Fehlpaarungen (Cox, 1997; Namsaraev und Berg, 2000). Es muss also ein Mechanismus vorhanden sein, der eine fehlerfreie Reparatur sicherstellt und mutagene Ereignisse hervorgerufen durch Rekombinationsereignisse minimiert.

1.1.2.2 Das MMR System bei der DSB Reparatur

Vergleicht man die DSB Reparaturmechanismen, wie das NHEJ oder das SSA mit der HR, dann ist die HR der zuverlässigste Mechanismus (Gatz und Wiesmüller, 2006; Valerie und Povirk, 2003).
Untersuchungen in Prokaryoten und niederen Eukaryoten zeigen, dass die MutS und MutL Homologen den Strangaustausch zwischen sehr kurzen Homologiebereichen verhindern. In Hefen wurde gezeigt, dass MSH2, MSH3, MSH6, MLH1 und PMS1 (PMS2 bei Säugetieren) für die Genauigkeitskontrolle der HR wichtig sind. Hierbei haben Mutationen in *MSH2* stets einen größeren Einfluss, als Mutationen in *MLH1* oder *PMS1*. Unter Berücksichtigung biochemischer Daten, konnte ein Modell für diesen Genauigkeitskontrollmechanismus erstellt werden, der Ereignisse betrifft, bei welchem Rad51 den Strang Transfer einleitet. Falls ein kurzer Homologiebereich gefunden wird, kontrollieren die MutS Homologe die Heteroduplex DNA Ausdehnung durch Blockierung des Strang Austausches, wenn Basenfehlpaarungen beteiligt sind. MutL Homologe fördern die MutS Funktionen und destabilisieren eventuell blockierte Zwischenprodukte (Surtees *et al.*, 2004).
In der Hefe verhindern MSH2, PMS1, MLH1 und MLH3 während der Meiose das *crossover* zwischen divergierenden Sequenzen. Es ist anzunehmen, dass hierbei MLH1/MLH3 die Rekombination möglicherweise als Reaktion auf bestimmte Protein-Interaktionen kontrolliert (Abdullah *et al.*, 2004; Surtees *et al.*, 2004). Der MLH1/MLH3 Komplex wird ebenso während der Meiose in Mäusen benötigt. Hierbei sorgen die durch MSH4/MSH5 gebundenen Rekombinations-intermediate unter

Beteiligung von MLH1/MLH3 für reziproke c*rossover* Ereignisse. Dies ist für eine akkurate chromosomale Trennung notwendig.
In Säugetierzellen konnte bereits gezeigt werden, dass MSH2, MSH3 und MSH6 die Rekombination zwischen divergierenden Sequenzen verhindern (Abuin *et al.*, 2000; de Wind *et al.*, 1995; Elliott und Jasin, 2001). Tischfield und Kollegen zeigten weiter, dass die Unterdrückung der mitotischen Rekombination in Fibroblasten aus gentechnisch veränderten Mäusen, nach MLH1 Verlust abgeschwächt ist (Shao *et al.*, 2004). Zudem konnten nach radioaktiver Bestrahlung einer MLH1 defizienten murinen Nieren-Zelllinie mitotische Rekombinationsereignisse beobachtet werden. Nach Rekonstitution des MLH1 Proteins konnte dies nicht nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2006b).

1.2 Das auf „*Enhanced Green Fluorescent* Protein“ (*EGFP*) basierende Testsystem zum Nachweis der DSB Reparatur (Akyüz *et al.*, 2002)

Um Rekombinationsereignisse in Hefen, wie *S. cerevisiae* und *S. pombe* zu untersuchen, wurden verschiedenste Systeme entwickelt, mit welchen intra- und intergenetische Rekombinationen nachweisbar sind (Fox und Smith, 1998; Osman und Subramani, 1998; Paques und Haber, 1999).
Um die DSB Reparatur in Säugern zu untersuchen, wurden Plasmid-basierende Untersuchungen entwickelt. Nach erfolgreicher DSB Reparatur wurde ein Resistenzgen rekonstituiert, die überlebenden Zellen konnten detektiert werden (Willers *et al.*, 2002).
Es ist bekannt, dass ein Verlust der meiose-spezifischen Endonuklease *SPO11* in *S. cerevisiae* oder seinem Homolog in *S. pombe* (*Rec12*+) die Entstehung meiotischer DSB verhindert und somit auch die meiotische Rekombination (Cao *et al.*, 1990; Cervantes *et al.*, 2000). Ein etabliertes System in *S. cerevisiae* zur gezielten Induktion von DSB verwendet die HO-Endonuklease, mit einer Erkennungssequenz von 22 Bp. Sie schneidet nur an einer Stelle, dem *mating-type* Lokus, im Gesamtgenom von *S. cerevisiae* (Paques und Haber, 1999). Durch ein definiertes Kulturmedium kann das mit einem induzierbaren Promotor fusionierte *HO*-Gen gezielt exprimiert werden. Dies induziert ortsspezifische DSB.

In somatischen Zellen von Säugern ist die HR ein seltenes Ereignis. Zum Nachweis von Rekombinationsereignissen hat sich der Einsatz von ortspezifischen Endonukleasen bewährt (Jasin, 1996). Von diesen Endonukleasen hervorgerufene DSB führen in mitotisch wachsenden Zellen zu einem Anstieg der Rekombinationsraten.

In Säugetierzellen wird vor allem die Endonuklease I-*Sce*I verwendet, welche aus Mitochondrien der Hefe isoliert wurde. Ihre Erkennungssequenz umfasst 18 Nukleotide und kommt im Genom von Säugetierzellen nicht vor (Plessis *et al.*, 1992).

Die Reparatur spezifisch induzierter DSB durch I-*Sce*I, kann durch Integration von Selektions-Marker-Genen (z. B. Puromycin) bzw. alternativen Reportergenen (z. B. *EGFP* oder *RFP*) chromosomal und extrachromosomal untersucht werden. Durch definiertes Design von Erkennungssequenz und nicht funktionellen *EGFP* Genen können verschiedene DSB Reparaturwege untersucht werden. Es ist somit möglich, die Rolle bestimmter Proteine bei verschiedenen Reparaturmechanismen zu klären. Bei dem hier beschriebenen System handelt es sich um ein reaktionsschnelles und leicht zu handhabendes Testsystem, basierend auf der Rekonstitution eines Wildtyp *EGFP*-Gens (*wtEGFP*).

Nach erfolgreicher DSB Reparatur durch die Rekonstitution des EGFP Gens und nachfolgender Expression des EGFP Proteins, können Reparaturereignisse durch Identifizierung von Grünfluoreszenz in lebenden Zellen per Durchflusszytometrie an einem FACS-Gerät nachgewiesen werden.

Für die Eigenfluoreszenz des EGFP Proteins sind eine von Sauerstoff abhängige posttranslationale Modifikation der Chromophor-Region und die Integrität der umgebenden Proteinstruktur notwendig. Mit Deletion von nur wenigen Aminosäuren kann ein Verlust der Grünfluoreszenz einhergehen (Cubitt *et al.*, 1995; Tsien, 1998).

Die Anordnung und das Design (Akyüz *et al.*, 2002) der Akzeptor- und Donor-*EGFP* Gene in einem retroviralen Vektorgerüst bestimmt die Untersuchungsmöglichkeit der verschiedenen DSB Reparaturmechanismen. Die Reparatur Substrate können nach retroviraler Transduktion linear ins zellulären Genom integriert werden, so dass auch der Einfluss des chromosomalen Kontext auf die DSB Reparatur abgeklärt werden kann.

Den Akzeptor-*EGFP* Genen ist ein CMV Promotor vorangestellt, die Donor-*EGFP* Gene folgen nach einem Abstandhalter, dargestellt durch eine Hygromycinresistenzkassette oder eine RFP (*red flourescent protein*) -Expressions-

Kassette. Die *EGFP* Gene unterscheiden sich einerseits durch die Sequenzänderungen in Nachbarschaft der I-*Sce*I Erkennungssequenz in der für die Chromophor-Region koordinierenden Nukleotide (∆-, *HR*- oder *EJ-EGFP*), andererseits durch die Gestaltung ihrer 3´ bzw. 5´-Enden. So existieren Varianten, bei denen das 3´ Ende deletiert wurde oder am 5´ Ende das Start-Kodon durch zwei Stop-Codons ersetzt wurde. Bei der Namensgebung dieser *EGFP* Gene wird der intakte Bereich des Genes benannt.

Varianten mit Änderungen in der für die Chromophor-Region (Aminosäuren 65-67) kodierenden Nukleotide unterscheiden sich wie folgt: Grundsätzlich wird die 18 Bp lange I-*Sce*I Erkennungssequenz von Deletionen oder Insertionen einiger Basen flankiert. Bei ∆-*EGFP* fehlen 46 Bp, bei *HR-EGFP* wurden 4 Bp entfernt. *EJ-EGFP* weist eine kurze Verdopplung (5 Bp) Im Bereich der Chromophor-Kodons auf (Abbildung 6). Hierdurch wurden innerhalb der Chromophor-Region unterschiedlich lange Homologien zum Donor-Gen erzeugt.

Mit Hilfe der I-*Sce*I Erkennungssequenz und Restriktionsendonuklease können gezielt DSB in den Reparatur-Substraten erzeugt werden und je nach Substrat-Design über verschiedene Mechanismen repariert werden, wobei je nach Substrat-Design auch Aussagen über die Qualität der Reparatur gemacht werden können.

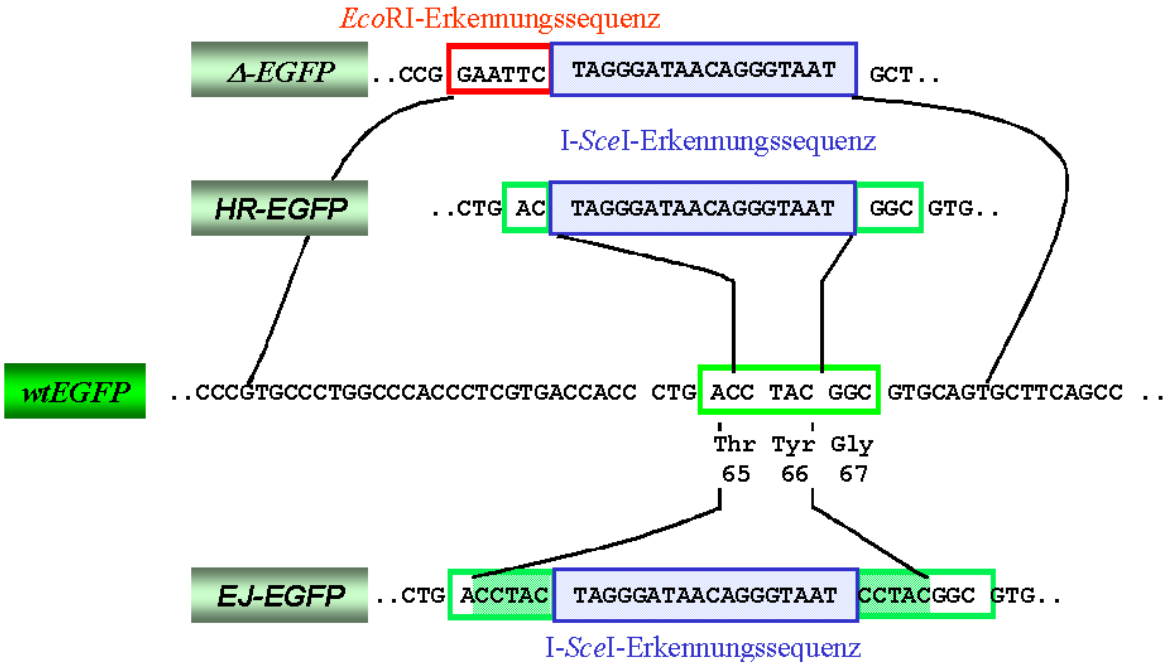

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Rekombinationsakzeptoren *Δ*-, *HR*- und *EJ-EGFP*.
Mittig angeordnet ist die *wtEGFP* Sequenz mit den Kodons für die drei Aminosäuren „T65-Y66-G67“ der Chromophorregion. Rot umrandet, eine *Eco*RI-Erkennungssequenz, die I-*Sce*I-Erkennungssequenz ist durch einen blauen Rahmen markiert. Die deletierten bzw. inserierten Sequenzen im Vergleich zur *wtEGFP*-Sequenz sind durch grüne Umrahmungen hervorgehoben. Zur Detektion des NHEJ flankiert die die I-*Sce*I-Erkennungssequenz eine 5 Bp Sequenzwiederholung (grün hinterlegt, *EJ-EGFP*) (aus Akyüz *et al.*, 2002).

Zur Detektion der konservativen HR wurde ein 3´ trunkiertes *5`EGFP*-Gen als Donor integriert, als Akzeptor-*EGFP* Gene wurden Δ-*EGFP* oder *HR-EGFP* genutzt. Die entstandenen Reparatursubstrate werden in folgenden Abschnitten als HR-EGFP/5´EGFP oder HR-5` und Δ-EGFP/5´EGFP oder Δ-5` Plasmide bezeichnet.
Bei Verwendung des 5´ trunkierten *3´EGFP*-Genes als Donor, entstanden die Plasmide HR-EGFP/3´EGFP (HR-3´) und Δ-EGFP/3´EGFP (Δ-3´), welche sowohl die konservative HR Als auch das SSA nachweisen können.
Zur Detektion des SSA wurde ein 3´-trunkiertes *5´EGFP*-Gen unter CMV Expressionskontrolle und *HR-EGFP* hinter den Abstandshalter *RFP* kloniert. Das entstandene Plasmid wird folgend als 5´-HR bezeichnet.
Zum Nachweis des NHEJ wird nur ein *EJ-EGFP* benötigt, in welchem ein Mikrohomologiebereich aus 5 Bp integriert ist. Die in diesem Abschnitt beschriebenen Reparatursubstrate sind in Abbildung 7 dargestellt.

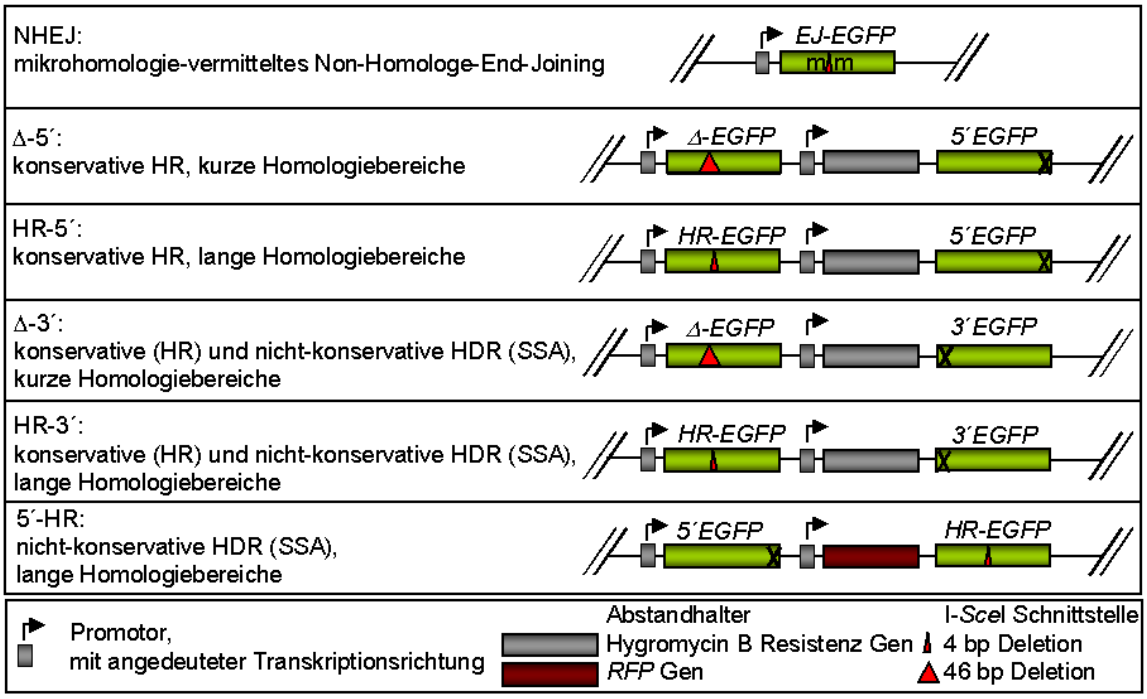

Abbildung 7: Design der Reparatur Substrate zur Analyse der verschiedenen DSB Reparatur Mechanismen.
Das fluoreszenz-basierende Testsystem beruht auf dem Nachweis von *wtEGFP* nach erfolgreicher DSB Reparatur. Der Bruch wird von der Meganuklease I-*Sce*I induziert. Im Plasmid EJ-EGFP ist die I-*SceI* Schnittstelle von 5 Bp Mikrohomologien (m) umgeben, es dient zum Nachweis des NHEJ. *5´EGFP* und *3´EGFP* sind am 3´ bzw. 5´ Ende trunkiert. Sie enthalten die Sequenzinformationen zur HR und SSA.
Die DSB Reparaturmöglichkeiten für das jeweilige Substrat der Plasmide sind auf der linken Seite der aufgeführt.

Für eine voll effiziente HR ist eine Mindestlänge von ca. 200 Bp mit 100 %iger Homologie der zu rekombinierenden Substrate notwendig (Elliott *et al.*, 1998; Rubnitz und Subramani, 1984). Beim Δ-*EGFP*-Gen ist eine kontinuierliche Homologie von 168 Bp gegeben, was eine limitierende Homologie zum Donor-*EGFP*-Gen darstellt. Das *HR-EGFP* weist eine kontinuierliche Homologie von 195 Bp und damit eine ausreichende Homologielänge zum Donor-*EGFP*-Gen aus.
Beim *HR-EGFP* Gen ist zusätzlich eine einzelne Mutation in Codon 64 (CTG→ATG) (Akyüz *et al.*, 2002) eingeführt. p53 inhibiert die HR besonders stark bei Ausprägung von Heteroduplexen mit den Fehlpaarungen A/G und C/T, das *HR-EGFP* Gen ist somit besonders zur Untersuchung der Funktionalität der Rekombination in Gegenwart von p53 geeignet.

1.3 RNA Interferenz (RNAi) Technologie

Evolutionär betrachtet ist die RNA Interferenz ein Schutzmechanismus der Organismen zur Erhaltung der Integrität des Genoms (Novina und Sharp, 2004).
Falls eine lange doppelsträngige RNA (dsRNA) in eine Zelle gelangt, wird diese durch das RNase III Enzym Dicer (Bernstein *et al.*, 2001; Ketting *et al.*, 2001) in kleinere RNA Duplexe (21 – 23 Nukleotide) abgebaut, siehe auch Abbildung 8. Diese kurzen RNA Duplexe werden mit siRNA (small interfering RNA) bezeichnet (Bernstein *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001). Die Dicer-siRNA Komplexe werden durch das *transactivating response RNA-binding protein* (TRBP) zum *RNA-induced silencing complex* (RISC) übertragen (Chendrimada *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2005). Der siRNA-Strang mit der schwächeren Bindungsenergie wird mit dem 5'-Ende in den RISC-Komplex eingelagert (Martinez *et al.*, 2002). Optimalerweise handelt es sich hierbei um den Antisense-Strang der siRNA, um eine exakte Sequenzerkennung der komplementären Ziel-mRNA zu erreichen (Chiu und Rana, 2002). Die mRNA wird durch die katalytische Untereinheit von RISC, Argonaute 2 (Ago2), gespalten. Die Piwi-Domäne von Ago2 spielt hier eine wesentliche Rolle (Carmell *et al.*, 2002), da diese eine RNase H-artige Endonuklease Aktivität besitzt, wodurch eine einzelne Phosphodiesterbindung in der mRNA gespalten werden kann (Kim *et al.*, 2007).
Mit Hilfe der RNAi kann die Funktion von Proteinen in einer Zelle untersucht werden (Novina und Sharp, 2004). Um die Expression eines Proteins zu unterdrücken muss die Sequenz der siRNA komplementär zur transkribierten RNA Sequenz (mRNA) des untersuchten Proteins sein. Die siRNA führt zum spezifischen Abbau der komplementären mRNA, wodurch dann die Translation von mRNA zu Protein in entsprechendem Maße vermindert wird. Die Beeinflussung der Expression des Proteins erfolgt posttranskriptionell (siehe Abbildung 8).

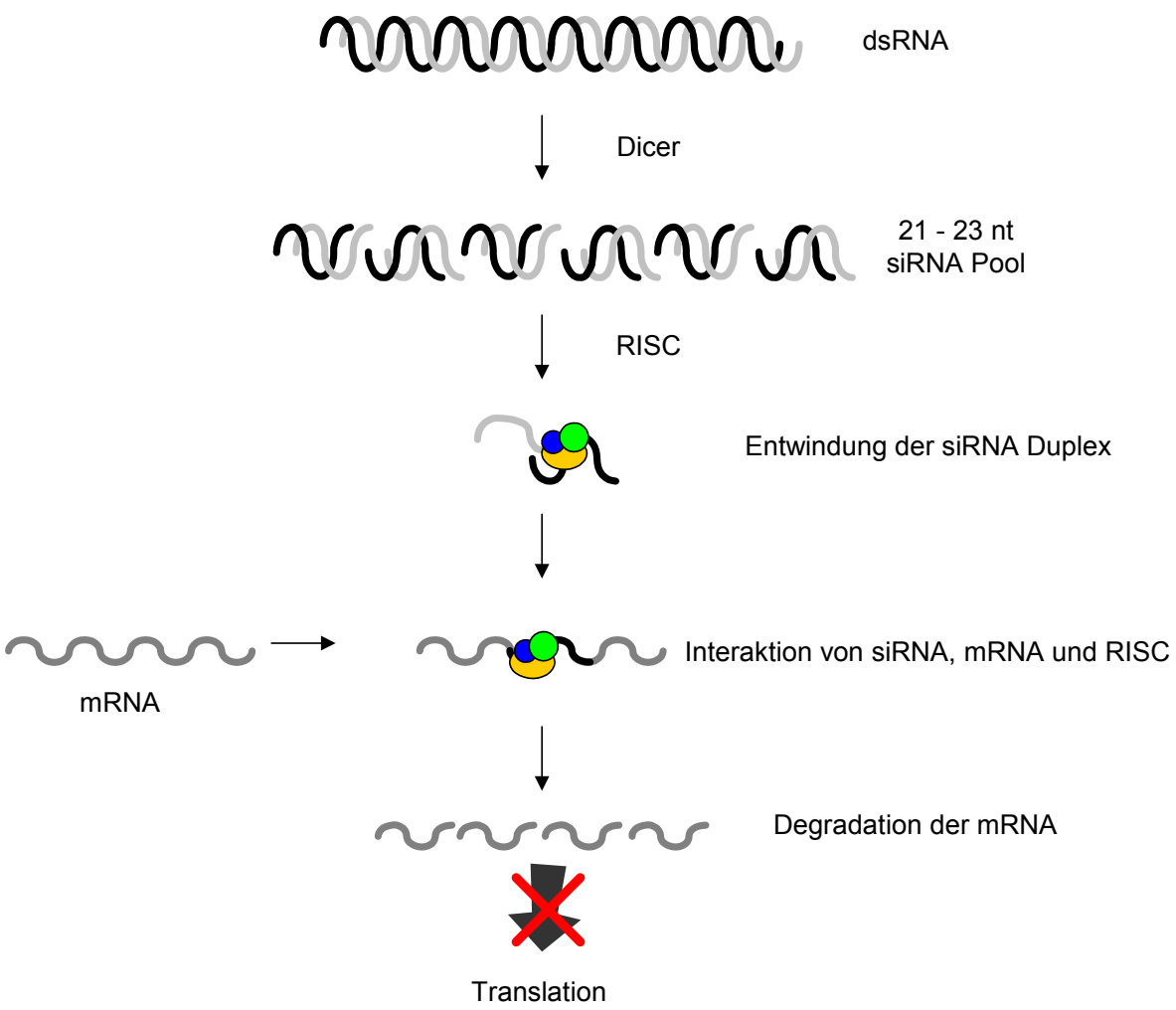

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Wirkweise der RNAi
dsRNA wird durch Dicer in 21 bis 23 nt große siRNA-Duplexe gespalten. Der Strang mit der geringeren Bindungsenergie am 5`-Ende wird in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) inkorporiert. RISC wird durch den siRNA-Strang zur komplementären mRNA geführt und zerschneidet diese durch eine Endonuklease-Aktivität. Nachdem die homologe mRNA degradiert wurde, löst sich RISC wieder und durchläuft einen neuen Zyklus (Campbell und Choy, 2005).

1.3.1 Transiente RNAi

Bei der transienten RNAi werden direkt siRNAs in die Zellen eingeschleust (Elbashir *et al.*, 2002). Die Herstellung der siRNAs kann dabei durch verschiedene Methoden erfolgen.

Ist die Sequenz der siRNA bekannt, können synthetische siRNAs durch chemische Synthese hergestellt werden (Micura, 2002). Synthetisch hergestellte siRNAs sind hochgradig rein, so dass Effekte auf die Zellen durch Fremd-Substanzen ausgeschlossen werden können.

Bei der *in vitro* Transkription werden ausgehend von Oligonukleotiden kleine RNA Fragmente synthetisiert, welche sich zu dsRNA zusammenlagern und durch den Dicer zur nativen siRNA prozessiert werden (Provost *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002).
Durch die transiente RNAi kann nur eine temporäre Suppression des Zielgens hervorgerufen werden, welche durch die Halbwertszeit des Zielproteins und der siRNA (Medema, 2004) bestimmt wird. Durch die Proliferation der Zellen wird die siRNA Konzentration zudem mit jeder Zellteilung halbiert (Maliyekkel *et al.*, 2006). Die Wirkungszeit liegt zwischen 3 und 5 Tagen (Holen *et al.*, 2002).

1.3.2 Stabile RNAi

Hier wird ein Vorläufermolekül der siRNA direkt in der Zelle exprimiert, welches als *short-hairpin* RNA (shRNA) bezeichnet wird (Kunath *et al.*, 2003). Die Matrize für die shRNA setzt sich aus dem *sense*-Strang und dem *antisense*-Strang einer siRNA zusammen, welche durch einen Spacer voneinander getrennt werden (Paddison *et al.*, 2002). Nach der Transkription der Sequenz durch die RNA Polymerase III (Pol III), bildet sich eine Haarnadelstruktur aus, welche wie dsRNA durch das Dicer Enzym zu siRNAs prozessiert wird (Kawasaki und Taira, 2003).
Um shRNA Konstrukte in der Zelle zu exprimieren, werden Vektorsysteme (siehe Abbildung 9) (Brummelkamp *et al.*, 2002; Sui *et al.*, 2002) oder virale Vektoren (Devroe und Silver, 2002) verwendet, in welchen die Expression des Konstruktes einem Pol III Promotor unterliegt. Terminiert wird die Transkription durch ein Poly-Thymin-Signal (T5-Tail) (Kunath *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 2002; Tuschl, 2002). Werden in die Vektorsysteme zusätzlich Resistenzgene (wie das Puromycinresistenzgen) integriert, kann eine permanente Expression der shRNA bzw. siRNA forciert werden und damit eine kontinuierliche Suppression des Zielgens.

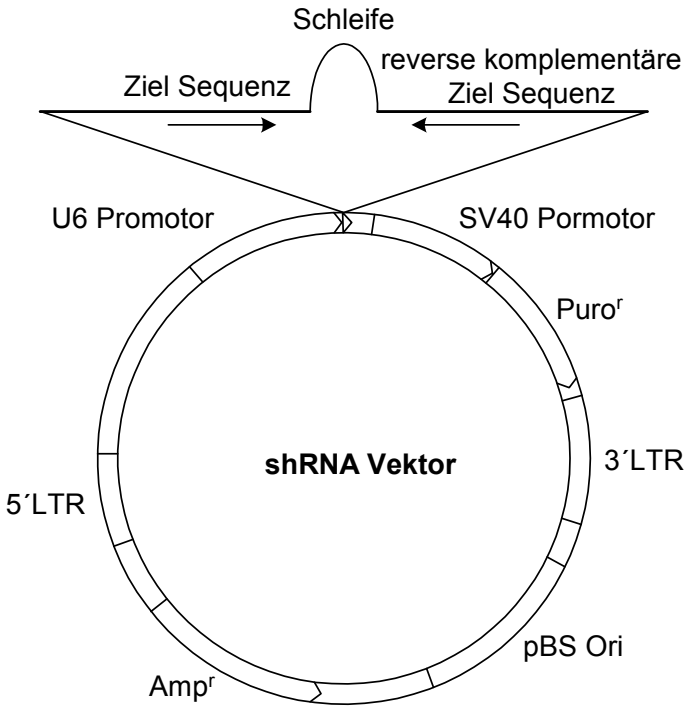

Abbildung 9: Schematische Darstellung eines shRNA Vektors
Der Vektor beinhaltet zur Virusexpression 5´ und 3´ LTRs des Moloney-Maus-Leukämie Virus (MMLV), welche ein Puromycinresistenzgen Puro^r mit SV40 Promotor flankieren und die U6-shRNA Expressions-Kassette. Für die bakterielle Amplifikation des Vektors ist eine Ampicillin Resistenz-Kassette (Amp^r) und ein Replikationsursprung (Ori) aus dem Plasmid pBS integriert (Nach Origene, Rockville, MD, USA).

1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Komponenten des MMR Systems auf die unterschiedlichen DSB Reparaturmechanismen untersucht werden und damit das Bild der Funktionen der beteiligten Proteine bei der Aufrechterhaltung der Genomstabilität weiter vervollständigt werden.

Die MMR Gene *hMSH2* und *hMLH1* sind bei HNPCC und bei Ovarialkarzinomen häufig mutiert. HNPCC ist gekennzeichnet durch eine hohe Mikrosatelliten Instabilität, hervorgerufen durch *Frameshift* Mutationen, als Folge des Fehlens der MMR während der DNA Replikation (Kolodner, 1995).

Die postreplikative MMR und die dabei beteiligten Komponenten sind bereits gut beschrieben. In Hefen konnte weiter nachgewiesen werden, dass die MutS Proteine MSH2, MSH3, MSH6 und weniger ausgeprägt auch die MutL Proteine MLH1 und PMS1 bei der Regulation von Rekombinationsereignissen eine Rolle spielen. Um eine eventuellen Mitwirkung der MMR Proteine bei den verschiedenen DSB Reparaturwegen einschließlich der Rekombination in menschlichen Zellen nachzuweisen, sollte das gut etablierte EGFP basierte Testsystem verwendet werden (Akyüz *et al.*, 2002). Dieses Testsystem sollte auf Zelllinien appliziert werden, welche sich in ihrem hMLH1 oder hMSH2 Status unterscheiden.

Um indirekte Einflüsse von hMLH1 und anderen MutL Proteinen auf die DSB Reparatur, verursacht durch die MMR, von direkten Einflüssen dieser Proteine zu unterscheiden, sollten zudem hMSH2 negative Zellen verwendet werden, in welchen die Expression von hMLH1, hPMS1 oder hPMS2 vor dem Hintergrund einer MMR-Dysfunktion beeinflusst werden sollte.

Um zu verstehen, wie im Detail MutS und MutL Proteine DSB Reparaturwege modulieren, sollten distinkte Reparaturfaktoren eines Reparaturweges und relevante Interaktionspartner in deren Funktionen beeinflusst und dann erneut DSB Reparatur Aktivitäten in Abhängigkeit von MutS und MutL Proteinen studiert werden.
Das hMLH1 Protein hat zudem vermutlich Einfluss auf die Induktion des Zell-Zyklus-Arrestes, vermittelt über die Phosphatidylinositol-3-Kinase zugehörigen Kinasen,

ATM und ATR. Hierbei wird sogar diskutiert, ob die Rolle von hMLH1 bei der Signaltransduktion als Antwort auf DNA Schäden von seinen Aufgaben bei der MMR trennbar ist. Um dies in Zusammenhang mit den beobachteten DSB-Reparatur-Funktionen in menschlichen Zellen abzuklären, sollte der Einfluss dieser Kinasen und der nachgeschalteten Signaltransduktionsfaktoren in den gewählten zellulären Systemen ebenfalls untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Eukaryotische Zelllinien und Bakterienstämme

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit genutzten eukaryotischen Zelllinien sind in Tabelle 1 aufgelistet, verwendete Bakterienstämme sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 1: Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	**Relevante Merkmale / Herkunft und Referenz**	**Kultivierung**
Lovo	Humane Kolon-Karzinom Zelllinie (ATCC CCL-229™), hMSH2 negativ.	DMEM, 10 % FCS, 200 nM Östradiol.
Lovo mutMSH2 Klon 5	Derivat der Kolon-Karzinom Zelllinie Lovo, östradiol-induzierbare Expression von mutiertem MSH2 mittels chromosomal integriertem Expressionsplasmid pGCmutMSH2 kombiniert mit pMVGalERVP Derivat der Kolon-Karzinom Zelllinie Lovo.	DMEM, 10 % FCS, 200 nM Östradiol.
Lovo wtMSH2 Klone 6 - 8	Derivate der Kolon-Karzinom Zelllinie Lovo, östradiol-induzierbare Expression Wildtyp MSH2 mittels chromosomal integriertem Expressionsplasmid pGCwtMSH2 kombiniert mit pMVGalERVP.	DMEM, 10 % FCS, 200 nM Östradiol.
HCT116	Humane Kolon-Karzinom Zelllinie (ATCC® CCL-247™), hMLH1 negativ; Giancarlo Marra, Zürich.	McCoys, 10 % FCS.
HCT116 + chr3	Derivat der humanen Kolon-Karzinom Zelllinie HCT116, durch zusätzliches Chromosom 3 hMLH1 positiv (Koi *et al.*, 1994); Giancarlo Marra, Zürich.	McCoys, 10 % FCS.

Fortsetzung Tabelle 1: Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	**Relevante Merkmale / Herkunft und Referenz**	**Kultivierung**
293T-Tet-Off-hMLH1	Humane embryonale Nieren-Zelllinie, Derivat von 293T (ATCC CRL-11268™) mit chromosomal integriertem Tett-Off System (Cejka *et al.*, 2003) mit hMLH1 cDNA, exogene hMLH1 Expression reprimiert durch Doxycyclin; Giancarlo Marra, Zürich.	DMEM, 10 % FCS (Tet system approved), 300 μg/ml Hygromycin, 100 μg/ml Zeocin, Unterdrückung der exogenen hMLH1 Expression durch Kultivierung in Anwesenheit von 50ng/ml Doxycyclin (mindestens 8 Tage).
KMV(HR-EGFP/3´EGFP) (Klon MHHR4)	Derivat der humanen, chronisch myeloischen Leukämie-Zelllinie K562 (ATCC® CCL-243), enthält das HR-EGFP/3`EGFP Konstrukt chromosomal integriert (Akyüz *et al.*, 2002).	RPMI 1640 phenolrotfrei, 12 % östradiolarmes FCS, 5 mM L-Glutamin.
KMV(Δ-EGFP/3´EGFP) (Klon MHΔ6)	Derivat der humanen, chronisch myeloischen Leukämie-Zelllinie K562 (ATCC® CCL-243), enthält das Δ-EGFP/3´EGFP Konstrukt chromosomal integriert (Akyüz *et al.*, 2002).	RPMI 1640 phenolrotfrei, 12 % östradiolarmes FCS, 5 mM L-Glutamin.
GM08436A	immortalisierte B-Lymphozyten, isoliert aus einem A-T-Patienten, heterozygote *ATM* Mutationen 4642delGATA und E1978X, Coriell Cell Repositories.	RPMI 1640, 15 % FCS, 2 mM L-Glutamin.
GM03403	immortalisierte B-Lymphozyten, isoliert aus einem Bloom-Syndrom Patienten, homozygote Deletions/Insertions Mutationen in *BLM* verursachen neue LSDR Codons nach der Aminosäure 736 und Translations-Stop; Giancarlo Marra, Zürich.	RPMI 1640, 15 % FCS, 2 mM L-Glutamin.

Fortsetzung Tabelle 1: Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	**Relevante Merkmale / Herkunft und Referenz**	**Kultivierung**
GM02253F	immortalisierte B-Lymphozyten, mutiert im *XPD* Gen, Coriell Cell Repositories.	RPMI 1640, 15 % FCS, 2 mM L-Glutamin.
HA187	immortalisierte B-Lymphozyten, isoliert aus einem A-T-Patienten, heterozygote *ATM* Mutationen E1978X und R250X, Thilo Doerk, Hannover.	RPMI 1640, 15 % FCS, 2 mM L-Glutamin.
HA126	immortalisierte B-Lymphozyten, isoliert aus einem A-T-Patienten, homozygote *ATM* Mutation Y171X, Thilo Doerk, Hannover.	RPMI 1640, 15 % FCS, 2 mM L-Glutamin.
GM08505 Gal13	SV40 immortalisierte Fibroblasten Zelllinie GM08505, isoliert aus Bloom-Syndrom Patient, *BLM* Defekt, enthält den pcDNA3 Vektor chromosomal integriert; Giancarlo Marra, Zürich.	α-MEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 350 μg/ml G418.
GM08505 Flg5	SV40 immortalisierte Fibroblasten Zelllinie GM08505, isoliert aus Bloom-Syndrom Patient, *BLM* Defekt, BLM Expression rekonstituiert durch chromosomal integrierte *BLM* cDNA in pcDNA3; Giancarlo Marra, Zürich.	α-MEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 350 μg/ml G418.
EUFA30-F	Haut-Fibroblasten, isoliert aus dem F-A J Patienten AG565, BACH1 negativ, Hans Joenje, Amsterdam.	DMEM, 15 % FCS.

Tabelle 2: Bakterienstämme

Stamm	Relevante Merkmale	Herkunft / Referenz
E. coli DH 5α	*F'mcrAΔ-(mrr hsdRMS-mcrBC), φ80dlacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araΔ139, Δ(ara,leu)7697, galU, galK, λ-, rspL, endA1, nupG*	New England Biolab, Frankfurt/M, Hanahan, 1983
E. coli XL 10 Gold	*Tet^{r}Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^{q}ZΔM15Tn10 (Tet^R) Amy Cam^r]^a*	Stratagene, Kalifornien, USA

2.2 Plasmide und Oligoribonukleotide

2.2.1 Plasmide

Alle verwendeten und selbst hergestellten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die verwendeten shRNA Vektoren sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 3: Plasmide

Plasmid	Merkmale	Herkunft / Referenz
pBlueScriptII KS$^{(+/-)}$ (pBS)	Plasmidderivat von pBR322 mit multipler Klonierungsstelle.	Stratagene, Heidelberg
pCMV-I-*Sce*I	Vektor zur Expression von I-*Sce*I in Säugerzellenunter der Kontrolle des CMV-Promotors.	Dr. Maria Jasin Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA, Rouet *et al*., 1994
p5bPuroCMV-wtEGFP (wtEGFP)	Positivkontrolle zu Rekombinationsvektoren zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wt*EGFP*-Expression in Säugerzellen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors.	Akyüz *et al.* 2002
p5bPuroCMV-EJ (EJ-EGFP)	NHEJ-Substrat	Akyüz *et al.* 2002

Fortsetzung Tabelle 3: Plasmide

Plasmid	**Merkmale**	**Herkunft / Referenz**
p5xtrshSV40Hygb PuroCMV-Δ (Δ-EGFP/3´EGFP)	Plasmidsubstrat für konservative und nichtkonservative homologe Rekombination, limitierende Homologielänge.	Akyüz *et al.* 2002
p5xtrshSV40Hygb PuroCMV-HR (HR-EGFP/3´EGFP)	Plasmidsubstrat für konservative und nichtkonservative homologe Rekombination, ausreichende Homologielänge.	Akyüz *et al.* 2002
p5xEsHygb PuroCMV-Δ (Δ-EGFP/5´EGFP)	Plasmidsubstrat für konservative homologe Rekombination, limitierende Homologielänge.	Akyüz *et al.* 2002
p5xEsCMVHygb PuroCMV-HR (HR-EGFP/5´EGFP)	Plasmidsubstrat für konservative homologe Rekombination, ausreichende Homologielänge.	Akyüz *et al.* 2002
p5bPuroCMV-N´-CMV-Red-HR (5´EGFP/HR-EGFP)	Plasmidsubstrat für nichtkonservative homologe Rekombination, ausreichende Homologielänge.	Hinsch, 2000
pMVGalERVP	östradiol-induzierbares Expression-System, Hybridprotein aus der GalER DNA-Bindedomäne des Gal-4 Proteins der Hefe und der Hormonbindedomäne des Menschen.	Braselmann *et al*., 1993
pGC	Expressionsvektor für Säugerzellen. Der Vektor basiert auf pSP65 und erlaubt die Expression eines klonierten Gens unter der Kontrolle des Gal4-Promotors.	Braselmann *et al*., 1993
pGCwtMSH2	Expressionsvektor für Säugerzellen. Der Vektor basiert auf pGC und erlaubt die Expression von Wildtyp-MSH2, unter der Kontrolle des Gal4-Promotors.	Marion Kurth, Lisa Wiesmüller, Hamburg

Fortsetzung Tabelle 3: Plasmide

Plasmid	**Merkmale**	**Herkunft / Referenz**
pGCmutMSH2	Expressionsvektor für Säugerzellen. Der Vektor basiert auf pGC und erlaubt die Expression von mutMSH2, unter der Kontrolle des Gal4-Promotors. Vektor zur Expression von mutiertem MSH2 Protein mit defekter ATP-Bindestelle (K675A), Durch *in vitro* Mutagenese wurde das Basentriplett hier AAA an Position 675 durch das Basentriplett GCC ersetzt.	Marion Kurth, Lisa Wiesmüller, Hamburg
pcDNA3	Leervektor, zur Protein-Expression in Säugerzellen ausgehend von cDNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
pcDNA3wtMSH2	*hMSH2* DNA Fragment aus pGC-wtMSH2, *Xba*I *Sal*I Verdau, Vektor zur Expression von wtMSH2 unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	In dieser Arbeit generiert.
pcDNA3mutMSH2	cDNA mut*MSH2* Fragment aus pGC-mutMSH2, *Xba*I *Sal*I Verdau, Vektor zur Expression von mutiertem MSH2 Protein mit defekter ATP-Bindestelle (K675A), unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Durch *in vitro* Mutagenese wurde das Basentriplett hier AAA an Position 675 durch das Basentriplett GCC ersetzt.	In dieser Arbeit generiert.
pcDNA3.1Puro	Leervektor zur Proteinexpression in Säugerzellen unter der Kontrolle des CMV-Promotors, mit Puromycinresistenzgen-Kassette.	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
pcDNA3.1Rad51SM	Überexpression von dominant negativem Rad51-Fusionsprotein mit Anteilen aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Mus musculus*.	(Lambert und Lopez, 2000)

Tabelle 4: shRNA Vektoren

Plasmid-Name	**shRNA Kassette (5´ → 3 ´)**	**Ursprung**	**Beschreibung**
pRSControl	Negativkontrollplasmid / Leervektor	Origene, Rockville, MD, USA	Plasmid ohne shRNA Kassette, dient als Kontrolle zu pRS-shRNA-Plasmiden.
pRSMLH1F pRSMLH1H	AGATCCAAGACAATGGCACCG GACTGCCTATCTTCATTCTTC	Origene, Rockville, MD, USA	2 Plasmide mit 21-mer shRNA Kassetten, Knockdown von hMLH1.
pRSMSH2 5 pRSMSH2 8	CAGGATGCCATTGTTAAAGAAATTGTCAA AGGCATGCTTGTGTTGAAGTTCAAGATGA	Origene, Rockville, MD, USA	2 Plasmide mit 29-mer shRNA Kassetten, Knockdown von hMSH2
pRSMSH3 2 pRSMSH3 4	GATTCTTGGTCAGTGAGGATGAAAGCAAA TGATGCTGTATCGGAAGTTCTCCATTCAG	Origene, Rockville, MD, USA	2 Plasmide mit 29-mer shRNA Kassetten, Knockdown von hMSH3
pRSMSH6 4 pRSMSH6 6	TGTCCTGTTCTCTTCAGGAAGGTCTGATA ATCAGATTCTGAGAGTGACATTGGTGGCT	Origene, Rockville, MD, USA	2 Plasmide mit 29-mer shRNA Kassetten, Knockdown von MSH6
pSuper	Negativkontrollplasmid / Leervektor	(Brummelkamp *et al.*, 2002)	Plasmid ohne shRNA Kassette, dient als Kontrolle zu pSuper-shRNA-Plasmid
pSuper-Rad52	Genaue Sequenz nicht bekannt.	(Brummelkamp *et al.*, 2002)	Plasmid mit shRNA Kassette, Rad52 Knockdown
pSHAG	Negativkontrollplasmid / Leervektor	(Collis *et al.*, 2003)	Plasmid ohne shRNA Kassette, dient als Kontrolle zu pSHAG-shRNA-Plasmid
pSHAG-ATM	Genaue Sequenz nicht bekannt.	(Collis *et al.*, 2003)	Plasmid mit shRNA Kassette, ATM Knockdown
pSHAG-ATR	Genaue Sequenz nicht bekannt.	(Collis *et al.*, 2003)	Plasmid mit shRNA Kassette, ATR Knockdown

2.2.2 Oligoribonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNA Oligonukleotide (Design, Synthese, HPP Reinigung, Qiagen, Hilden) sind in Tabelle 5 aufgeführt. Je Target DNA Sequenz wurden wurden ein Sense und ein Antisense RNA Oligonukleotid synthetisiert. Die RNA Moleküle wurden nach den Angaben des Herstellers hybridisiert. Die so entstandenen siRNA-Duplexe wurden bei den Transfektion eingesetzt.

Tabelle 5: Oligoribonukleotide

Name	**Target DNA Sequenz (5´ → 3´)**	**Beschreibung**
control	AATTCTCCGAACGTGTCACGT	Negativ Kontrolle
Allstar siRNA	-	Negativ Kontrolle
ATM 12 validated	-	Sequenz gegen mRNA von ATM gerichtet.
ATM 5 validated	-	Sequenz gegen mRNA von ATM gerichtet.
ATR 11 validated	-	Sequenz gegen mRNA von ATR gerichtet.
ATR 12 validated	-	Sequenz gegen mRNA von ATR gerichtet.
BACH1-1	AAGTACAGTACCCCACCTTAT	Sequenz gegen mRNA von BACH1 gerichtet. Sequenzinformation von S. Cantor, Worcester, USA.
BACH1-2	AAAGCTTACCGTCACAGCTT	Sequenz gegen mRNA von BACH1 gerichtet. Sequenzinformation von S. Cantor, Worcester, USA.
BLM 1	CCGAATCTCAATGTACATAGA	Sequenz gegen mRNA von BLM gerichtet
BLM 2	CTGACCATCTGTGACTATAAA	Sequenz gegen mRNA von BLM gerichtet.

Fortsetzung Tabelle 5: Oligoribonukleotide

Name	**Target DNA Sequenz (5´ → 3´)** **Sense Strang siRNA (S:)** **Antisense Strang siRNA (AS:)**	**Beschreibung**
ERCC1-1	CACCGTGAAGTCAGTCAACAA	Sequenz gegen mRNA von ERCC1 gerichtet
ERCC1-2	CCCGGGTGACTGAATGTCTGA	Sequenz gegen mRNA von ERCC1 gerichtet.
PMS1-1	CAGCGAATGGTTTCAAGATAA	Sequenz gegen mRNA von PMS1 gerichtet.
PMS1-2	TTGGAACGATACAATAGTCAA	Sequenz gegen mRNA von PMS1 gerichtet.
PMS2-1	CCGGATGTAAATTTCGAGTTT	Sequenz gegen mRNA von PMS2 gerichtet.
PMS2-2	CAGACTCGTGAATGAGGTCTA	Sequenz gegen mRNA von PMS2 gerichtet.
MLH1-1	GTGGCTCATGTTACTATTACA	Sequenz gegen mRNA von MLH1 gerichtet.
MLH1-2	CCGATACAAAGTGTTGTATCA	Sequenz gegen mRNA von MLH1 gerichtet.
MSH2-1	CCCATGGGCTATCAACTTAAT	Sequenz gegen mRNA von MSH2 gerichtet.
MSH2-2	TCCAGGCATGCTTGTGTTGAA	Sequenz gegen mRNA von MSH2 gerichtet.
MSH6-1	CCGAAGTTGTAGAGCTTCTAA	Sequenz gegen mRNA von MSH6 gerichtet.
MSH6-2	ATCGCCATTGTTCGAGATTTA	Sequenz gegen mRNA von MSH6 gerichtet.
MSH3-1	CAGCAAGGAGTTATGGATTAA	Sequenz gegen mRNA von MSH3 gerichtet.
MSH3-2	CCGCTAGAATTACAATACATA	Sequenz gegen mRNA von MSH3 gerichtet

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

Immunodetektion der per Western Transfer geblotteten Proteine erfolgte mit Hilfe der in Tabelle 6 aufgelisteten Primärantikörper.

Tabelle 6: Primärantikörper

Name	Beschreibung	Herkunft
Anti-Aktin	Polyklonaler Ziege-Antikörper, Klon I19, bindet Epitop am C-Terminus von humanem Aktin	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-ATM	Monoklonaler Maus-Antikörper, detektiert ATM, Klon 5C2	GeneTex, San Antonio, USA
Anti-ATR	Polyklonales Kaninchen-Serum, gerichtet gegen humanes ATR zwischen den As 400 – 460, ab2905	Abcam, Cambridge, USA
Anti-ERCC1	Monoklonaler Maus-Antikörper, zur Detektion von ERCC1, Klon 8F1	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-GAPDH	Monoklonaler Maus-Antikörper, bindet die humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Klon 9484	Abcam, Cambridge, USA
Anti-HA-tag	Monoklonaler Ratten-Antikörper, bindet den HA-tag, Klon 3F10, Peroxidase konjugiert .	Roche, Mannheim
Anti-MLH1	Monoklonaler Maus-Antikörper, erkennt humanes MLH1, Klon G168-15	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-MRE11	Polyklonales Kaninchen-Serum, bindet humanes MRE11	Novus Biologicals, USA
Anti-MSH2	Polyklonales Kaninchen-Serum, bindet humanes MSH2 am N-Terminus, N-20	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-NBS1	Monoklonaler Maus-Antikörper, detektiert humanes Nibrin, Epitop nahe des C-Terminus, Klon Y112	Epitomics, Burlingame, USA

Fortsetzung Tabelle 6: Primärantikörper

Name	**Beschreibung**	**Herkunft**
Anti-PMS1	Polyklonales Kaninchen-Serum, bindet humanes PMS1 am C-Terminus, C-20	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-PMS2	Monoklonaler Maus-Antikörper, detektiert humanes PMS2 C-terminal, Klon A16-4	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Rad50	Monoklonaler Maus-Antikörper, gerichtet gegen Rad50 von As 672 - 786, Klon 13	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Rad51	Monoklonaler Maus-Antikörper, bindet humanes Rad51, Klon 51RAD01	Neomarkers, Fremont, USA
Anti-α-Tubulin	Monoklonaler Maus-Antikörper, welcher das humane α-Tubulin am Epitop zw. den As 426 und 450 detektiert, Klon DM1A	Abcam, Cambridge, USA

2.3.2 Sekundärantikörper

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Name / Beschreibung	Herkunft
Ziege-anti-Maus, konjugiert mit Peroxidase (Affinitätsgereinigt)	Pierce/Perbio, Rockford, USA
Ziege-anti-Kaninchen, konjugiert mit Peroxidase (Affinitätsgereinigt)	Pierce/Perbio, Rockford, USA

2.4 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

2.4.1 Zellanzucht

2.4.1.1 Nährmedien

In dieser Arbeit wurden Derivate von *E. coli* zur Amplifikation der Plasmide verwendet.

Die *E. coli* Kulturen wurden in LB-Medium (vgl. Tabelle 8), SOB-Medium (
Tabelle 9) oder SOC-Medium (siehe Tabelle 10) herangezogen. Für feste Medien erfolgte die Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar. Nach anschließender Autoklavierung (20 min bei 121°C) wurden die keimfreien (sterilen) Medien zur Anzucht von Reinkulturen verwendet. Sofern nötig, wurden Antibiotika zur Selektion der Anzucht dem Kultiviermedium nach Autoklavierung zugesetzt, siehe Tabelle 11.

Tabelle 8: LB-Medium (Luria-Bertani, SAMBROOK et al., 2001)

Bestandteile	Zugabe [g]
Trypton	10
NaCl	10
Hefeextrakt	5
H_2O	ad 1000 ml

Tabelle 9: SOB-Medium

Bestandteile	Zugabe [g]
Trypton	20
Hefeextrakt	5
NaCl	0,5
KCl (250 mM)	10 ml
H_2O	950 ml

Nach Einstellung des pH-Wertes mit 5N NaOH auf den Wert 7 wurde das Mediumvolumen auf 1000 ml aufgefüllt und die Lösung im Anschluss autoklaviert. Direkt vor Gebrauch wurden 5 ml 2 M $MgCl_2$-Lösung steril hinzugegeben.

Tabelle 10: SOC-Medium

Bestandteile	Zugabe [ml]
SOB-Medium	1000
Glucose (1 M)	20

Die 1 M Glucosestammlösung wurde vor Zugabe sterilfiltriert.

Tabelle 11: Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Arbeitskonzentration [µg/ml Medium]
Ampicillin	100 (H_2O)	100
Kanamycin	100 (H_2O)	100

2.4.1.2 Anzuchtbedingungen

Für die Isolierung eines reinen Plasmids mussten die *E. coli* Kulturen aus der Stammsammlung angezogen und mittels eines sterilen Zahnstochers auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum zu Selektion ausgestrichen werden. Nach Wachstum über Nacht konnten am nächsten Tag Einzelkolonien zum Animpfen eines Flüssigmediums entnommen werden. Die Bakterienzellen auf der Agarplatte waren bei 4 °C bis zu 4 Wochen haltbar.
Die Bakterienzellen wurden unter aeroben Bedingungen kultiviert. Es wurden Reagenzgläser oder Erlenmeyerkolben verwendet und bei 37 °C und 160 – 200 Upm auf einem Rotationsschüttler inkubiert.

2.4.1.3 Trübungsmessung

Anhand der Zunahme der optischen Dichte (OD) einer Bakterienkultur konnte mittels eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 600 nm der Wachstumsverlauf der Kultur verfolgt werden. Die Messung erfolgte in einer 1 ml Glasküvette mit 1 cm Schichtdicke. Als Referenzwert diente unbeimpftes Medium. Es wurde darauf geachtet, dass die Absorptionswerte nicht über 0,3 lagen, da sonst die Linearität zwischen optischer Dichte und Zellzahl nicht mehr gesichert war. Bei Überschreitung dieses Wertes wurde die Probe nach weiterer Verdünnung mit unbeimpftem Medium wiederholt.

2.4.1.4 Stammhaltung

Sofern ein neuer Stamm hergestellt wurde, sollte dieser in einer Stammsammlung hinterlegt werden. Hierfür wurde *E. coli* in LB-Medium, jeweils mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht herangezogen, mit 10 % DMSO (v/v) versetzt, und bei –80 °C gelagert.

2.4.1.5 Transformation von *E.coli* nach der SEM-Methode (Simple and Efficient Method (Inoue *et al.*, 1990) modifiziert)

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurden diese zunächst in einer Vorkultur gezogen. Aus dieser Vorkultur wurde 250 ml SOB-Medium beimpft und bei 18 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min auf Eis gestellt und bei 4000 Upm, 10 min und 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis gestellt und anschließend erneut zentrifugiert (4000 Upm, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden in 20 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen, der Suspension wurde tropfenweise DMSO zugesetzt, bis eine Endkonzentration von 7 % (v/v) erreicht wurde. Nach weiteren 10 min auf Eis wurden 100 µl Aliquots der Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so gewonnenen Zellen waren bei –80 °C mehrere Monate haltbar. Zur Durchführung einer Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 5-10 µl Ligationsansatz oder 500 ng Plasmid versetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min auf Eis, anschließend ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C und eine erneute Inkubation auf Eis für 10 min. Den Zellen (100 µl) wurden dann 1 ml LB-Medium zugegeben. Der ganze Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C geschüttelt und dann auf Selektivmedium ausplattiert.

TB-Puffer

Pipes	10 mM
$CaCl_2 * 2\ H_2O$	15 mM
KCl	250 mM
$MnCl_2$	55 mM

pH 6,7 mit KOH eingestellt,
sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert

2.4.2 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.4.2.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden autoklaviert, hitzeempfindliche Geräte wurden mit 70 % Ethanol gespült, Lösungen die nicht autoklavierbar waren, wurden sterilfiltriert. Durch die Behandlung der Geräte und Lösungen sollten die ubiquitär vorkommenden Nukleasen inaktiviert werden.
Geräte und Reagenzien, die mit RNA in Berührung kommen sollten, wurden zweimal autoklaviert. Benötigte Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem H_2O angesetzt und separat aufbewahrt. Bei allen Arbeitsschritten wurden Einweghandschuhe getragen, um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden. Alle hitzelabilen Geräte und die Arbeitsfläche wurden mit 0,5 % (w/v) SDS und 0,1 M NaOH gereinigt und anschließend mit DEPC behandeltem autoklaviertem H_2O gespült. Lösungen, welche RNA enthielten, wurden bei –80 °C aufbewahrt, auf Eis aufgetaut und nach Gebrauch sofort wieder eingefroren.

2.4.2.2 Reinigung und Konzentrierung von DNA

2.4.2.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Proteine und DNA wurden mittels Phenol-Chloroform-Extraktion voneinander getrennt. Zunächst wurde das Volumen der zu reinigenden Probe auf 200 µl erhöht, dann erfolgte die Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1 (v/v/v)), Sambrook et al., 2001). Durch kräftiges Mischen der beiden Phasen wurden die Proteine denaturiert. Bei der anschließenden Zentrifugation (13000 Upm, 5 min, Raumtemperatur) trennten sich beide Phasen wieder. Die obere wässrige DNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (24:1 (v/v)) versetzt. Durch erneutes kräftiges Mischen wurden die Phenolreste extrahiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation (13000 Upm, 5min, RT). Wieder wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues Gefäß überführt. Um die DNA in der Lösung zu konzentrieren, folgte eine Ethanolfällung.

2.4.2.2.2 Ethanolfällung

Bei der Ethanolfällung wurde der DNA-haltigen Lösung 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) zugegeben, Endkonzentration 0,3 M Na-Acetat. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 Volumen 96 %igem, unvergälltem Ethanol (v/v). Nach vorsichtigem Mischen und 20 min Inkubation bei Raumtemperatur fällt die enthaltene DNA aus. Die gefällte DNA wurde dann bei 15000 Upm und RT für 20 min zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde mit 500 – 1000 µl 70 % Ethanol (v/v) gespült und anschließend bei 37 °C im Brutschrank getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in TE-Puffer gelöst.

TE-Puffer

Tris-HCL (pH 8,0)	10 mM
EDTA	1 mM
H_2O	ad 200 ml

2.4.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung konnte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt werden. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1,0 folgenden Nukleinsäurekonzentrationen (Sambrook et al., 2001):

doppelsträngige DNA	50 µg / ml
doppelsträngige RNA	40 µg / ml

Der Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung konnte über den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 (Sambrook et al., 2001), kann die Lösung als rein angesehen werden, es liegen also keine Verunreinigungen durch Phenol oder Proteine vor.

2.4.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente konnten zur analytischen und präparativen Auftrennung einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen werden. Es wurden unterschiedliche

Agarosekonzentrationen (0,8 % bis 2 %) eingesetzt, in Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden Fragmente.
Die entsprechende Menge Agarose wurde in 0,5x TBE- oder 1x TAE-Puffer eingewogen, aufgekocht und gelöst. Bei einer Temperatur von ca. 60 °C konnte ein Gel gegossen werden. Nach Verfestigung des Gels wurde es mit Puffer überschichtet.
Die DNA-Proben wurden vor Gelauftrag in einem 0,2x Volumen 5x Probenauftragspuffer aufgenommen. Dies erhöhte die Dichte der Proben, wodurch sie in die Geltaschen absanken.
Die Elektrophorese wurde in Abhängigkeit von der Gelgröße und Geldicke bei einer konstanten Spannung von 100 V für 1 – 2 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren im Gel durch ein Ethidiumbromid-Färbebad (1 µg/ml, 10 - 25 min) angefärbt. Überschüssiges Ethidiumbromid konnte in einem Wasserbad wieder entfernt werden. Das mit den Nukleinsäuren interkalierte Ethidiumbromid, konnte nun mit einem UV-Transilluminator durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Mittels einer Videodokumentationsanlage konnte das Gelbild digitalisiert und ausgedruckt werden.

50x TAE-Stammlösung (Sambrook *et al*., 2001)

Tris-Base	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
H_2O	ad 1000 ml
pH 7,5	

10x TBE-Stammlösung (Sambrook *et al*., 2001)

Tris-Base	121,1 g
Borsäure	51,35 g
EDTA	3,72 g
H_2O	ad 1000 ml
pH 8,0	

5x Probenauftragspuffer (Sambrook *et al*., 2001)

Ficoll 400	15 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)
H_2O	ad 50 ml

2.4.2.5 Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Größe von DNA-Fragmenten zu bestimmen, wurde auf jedes nicht denaturierende Agarosegel der Größenstandard GeneRuler DNA Ladder Mix von MBI Fermentas, St. Leon-Rot, aufgetragen. Durch den Vergleich mit Banden definierter Länge konnte die Länge der Fragmente in der jeweiligen DNA-Probe ermittelt werden.

2.4.2.6 Isolierung von Nukleinsäuren

2.4.2.6.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Für Mini-Plasmidpräparationen wurden 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum mit je einer transformierten Bakterienkolonie angeimpft und auf einem Schüttler bei 37 °C und 180 Upm über Nacht inkubiert. 1,5 ml dieser Kultur wurden in einem Reaktionsgefäß bei 14000 Upm (Eppendorf-Tischzentrifuge) für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zur Isolierung der Plasmid-DNA mit dem *QIAmp-Mini-DNA-Kit* nach Anleitung des Herstellers (Qiagen, Hilden) bearbeitet.
Die in TE-Puffer aufgenommene Plasmid-DNA wurde durch Restriktion und analytische Agarosegelelektrophorese charakterisiert.

2.4.2.6.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Für eine Maxi-Plasmidpräparation wurde eine Kultur in 300 ml Medium über Nacht in einem 2 l Erlenmeyer-Kolben bei 37°C und 180 Upm herangezogen. Die Bakterien wurden bei 5000 Upm für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus der Kultur erfolgte mit Hilfe eines Marligen (Ijamsville, USA) Plasmid-Maxi-Kits, nach Angaben des Herstellers. Die Qualität des erhaltenen Plasmids wurde mittels eines Restrikionsverdaus und anschließender Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.4.2.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel nach präparativen Restriktionsenzymspaltungen, erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits, nach Anweisung des Herstellers (Qiagen, Hilden). Nach der Auftrennung der DNA Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese, wurde das gewünschte Fragment aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstückchen wurde gewogen und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction aus der Agarosegelmatrix isoliert.

2.4.2.7 Enzymatische Modifikation von DNA

2.4.2.7.1 Restriktionsspaltung von DNA

Mit Restriktionsendonukleasen kann DNA sequenzspezifisch gespalten werden. Der Restriktionsverdau erfolgte in einem Volumen von 10 µl oder mehr. Pro µg DNA wurden 2 –10 Units des entsprechenden Enzyms eingesetzt, wobei 1 U als die Enzymmenge definiert ist, die benötigt wird, um 1 µg λ-DNA bei 37 °C in 1 h vollständig zu spalten. Das Volumen des Ansatzes wurde so gewählt, dass der eingesetzte Enzymanteil nicht mehr als 1/10 Volumen des Gesamtvolumens betrug, da sonst das in den Lagerungspuffern der Enzyme vorhandene Glycerin zur Hemmung oder unspezifischem Schneiden der Restriktionsendonukleasen führt (Fuchs und Blakesley, 1983). Die Spaltung erfolgte im vom Hersteller empfohlenen Puffersystem bei empfohlener Temperatur für 1 – 15 h. Falls 2 Enzyme verwendet werden sollten, wurde ein für beide Enzyme optimales Puffersystem gewählt. War dies nicht möglich, wurde zunächst mit einem Enzym gearbeitet und die DNA anschließend einer Ethanolfällung unterzogen. Nun war es möglich das Puffersystem zu wechseln und so den zweiten Verdau durchzuführen. Der Restriktionsverdau wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Restriktionsendonukleasen konnten durch Hitzeeinwirkung (65 °C, 20 min) inaktiviert oder durch Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanolfällung entfernt werden.

2.4.2.7.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation erfolgte in 10 µl Ansätzen. Da die Vektoren meist mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten waren, wurde ein Konzentrationsverhältnis von Vektor zu Insert von 1 : 2 angestrebt. Den Ansätzen wurde 1 – 2 U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und 0,1 Volumen 10x

Ligasepuffer zugegeben und mit H_2O auf das Endvolumen aufgefüllt. Es folgte eine Inkubationszeit von 1 h bei RT. Anschließend wurden sie in einem Wasserbad von 25 °C auf 4 °C im Kühlschrank abgekühlt. Die Ansätze wurden bis zur Transformation bei –20 °C gelagert.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

2.5.1.1 Herstellung eines Totalhomogenates

Hierfür wurden 1 x 10^6 bis 1 x 10^7 Zellen 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet so mit 3x SDS Probenpuffer versetzt, dass eine Zellkonzentration von 0,5 – 1 x 10^4 Zellen/µl SDS-Probenpuffer, erreicht wurde. Die Proben wurden 15 min auf 95°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

3x SDS-Probenpuffer

175 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
20 %	Glyzerin
5 %	SDS
4,6 %	DTT
0,05 %	Bromphenolblau
5 %	β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)

2.5.1.2 Herstellung eines Zelllysates

Hierfür wurden 1 x 10^6 bis 1 x 10^7 Zellen 5 min bei 250 x g zentrifugiert, mit kaltem PBS gewaschen erneut bei 250xg für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit der 2-3-fachen Volumenmenge Lysispuffer versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10000 x g, 15 min, 4°C), um unlösliche Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen, die Proteinkonzentration bestimmt. Die löslichen Proteinfraktionen wurden mit Lysispuffer auf die gleichen Konzentrationen eingestellt und 6x SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:6 dazugegeben. Die Proben wurden 15 min auf 95°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

Lysispuffer

50 mM	Tris (pH 7,4)
150 mM	NaCl
2 mM	EGTA
2 mM	EDTA
25 mM	NaF
25 mM	β-Glycerophosphat
0,1mM	NaV
0,2 %	TritonX-100
0,3 %	NP-40
1	Proteaseinhibitorcocktailtablette pro 10 ml (frisch zugesetzt)

6x SDS-Probenpuffer

350 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
36 %	Glyzerin
10 %	SDS
9,3 %	DTT
0,05 %	Bromphenolblau
5 %	β-Mercaptoethanol (frisch zugesetzt)

2.5.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts in Zelllysaten (siehe 2.4.1) wurde mit dem „BCA™ Protein Assay“ (Pierce/Perbio, Rockford, USA) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die photometrische Messung des gebildeten Farbstoffs wurde mit dem Mikrotiterplatten-Photometer MRX (Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) bei 570 nm durchgeführt.

2.5.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Hierfür wurde das Gelsystem von Pharmacia eingesetzt (Gelgröße: 8 x 10 x 0,075 cm). Aufgrund der vollständigen Denaturierung der Proteine und der Ummantelung mit SDS-Molekülen können diese in einem

elektrischen Feld gemäß Masse getrennt werden. Die Pipettierschemata der SDS-Polyacrylamid-Gele sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Pipettierschema für SDS-PAGE Gele

Proteingröße	60-200 kDa Trenngel 8 %ig	16-70 kDa Trenngel 10 %ig	16-70 kDa Trenngel 12 %ig	12-45 kDa Trenngel 15 %ig	Sammelgel
Acrylamid 30 %; 0,8 % bisAcrylamid	12 ml	15 ml	18 ml	22,5 ml	3,9 ml
4x SDS/Tris pH 8,8	11,25 ml	11,25 ml	11,25 ml	11,25 ml	-
4x SDS/Tris pH 6,8	-	-	-	-	7,5 ml
H_2O	21,75 ml	18,75 ml	15,75 ml	11,25 ml	18,3 ml
10 % APS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Mit Ausnahme von APS und TEMED, wurden alle Trenngel Lösungen in ein Becherglas überführt und 5 min entgast (optional). Um die Polymerisierung zu induzieren wurden zeitgleich APS und TEMED zugefügt. Die Lösung wurde zügig in die Gießkammer (Hoefer Pharmacia Biotech, Freiburg) überführt und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde Isopropanol dekantiert, und auf das Trenngel ein Sammelgel gegossen und die Kämme (0,1 cm) eingesteckt.

Zur Größenbestimmung der Proteine wurden die Molekulargewichtstandards HiMark™ Pre-Stained High Molecular Weight Protein Standard von Invitrogen Gibco, Karlsruhe, PageRuler™ Plus Pre-Stained Protein Ladder und PageRuler™ Pre-Stained Protein Ladder, beide von MBI Fermentas, St. Leon-Rot, verwendet.
Vor der Gelelektrophorese wurden die Proteinproben für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte in SDS-PAGE-Laufpuffer im elektrischen Feld bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel. Nach der Elektrophorese erfolgte die Darstellung der Proteine durch eine Western-Blot Analyse.

SDS-PAGE-Laufpuffer

250 mM	Tris/HCl
1,9 M	Glycin
1 %	SDS

4x SDS-Sammelgelpuffer

0,5 M	Tris/HCl
0,4 %	SDS
pH 6,8	

4x SDS-Trenngelpuffer

1,5 M	Tris/HCl
0,4 %	SDS
pH 8,8	

2.5.1.5 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot) (Towbin *et al.*, 1992)

Nach der SDS-Gelelektrophorese (2.1.4.1.4) erfolgte der Transfer der Proteine auf PVDF (Immobilon™-P, Millipore, Eschborn) oder Nitrocellulose Membranen (Hybond™ Extra, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mittels einer Hoefer-Naßblotapparatur.
Nitrocellulose Membranen wurden in Western-Blot-Puffer äquilibriert. PVDF Membranen mussten vor dem Proteintransfer zur Benetzung in Methanol geschwenkt werden. Anschließend wurde 2 mal mit ddH_2O gewaschen und abschließend in Western-Blot-Puffer äquilibriert.
Der Transfer erfolgte entweder für 90 min bei 100V, auf Eis. Ab einer Proteingröße von ca. 250 kDa, erfolgte der Transfer für 10 h bei 30V im Kühlraum, je nach Größe der zu untersuchenden Proteine.
Um den erfolgreichen Proteintransfer zu überprüfen, konnten Proteine auf den Membranen mit Ponceau-Rot-Lösung (Ponceau S solution, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) angefärbt werden.

10x Western-Blot-Puffer

60g	Tris-Base;
30 g	Glycin auf
ad	1000ml ddH_2O

2.5.1.6 Immundetektion der Proteine im Western-Blot mit Chemilumineszenzreaktion

Zur Immunodetektion transferierter Proteine mussten zunächst unspezifische Bindungsstellen der Membranen mit PBS-T-Puffer und 5 % Milchpulver 45 min bei RT abgesättigt werden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper in PBS-T-Puffer versetzt mit 5 % Milchpulver für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Der Primärantikörper erkennt spezifisch ein auf der Membran immobilisiertes Protein. Überschüssige, ungebundene Primärantikörper wurden durch drei je fünfminütige Waschschritte mit PBS-T-Puffer entfernt.

Zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers wurde die Membran eine Stunde mit einem von der Art des Primärantikörpers abhängigen Sekundärantikörper-Peroxidase (HRP)-Konjugat (Pierce/Perbio, Rockford, USA), 1:10000 verdünnter anti-Maus-HRP oder anti-Kaninchen-HRP in PBS-T-Puffer mit 5 % Milchpulver, inkubiert und wie nach Inkubation mit dem Primärantikörper gewaschen.

Gebundene HRP-Sekundärantikörper wurden mit dem SuperSignal® West Pico oder SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Pierce/Perbio, Rockford, USA) nach Anweisung des Herstellers in Form von Chemilumineszenzsignalen, wobei diese nach Entwickeln der im Dunkeln auf die Membran gelegten Röntgenfilme (Hyperfilm, Amersham, Buckinghamshire, England) als Schwärzungen erkennbar wurden. Die densitometrische Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte durch den ChemImager 5500, Software Alpha der Firma Imunotech Corporation, San Leonardo, Kalifornien, USA. Die so ermittelte relative Proteinexpression wurde gegen die jeweilige Auftragskontrolle (Aktin, Tubulin, GAPDH) normalisiert.

Membranen mit den darauf gebundenen Proteinen konnten für mehrere Immundetektionen verwendet werden. Hierzu mussten bereits gebundene Antikörper-Komplexen wieder entfernt werden. Die Membran wurde für 5-30 min (abhängig von der Affinität des Antikörpers) in Western-Blot-*stripping*-Puffer (Pierce/Perbio, Rockford, USA) bei RT geschwenkt, anschließend zweimal 10 min in PBS-T-Puffer gewaschen. Die so behandelte Membran konnte dann für weitere Immundetektionen verwendet werden.

10x PBS (0.1 M PBS, pH 7.2)

10,9 g	Na_2HPO_4 (anhydrous)
3,2 g	NaH_2PO_4 (anhydrous)
90 g	NaCl
2 %	Tween 20

2.6 Zellkulturtechniken

2.6.1 Kultivierung von adhärenten Zellen

Die Kultivierung adhärenter Zelllinien erfolgte in Gewebekulturschalen der Fa. Nunc, Wiesbaden, bei 5 % CO_2 und 37°C. Zum Passagieren wurden die Zellen mit PBS gespült , anschließend 5 min bei 37°C mit Trypsin-EDTA- oder Accutase-Lösung (PAA Laboratories, Pasching) überschichtet. Nach Inkubation 0bei 37°C von der Kulturschale gelöst, wurden die Zellen durch Zugabe von Kulturmedium verdünnt und auf neue Gewebekulturschalen verteilt. Die für die jeweilige Zelllinie verwendeten Medien sind in Tabelle 1 angegeben. Die Lovo Klone wurden in phenolrotfreiem DMEM mit Zusatz von 10 % östradiolarmem FCS und 200 nM Östradiol kultiviert, da Phenolrot aufgrund der Strukturähnlichkeit mit Östradiol schwach an den GalERVP-Transkriptionsfaktors bindet und somit die Expression des rekonstituierten mut/wtMSH2 Proteins induziert, welches unter dessen Expressionskontrolle liegt. Durch Aktivkohlebehandlung des FCS wurde der Östradiolgehalt des Serums auf unter 10 % des Ausgangsgehaltes reduziert.

östradiolarmes FCS

10 g	Norit A (Aktivkohle)
1,2 g	Dextran 35
1 l	FCS

30 min rühren,
anschließend bei 19.000 x g abzentrifugieren,
Überstand sterilfiltrieren.

2.6.2 Kultivierung von Suspensionskulturzellen

KMV(HR-EGFP/3´EGFP) und KMV(∆-EGFP/3'EGFP) Zellen, welche in Suspensionskultur wachsen, wurden aufgrund der durch Östradiol induzierbaren

Aktivität des GalERVP-Transkriptionsfaktors ebenfalls in phenolrotfreiem RPMI Medium mit östradiolarmem FCS, gehalten (Akyüz *et al.*, 2002).
Alle lymphoblastoiden Zellen wurden in RPMI herangezogen.
Zur Vermehrung wurden Suspensionskulturzellen 1:6 mit Medium verdünnt, in neue Zellkulturschalen überführt (Sarstedt, Nümbrecht) und bei 5 % CO_2 und 37°C kultiviert.

2.6.3 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zur Lagerung der Zelllinien, wurden diese zunächst von den Zellkulturschalen gelöst (2.5.2.1), abzentrifugiert (400xg, 5 min, RT) und in 1,5 ml Einfriermedium (Cryomaxx S, PAA Laboratories, Pasching) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryotubes (Greiner, Frickenhausen) überführt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Die so konservierten Zellen konnten bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.
Sollten neue Zelllinien kultiviert werden, mussten diese zunächst aufgetaut werden. Hierbei wurde der Inhalt eines Kryotubes in 15 ml Medium aufgenommen und zentrifugiert (400xg, 3 min, RT), um die Zellen vom DMSO-haltigen Einfriermedium zu befreien. Die sedimentierten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und auf Gewebekulturschalen gegeben. Nach ca. 24 h wurde das Medium erneuert.

2.6.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienzen wurden eukaryotische Zellen mit dem Plasmid p5bPuroCMV-wtEGFP transfiziert. 12-96 h nach Transfektion wurde der prozentuale Anteil der grünfluoreszierenden Zellen entweder am inversen Immunfluoreszenz-Mikroskop oder am Durchflusszytometer bestimmt.

2.6.4.1 Transfektion durch Elektroporation

Hier werden die Zellen einem elektrischen Feld ausgesetzt. Durch diese Behandlung entstehen für Millisekunden kleine elektrisch neutrale Poren in der Zellmembran, durch welche die Passage von Molekülen wie DNA und RNA in die Zelle möglich wird. Die Elektroporation wurde wie bei (Baum *et al.*, 1994) beschrieben durchgeführt.
Für einen Elektroporationsansatz wurden 0,4 x 10^7 Zellen für 5 min bei 250xg zentrifugiert und in 400 µl Kulturmedium ohne FCS resuspendiert. In einer

Elektroporationsküvette wurden 10 - 30 µg DNA vorgelegt und die 400 µl Zellsuspension zugefügt. Der Ansatz wurde durch auf- und abpipettieren gut durchmischt.

Die Elektroporation erfolgte für die in dieser Arbeit verwendeten KMV(HR-EGFP/3´EGFP) und KMV(∆-EGFP/3´EGFP) Zellen, bei 200 Volt und 1050 µF, bei den lymphoblastioden Zellen wurde 240 V und 1050 µF gewählt. Die Zellen wurden nach der Elektroporation sofort in eine 6-well Schale mit 3 ml Erhaltungsmedium aufgenommen und 24 h im Brutschrank inkubiert. Elektroporierte Zellen und DNA-Mixe sind in Tabelle 13 aufgezeigt.

Tabelle 13: Zellen, welche durch Elektroporation transfiziert wurden.

Zellen	DNA- Mix	Gesamt-DNA-Menge pro Elektroporation
KMV(HR-EGFP/3´EGFP), KMV(∆-EGFP/3´EGFP)	5 µg pCMV-I-*Sce*I 5 µg pBS oder wtEGFP Bei Knockdown: 20 µg shRNA 5 µg pCMV-I-*Sce*I 5 µg pBS oder wtEGFP	10 µg 30 µg
GM08436A	15 µg shRNA 5 µg pCMV-I-*Sce*I 5 µg Reparatursubstrat 5 µg pBS oder wtEGFP	30 µg

Zur Analyse von hMSH2-defizenten KMV(∆-EGFP/3'EGFP) Zellen wurden diese zunächst mit jeweils 15 µg der shRNA Vektoren pRSMSH2 5 und pRSMSH2 8 elektroporiert, für 72h kultiviert und anschließend erneut transfiziert, mit 20 µg shRNA oder Expressionsplasmid, 5 µg pCMV-I-*Sce*I und 5 µg pBS oder wtEGFP. Die Analyse der Reparaturfrequenz erfolgte 24 h nach der zweiten Transfektion.

2.6.4.2 Transfektion durch Lipofektion

Bei der Lipofektion werden Nukleinsäuren mit Hilfe von Liposomen, welche mit der Zellmembran fusionieren in die Zelle eingebracht. In dieser Arbeit wurde das Prinzip der kationischen Lipidvesikel angewendet. Hierbei lagert sich die negativ geladene DNA an positiv geladene Liposomen.

Bei kommerziell erhältlichen Lipofektionsreagenzien wird die DNA in Form von Liposomen eingepackt und wahrscheinlich durch Endozytose in die Zellen aufgenommen.

2.6.4.2.1 Lipofektion mittels FuGENE

FuGENE HD und FuGENE 6 Transfektionsreagenzien (Roche, Mannheim) wurden zur effizienten Transfektion adhärent wachsender eukaryotischer Zellen verwendet. Hierfür wurden die Zellen 24 h vor Transfektion in 6-Well-Platten ausgesäht (Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion: 60 – 80 %, in 2 ml Medium ohne Antibiotika). Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers (Roche) in einem Verhältnis von 2:1 (FuGENE 6 und FuGENE HD zu DNA) durchgeführt.
Das raumtemperierte FuGENE 6 oder FuGENE HD wurde in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen (aus Polystyrol) in 100 µl vorgelegtes OptiMEM (Gibco, Karlsruhe) ohne FCS (oder andere Zusätze) pipettiert, gemischt und anschließend mit der in 50 µl ddH_2O verdünnten DNA gemischt. Es folgte eine Inkubation der Mischung von 30 min bei RT. Der Transfektionsmix (150 µl) wurde vorsichtig in das Medium der Zellen geträufelt und die Schale kurz vorsichtig geschwenkt und bis Versuchsende bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zellen welche mit FuGENE Reagenz transfiziert wurden sind inTabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Zellen, transfiziert mit FuGENE

Zellen	DNA- Mix	Gesamt-DNA-Menge pro Transfektion
293T-Tet-Off-hMLH1	0,66 µg pCMV-I-*Sce*I 0,66 µg Reparatursubstrat 0,66 µg pBS oder wtEGFP Bei Knockdown von ATM und oder ATR: 1,5 µg pSHAG-ATM plus 1,5 µg pSHAG-ATR oder 3 µg pSHAG control (Collis *et al.*, 2003). 0,5 µg pCMV-I-*Sce*I 0,5 µg Reparatursubstrat oder 0,5 µg pBS oder wtEGFP	2 µg 4 µg
HCT116 +/- chr3	0,66 µg pCMV-I-*Sce*I 0,66 µg Reparatursubstrat 0,66 µg pBS oder wtEGFP	2 µg
Lovo und Lovo Klone 6-8	0,66 µg pCMV-I-*Sce*I 0,66 µg Reparatursubstrat 0,66 µg pBS oder wtEGFP	2 µg

2.6.4.2.2 Lipofektion mittels HiPerFect

HiPerFect Transfektionsreagenz (Qiagen, Hilden) wurde ebenfalls zur effizienten Transfektion adhärent wachsender eukaryotischer Zellen verwendet. Wieder wurden die Zellen 24 h vor Transfektion in 6-Well-Platten ausgesäht (Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion: 60 – 80 %, 2 ml Medium ohne Antibiotika). Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Ein Transfektionsansatz bestand aus 2,5 µg DNA, 20 µl HiPerFect und 177,5 µl OptiMEM. Nach 15 min Inkubation wurde 200 µl Transfektionsmix vorsichtig in das Medium der Zellen geträufelt und die Schale vorsichtig geschwenkt und bis Versuchsende bei 37°C im Brutschrank inkubiert. HiPerFect Transfektionsreagenz wurde zur Transfektion von Lovo Zellen verwendet.

2.6.4.2.3 Lipofektion mittels XtremeGENE

XtremeGENE siRNA Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim) wurde für Kotransfektionen von RNA und DNA mit adhärent wachsenden Zellen verwendet. Die Zellen wurden 24 h vor Transfektion in 6-Well-Platten ausgesäht (Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion: 60 – 80 %, 2 ml Medium ohne Antibiotika).

Der Nukleinsäuren-Mix bestand aus:
1 µg DNA + 10 – 50 nM siRNA ad 100 µl OptiMEM.
Der XtremeGENE-Mix bestand aus:
6 µl XtremeGENE + 94 µl OptiMEM.

Der Nukleinsäuren-Mix und XtremeGENE-Mix musste sofort gemischt werden. Nach 20 min Inkubation bei RT wurden 200 µl pro 6-well auf die Zellen pipettiert, die Schale kurz vorsichtig geschwenkt und bis Versuchsende bei 37°C im Brutschrank inkubiert. XtremeGENE wurde bei den adhärent wachsenden Zelllinien 293T-Tet-Off-hMLH1 und Lovo angewandt.

2.6.4.3 Transfektion durch *Nucleofection* (Amaxa)

Bei dieser Transfektionsmethode handelt es sich um eine Mischung aus Elektroporation und Lipofektion. Die Zellen werden in speziellen Lösungen resuspendiert und anschließend einem elektrischen Feld ausgesetzt. Dadurch ist es möglich, selbst sehr schwer zu transfizierende Zellarten zu untersuchen.
Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers (Lonza, Köln).
Es wurden 0,5 x 10^6 Zellen/Küvette verwendet. Die Messung erfolgte nach 24 h Kultivierung in 6 well Platten (3 ml Medium pro well). Durch Amaxa transfizierte Zellen sind mit den entsprechenden DNA-Mixen in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Amaxa Transfektionen, Zellen, DNA-Mixe, Kits und Programme

Zellen	DNA- Mix	Kit	Programm
GM02253F HA187 HA126 HA290 GM03403	5 µg shRNA 2,5 µg pCMV-I-*Sce*I 2,5 µg Reparatursubstrat oder 2,5 µg wtEGFP	BC	U 15
EUFA30-F	3 µg shRNA 1 µg pCMV-I-*Sce*I 1 µg Reparatursubstrat 1 µg pBS oder wtEGFP	MEF 2	T 20
GM08505 Flg5/Gal13	Bei Knockdown mit siRNA: 1,66 µg pCMV-I-*Sce*I 1,66 µg Reparatursubstrat 1,66 µg pBS oder wtEGFP 13 nM siRNA	MEF 2	A 23

2.7 Bestimmung der Generationszeit

Zur Ermittlung der Generationszeit einer Zelllinie, wurde zunächst die Zellmenge mittels Neubauer Zählkammer ermittelt, anschließend eine definierte Anzahl an Zellen auf 6-well-Platten ausgesäht. Bis zu 72 h nach Aussaht, wurden die Zellen in 12 Stunden Intervallen geerntet und die Zellzahl erneut bestimmt. Die Generationszeit wurde wie folgt berechnet.

$$\ln N - \ln N0 = k\Delta t$$

$$\rightarrow\ k = (\ln (N/N0))\ \Delta t$$

$$\rightarrow \text{Generationszeit } (t) = \ln 2/k$$

N Stellt die Zellzahl am Ende des Zeitabschnittes dar, N0 wird definiert durch die Anfangszellzahl. Δt bestimmt die Zeitspanne in Stunden, zwischen N und N0.

2.8 Durchflusszytometrie

Die Frequenz der DSB-Reparatur und die Verteilung der Zellen in den Zellzyklus Phasen wurde mit einem Durchflusszytometer (FACS Calibur), der Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, bestimmt. Es stellt ein optisches Meßsystem dar, mit dem Fluoreszenz- und Lichtstreusignale von Zellen, die sich in Suspension befinden, analysiert werden können. Die Messmethode erlaubt die optische Analyse mehrerer Tausend bis Millionen Zellen innerhalb kürzester Zeit. Die Zellen werden durch eine Messküvette gesogen, wo sie von einem gebündelten Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge (Argon-Laser mit 488 nm) angeregt werden. Passiert eine Zelle die Messstelle, wird sie vom Laser bestrahlt, wodurch es zu mehreren Effekten kommt.
Die Streuung der Laserstrahlen nach vorne (Vorwärtsstreulicht, FSC), stellt die Lichtbeugung dar, welche proportional zur Zelloberfläche steht und damit die Zellgröße detektiert. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) stellt die Lichtbrechung und Reflexion dar, die sich proportional zur Zellkomplexität und -granularität verhalten.
Vorangehende Färbungen von Zellbestandteilen (z. B. DNA) mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes oder Expression eines Fluoreszenzfarbstoffes in der Zelle (z. B. *EGFP*) werden durch eín, nach Anregung der Chromophore, emittiertes Fluoreszenzsignal detektiert. Das von der Zelle emittierte und gestreute Licht wird von verschiedenen Spiegeln mit unterschiedlichen Filtern erfasst, die Daten an einem Computer quantifiziert.

2.8.1 Rekombinationsfrequenzmessung (Akyüz *et al.*, 2001)

Zur Analyse der Zellen wurde eine ausreichende Zellmenge zentrifugiert (1200 Upm, 5 min), das Zellpellet in 1 ml PBS / 0,2 % EDTA resuspendiert, erneut sedimentiert und in 250 µl PBS / 0,2 % EDTA resuspendiert, um eine Endkonzentration an Zellen von 10^6 Zellen/ml zu erreichen. Die Zellsuspension wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und die Fluoreszenzen der Zellen am Durchflusszytometer der Fa. Becton Dickinson (FACS Calibur) analysiert.
Zur Darstellung der Zellen als Dot-Plot-Diagramm mussten diese im FSC- und SSC-Kanal zunächst justiert werden (Abbildung 10a). Im abgebildeten Graphen ist das Seitwärtsstreulicht (SSC-H) gegen das Vorwärtsstreulicht (FSC-H) aufgetragen.

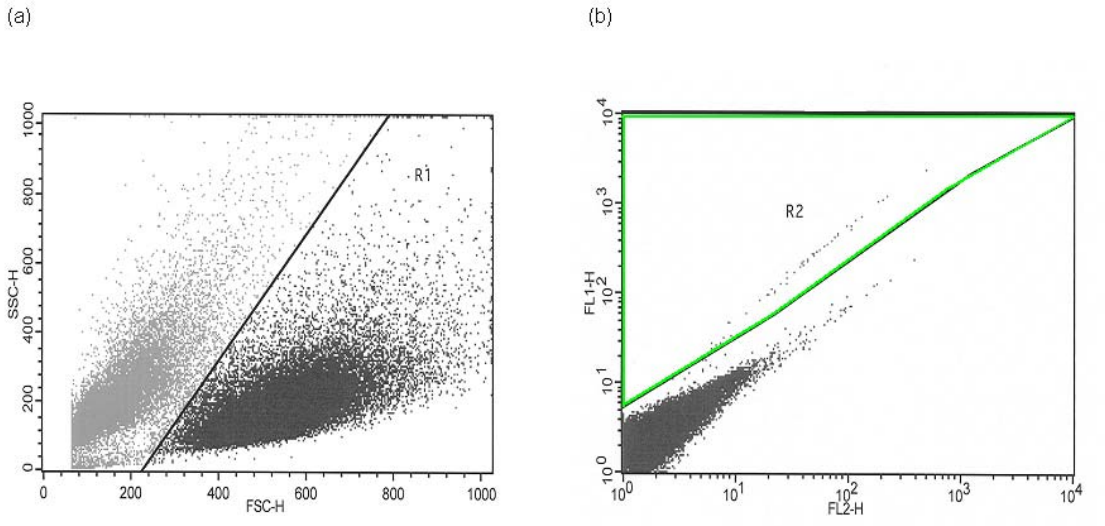

Abbildung 10: Meßdokumente zur Detektion grün fluoreszierender Zellen.
Dot-Blot Diagramme zur Diskriminierung lebender (R1) und toter Zellen (a) und zur Detektion grün fluoreszierender Zellen (R2) (b).

Zur Quantifizierung grünfluoreszierender Zellen werden zwei Fluoreszenzkanäle gemessen, wobei FL1 das grün fluoreszierende EGFP detektiert, FL2 die orangefarbene Eigenfluoreszenz der Zellen nachweist. Das Gate R2 markiert die fluoreszierenden Zellen, wie in Abbildung 10b veranschaulicht. Um die DNA Reparaturfrequenz zu ermitteln, wird zudem die Transfektionseffizienz ermittelt. Hierfür musste parallel zur Messung in ansonsten identischen Proben eine Transfektion mit wtEGFP durchgeführt werden. Die Berechnung der Reparaturfrequenz erfolgte nach folgender Formel.

DSB Reparatur Frequenz [%] = Events pro Zellzahl [%] / Transfektionseffizienz [%]

2.8.2 Einparametrische Zellzyklusanalyse (Propidiumiodidfärbung)

Zur Anfärbung der DNA in Zellen, wurde der Farbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet, welcher, ähnlich wie Ethidiumbromid, mit dieser interkaliert.
Zunächst wurde ein Zellpellet von 10^6 Zellen mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Zur Fixierung der Zellen wurde auf einem Vortex 9 ml eiskalte Fixierlösung langsam dazugetropft, anschließend folgte eine Inkubation 15 min auf Eis. Die fixierten Zellen mussten dann mindestens 1 h (bis zu mehreren Wochen) bei -20°C gelagert werden.

Für die Färbung wurden die fixierten Zellen in zwei Schritten mit zunächst 1:1 Fixierlösung/PBS, anschließend mit PBS gewaschen und rehydriert. Das Zellpellet wurde mit 250 - 500 µl 1x PI-Färbelösung resuspendiert und 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert und bis zur Messung mit einem Durchflusszytometer der Fa. Becton Dickinson (FACS Calibur) im Dunkeln bei RT aufbewahrt.

Fixierlösung

80 % (v/v)	Ethanol	:	Aceton
Verhältnis	1	:	1

10x PI-Färbelösung

500 µg/ml Propidiumiodid in 38 mM Na-Citrat
pH 7,0

1x PI-Färbelösung

10 x PI-Färbelösung
1/10 mit PBS verdünnen
50 µg/ml RNase A (frisch ansetzen)

Die Zellzyklusphasen konnten nun anhand des DNA Gehaltes der Zellen analysiert werden, da bei der Zellteilung diploider Zellen vier deutlich abgrenzbare Phasen (G1, S, G2 und M) durch unterschiedliche DNA Mengen indiziert werden. Die Intensität des erhaltenen Fluoreszenzsignals ist abhängig vom DNA-Gehalt der Zelle.
Die Phase, in welcher sich die Zellen nicht teilen, wird als G0-Phase bezeichnet. DNA, welche in normalen diploiden Zellen als Chromosomenpaar vorliegt, wird mit 2n angegeben.
G1-Phase: Sie stellt den Beginn der Zellteilung dar. Hier finden RNA und Proteinsynthesen statt, der DNA Gehalt bleibt konstant bei 2n. Zellen in der G0- oder G1-Phase sind anhand ihres DNA Gehaltes nicht unterscheidbar. Die Phasen werden deshalb kollektiv als G0/G1 bezeichnet.

S-Phase: Diese Phase beginnt mit der Replikation der DNA. Sie dauert an bis die gesamte DNA verdoppelt (redupliziert) ist. Der DNA Gehalt ändert sich in dieser Phase von 2n auf 4n.

G2-Phase: Nach der S-Phase geht die Zelle in die G2-Phase über, während die Zelle die eigentliche Teilung vorbereitet, bleibt der DNA Gehalt bei 4n.

M-Phase: Hier findet die Mitose statt. Der DNA Gehalt bleibt bei 4n, bis die Tochterzellen entstehen, mit einem DNA Gehalt von je 2n.

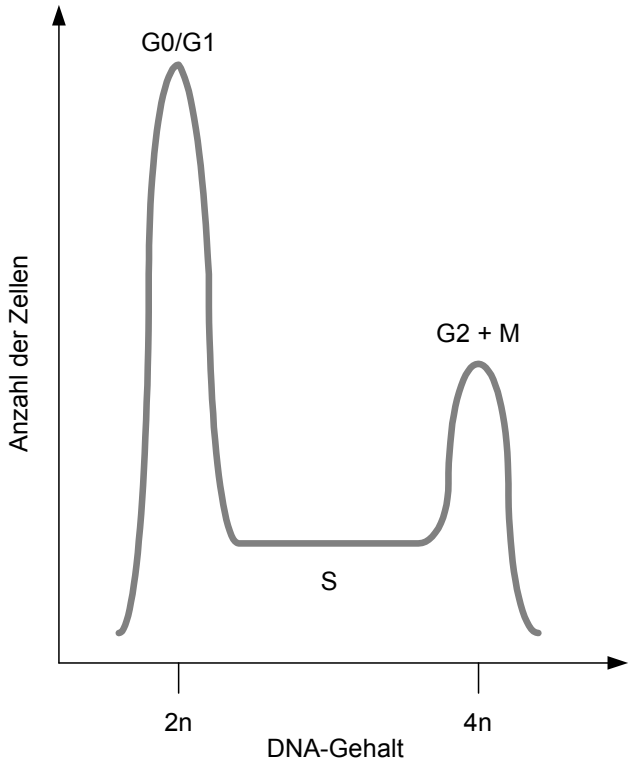

Abbildung 11: Histogramm zur Verteilung des DNA-Gehaltes in einer Zellpopulation mit normalem Zellzyklus.

Zur Auswertung der Zellzyklusdaten nach Anfärbung der DNA mittels Propidiumiodid, wurden die Zellen zunächst in einem Dot-Plot Diagramm dargestellt (FL2-A gegen FL2-W). Hierbei konnten die Dupletten von der weiteren Analyse ausgegrenzt werden. Dupletten sind nicht vollständig separierte Zellen, welche vom Durchflusszytometer als eine Zelle erkannt werden, wodurch „falsche“ DNA Mengen detektiert werden.

Die selektierte Zellpopulation konnte nun als Histogramm dargestellt werden (siehe Abbildung 11), wobei der DNA Gehalt gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen wurde. Es konnte nun der jeweilige prozentuale Anteil der Zellzyklus Phasen ermittelt werden.

2.9 Chemikalien, Enzyme, Geräte, Software und andere Produkte

2.9.1 Geräte

Es wurden folgende zum Teil im Text erwähnte Geräte genutzt:

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem SE250 Mighty Small II
Western-Blotkammer TE Series
Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Power Supply EPS 1000
Power Supply EPS 1001
Power Supply EPS 2A 200
Bandelin, Berlin
Ultraschallbad Sonorex RK31
Beckmann, München
Spektralphotometer DU640
Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer FACS Calibur
Bender und Hobein, Zürich
VortexGenie 2
B. Braun Biotech International, Melsungen
Certomat® R, Schüttler
Certomat® H, Brüter
Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sub-Cell® GT, Gelkammer
Power-Supply PAC 300
Gene Pulser mit Pulse Controller (Xcell™)
Biotec-Fischer, Reiskirchen
Schüttler Phero-Shaker
Schüttler Variospeed
Biozym Diagnostik, Oldenburg
MultiImageTMLight Cabinet
Clean Air Techniek, Woerden, Niederlande
Sterilbank Clean Air DLF/REC6
Sterilbank Clean Air DLF/BSS6
Dynatech Laboratories, Chantilly, USA
Mikrotiterplatten-Photometer MRX
Embitec, San Diego, USA
Agarosegelelektrophorese-Kammer RunOne
Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415 C
Concentrator 5301
Forma Scientific, Marietta, USA
Brutschrank 3862
Heidolph Instruments, Schwabach
Magnetrührer Heidolph MR1
Heraeus, Hanau
Brutschrank B6760
Multifuge 3S-R
Heraeus-Sepatech, Osterode

Biofuge 13
Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotanta 96R
Hoefer Pharmacia Biotech, Freiburg
Power-Supply EPS 2A 200
Nassblotapparatur
Mini-Gel-Apparatur
Gelgießkammer SE200
H+P, Oberschleißheim
Autoklav, Varioklav 75S
Janke&Kunkel, Staufen im Breisgau
Magnetrührer IKA-Combimag RCO
Kendro, Asheville, USA
Gefrierschrank -86 °C, HFU3285SITOP-V37
Kendro, Osterode
Biofuge pico
Multifuge 1 S-R
Multifuge 3 S-R
Kirsch, Offenburg
Gefrierschrank Froster-520
L'air Liquide, Champigny, Frankreich
Stickstofftank BT40
LG Electronics, Seoul, Korea
Mikrowelle MS-1915H
Liebherr, Ochsenhausen
Kühl-, Gefrierkombischrank Premium NoFrost
Lonza, Amaxa, Köln
Amaxa Nucleofector I und II
Messer-Griessheim, Euteneuen
Stickstofftank Apollo 200
Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
pH-Meter MP230
MWG Biotech AG, Ebersberg
PCR-Maschine Primus Thermocycler
Olympus, Tokyo, Japan
Mikroskop Olympus IX50-S8F
PeqLab, Erlangen
Agarosegelelektrophorese-Kammer PerfectBlue Mini M
Sartorius, Göttingen
Analysenwaage Sartorius BP61
Snijders, Tilburg, Niederlande
Test-Tube-Rotator
Thermo-Dux, Wertheim
Heizblock Techne Dry-block DB2A
Thermo, Egelsbach
Brutschrank 311
Gefrierschrank -86 °C, Forma Scientific 917
Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 25
Ziegra, Isernhagen
Eismaschine

2.9.2 Chemikalien, Enzyme und andere Produkte

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck KgaA (Darmstadt), Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG (Heidelberg), Riedel de Häen AG (Seelze) und Geschäftsbereich Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen.

Spezielle Chemikalien, Enzyme und Produkte stammten von folgenden Firmen:

Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Hybond™ C Extra Nitrocellulosemembran
Hyperfilm ECL
Protein A-Sepharose
Protein G-Sepharose
Applichem, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat
Biochrom, Berlin
L-Glutamin
Bio-Rad Laborities, Hercules, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)
2-Mercaptoethanol
Biozym Diagnostics, Hessisch Oldendorf
Protogel™(30 % Acrylamid/0,8 %Bisacrylamid)
Becton-Dickinson Bioscience Clontech, Heidelberg
FACS-Clean
FACS-Flow
FACS-Rinse
FACS-Rundbodenröhrchen (5 ml)
FCS, Tet system approved
Falconröhrchen 15 ml /50 ml
Brand, Wertheim
Pasteurpipetten
Braun, Tuttlingen
Skalpel
Carl Roth GmbH, Karlruhe
SDS, DMSO
Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Agar
Bacto-Trypton
Hefe-Extrakt
Eppendorf, Hamburg
Plastik-Reaktionsgefäße 0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml
Fluka, Neu Ulm
Nonidet P40
Greiner-Bio-One, Frickenhausen
Einfrierröhrchen
ICN Biomedicals, USA
Opti-Freeze®
Invitrogen Gibco, Karlsruhe
α-MEM

Acrylamide/Bis Solution (19:1) 40 % (w/v)
Agarose
G418
HiMark Pre-Stained HMW Protein Standard
McCoys
Natriumpyruvat
OptiMEM
Penicillin/Streptomycin
Penicillin/Streptomycin/Glutamine
RPMI 1640 phenolrotfrei
Zeocin

J.T.Baker, Holland, Deventer
Glycerol

Lonza, Amaxa, Köln
Nucleofector Kit MEF2
Nucleofector Kit BC

Marligen, USA, Ijamsville
High Purity Plasmid Maxiprep System

MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Mass Ruler DNA Ladder, Low Range
Page Ruler Pre-Stained Protein Ladder
Page Ruler Pre-Stained Protein Ladder Plus

Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)
Laurylsulfat Natriumsalz (SDS)
Natriumflourid
Orange G
Refobacin (Gentamicin)
TEMED
Tween 20

Millipore, Eschborn
Immobilon™-P Membran (PVDF)

MWG Biotech AG, Ebersberg
Oligodesoxynukleotide
Taq-DNA-Polymerase

national diagnostics, USA, Atlanta
Acrylamide/Bisacrylamide (30:0,8) (w/v)

New England Biolabs GmbH
BSA
Restriktionsendonukleasen
dNTPs

Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen
ZK-96, 24- und 6-Loch-Platte
ZK-Platte 9 cm^2 / 15 cm^2

PAA Laboratories, Pasching, Deutschland
Accutase
Cryomaxx S (Einfriermedium)
DMEM
FCS
PBS (1x)

PBS (10x)
RPMI 1640
Trypsin-EDTA-Lösung
Puromycin
Premier Foods Ltd., UK, Long Sutton
Magermilchpulver Marvel
Qiagen, Hilden
Taq-DNA-Polymerase
Roche, Mannheim
Hygromycin B
FuGENE 6
FuGENE HD
QIAprep Miniprep Kit (50)
XtremeGENE
Roth, Karlsruhe
EGTA
Tris/HCl
Rotiphorese 10x SDS Page
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ampicillin
Hygromycin
Kanamycin
Proteaseinhibitorcocktailtabletten (completeMini)
Sartorius AG, Göttingen
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)
Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen
ZK-96, 24- und 6-Loch-Platte
ZK-Platte 9 cm^2 / 15 cm^2
Schleicher und Schüll, Dassel
Filterpapier Whatman 3 MM
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Östradiol
Bleomycin
Bromphenolblau
Doxycyclin
Ethidiumbromid
Ponceau S solution
Propidiumiodid (PI)
Proteinase K
RNase A
Triton-X-100
Trizma-Base
Trypanblau
Natriumvanadat (NaV)
Thermo scientific, USA, Rockford Illinois
Protein-assay-kit (BCA)
SuperSignal ® West Pico Chemiluminescent Substrate
SuperSignal ® West Dura Extended Duration Substrate

2.9.3 Software

BD™ PlateManager 1.0.1 BD Biosciences, Heidelberg
BD Cell Quest™ Pro 4.0.2 BD Biosciences, Heidelberg
BD Cell Quest™ Pro 5.2.1 BD Biosciences, Heidelberg
ChemiImager™5500 Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA
Clone Manager 7.04 Scientific&Educational Software, Cary, NC, USA
DU640 Benutzersoftware Beckman, München
Gimp 2.2 FSFE, Düsseldorf
Magellan 3 Tecan, Crailsheim
Microsoft Office Professional 2003 Microsoft, Redmond, WA, USA
Reference Manager Professional 10 Thomson ResearchSoft, Stamford, CT, USA

3 Ergebnisse

3.1 Effekt der humanen MutL Homologen auf die DSB Reparaturmechanismen

Um den Einfluss des hMLH1 Proteins auf die rekombinative DNA Reparatur systematisch zu untersuchen, wurde das *EGFP*-basierende Testsystem eingesetzt (Akyüz *et al.*, 2002). Erste Untersuchungen wurden in einem isogenen humanen zellulären System mit unterschiedlichem hMLH1 Status durchgeführt.

In dem *EGFP*-basierenden Testsystem kann durch die Meganuklease I-*Sce*I ein artifizieller DSB induziert werden. Je nach gewähltem Reparatursubstrat können die verschiedenen Reparaturwege, z. B. NHEJ oder homolog gerichtete Mechanismen (HR, SSA), detektiert werden.

Mit dem Plasmid EJ-EGFP können erfolgreiche NHEJ Ereignisse detektiert werden. Die Plasmide ∆-EGFP/5´EGFP und HR-EGFP/5´EGFP ermöglichen eine Analyse der konservativen HR (meist Genkonversion). Mit Hilfe der Vektoren ∆-EGFP/3´EGFP und HR-EGFP/3´EGFP werden alle HR Wege detektiert, hauptsächlich jedoch Genkonversion und SSA.

In Hefen wurde nach Verlust von *mlh1*, von einer überdurchschnittlichen Zunahme von DNA Austausch Ereignissen berichtet, welche in einiger Entfernung vom DSB stattfanden (Surtees *et al.*, 2004). Deswegen sollte der Effekt von hMLH1 hinsichtlich der Sequenzlängen, welche der Reparatur zur Verfügung stehen, analysiert werden. Mit Hilfe der HR-Plasmide konnte die Sequenzlänge zur Ausbildung perfekter Homologiebereiche variiert werden. Die ∆-Substrate weisen einen 164 Bp langen Homologiebereich auf, 46 Bp sind neben der I-*Sce*I Schnittstelle deletiert. Im Vergleich hierzu weisen die HR-Substrate lediglich eine Deletion von 4 Bp aus.

Die korrekte genetische Rekonstitution eines funktionellen Wildtyp EGFP Gens wurde durch die Unterscheidung grün fluoreszierender Zellen aus einer Population nicht leuchtender Zellen mittels FACS Analyse überprüft.

Um indirekte Effekte auf die DSB Reparatur auszuschließen, hervorgerufen durch Unterschiede in der Transfektionseffizienz, Wachstumgeschwindigkeit, Zell-sterblichkeit, in transkriptionellen und translationalen Aktivitäten, wurden zeitgleich identische Kotransfektionen mit dem Wildtyp EGFP Kontrollplasmid durchgeführt. Diese individuell bestimmten Transfektionseffizienzen dienten zur Kalkulation jeder einzelnen DSB Reparaturfrequenz.

3.1.1 Untersuchung der DSB Reparatur in isogenen zellulären Systemen mit und ohne hMLH1

3.1.1.1 Untersuchung der DSB Reparatur in 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen

Für die Untersuchungen des Einflusses des hMLH1 auf die DSB Reparatur, wurde zunächst die humane embryonale Nieren-Zelllinie 293T-Tet-Off-hMLH1 (Derivat von 293T, ATCC CRL-11268™) verwendet. Durch stabile Transfektion mit Vektoren, welche die hMLH1 cDNA unter die Kontrolle eines induzierbaren Tett-Off Systems bringen (Cejka *et al.*, 2003), war es möglich bei Kultivierung der Zellen in Gegenwart von Doxycyclin (dox) die exogene hMLH1 Expression zu unterdrücken, was mittels Western-Blot Analysen überprüft werden konnte (Abbildung 12a). Die endogene hMLH1 Expression wird in der Zelllinie durch Promotor-Hypermethylierung unterdrückt.

Um indirekte Effekte durch Zellzyklusarrest oder Zelltod auf die DSB Reparatur durch den Verlust von hMLH1 auszuschließen, wurden Zellzyklusanalysen nach PI-Färbung der Zellen durchgeführt. Die hierfür notwendigen Proben wurden parallel zu den DSB Reparatur Messungen gewonnen. Initiale Anteile der DSB Reparatur Analysen wurden von Michael Schrauder, Ulm, durchgeführt.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Doxycyclin behandelten und unbehandelten 293T in den Zellzyklusanalysen: Weder für die sub-G1 Phase (welche die Apoptose darstellt), noch für die G1-, S-, oder G2-Phasen (Abbildung 12b).

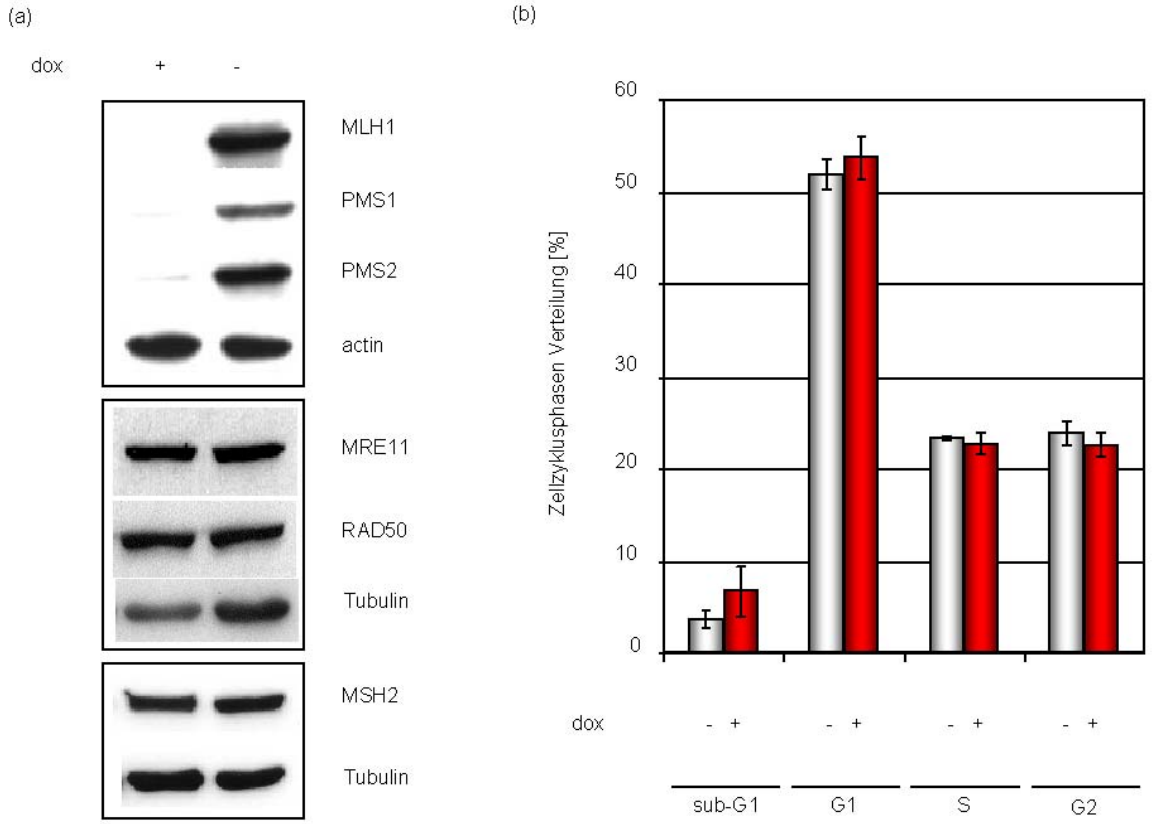

Abbildung 12: Western Blot und Zellzyklusanalyse, 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen mit und ohne Doxycyclin.
(a) Protein Expressionsanalyse. Die Zellen wurden in Ab- / Anwesenheit von Doxycyclin kultiviert, um die exogene hMLH1 Expression zu regulieren. Für die Immundetektion von hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMRE11, hRad50 und hMSH2 wurden Zelllysate eingesetzt. Die Auftragsmenge wurde durch Reinkubation der Western Blots mit Anti-Aktin oder Anti-Tubulin Antikörper überprüft. (b) Zellzyklusanalyse. Der DNA Gehalt der Zellen wurde nach PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die sub-G1-Phase indiziert DNA-haltige apoptotische Zellen. Die sub-G1-Phase indiziert DNA-haltige apoptotische Zellen. Die Angabe der einzelnen Phasen erfolgte in Prozent. Säulen entsprechen Mittelwerten aus 5 Messungen, Fehlerbalken dargestellt durch die Standardabweichungen.

Begeitend zum hMLH1 Verlust war eine Abnahme der Proteinmengen von hPMS1 und hPMS2 feststellbar. Dieses Ergebnis ist konsistent mit früheren Berichten welche zeigten, dass hMLH1 seine Komplexpartner stabilisiert (Cejka *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2004; Raschle *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde überprüft, ob Doxycylin einen Einfluss auf die Expression von hMSH2, hMRE11 oder hRad50 ausübt (Miquel *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2008). Dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der DSB Reparatur wurden die hMLH1 positiven und hMLH1 negativen Zellen mit I-*Sce*I Expressionsplasmid und je einem der Reparatursubstrate (EJ-EGFP, ∆-EGFP/5´EGFP, HR-EGFP/5´EGFP, ∆-EGFP/3´EGFP,

HR-EGFP/3´EGFP) kotransfiziert. Nach 24 h erfolgte die Detektion der Reparaturereignisse, dargestellt in Abbildung 13.

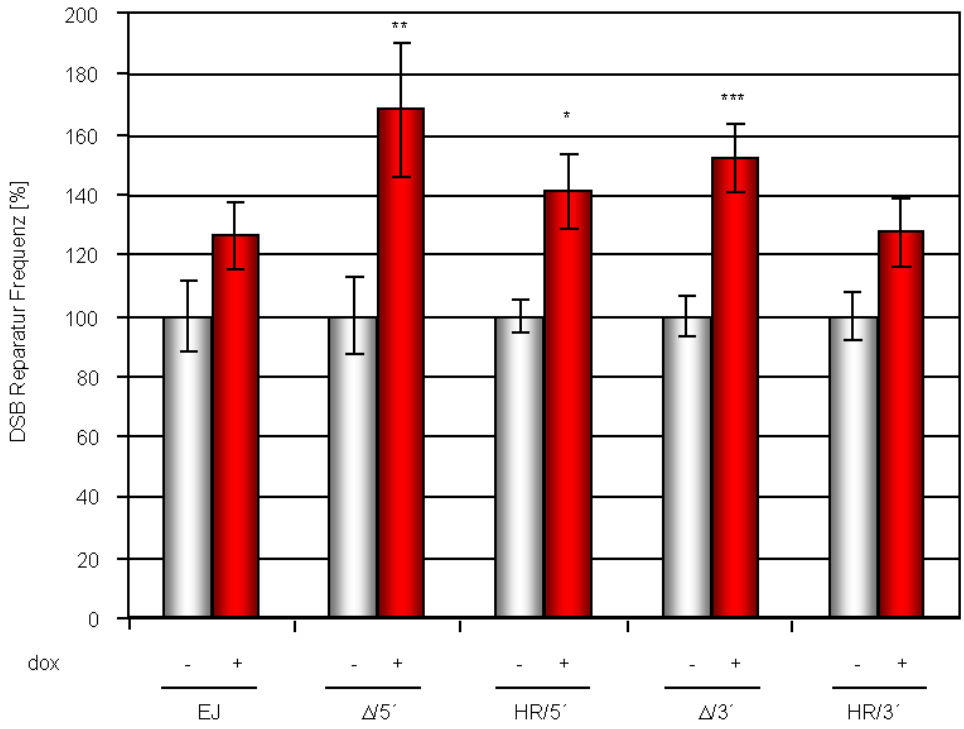

Abbildung 13: DSB Reparatur Analyse von 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen mit und ohne Doxycyclin.
Die Zellen wurden mit dem Meganuklease Expressionsplasmid pCMV-I-*Sce*I und den DSB Reparatursubstraten EJ-EGFP (EJ), Δ-EGFP/5´EGFP (Δ/5´), HR-EGFP/5´EGFP (HR/5´), Δ-EGFP/3´EGFP (Δ/3´) oder HR-EGFP/3´EGFP (HR/3´) kotransfiziert. Nach 24 h wurden die DSB Reparatur Frequenzen ermittelt. Zum direkten Vergleich der DSB Frequenzen mit und ohne hMLH1 Expression, wurden die Werte mit hMLH1 auf 100 % gesetzt, die anderen Frequenzen ohne hMLH1 wurden darauf bezogen. (absolut Werte für 100 %: 0,9 x 10^{-4} for EJ-EGFP, 1,8 x 10^{-3} for Δ-EGFP/5´EGFP, 1,5 x 10^{-3} für HR-EGFP/5´EGFP, 7,4 x 10^{-3} für Δ-EGFP/3´EGFP, 10,5 x 10^{-3} für HR-EGFP/3´EGFP). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler zu 15 Messungen (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Die DSB Reparaturmessungen zeigten eine 26 %ige Zunahme des NHEJ, nach Ausschalten der exogenen hMLH1 Expression (statistisch nicht Signifikant, $P = 0,193$). Zudem wurde eine 68 %ige und 41 %ige Stimulierung der konservativen HR mit kurzen (Δ-EGFP/5´EGFP, $P = 0,009$) oder langen (HR-EGFP/5´EGFP, $P = 0,012$) Homologiebereichen nachgewiesen. Bei der Messung der HR mit Hilfe der Δ-EGFP/3´EGFP- und HR-EGFP/3´EGFP Substrate war eine Erhöhung von 52 % ($P = 0,000$) und 28 % ($P = 0,052$) detektierbar.
In Proben ohne I-*Sce*I induzierten DSB konnten 13 – 17-fache niedrigere Werte für die HR bei Einsatz von Δ-EGFP/5´EGFP und HR-EGFP/5´EGFP gemessen werden.

Im Falle von EJ-EGFP waren ohne I-*Sce*I Expression keine grün fluoreszierenden Zellen nachweisbar (nicht gezeigt).

3.1.1.2 Untersuchung der DSB Reparatur in HCT116 +/- Chromosom 3

Zur weiteren Abklärung des Einflusses von hMLH1 auf die DSB Reparatur wurde die Zellinie HCT116 untersucht, welche hMLH1 defizient ist. In HCT116 +chr3 war die hMLH1 Expression durch ein zusätzlich eingeführtes Chromosom 3 möglich.
Western Blot Analysen zeigten erneut, dass der Verlust von hMLH1 mit einer starken Abnahme von hPMS1 und hPMS2 einhergeht (siehe Abbildung 14a). Da HCT116 mutiertes hMRE11 enthält, wurde bei der Immundetektion eine geringe Proteinmenge mit zusätzlichen Banden sichtbar (Miquel *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2008). Unterschiede, hervorgerufen durch die hMLH1 Expression für hMRE11 und hRad50 waren nicht feststellbar.
In Zellzyklusanalysen (dargestellt in Abbildung 14b), zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die Zellzyklus Phasen sub-G1, G1, S und G2, zwischen HCT116 und HCT116 +chr3.

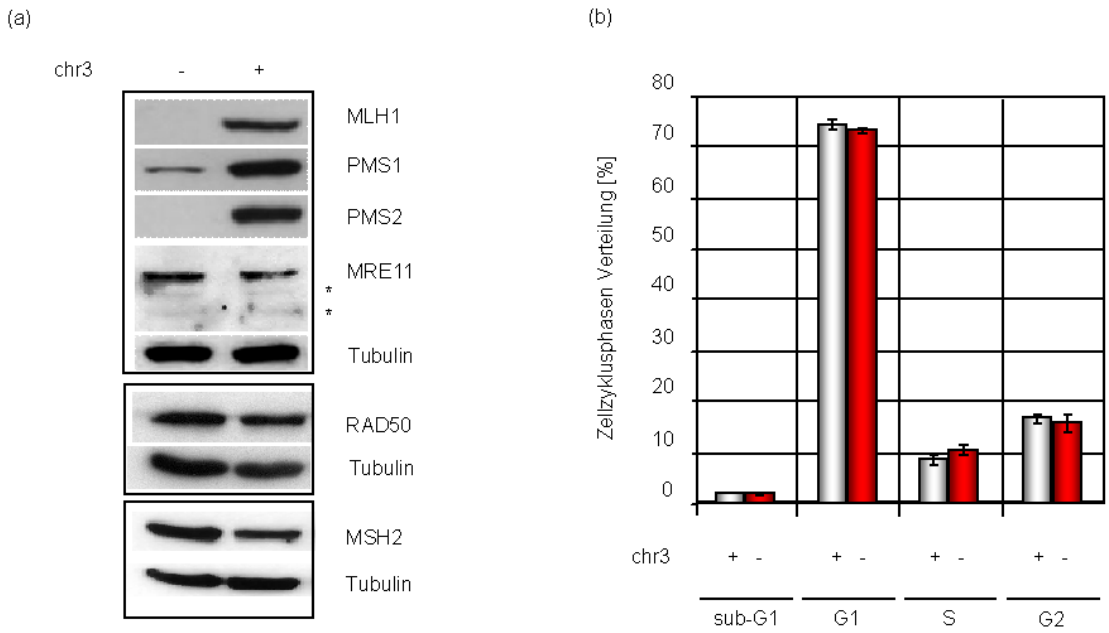

Abbildung 14: Western Blot und Zellzyklusanalyse HCT116 und HCT116 +chr3.
(a) Protein Expressionsanalyse. Für die Immundetektion wurden Zelllysate eingesetzt. Die Proteine hMLH1, hPMS1, hPMS2, hRad50 und hMSH2 wurden analysiert. Die zusätzlichen Banden von mutiertem hMRE11 sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Auftragsmenge wurde durch Reinkubation der Western Blots mit Anti-Tubulin Antikörper überprüft. (b) Zellzyklusanalyse. Der DNA Gehalt der Zellen wurde nach PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die sub-G1-Phase indiziert DNA-haltige apoptotische Zellen. Die Angabe der einzelnen Phasen erfolgt in Prozent. Säulen repräsentieren Mittelwerte aus 2 bis 3 Messungen, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Wie mit 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen wurden mit den HCT116 und HCT116 + chr3 Zellen DSB Reparatur Messungen durchgeführt. DSB Reparatur Analysen wurden von Michael Schrauder, Ulm, durchgeführt. Die verwendeten Rekombinations-substrate waren EJ-EGFP, Δ-EGFP/5´EGFP, HR-EGFP/5´EGFP und Δ-EGFP/3´EGFP (siehe Abbildung 15).

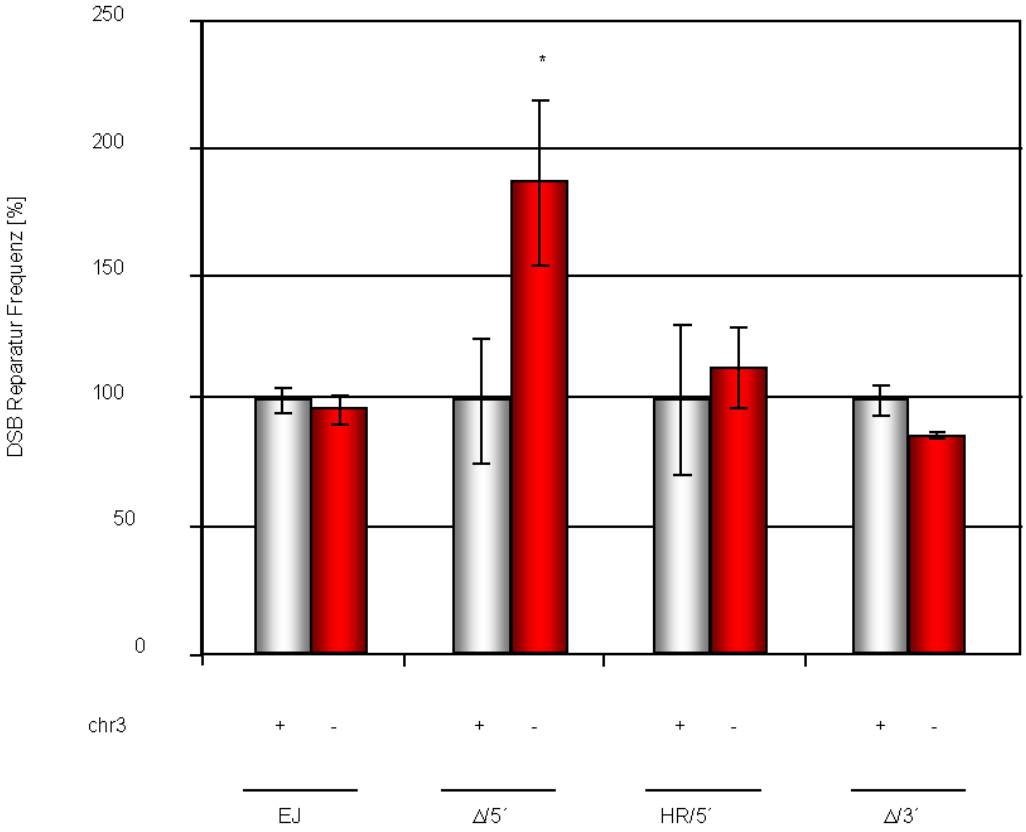

Abbildung 15: DSB Reparatur Analyse HCT116 und HCT116 +chr3 Zellen.
Die Zellen wurden mit dem Meganuklease Expressionsplasmid pCMV-I-*Sce*I und den DSB Reparatursubstraten EJ-EGFP (EJ), Δ-EGFP/5´EGFP (Δ/5´), HR-EGFP/5´EGFP (HR/5´) oder Δ-EGFP/3´EGFP (Δ/3´) kotransfiziert. Nach 24 h wurden die DSB Reparaturfrequenzen ermittelt. Zum besseren Vergleich der DSB Frequenzen mit und ohne hMLH1 Expression, wurden die mit hMLH1 erzielten Werte auf 100 % gesetzt, die anderen Frequenzen ohne hMLH1 wurden darauf bezogen. (absolute Werte für 100 %: 0,9 x 10^{-3} für EJ-EGFP, 1,2 x 10^{-3} für Δ-EGFP/5´EGFP, 1,6 x 10^{-3} für HR-EGFP/5´EGFP, 17,7 x 10^{-3} für Δ-EGFP/3´EGFP). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler zu 15 Messungen; *, $P < 0,05$).

In HCT116 Zellen ohne hMLH1 konnte eine 86 % ($P = 0,032$) höhere HR Frequenz detektiert werden, verglichen mit den hMLH1 positiven Zellen HCT116 +chr3. Diese Erhöhung der DSB Reparaturfrequenzen war nur für die homologe Rekombination, insbesondere mit kurzen Homologiebereichen (Δ-EGFP/5´EGFP) feststellbar.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sowohl 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen als auch HCT116 ohne hMLH1 Expression verglichen mit ihren isogenen

Gegenspielern mit hMLH1 Expression eine Erhöhung der HR Aktivität aufweisen. Dieser Effekt war besonders ausgeprägt bei der konservativen HR, falls nur kurze Homologielängen zur Reparatur verwendet werden können. Dies deutet darauf hin, dass hMLH1 bei der homeologen Rekombination eine Rolle spielt, also zwischen DNA-Sequenzen, die keine vollständige Homologie aufweisen.

3.1.2 Der Einfluss von hMLH1 auf die DSB Reparatur im chromosomalen Kontext

Um die bisherigen Ergebnisse des hMLH1 Effektes zu untermauern, wurde dessen Einfluss im Chromatin Kontext untersucht. Hierfür wurden bereits gut charakterisierte KMV Zelllinien (abgeleitet von der humanen Erythroleukämiezelllinie K562), in welche die ∆-EGFP/3´EGFP oder HR-EGFP/3´EGFP Substrate stabil ins Chromosom integriert worden waren (Akyüz *et al.*, 2002), verwendet.

Es konnten keine vergleichenden Analysen der chromosomalen HR mit den Substraten ∆-EGFP/5´EGFP und HR-EGFP/5´EGFP durchgeführt werden, da die entsprechenden HR Frequenzen unter der Detektionsgrenze liegen würden.

In unserer Arbeitsgruppe konnte durch die Expression eines dominant negativen Rad51 Proteins (SMRad51) jedoch nachgewiesen werden, dass die Rad51 von abhängige HR einen wesentlichen Beitrag zu der chromosomalen DSB Reparatur an den Substraten ∆-EGFP/3´EGFP und HR-EGFP/3´EGFP leistet (Restle *et al.*, 2008).

Die KMV(HR-EGFP/3´EGFP) Zellen wurden mit dem I-*Sce*I Expressionsplasmid und den shRNA Vektoren pRSMLH1F oder pRSMLH1G elektroporiert. Die shRNA Plasmide, welche gegen unterschiedliche 21 Nukleotide lange Sequenzen in der hMLH1 mRNA gerichtet sind, bewirkten eine deutliche Abnahme der hMLH1 Proteinmenge, wie in Abbildung 16a ersichtlich (ca. 50 %, verglichen mit dem Leervektor pRScontrol, normalisiert gegen die Auftragskontrolle, Transfektions-effizienz 80 %). Indirekte Effekte auf die DNA Reparatur, welche von Unterschieden in der Zellzyklusverteilung oder Zelltod herrühren konnten, wurden auch von vorneherein ausgeschlossen (siehe Abbildung 16b).

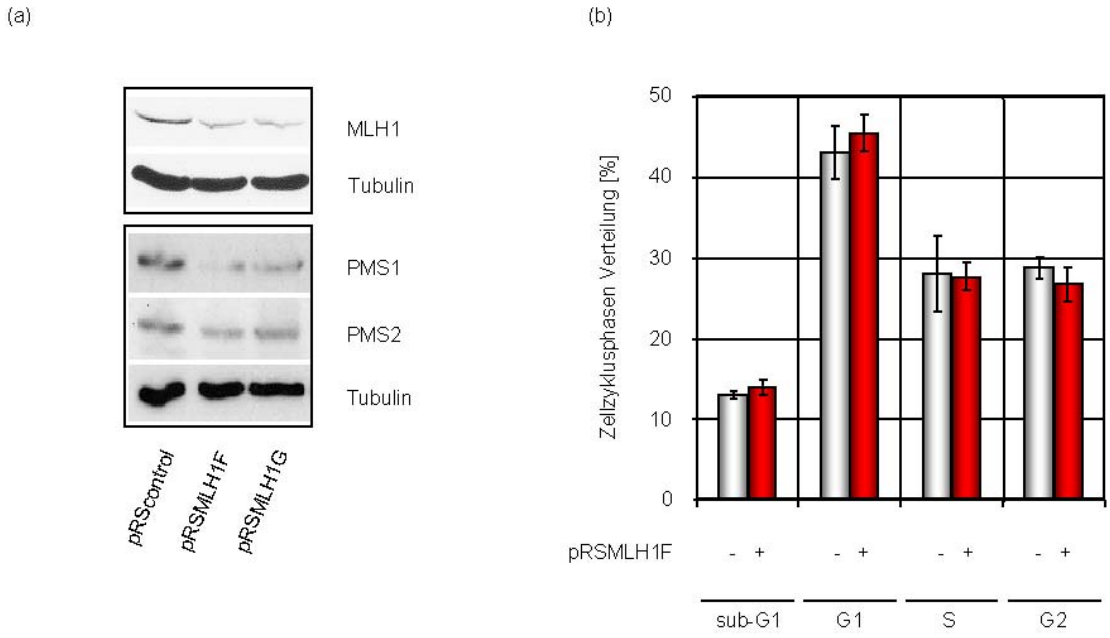

Abbildung 16: Western Blot und Zellzyklusanalyse von Zellen mit chromosomal integriertem DSB Reparatursubstrat.
Die verwendeten Zellproben wurden unter DSB Reparatur Messbedingungen hergestellt. (a) Protein Expressionsanalyse. Für die Immundetektion wurden Totalhomogenate eingesetzt. Die Proteinmengen von hMLH1, hPMS1, hPMS2 wurden nach Knockdown von hMLH1 durch Transfektion mit pRSMLH1F analysiert. Die Auftragsmenge wurde durch Reinkubation der Western Blots mit Anti-Tubulin Antikörper überprüft. (b) Zellzyklusanalyse. Der DNA Gehalt der Zellen wurde nach PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die sub-G1-Phase indiziert DNA-haltige apoptotische Zellen. Die Angabe der einzelnen Phasen erfolgte in Prozent. Säulen entsprechen den Mittelwerten aus 4 Messungen, Fehlerbalken den Standardabweichung.

Im Einklang mit meinen Ergebnissen in HCT116 (Kapitel 3.1.1.2) und 293T-Tet-off-hMLH1 (Kapitel 3.1.1.1) waren die Protein Mengen von hPMS1 und hPMS2 erniedrigt.

Der Knockdown von hMLH1 in KMV(HR-EGFP/3´EGFP) Zellen bewirkte mit beiden Vektoren eine 2,5-fache Steigerung der DSB Reparatur (siehe Abbildung 17a). Die Transfektion der KMV(Δ-EGFP/3´EGFP) Zellen ergab 3,9-fach höhere Rekombinationsfrequenzen verglichen mit pRScontrol (Abbildung 17b), zudem ergab sich ein signifikanter Unterschied (P = 0,034) zwischen der Zunahme in KMV(HR-EGFP/3´EGFP) und KMV(Δ-EGFP/3´EGFP) Zellen.

Um diesen Befund mit Meganuklease I-*Sce*I eine physiologische Rolle zuordnen zu können, wurden die Zellen mit DSB induzierenden Agenzien behandelt, wie dem Topoisomerase II Inhibitor Etoposid und der radiomimetischen Substanz Bleomycin. Mit Hilfe dieser Substanzen sollten DSBe induziert werden, ohne dabei die Expression der Meganuklease I-*Sce*I zu induzieren. Wie in Abbildung 17c ersichtlich,

war für beide Agenzien die HR nach hMLH1 Knockdown beinahe 2-fach stimuliert (Etoposid P = 0,035, Bleomycin P = 0,020).

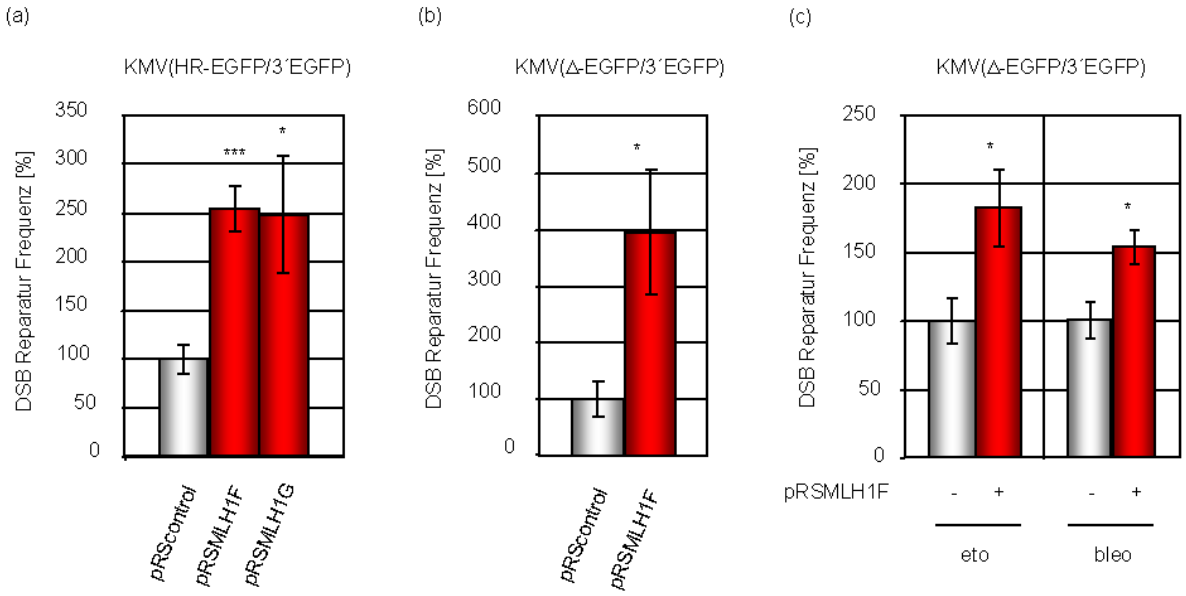

Abbildung 17: Homologie gerichtete DSB Reparaturanalyse mit chromosomal integrierten Reparatursubstraten.
Messung der chromosomalen Rekombination. (a) KMV(HR-EGFP/3'EGFP) und (b) KMV(Δ-EGFP/3'EGFP) Zellen wurden mit dem Meganuklease Expressionsplasmid pCMV-I-*Sce*I und den shRNA Vektoren pRSMLH1F oder pRSMLH1G (vermitteln hMLH1 gerichtete RNAi) oder dem Leervektor (pRScontrol) transfiziert. Zum Vergleich der DSB Frequenzen wurden die Werte mit Kontrollplasmid pRScontrol auf 100 % gesetzt, die anderen Frequenzen nach hMLH1 Knockdown wurden jeweils darauf bezogen. (absolute Werte: HR-EGFP/3'EGFP: 2 x 10^{-4}; Δ-EGFP/3'EGFP: 1 x 10^{-4}). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 4 - 11 Messungen (*, P < 0,05; ***, P < 0,001). (c) Effekt von hMLH1 auf die Rekombination nach Etoposid und Bleomycin Behandlung. KMV(Δ-EGFP/3'EGFP) Zellen wurden mit pRSMLH1F oder dem Leervektor (pRScontrol) transfiziert und mit 50 µM Etoposid (eto) oder 50 mU/ml Bleomycin (bleo) inkubiert. Die Werte des Kontrollplasmids pRScontrol wurden auf 100 % gesetzt. (absolute Werte für 100 %: Für eto und bleo: 2 x 10^{-5}). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 6 Messungen (*, P < 0,05)

Um einen indirekten Effekt des hMLH1 Proteins auf die HR durch eine Störung des NHEJ auszuschließen, wurde die Zelllinie HA290, welche kein funktionelles XRCC4 (nötig für ein effizientes NHEJ) besitzt, untersucht. Nach einem hMLH1 Knockdown zeigte auch diese Zelllinie eine Erhöhung (5-fach, P = 0,035) der HR (Abbildung 18b).

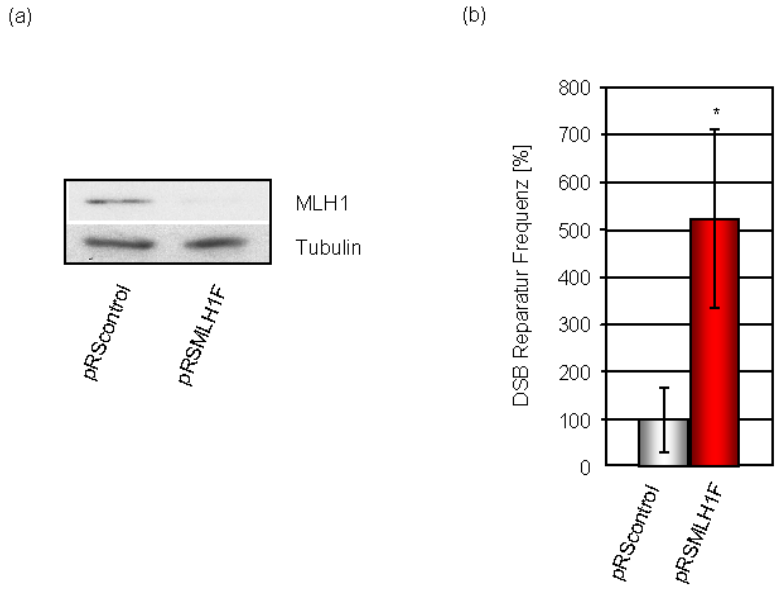

Abbildung 18: DSB Reparatur und Western Blot nach Knockdown von hMLH1 in *XRCC4* mutierten HA290 Zellen.
(a) Western Blot von hMLH1. Zellen wurden nach dem Amaxa Protokoll elektroporiert. Verwendet wurden die Plasmide pCMV-I-*Sce*I, Reparatursubstrat ∆-EGFP/5´EGFP und pRScontrol oder pRSMLH1F. Für die Immundetektion wurden Zelllysate verwendet. Nachdem der hMLH1 Knockdown überprüft worden war, wurde die Auftragsmenge durch Reinkubation des Western Blots mit Anti-Tubulin Antikörper kontrolliert. (b) DSB Reparatur. HA290 Zellen wurden, wie unter (a) beschrieben, transfiziert. Die Messung erfolgte nach 24 h. Die Werte der DSB Reparaturfrequenz für den Leervektor pRScontrol wurden auf 100 % gesetzt (absoluter Wert für 100 %: 1 x 10^{-4}). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 9 Messungen (*, $P < 0,05$)

Da eine Beeinflussung der hMLH1 Proteinmenge auch immer einen Einfluss auf hPMS1 und hPMS2 hat, kann nicht unterschieden werden, ob die Erhöhung der HR ein spezifischer Effekt von hMLH1, hPMS1 oder hPMS2 ist. Es kann aber angenommen werden, dass die hMutL Komplexe die HR als Reaktion auf unterschiedlich induzierte DSBe herunterregulieren. Diese Regulation erfolgt sowohl an extrachromosomalen als auch an chromosomalen DNA Substraten, sie tritt am deutlichsten auf, wenn kurze Homologiebereiche beteiligt sind.

3.1.3 Die hMLH1-vermittelte HR-Regulation bei Fehlen des MMR Proteines hMSH2

Nachdem den hMutL Komplexen eine regulatorische Rolle bei der HR zugewiesen werden konnte, war weiter abzuklären, ob die Regulation der DSB Reparatur unabhängig von der MMR stattfindet. Hierfür wurde der Einfluss des funktionellen

Bindegliedes hMSH2 aus der MMR untersucht. Das hMSH2 Protein stellt das zentrale Molekül der MutS Komplexe dar.

3.1.3.1 Untersuchung der DSB Reparatur in der hMSH2 negativen Zelllinie Lovo

DSB Reparaturmessungen wurden in der humanen kolorektalen Adenokarzinom Zelllinie Lovo durchgeführt. Wie in Abbildung 19 veranschaulicht exprimiert diese, durch eine teilweise Deletion des *MSH2* Genes, kein hMSH2 Protein (O'Regan *et al.*, 1996).

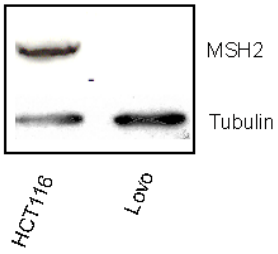

Abbildung 19: Western Blot Analyse von HCT116 und Lovo Zellen zur Überprüfung des hMSH2 Status.
Für die Immundetektion wurden Totalhomogenate eingesetzt. Die hMSH2 Expression wurde überprüft, die Auftragsmenge durch Reinkubation des Western Blots mit Anti-Tubulin Antikörper.

Um die hMLH1 Proteinmenge in den Zellen zu erniedrigen, wurden zwei hMLH1 spezifische synthetische siRNAs (MLH1-1 und MLH1-2) verwendet und gemeinsam mit der Meganuklease I-*Sce*I und dem jeweiligen DSB Reparatur Substrat in die Zellen transfiziert. Als Kontrollen dienten zum einen eine nicht spezifische siRNA und zum anderen zwei siRNAs, die spezifisch gegen hMSH2 gerichtet waren (MSH2-1 und MSH2-2).

Wie in Abbildung 20 ersichtlich, bewirkte der Knockdown von hMLH1 geringe, statistisch nicht signifikante Unterschiede der DSB Reparatur bei den Substraten EJ-EGFP, HR-EGFP/5´EGFP, ∆-EGFP/3´EGFP, HR-EGFP/3´EGFP (P > 0,05). Die Messungen mit dem Substrat ∆-EGFP/5´EGFP zeigten eine signifikante 2,5-fache Zunahme der HR nach hMLH1 Knockdown mittels siRNA (P = 0,011). Zeitgleich wurde in Lovo der Einfluss der Komplexpartner hPMS1 und hPMS2 auf die Regulation der HR vermittelt durch hMLH1, untersucht. So wurden jeweils zwei spezifische siRNAs (bei hPMS1 PMS1-1 und PMS1-2, bei hPMS2 PMS2-1 und PMS2-2) für DSB Reparaturmessungen verwendet. Es zeigte sich das selbe DSB Reparaturmuster wie nach Knockdown von hMLH1 (siehe Abbildung 20). Mit dem

Reparatursubstrat Δ-EGFP/5´EGFP war eine Erhöhung der HR feststellbar, bei hPMS1 2,5-fach (*P* = 0,029) und bei hPMS2 2,4-fach (*P* = 0,031).

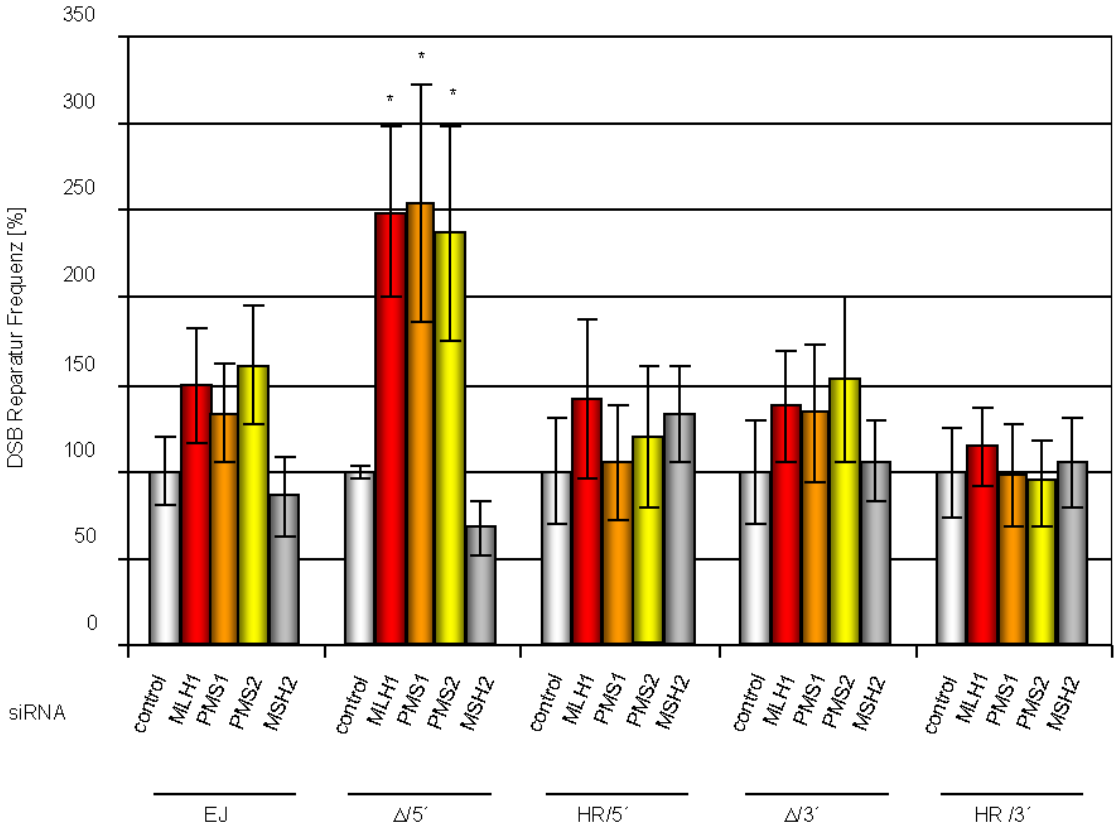

Abbildung 20: DSB Reparatur in hMSH2-negativen Lovo Zellen.
Die Zellen wurden mit dem Meganuklease Expressionsplasmid pCMV-I-*Sce*I und den DSB Reparatursubstraten EJ-EGFP (EJ), Δ-EGFP/5´EGFP (Δ/5´), HR-EGFP/5´EGFP (HR/5´), Δ-EGFP/3´EGFP (Δ/3´) oder HR-EGFP/3´EGFP (HR/3´) und mit jeweils 2 siRNAs gerichtet gegen hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH2 oder einer nicht spezifischen Kontroll siRNA (control) kotransfiziert. Zum direkten Vergleich der DSB Reparatur Frequenzen, wurden die Werte der Kontroll siRNA 100 % gesetzt, die anderen Frequenzen darauf bezogen. (absolute Werte für 100 %: $0{,}7 \times 10^{-2}$ für EJ-EGFP, $1{,}8 \times 10^{-2}$ für Δ-EGFP/5´EGFP, $4{,}3 \times 10^{-2}$ für HR-EGFP/5´EGFP, $8{,}1 \times 10^{-2}$ für Δ-EGFP/3´EGFP und $9{,}2 \times 10^{-2}$ für HR-EGFP/3´EGFP). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 6 bis 12 Messungen (*, $P < 0{,}05$).

Die Verminderung der Proteinmengen nach hMLH1 Knockdown durch siRNA Behandlung wurde mittels Western Blot Analysen (siehe Abbildung 21a) überprüft, densitometrisch quantifiziert und gegen die Auftragskontrolle normalisiert. Dabei konnte eine Reduktion der hMLH1 Proteinmenge, nach 24 h Inkubation auf 37 % bis 38 % der Menge in der Kontrolle festgestellt werden. Die Proteinmengen von hPMS1 und hPMS2 waren nach hMLH1 Knockdown ebenfalls vermindert, jeweils auf 53 – 78 % und 26 – 40 %.

Die Funktionalität der siRNAs gegen hPMS1 und hPMS2 wurde zeitgleich zu hMLH1 mittels Western Blot überprüft, wobei sich eine Reduktion der Proteinmenge von hPMS1 auf 3 – 38 %, von hPMS2 auf 30 – 73 % der Menge in der jeweiligen Kontrolle zeigte (Abbildung 21a). Nach Knockdown von hPMS1 und hPMS2 konnte zudem eine Abnahme des hMLH1 Proteines auf 56 – 87 %, verglichen mit der control siRNA, nachgewiesen werden.

Um unspezifische Effekte der siRNAs auf andere Proteinexpressionen ausschließen zu können, wurde die Expression der Meganuklease I-*Sce*I, Tubulin und dem DNA Reparaturprotein hERCC1 (Daten nicht gezeigt) überprüft, wobei sich keine Auswirkungen auf deren Expression zeigten. Keines dieser Proteine war hinsichtlich seiner Proteinmenge von den siRNAs gegen hMLH1, hPMS1 oder hPMS2 beeinflusst. Zellzyklusanalysen, gezeigt in Abbildung 21b, wiesen keine signifikanten Veränderungen in der Zellzyklusverteilung oder bzgl. Zelltod nach hMLH1 Knockdown auf.

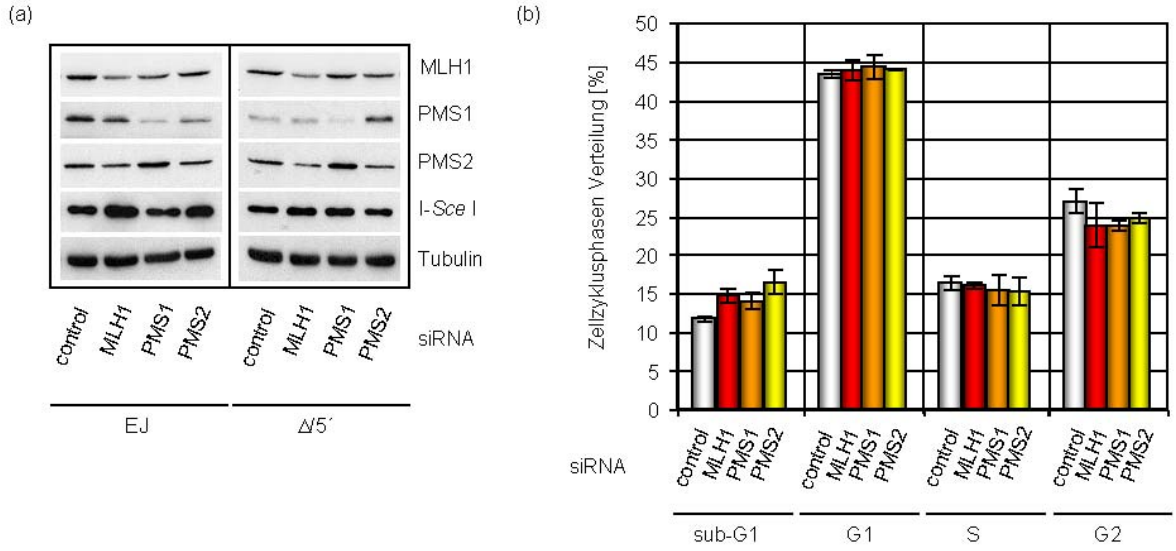

Abbildung 21: Protein Expressions- und Zellzyklus Analysen an Lovo Zellen nach siRNA Transfektion.
(a) Protein Expressionsanalyse. Die verwendeten Zellproben wurden unter DSB Reparatur Messungsbedingungen hergestellt, kotransfiziert mit EJ-EGFP (EJ) oder Δ-EGFP/5´EGFP (Δ/5´), wie in Abbildung 20 beschrieben. Für die Immundetektion wurden Zelllysate eingesetzt. Die Proteinmengen von hMLH1, hPMS1, hPMS2 und HA-tagged I-*Sce*I Meganuklease wurden analysiert. Die Auftragsmenge wurde überprüft durch Reinkubation der Western Blots mit Anti-Tubulin Antikörper. (b) Zellzyklusanalyse. Der DNA Gehalt der Zellen wurde nach PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die sub-G1-Phase indiziert DNA-haltige apoptotische Zellen. Die Angabe der einzelnen Phasen erfolgte in Prozent. Säulen entsprechen den Mittelwerten aus 2 Messungen, Fehlerbalken den Standardabweichungen.

Damit ausgeschlossen werden konnte, dass die DSB Reparaturfrequenz mit den nicht-rsponsiven Substraten, also allen außer Δ-EGFP/5´EGFP, zu hoch war, um eine weitere Zunahme nach hMLH1 Knockdown zu zeigen, wurde in einem anschließenden Experiment das I-*Sce*I Expressionsplasmid titriert. Durch eine verminderte Expression der Meganuklease I-*Sce*I kann die Anzahl der DSB in der Zelle und damit die Reparaturfrequenz verringert werden. Aus Abbildung 22 wird deutlich, dass durch eine I-*Sce*I-Titration eine eventuelle Sättigung der Reparatur-Komplexe ausgeschlossen werden konnte, da bei Entstehung einer kleineren Zahl von DSB keine erhöhte DSB Reparatur aufgrund des Effektes von hMLH1 mit dem HR-EGFP/3´EGFP Substrat nachgewiesen werden konnte.

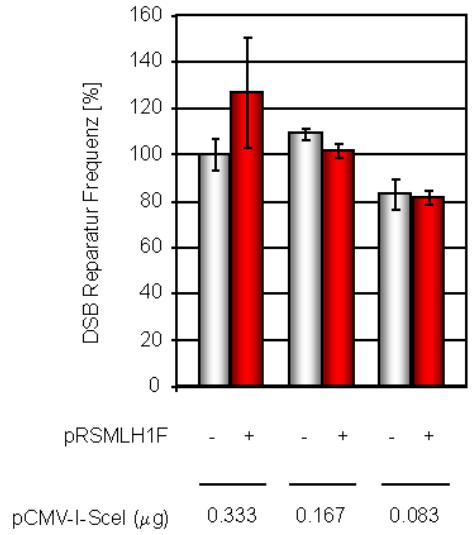

Abbildung 22: DSB Reparatur bei Knockdown von hMLH1 in Lovo Zellen und abnehmender I-*Sce*I Menge.
Lovo Zellen wurden mit den Plasmiden HR-EGFP/3´EGFP, pRScontrol oder pRSMLH1F, und 0,333 µg (wie in Abbildung 20), 0,167 µg oder 0,083 µg pCMV-I-*Sce*I (jeweils 1 µg Gesamt DNA) transfiziert. Messung der Reparatur nach 24 h. Die DSB Reparaturfrequenz von pRScontrol wurde auf 100 % gesetzt. (Absoluter Wert: 5 x 10^{-2} für HR-EGFP/3´EGFP). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 3 Messungen).

Um weiterhin mögliche unspezifische Effekte vermittelt durch siRNAs auszuschließen wurden zwei hMLH1 spezifische siRNAs (MLH1-1 und MLH1-2) in hMLH1 negativen (+dox) und positiven (-dox) 293T-Tel-Off-hMLH1 Zellen verwendet. Auch hier konnte eine Zunahme der HR nach Knockdown von vorhandenem hMLH1 gezeigt werden (siehe Abbildung 23), wohingegen kein Effekt nachweisbar war, wenn kein hMLH1 in der Zelle exprimiert wurde.

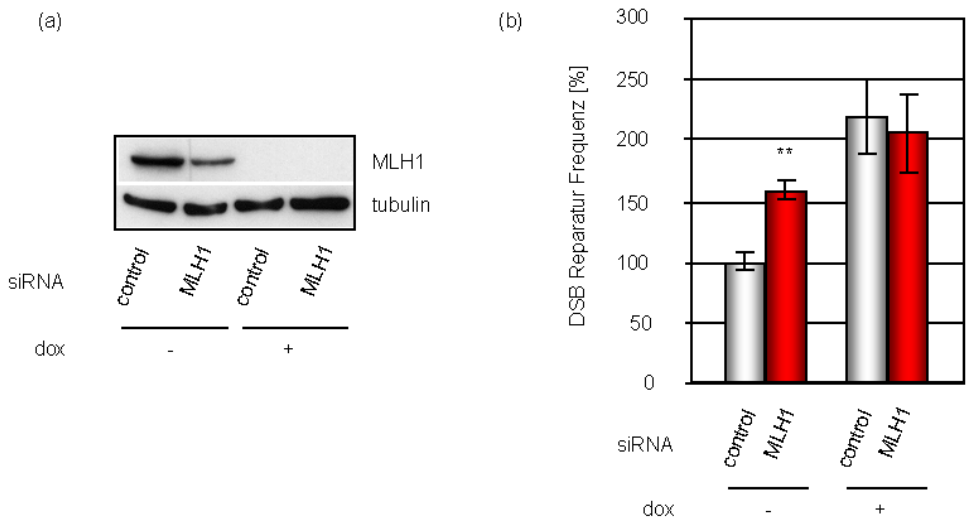

Abbildung 23: Einfluss von hMLH1 Knockdown in 293T-Tel-Off-hMLH1 Zellen mit und ohne hMLH1.
(a) Protein Expressionsanalyse. Die Zellen wurden in Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin kultiviert und mit pCMV-I-*Sce*I, Δ-EGFP/5´EGFP und 2 siRNAs gerichtet gegen hMLH1 oder Kontroll siRNA (control) kotransfiziert. Für die Immundetektion von hMLH1 wurden Zelllysate eingesetzt. Die Auftragsmenge wurde durch Reinkubation des Western Blots mit dem Anti-Tubulin Antikörper überprüft. (b) DSB Reparatur Analyse. Die Transfektion der Zellen erfolgte wie unter (a) beschrieben. Zum besseren Vergleich der DSB Reparaturfrequenzen wurden die Werte mit hMLH1 und Kontroll-siRNA auf 100 % gesetzt. (absoluter Wert für 100 %: 1 x 10^{-3}). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 6 Messungen (**, P < 0,01).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass hMSH2 bei der hMutL vermittelten Regulation der HR keine Rolle spielt, ferner bestätigen die hPMS1 und hPMS2 Knockdown Experimente eine Mitwirkung der MutLα- und MutLβ-Komplexe in diesem regulatorischen Prozess.

3.1.3.2 Untersuchung der DSB Reparatur nach Doppel-Knockdown von hMSH2 und hMLH1 im chromosomalen Umfeld

Um die bisherige Beobachtung einer MutL abhängigen und MMR unabhängigen HR Regulation in einer anderen Zelllinie zu bestätigen, wurden Doppel-Knockdown Experimente in KMV(Δ-EGFP/3´EGFP) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit zwei shRNAs gegen hMSH2 (pRSMSH2-5 und pRSMSH2-8) vortransfiziert und anschließend über 72 h kultiviert. Nach Ablauf der Zeit wurden diese hMSH2-depletierten Zellen mit dem eigentlichen DSB-Reparatur-Mix und pRSMLH1F transfiziert, letzteres um die hMLH1 Expression zu reduzieren (auf jeweils 41 – 45 %, siehe Abbildung 24). Die durchgeführten Zellzyklusanalysen zeigten keinen Einfluss

der Expressionsbeeinflussung von hMLH1 und hMSH2 auf die einzelnen Phasen oder den Zelltod (Daten nicht gezeigt).

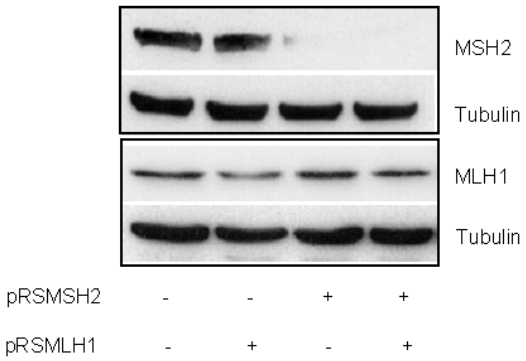

Abbildung 24: Protein Expressionsanalyse mit KMV(Δ-EGFP/3'EGFP) Zellen für hMSH2 und hMLH1 nach Doppel-Knockdown.
Zur Unterdrückung der hMSH2 Expression wurden die Zellen mit den shRNA Vektoren pRSMSH2-5 und pRSMSH2-8 oder pRScontrol elektroporiert und nach 72 h mit pCMV-I-SceI und pRSMLH1F oder pRScontrol kotransfiziert. Die DSB Reparatur Analyse erfolgte weitere 24h später. Für die Immundetektion von hMLH1 und hMSH2 wurden Zelllysate eingesetzt. Die Auftragsmenge wurde durch Reinkubation des Western Blots mit dem Anti-Tubulin Antikörper überprüft.

Die DSB Reparatur Frequenzen sind in Abbildung 25 gezeigt. Unter den gewählten Bedingungen konnte eine 2-fache Zunahme der HR bei normaler hMSH2 Expression (*P* = 0,000) und nach hMSH2 Knockdown (*P* = 0,027) festgestellt werden.

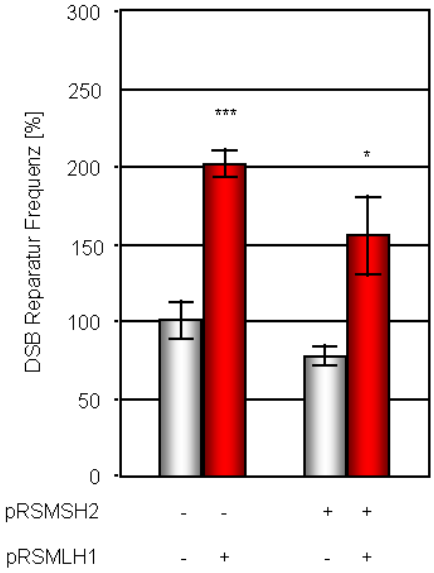

Abbildung 25: DSB Reparatur in hMSH2-defizienten KMV(Δ-EGFP/3'EGFP) Zellen.
Die Zellen wurden elektroporiert, wie unter Abbildung 24 beschrieben. Zum besseren Vergleich der DSB Reparatur Frequenzen wurden die Werte ohne hMSH2 und hMLH1 Knockdown auf 100 % gesetzt. (absoluter Wert: 2 x 10^{-4}). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 6 Messungen (*, *P* < 0,05; ***, *P* < 0,001).

Dies bedeutet, dass hMutL Komplexe die HR unabhängig von hMSH2 in Lovo und in KMV(Δ-EGFP/3´EGFP) Zellen und damit im extra- und intrachromosomalen Kontext regulieren.

3.1.4 Die hMutL-vermittelte HR-Regulation bei Fehlen von ATM, BLM oder BACH1

3.1.4.1 Untersuchung der DSB Reparatur bei Knockdown von hMLH1 in ATM negativen Zelllinien

Für hMLH1, hPMS1 und hPMS2 wurde in der Literatur eine Stimulierung der ATM-Signal Kaskade beschrieben (Duckett *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2004; O'Brien und Brown, 2006) Aus diesem Grunde wurde der Einfluss von ATM auf die hMutL abhängige Regulation der HR in den A-T Zelllinien GM08436A, HA187 und HA126 mit mutiertem ATM untersucht. Für die DSB Reparatur Messungen wurden die Zellen mit dem Substrat Δ-EGFP/5´EGFP, dem Meganuklease Expressionsplasmid I-*Sce*I und dem hMLH1 Knockdown Plasmid pRSMLH1F transfiziert.

In Western Blot Analysen zeigte sich eine Reduzierung der Proteinmenge nach Knockdown auf 22 – 57 %, verglichen mit der Kontrolltransfektion und normalisiert gegen die Auftragskontrolle (Abbildung 26a).

In Abbildung 26b sind die Ergebnisse der DSB Reparatur Messungen dargestellt. Sie zeigen eine 2-fache (P = 0,002), 2,7-fache (P = 0,041) und 1,7-fache (P = 0,031) Erhöhung der HR Frequenzen, nach Verringerung der hMLH1 Expression in GM08436A, HA187 und HA126 Zellen. In den ATM kompetenten Kontrollzellen konnte im Vergleich dazu eine 1,8-fache (P = 0,008) Stimulierung ermittelt werden.

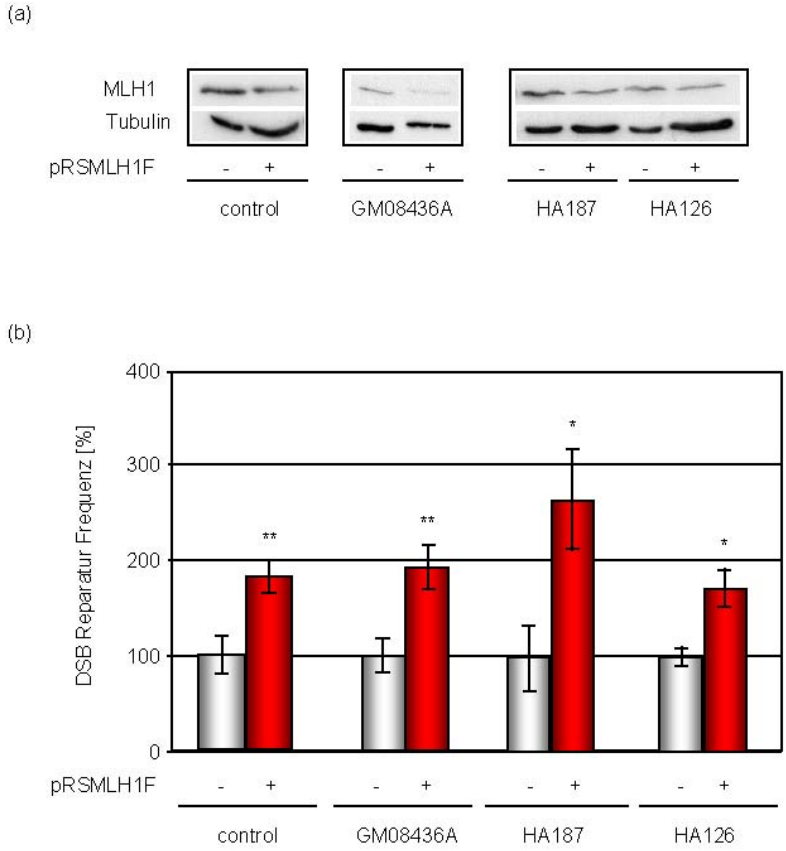

Abbildung 26: DSB Reparatur Frequenz von A-T Zellen nach hMLH1 Knockdown.
GM02253F (control) und die A-T Zellen GM08436A, HA187 und HA126 wurden elektroporiert oder per Amaxa mit den Plasmiden pCMV-I-SceI, Δ-EGFP/5´EGFP, pRSMLH1F oder pRScontrol transfiziert. (a) Protein Expressionsanalysen. Für die Immundetektion von hMLH1 wurden Zelllysate eingesetzt. Die Auftragsmenge wurde durch Reinkubation des Western Blots mit dem Anti-Tubulin Antikörper überprüft. (b) DSB Reparatur Analyse. Die Transfektion der Zellen erfolgte wie bereits beschrieben. Zum besseren Vergleich der DSB Reparatur Frequenzen, wurden die Werte ohne hMLH1 Knockdown auf 100 % gesetzt. (absolute Werte für 100 %: 1 x 10^{-4} für GM02253F, HA187 und HA126, 6 x 10^{-4} für GM08436A). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 6 bis 9 Messungen (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$).

3.1.4.2 Untersuchung der DSB Reparatur nach Doppel-Knockdown der Kinasen ATM und ATR in 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen

Es wurde beschrieben (Shiloh, 2003), dass die Kinase ATR ein sehr ähnliches Substratspektrum wie ATM aufweist. Daher ist es möglich, dass ATR Funktionen von ATM übernimmt und so dessen Verlust kompensiert. Aus diesem Grunde wurde die HR nach Gen Knockdown der Kinasen ATM und ATR mit den shRNA Plasmiden pSHAG-ATM und pSHAG-ATR (Collis *et al.*, 2003) in 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen untersucht.

In hMLH1 exprimierenden Zellen war die Proteinexpression von ATM und ATR auf 50 - 60 %, in hMLH1 Zellen ohne Expression auf 0 – 40 % reduziert (Abbildung 27a).

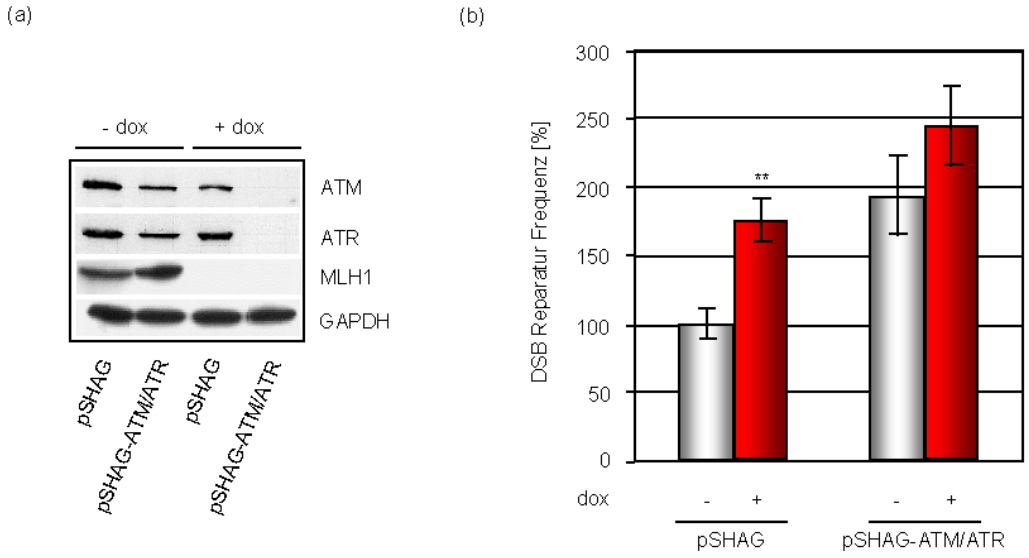

Abbildung 27: HR nach ATM und ATR Knockdown in 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen.
(a) Protein Expressionsanalyse. Die Zellen wurden in Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin kultiviert und mit pCMV-I-*Sce*I, Δ-EGFP/5´EGFP und den shRNA Vektoren pSHAG-ATM, pSHAG-ATR oder pSHAG kotransfiziert. Für die Immundetektion (12 h nach Transfektion) von hMLH1, ATM und ATR wurden Zelllysate eingesetzt. Kontrolle der Auftragsmenge durch Reinkubation mit Anti-GAPDH Antikörpern. (b) DSB Reparatur Analyse. Die Transfektion der Zellen erfolgte wie unter (a) beschrieben. Zum besseren Vergleich der DSB Reparaturfrequenzen wurden die Werte mit hMLH1 Expression ohne Knockdown auf 100 %. (absolute Wert für 100 %: 1×10^{-3}). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler zu 15 bis 21 Messungen (**, $P < 0{,}01$).

Wie in Abbildung 27b gezeigt, bewirkte das Ausschalten von hMLH1 (+ dox) eine 1,8-fache Zunahme (P = 0,001) der HR Frequenz bei Verwendung des Δ-EGFP/5´EGFP Substrates. Nach ATM/ATR Doppel-Knockdown, führte der Verlust von hMLH1 zu einer 1,3-fachen, nicht signifikanten Zunahme der HR Aktivität (P = 0,227). Interessanterweise bewirkte der Knockdown von ATM und ATR, ohne hMLH1 Beeinflussung (- dox), eine 1,9-fache Erhöhung (P = 0,002) und bei Unterdrückung von hMLH1 (+ dox) eine 1,4-fache (P = 0,004) Stimulation der HR. Diese Beobachtungen demonstrieren eine Beteiligung des ATM/ATR Signalweges bei dem anti-rekominogenen Effekt der hMutL Komplexe.

3.1.4.3 Untersuchung der DSB Reparatur bei Knockdown von hMLH1 in BLM negativen Zelllinien

Die RecQ Helikase BLM, welche ein Phosphorylierungssubstrat von ATM darstellt, hat Funktionen unter anderem bei der Regulation der HR. Zudem wurde sie als Interaktionspartner von hMLH1 identifiziert (Pedrazzi *et al.*, 2001). Um eine Beteiligung von BLM bei der Regulation der HR durch hMLH1 zu analysieren, wurde für HR Messungen die lymphoblastoide Bloom Syndrom Zelllinie GM03403 mit mutiertem BLM verwendet. Nach Transfektion der Zellen mit den Plasmiden pCMV-I-*Sce*I, ∆-EGFP/5´EGFP und pRSMLH1F erfolgte die Überprüfung der Proteinmenge von hMLH1 via Western Blot und ergab eine Reduktion der hMLH1 Proteinmenge auf 62 % (Abbildung 28a). Zudem konnte eine 12-fache (P = 0,048) Erhöhung der HR nach hMLH1 Knockdown nachgewiesen werden (Abbildung 28b).

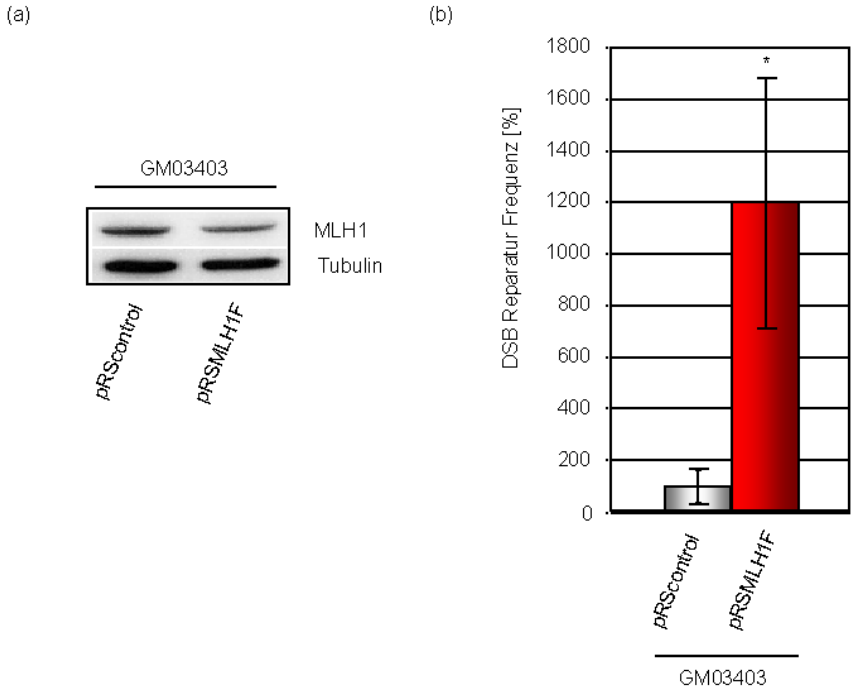

Abbildung 28: HR nach hMLH1 Knockdown in Bloom-Syndrom Zellen GM03403.
Die Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV-I-SceI, ∆-EGFP/5´EGFP, pRSMLH1F oder pRScontrol gemäß Amaxa Protokoll transfiziert, (a) Protein Expressionsanalysen. Für die Immundetektion von hMLH1 wurden Zelllysate eingesetzt. Kontrolle der Auftragsmenge durch Reinkubation mit Anti-Tubulin Antikörpern. (b) DSB Reparatur Analyse. Die Transfektion der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Zum besseren Vergleich der DSB Reparaturfrequenzen, wurden die Werte der pRScontrol Transfektion auf 100 % gesetzt. (absoluter Wert für pRScontrol: 2 x 10^{-5}). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler zu 6 Messungen (*, P < 0,05).

Gleichzeitig wurde die Untersuchung auch mit der immortalisierten Bloom Syndrom Fibroblastenlinie GM08505 Flg5 und mit der rekonstituierten, BLM-positiven Linie Gal13 durchgeführt. Der Knockdown von hMLH1 erfolgte mittels siRNA auf ein Proteinniveau im Vergleich zur Kontrolle von 37 – 45 % (Abbildung 29a). Messungen der HR Frequenzen ergaben in BLM-negativen Zellen eine 1,9-fache Erhöhung (P = 0,009), In BLM-positiven Zellen hingegen eine 2,7-fache Stimulierung (P = 0,013) (siehe Abbildung 29b).

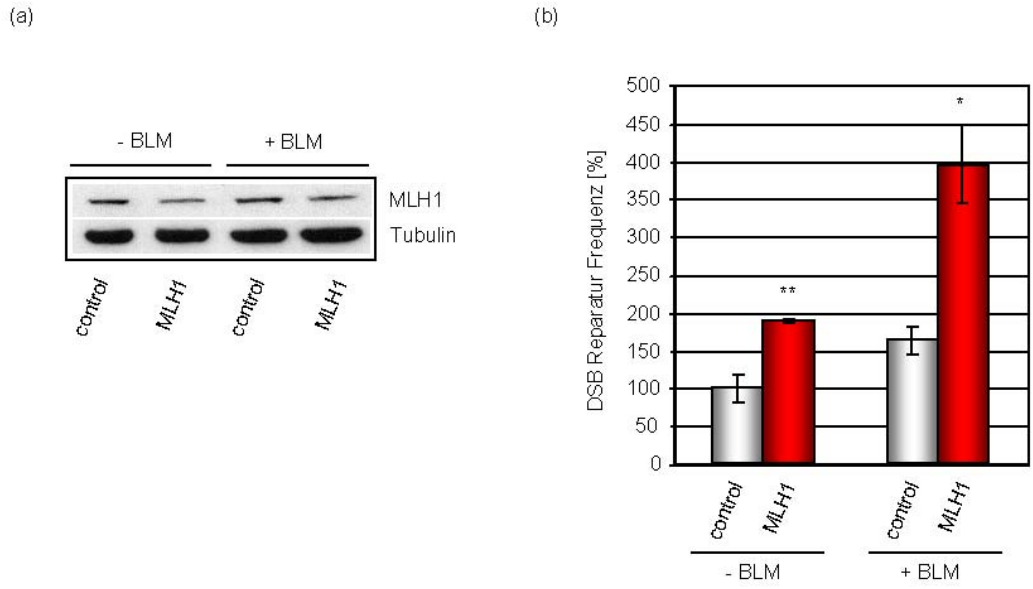

Abbildung 29: HR in GM08505 Flg5 und der rekonstitutierter BLM positiven Zelllinie GM08505 Gal13.
Die Fibroblasten Zelllinien wurde gemäß Amaxa Protokoll mit den Plasmiden pCMV-I-SceI, ∆-EGFP/5´EGFP und den Kontroll siRNA (Allstars negative control) oder 2 siRNAs gegen hMLH1 transfiziert. (a) Protein Expressionsanalysen. Für die Immundetektion von hMLH1 wurden Zelllysate verwendet. Die Auftragsmenge wurde durch Reinkubation mit Anti-Tubulin Antikörpern kontrolliert. (b) DSB Reparatur Analyse. Die Transfektion der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Zum besseren Vergleich der DSB Reparatur Frequenzen wurden Werte für die Kontroll siRNA in BLM-negativen Zellen auf 100 % gesetzt. (absoluter Wert für 100 %: 2 x 10^{-3}). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 3 Messungen (*, P < 0,05; **, P < 0,01).

Weder in den A-T Zelllinien, den BLM Syndrom Zellen noch in den 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen konnten Unterschiede in der ZellzyKlusverteilung noch bzgl. Zelltod nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.1.4.4 Untersuchung der DSB Reparatur nach Knockdown von BACH1 in 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen

Neueste Untersuchungen zur BRCA1 assoziierten Helikase BACH1/BRIP1/FANCJ zeigten ein Bindevermögen von hMLH1 (Peng *et al.*, 2007). Um zu beurteilen, ob diese Interaktion Einfluss auf die Regulation der HR hat, wurde die DSB Reparatur nach Knockdown der Helikase BACH1 mit 2 siRNAs (je 5 nM) in 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen analysiert.

Die Proteinexpression von BACH1, Abbildung 30a, war in hMLH1 exprimierenden Zellen auf 40 % reduziert, in Zellen ohne hMLH1 Expression auf 50 %. In den 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen konnten keine Unterschiede in der Zellzyklusverteilung oder bzgl. Zelltod nachgewiesen werden (Abbildung 30b). Wie in Abbildung 30c gezeigt, bewirkte das Ausschalten von hMLH1 (+ dox) eine 2,3 fache Zunahme (P = 0,0021) der HR Frequenz bei Verwendung des ∆-EGFP/5´EGFP Substrates. Nach BACH1 Knockdown zeigte sich bei vorhandener hMLH1 Expression eine 1,8 fache, nicht signifikante Zunahme der HR Aktivität (P = 0,21). Der Knockdown von BACH1 bei zusätzlicher Unterdrückung von hMLH1 (+ dox) zeigte eine ähnliche Stimulation (2,3 fach, P = 0,0047) der HR wie die Kontrolle, bei vorhandener hMLH1 Expression.

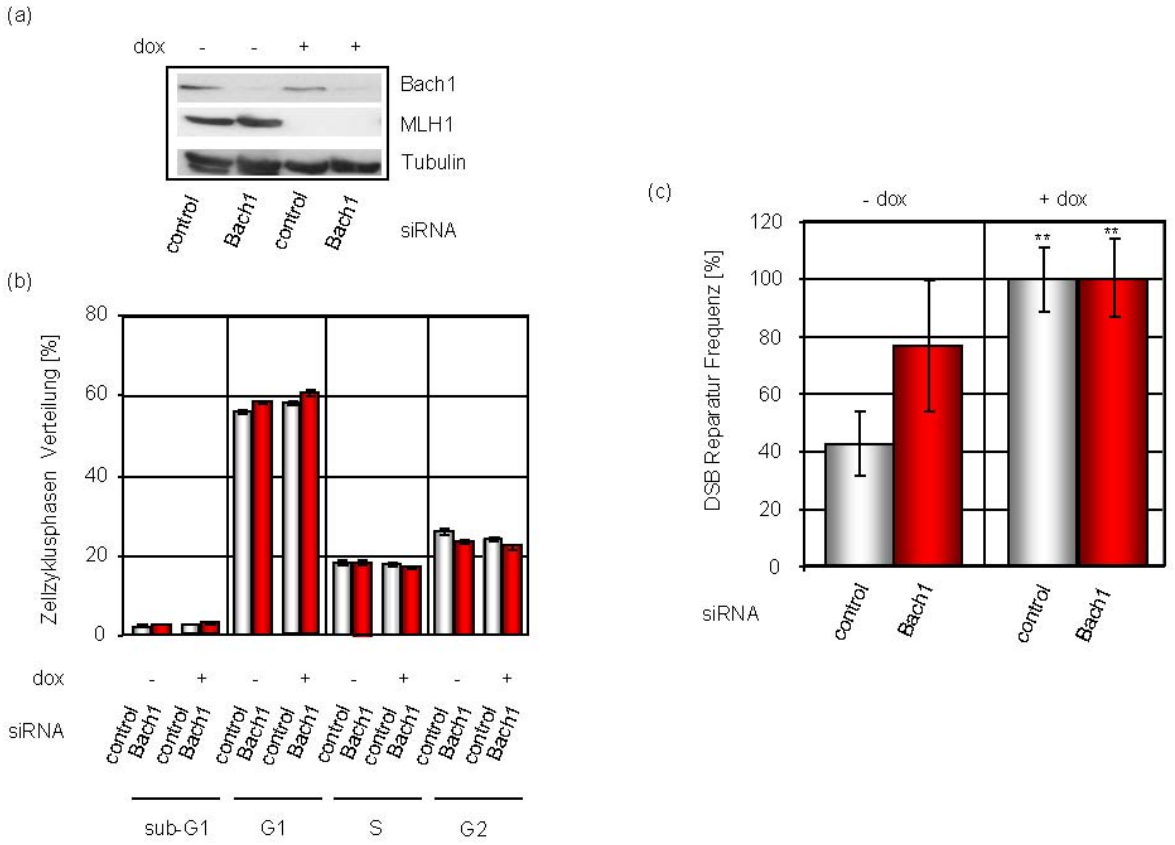

Abbildung 30: HR nach BACH1 Knockdown in 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen.
(a) Protein Expressionsanalyse. Die Zellen wurden in Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin kultiviert und mit pCMV-I-*Sce*I, Δ-EGFP/5´EGFP und den Kontroll siRNAs Allstars negativ control oder 2 siRNAs gerichtet gegen BACH1 kotransfiziert. Die Immundetektion von hMLH1 und BACH1 erfolgte 24h nach Transfektion unter Verwendung von Zelllysaten. Kontrolle der Auftragsmenge durch Reinkubation mit Anti-Tubulin Antikörpern. (b) Zellzyklusanalyse. Der DNA Gehalt der Zellen wurde nach PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Angabe der einzelnen Phasen erfolgt in Prozent. Säulen repräsentieren Mittelwerte aus 2 Messungen, Fehlerbalken Standartabweichungen. (c) DSB Reparaturanalyse. Die Transfektion der Zellen erfolgte wie unter (a) beschrieben. Zum besseren Vergleich der DSB Reparaturfrequenzen, wurden die Werte ohne hMLH1 und mit BACH1 Expression 100 % gesetzt. (absoluter Wert: 2,5 x 10^{-3}). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler zu 12 Messungen (**, $P < 0{,}01$).

3.1.4.5 Untersuchung der DSB Reparatur bei Knockdown von hMLH1 in BACH1 negativen Zelllinien

Zur weiteren Abklärung des Zusammenspiels von hMLH1 und BACH1 wurde die DSB Reparatur in *BACH1*-null Fanconi-Anämie Fibroblasten analysiert. Es konnte eine Unterdrückung von hMLH1 in F-A J Zellen auf 19 % nachweisen werden (Abbildung 31a). Bei Messungen der HR zeigte sich eine 2,7-fache Zunahme (P = 0,039) nach hMLH1 Verlust (Abbildung 31b).

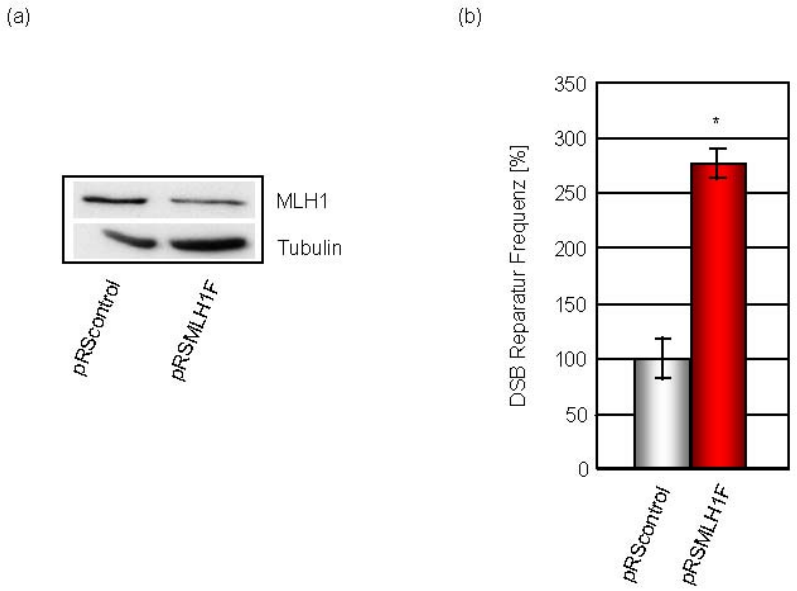

Abbildung 31: HR nach Knockdown von hMLH1 in Zellen mit mutiertem *FANCJ*.
F-A J Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV-I-SceI, Δ-EGFP/5´EGFP, pRSMLH1F oder pRScontrol gemäß Amaxa Protokoll transfiziert. (a) Protein Expressionsanalyse von hMLH1 in F-A J Zellen. Die Immundetektion erfolgte 24 h nach Transfektion unter Verwendung von Zelllysaten. Kontrolle der Auftragsmenge durch Reinkubation mit Anti-Tubulin Antikörpern. (b) DSB Reparatur Analyse. Die Transfektion der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Zum besseren Vergleich der DSB Reparatur Frequenzen wurden die Werte der Kontrolle auf 100 % gesetzt. (absoluter Wert: 1 x 10^{-4}). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 6 Messungen; *, P < 0,05).

Diese Ergebnisse zeigen, dass weder BLM noch BACH1 grundsätzlich für die hMutL abhängige Unterdrückung der homologen Rekombination notwendig sind. Eine partielle Beteiligung von sowohl BLM als auch BACH1 bei dem anti-rekominogenen Effekt der hMutL Komplexe ist jedoch weiterhin vorstellbar.

3.2 Einfluss des hMSH2 Proteins auf die DSB Reparaturmechanismen

In Säugetierzellen ist beschrieben, dass MSH2, MSH3 und MSH6 die Rekombination zwischen divergierenden Sequenzen verhindern (Abuin *et al.*, 2000; de Wind *et al.*, 1995; Elliott und Jasin, 2001). Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung der MutS Komplexe in Prokaryoten und niederen Eukaryoten bei der Genauigkeitskontrolle der homologen Rekombination. Über eine mögliche Beteiligung des Rad51 Proteines wird diskutiert (Surtees *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der MutS Komplexe auf die verschiedenen DSB Reparatur Wege in humanen Zellen untersucht werden.

Hierfür wurde in der hMSH2 negativen, humanen kolorektalen Adenokarzinom Zelllinie Lovo (O'Regan *et al.*, 1996) die exogene Expression des Proteines über cDNA vermittelt. Es wurden stabile hMSH2 Klone generiert. Für weitere Untersuchungen erfolgte die Expression von hMSH2 transient.

Zudem sollte der Einfluss der ATP-Hydrolyse durch hMSH2 auf die DSB Reparatur abgeklärt werden. Durch eine Mutation im *hMSH2* Gen wurde von meiner Vorgängerin Marion Kurth, Hamburg, ein Protein mit defekter ATP-Bindestelle (K675A) generiert. Durch *in vitro* Mutagenese wurde die hydrophile positiv geladene Aminosäure Lysin (Basentriplett hier AAA) an Position 675 durch das hydrophobe Alanin (Basentriplett hier GCC) ersetzt, wodurch die Funktionalität der ATP-Bindestelle zerstört wurde.

Bei Mäusen wurde beschrieben, dass die Mutation (Msh2G674A) in MSH2 zu einer Inaktivierung der ATPase-Aktivität führt. Die Mutation hat keinen Einfluss auf die Signalkaskade der Apoptose oder die Basenfehlpaarungserkennung. Jedoch wird die Mismatch-Reparatur verhindert, da durch die fehlende Konformationsveränderung des MutSα-Komplexes nachgeschalteter Proteine, wie MLH1, PMS2 oder Exo1, nicht rekrutiert und aktiviert werden (Martin *et al.*, 2003). Eine weitere Studie charakterisiert die Hemmung der ATPase-Aktivität des MutSα-Komplexes durch Cadmium (Banerjee und Flores-Rozas, 2005). Hier wird die Erkennung der Basenfehlpaarung nicht beeinflusst, es findet auch hier keine Mismatch-Reparatur statt.

3.2.1 Einfluss des hMSH2 Proteines auf die DSB Reparatur in Zellklonen mit induzierbarer Expression

Im pGC-Vektorsystem unterliegt die Genexpression der Kontrolle des Gal4-Promotors. Der Vektor pMVGalERVP ermöglicht die Expression eines Hybridproteins (GalER) aus der DNA-Bindedomäne des Gal4 Proteins der Hefe und der Östrogen-bindedomäne des Menschen. Auf dem Vektor pGC befindet sich eine Gal4 Bindestelle. Nach Östrogengabe findet die Expression des dieser Bindestelle nachgeschalteten Genes, hier *hMSH2*, statt. Durch die induzierbare *hMSH2* Expression war es meiner Vorgängerin Silke Süße, Hamburg möglich stabile Klone zu isolieren, da die Erfahrungen aus anderen Laboren zeigte, dass konstitutive Expression toxisch wirken kann.
Um die Vergleichbarkeit der Klone sicherzustellen, ermittelte ich zunächst die Generationszeiten. Die Zeitwerte sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Generationszeiten von Lovo und abgeleiteten hMSH2 exprimierenden Klonen.

Generationszeiten (h)							
Lovo		Lovo Klon 6		Lovo Klon 7		Lovo Klon 8	
Östradiol +	Östradiol -	Östradiol +	Östradiol -	Östradiol +	Östradiol -	Östradiol +	Östradiol -
23 h	23 h	20 h	23 h	28 h	18 h	24 h	27 h

Unter dem Einfluss von Östradiol, also bei induzierter hMSH2 Expression, zeigte Klon 6 eine Generationszeit von 20 h, Klon 7 von 28 h und Klon 8 von 24 h. Für die Ursprungszelllinie Lovo konnte eine ähnliche Generationszeit von 23 h ermittelt werden.
Die Überprüfung der Expression des hMSH2 Proteines erfolgte via Western Blot Analysen. In allen drei Klonen konnte eine erfolgreiche Expression des hMSH2 Proteines nachgewiesen werden (Abbildung 32a). Der Einfluss des induziert exprimierten hMSH2 Proteines auf den Zellzyklus ist in Abbildung 32b dargestellt. Bei Klon 6 und Klon 7 war eine leichte Verschiebung der S-Phase in Richtung G2-Phase nachweisbar. Klon 8 zeigte eine leicht erhöhte sub-G1-Phase und eine Verringerung der G2-Phase.

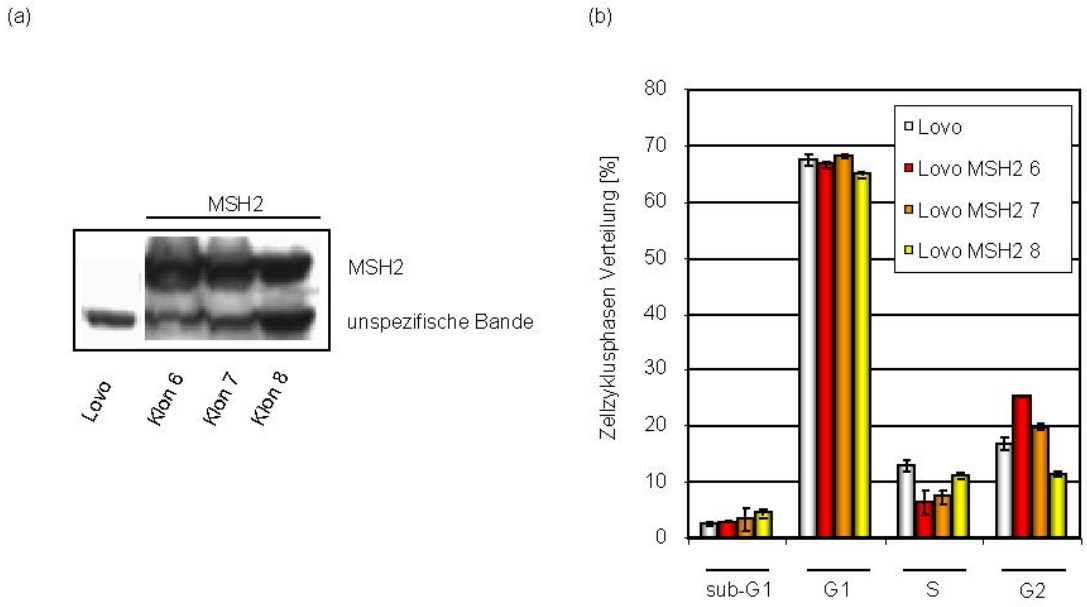

Abbildung 32: Protein Expressions- und Zellzyklus Analysen an stabilen hMSH2 Lovo Klonen.
(a) Protein Expressionsanalyse. Die verwendeten Zellproben wurden unter DSB Reparatur Messungsbedingungen hergestellt, nämlich hier kotransfiziert mit Δ-EGFP/5´EGFP (Δ/5´) und pCMV-I-SceI. Für die Immundetektion wurden Zellhomogenate eingesetzt. Die Auftragsmenge wurde überprüft durch eine unspezifische Bande hervorgerufen durch Interaktion des MSH2 Antikörpers mit einem Protein mit kleinerem Molekulargewicht. (b) Zellzyklusanalyse. Der DNA Gehalt der Zellen wurde nach PI-Färbung durchfluss-zytometrisch bestimmt. Die sub-G1-Phase indiziert DNA-haltige apoptotische Zellen. Die Angabe der einzelnen Phasen erfolgte in Prozent. Säulen entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen, Fehlerbalken Standardabweichungen.

Bei den DSB Reparatur Messungen (siehe Abbildung 33) zeigte sich für Substrat EJ-EGFP in Lovo MSH2 Klon 6 eine statistisch nicht signifikante Abnahme der DSB Reparatur für ($P > 0,05$). Für die MSH2 Klone 7 und 8 war eine 3,3-fache, statistisch signifikante Abnahme der DSB Reparatur für EJ-EGFP ($P = 0,0001$) nachweisbar.

Für das Substrat Δ-EGFP/5´EGFP konnte in Klon 8 eine signifikante 1,7-fache Erhöhung der HR ($P = 0,008$) nachgewiesen werden, die beiden anderen Klone zeigten für das Rekombinationssubstrat Δ-EGFP/5´EGFP statistisch nicht signifikante Zunahmen der DSB Reparatur ($P > 0,05$).

Für das Reparatursubstrat HR-EGFP/5´EGFP zeigte sich in Klon 8 eine 4-fache Verringerung ($P = 0,0062$) der Reparaturfrequenz. In Klon 6 und Klon 7 war keine Signifikanz nachweisbar.

Auch für das Reparatursubstrat Δ-EGFP/3´EGFP waren keine statistisch signifikanten Veränderungen der Reparaturfrequenz festzustellen. Bei der Untersuchung der HR und des SSAs mit ausreichenden Homologiebereichen (HR-

EGFP/3´EGFP) waren signifikante Erhöhungen der Reparaturfrequenz für alle drei Klone nachweisbar (Klon 6: 2,6-fache Erhöhung, *P* = 0,012; Klon 7: 1,6-fache Erhöhung, *P* = 0,009; Klon 8: 1,5-fache Erhöhung, *P* = 0,016).

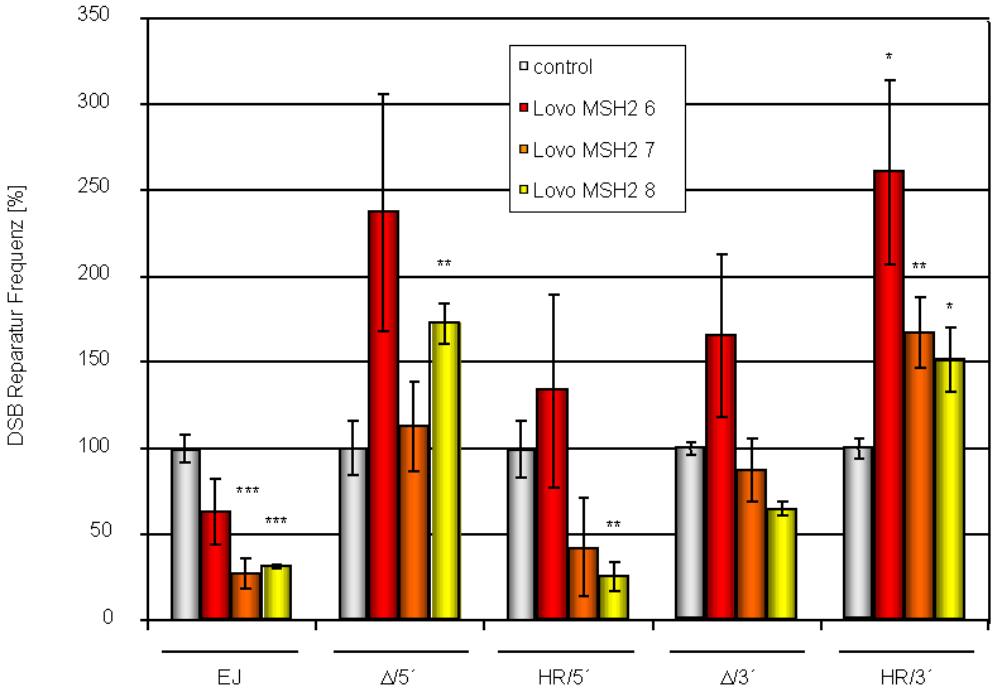

Abbildung 33: DSB Reparatur in Lovo Klonen nach induzierter hMSH2 Expression.
Die Zellen wurden mit dem Meganuklease Expressionsplasmid pCMV-I-*Sce*I und den DSB Reparatursubstraten EJ-EGFP (EJ), Δ-EGFP/5´EGFP (Δ/5´), HR-EGFP/5´EGFP (HR/5´), Δ-EGFP/3´EGFP (Δ/3´) oder HR-EGFP/3´EGFP (HR/3´) kotransfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels Reagenz FuGENE 6 und 2 µg Gesamt-DNA, die DSB-Reparatur-Messung erfolgte 24h nach Transfektion. Die Werte der Kontrolle (control) wurden gemittelt aus der hMSH2 negativen Zelllinie Lovo und Lovo mutMSH2 Klon 5. Dieser zeigte keine Expression des Proteines. Zum besseren Vergleich der DSB Reparaturfrequenzen wurden die Kontroll Werte auf 100 % gesetzt, die anderen Frequenzen jeweils darauf bezogen. (absolute Werte für 100 %: 0,22 x 10^{-2} für EJ-EGFP; 0,16 x 10^{-2} für Δ-EGFP/5´EGFP; 0,07 x 10^{-2} für HR-EGFP/5´EGFP; 0,73 x 10^{-2} für Δ-EGFP/3´EGFP; 1,1 x 10^{-2} für HR-EGFP/3´EGFP). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 6 bis 9 Messungen (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Es wird angenommen, dass das NHEJ in mitotisch wachsenden Zellen während der G1 und frühen S-Phase des Zellzyklus, eine größere Rolle spielt. Die HDR kommt hingegen während der Meiose und in mitotisch wachsenden Zellen bei vorhandenen Schwesterchromatiden (späte S- und G2-Phase) vermehrt zum Tragen (Jackson und Jeggo, 1995; Lee *et al.*, 1997; Takata *et al.*, 1998). Da bei den Zellzyklusanalysen kein signifikanter Effekt auf die G1-Phase feststellbar war, kann die Erniedrigung des NHEJ auf den Einfluss des hMSH2 Proteines zurückgeführt werden. Da die HDR hauptsächlich in der späten S- und G2-Phase stattfindet, kann man Unterschiede in

diesen beiden Phasen vernachlässigen. Somit ist auch in allen Klonen die nachweisbare Erhöhung der HDR auf eine direkte Wirkung zurückzuführen.

3.2.2 Einfluss des hMSH2 Proteines auf die DSB Reparatur nach transienter Expression

Weiterhin sollte der Einfluss der ATP-Hydrolyse von hMSH2 auf die DSB Reparatur abgeklärt werden. Durch eine Mutation im *hMSH2* Gen wurde von Marion Kurth, Hamburg, ein Protein mit defekter ATP-Bindestelle (K675A) generiert. Durch *in vitro* Mutagenese wurde die hydrophile positiv geladene Aminosäure Lysin (Basentriplett hier AAA) an Position 675 durch das hydrophobe Alanin (Basentriplett hier GCC) ersetzt, wodurch die Funktionalität der ATP-Bindestelle zerstört wurde. Da es trotz wiederholter Versuche meiner Vorgängerin Silke Süße, Hamburg, nicht gelungen war stabile Klone für die induzierbare Expression von mutiertem MSH2 (mutMSH2) zu generieren, sollten wtMSH2 und mutMSH2 nach transienter Proteinexpression in ihrer Funktionalität verglichen werden.

3.2.2.1 Herstellung der Plasmide pcDNA3wtMSH2 und pcDNA3mutMSH2

Für transiente Untersuchungen sollte die Expression des hMSH2 Proteines dem CMV-Promotor unterstellt werden. Die notwendigen cDNA Fragmente wurden zunächst über einen *Xba*I *Sal*I Doppelverdau der Plasmide pGCwtMSH2 und pGCmutMSH2 isoliert. Anschließend wurden die Enden der Fragmente durch eine Klenow *Fill-in* Behandlung geglättet und in pcDNA3 (*Eco*RV Verdau, mittels Shrimp Alkaline Phosphatase dephosphoryliert) ligiert. Nach erfolgter Transformation in *E. coli* DH5α und anschließender Selektion auf Ampicillin Agarplatten, wurden 48 Klone isoliert und per Restriktionsanalyse charakterisiert. Das Klonierungsschema ist in Abbildung 34 dargestellt. Für die Restriktionsanalyse wurden die Enzyme *Xho*I, *Pvu*I, *Sma*I und *Hin*dIII eingesetzt.

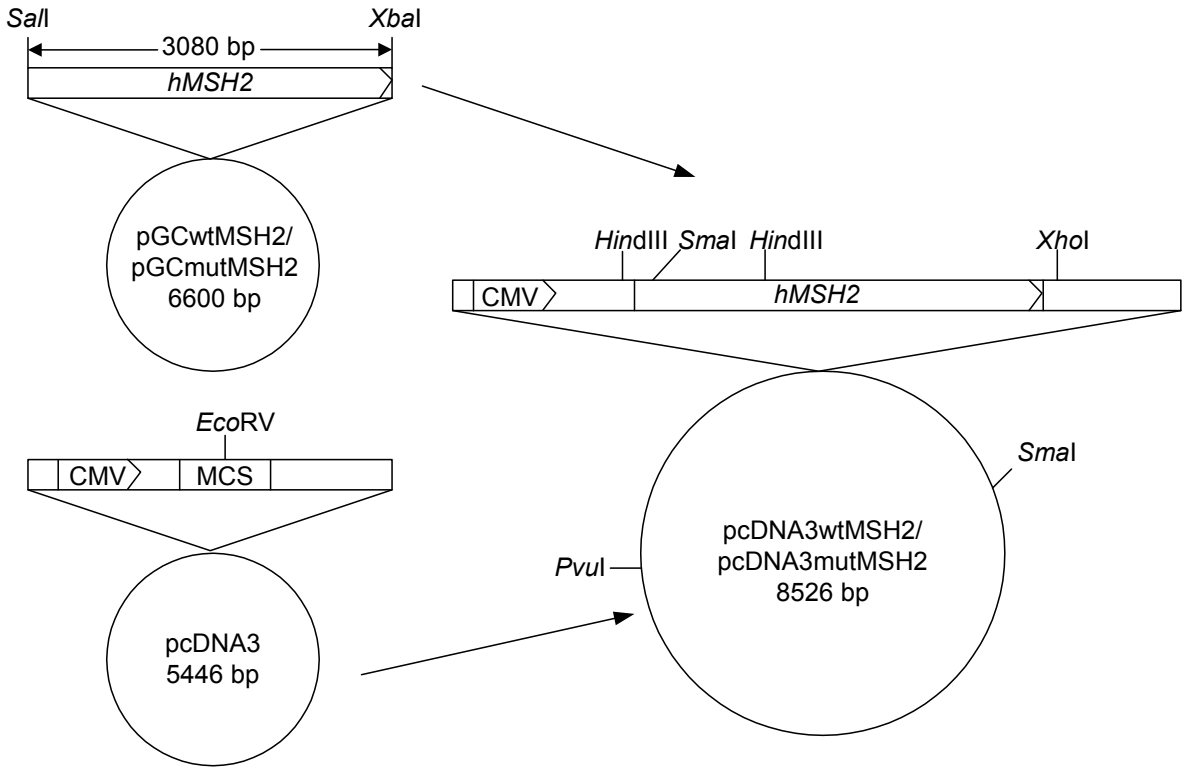

Abbildung 34: Schematische Darstellung der Klonierung der Plasmide pcDNA3wtMSH2 und pcDNA3mutMSH2.
Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit sind nur die relevanten Restriktionsschnittstellen und Plasmidbereiche eingezeichnet. CMV stellt den CMV Promotor dar. MCS definiert die *multiple cloning site*. Das hMSH2 Gen (*hMSH2*), die MCS und CMV sind nicht maßstabsgetreu abgebildet.

3.2.2.2 DSB Reparatur nach transienter hMSH2 Expression

Bei den transienten Untersuchungen zum Einfluss des hMSH2 Proteines auf die DSB Reparatur erfolgte die Expression der hMSH2 Proteine in der hMSH2 negativen Zelllinie Lovo. Die Expression des mutMSH2 und wtMSH2 Proteines wurde mittels Western-blot überprüft (siehe Abbildung 35a). Nach Rekonstitution des hMSH2 Proteines waren auch die Komplexpartner hMSH6 und hMSH3 wieder nachweisbar. Es wurde bereits gezeigt, dass hMSH2 für die Stabilisierung der Komplexpartner notwendig ist (Marra *et al.*, 1998). Die Expression von mutiertem MSH2 war um den Faktor 1,4 höher als die Expression von wtMSH2. Trotz des höheren mutMSH2 Gehaltes in den Zellen, war der Proteingehalt der Komplexpartner hMSH3 und hMSH6 geringer (Proteingehalt MSH3: 44 %; MSH6: 55 %), im Vergleich zu wtMSH2 exprimierenden Lovo Zellen. Die Mutation der ATP-Bindestelle beeinflusst die Komplexbildung, es konnte jedoch sowohl hMSH3 als auch hMSH6 nachgewiesen werden.

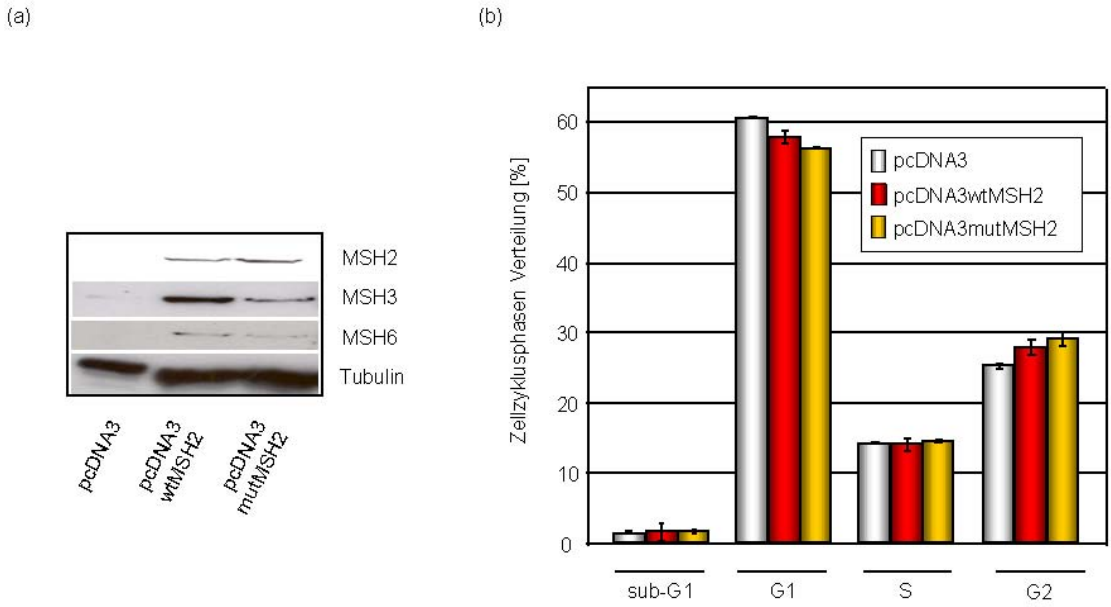

Abbildung 35: Protein Expressions- und Zellzyklus Analysen an Lovo Zellen nach transienter hMSH2 Expression.
(a) Protein Expressionsanalyse. Die verwendeten Zellproben wurden unter DSB Reparatur Messbedingungen hergestellt, hier mit Δ-EGFP/5´EGFP (Δ/5´) und pCMV-I-SceI kotransfiziert. Für die Immundetektion wurden Zelllysate eingesetzt. Kontrolle der Auftragsmenge durch Reinkubation mit Anti-Tubulin Antikörpern. (b) Zellzyklusanalyse. Der DNA Gehalt der Zellen wurde nach PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die sub-G1-Phase indiziert DNA-haltige apoptotische Zellen. Die Angabe der einzelnen Phasen erfolgte in Prozent. Säulen entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen, Fehlerbalken Standardabweichungen.

Die Zellzyklusanalyse zeigte eine leichte Abnahme der G1-Phase und eine leichte Zunahme der G2-Phase für pcDNA3mutMSH2 und schwächer ausgeprägt für pcDNA3wtMSH2 transfizierte Lovo Zellen (siehe Abbildung 35b).

Bei den DSB Reparatur Messungen, Abbildung 36, konnten für alle DSB-Reparatursubstrate signifikante Erhöhungen der Reparaturfrequenz, nach Expression von wtMSH2, nachgewiesen werden.
Die Steigerung der Reparaturfrequenzen war für EJ-EGFP 2,4-fach (P = 0,0001), für Δ-EGFP/5´EGFP (1,8-fach, P = 0,0037), für HR-EGFP/5´EGFP (2,2-fach, P = 0,0007), für Δ-EGFP/3´EGFP (1,3-fach, P = 0,0045), für HR-EGFP/3´EGFP (1,5-fach, P = 0,0016) und für 5´EGFP/HR-EGFP (1,7-fach, P = 0.0001).
Nach Expression des hMSH2 Proteines mit defekter ATP-Bindestelle wurden ebenfalls DSB Reparatur Messungen durchgeführt. Auch hier konnten signifikante Erhöhungen der Frequenz für die Substrate EJ-EGFP (2-fach, P = 0,0001), für Δ-EGFP/5´EGFP (1,6-fach, P = 0,033), für HR-EGFP/5´EGFP (1,8-fach, P = 0,0013),

für Δ-EGFP/3´EGFP (1,2-fach, *P* = 0,031) und für HR-EGFP/3´EGFP (1,4-fach, *P* = 0,0004) nachgewiesen werden. Bei 5´EGFP/HR-EGFP war nur eine 1,3-fache, nicht signifikante Erhöhung der Reparaturfrequenz detektierbar (*P* > 0,05).

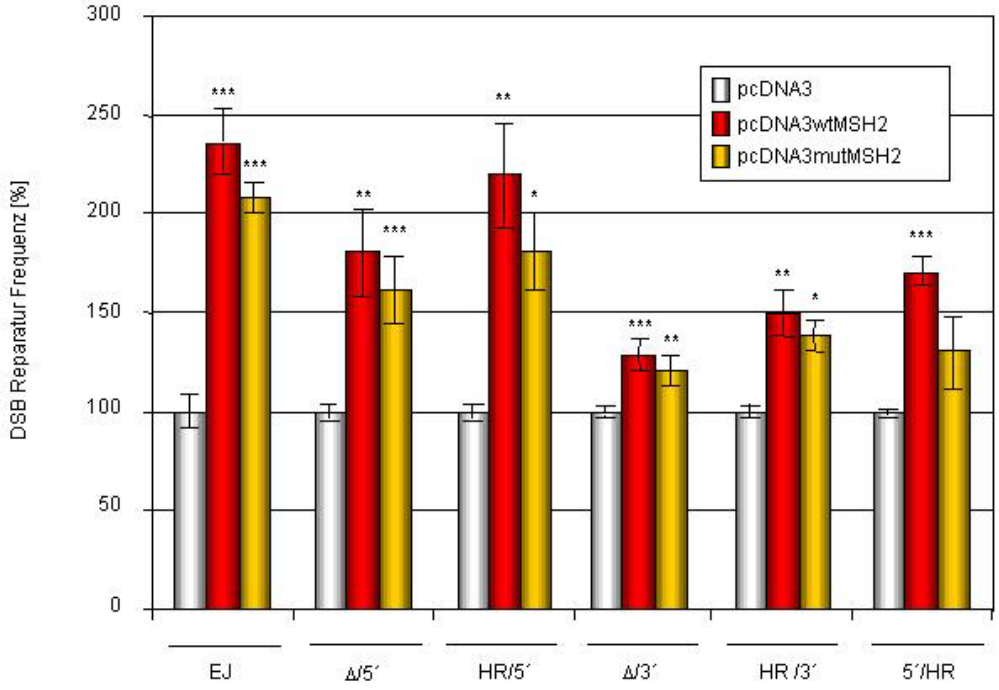

Abbildung 36: DSB Reparatur in Lovo Zellen nach transienter Expression des hMSH2 Proteines.
Die Zellen wurden mit dem Meganuklease Expressionsplasmid pCMV-I-*Sce*I und den DSB Reparatursubstraten EJ-EGFP (EJ), Δ-EGFP/5´EGFP (Δ/5´), HR-EGFP/5´EGFP (HR/5´), Δ-EGFP/3´EGFP (Δ/3´), HR-EGFP/3´EGFP (HR/3´) oder 5´EGFP/HR-EGFP (5´/HR) und mit pcDNA3wtMSH2 oder pcDNA3mutMSH2 oder dem Leervektor pcDNA3 kotransfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels Reagenz HiPerfect und 2,5 µg Gesamt-DNA, die Rekombinationsmessung 24h nach Transfektion. Zum besseren Vergleich der DSB Reparaturfrequenzen wurden die Werte des Leervektors auf 100 % gesetzt, die anderen Frequenzen jeweils darauf bezogen. (absolute Werte für 100 %: 0,05 für EJ-EGFP, 0,93 für Δ-EGFP/5´EGFP, 0,58 für HR-EGFP/5´EGFP; 2,3 für Δ-EGFP/3´EGFP; 3,0 für HR-EGFP/3´EGFP; 0,1 für 5´EGFP/HR-EGFP). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 6 bis 9 Messungen (*P* < 0,05; **, *P* < 0,01; ***, *P* < 0,001).

Nach transienter Überexpression der hMSH2 Proteine konnte demnach für alle Reparaturwege eine Steigerung festgestellt werden. Ein Grund hierfür könnte eine unphysiologisch hohe extrachromosomale Expression der Proteine sein. Dennoch bestätigte sich auch bei der transienten Expression der hMSH2 Proteine deren Einfluss auf die HDR mit ausreichenden Homologiebereichen (Substrat HR-EGFP/3´EGFP). Nach Expression von wtMSH2 konnte hier der deutlichste Effekt nachgewiesen werden.

Zudem konnte nur ein partieller Einfluss der ATP-Bindestelle auf die Regulation der DSB Reparatur nachgewiesen werden. Es zeigte sich hier mit Ausnahme für das SSA spezifische 5´EGFP/HR-EGFP Substrat nahezu das gleiche Reparaturmuster wie bei intakter ATP Bindestelle. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass für die Regulation des NHEJ oder der HR durch transient exprimiertes hMSH2 ATP Hydrolyse notwendig ist. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass diese einen Beitrag zur Stimulierung des SSA leistet.
Um den Einfluss des hMSH2 Proteines auf die Regulation der DSB Reparatur genauer zu untersuchen, wurden DSB-Reparatur-Analysen nach Knockdown der endogenen MutS Homologen durchgeführt.

3.2.3 Der Einfluss der MutS Homologen auf die DSB Reparatur im chromosomalen Kontext

Um die bisherigen Ergebnisse des hMSH2 Effektes zu bestätigen, untersuchte ich den Einfluss der endogenen MutS Homologen und dies zusätzlich im Chromatin Kontext. Hierfür verwendete ich die in Kapitel 3.1.2 beschriebene KMV Zelllinie, in welcher das HR-EGFP/3´EGFP Substrat stabil ins Chromosom integriert ist. In dieser Zelllinie wurden die MutS Homologen hMSH2, hMSH3 und hMSH6 jeweils mit 2 unterschliedlichen shRNA Plasmiden in ihrer Expression beeinflusst.

Sechs Messungen der DSB Reparatur Analysen (Abbildung 38) wurden hierbei von A. Schwan, Ulm, durchgeführt.
Für das ∆-EGFP/3´EGFP Substrat wurden keine signifikanten Unterschiede in den Reparaturereignissen im chromosomalen Kontext nach Gen Knockdown der MutS Homologen festgestellt. Daher werden die Daten hier nicht aufgeführt.
Die KMV(HR-EGFP/3´EGFP) Zellen wurden mit dem I-*Sce*I Expressionsplasmid und den shRNA Vektoren pRSMSH2 5, pRSMSH2 8, pRSMSH3 1, pRSMSH3 4, pRSMSH6 4 oder pRSMSH6 6 elektroporiert. Die gegen MSH2 gerichteten plasmidbasierten shRNAs bewirkten eine Abnahme der hMSH2 Proteinmenge um 90 %, wie aus Abbildung 37a ersichtlich (verglichen mit dem Leervektor pRScontrol, normalisiert gegen die Auftragskontrolle). Auch die Proteinmengen der Komplexpartner hMSH3 und hMSH6 waren auf bei hMSH3 30 % - 60 % und hMSH6 auf 50 % - 60 % des Kontrollniveaus verringert. Die gegen hMSH3 gerichteten shRNAs bewirkten eine Abnahme der hMSH3 Proteinmenge auf jeweils 80 %, gegen

hMSH6 gerichtete shRNAs verursachten eine Reduktion der Proteinmenge auf 50 %, jeweils verglichen mit dem Leervektor pRScontrol, normalisiert gegen die Auftragskontrolle. Indirekte Effekte, welche von Unterschieden im Zellzyklus oder Zelltod herrühren, können auch hier ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

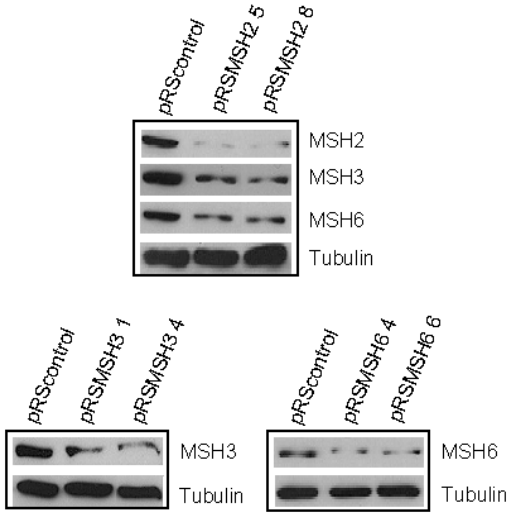

Abbildung 37: Western Blot Analyse an Zellen mit chromosomal integriertem DSB Reparatursubstrat nach Knockdown der MutS Homologen.
Die verwendeten Zellproben wurden unter DSB Reparatur Messungsbedingungen hergestellt (siehe Abbildung 38). Für die Immundetektion wurden Lysate eingesetzt. Die Proteinmengen von hMSH2, hMSH3 und hMSH6 wurden nach Knockdown überprüft. Kontrolle der Auftragsmenge durch Reinkubation mit Anti-Tubulin Antikörpern.

Der Knockdown von hMSH2 in KMV(HR-EGFP/3´EGFP) Zellen bewirkte bei pRSMSH2 5 eine 2,5-fache, signifikante Erniedrigung, bei pRSMSH2 8 eine signifikante Halbierung der DSB Reparaturfrequenz verglichen mit pRScontrol (P = 0,0003 bzw. P = 0,0022) (siehe Abbildung 38). Bei negativer Beeinflussung der hMSH3 und hMSH6 Proteinexpression zeigte sich ebenfalls eine signifikante Verringerung der DSB Reparaturfrequenzen (pRSMSH3 1: 2-fach, P = 0,0054; pRSMSH3 4: 2,5-fach, P = 0,0003; pRSMSH6 4: 1,7-fach, P = 0,044; pRSMSH6 6: 1,8-fach, P = 0,011).

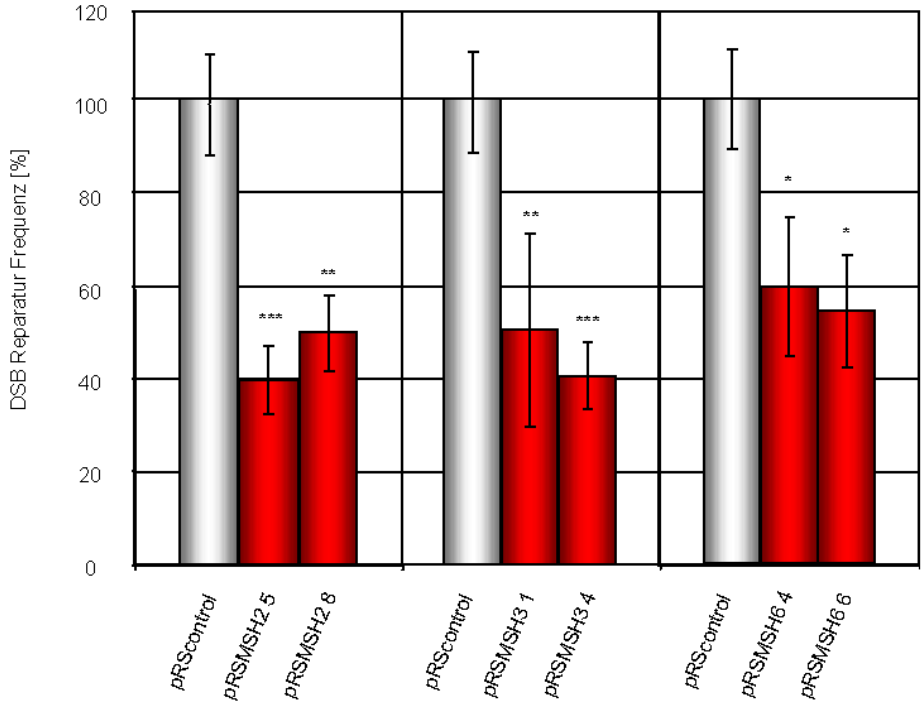

Abbildung 38: HDR Analyse nach Knockdown der MutS Homologen in KMV(HR-EGFP/3´EGFP)
Messung der chromosomalen Rekombination. KMV(HR-EGFP/3'EGFP) Zellen wurden mit dem Meganuklease Expressionsplasmid pCMV-I-*Sce*I und den shRNA Vektoren pRSMSH2 5, pRSMSH2 8, pRSMSH3 1, pRSMSH3 4, pRSMSH6 4 oder pRSMSH6 6 oder dem Leervektor (pRScontrol) transfiziert. Zum besseren Vergleich der DSB Reparatur Frequenzen wurden die Werte für das Kontrollplasmid pRScontrol auf 100 % gesetzt, die Frequenzen nach Knockdown der Proteine wurden jeweils darauf bezogen. (absoluter Wert für 100 %: 3 x 10^{-4}). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 12 - 14 Messungen ($P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Im Einklang mit den Ergebnissen aus Lovo, nach Expression von exogenem hMSH2, zeigte sich nach Knockdown von endogenem hMSH2 in KMV(HR-EGFP/3´EGFP) Zellen eine Erniedrigung der DSB Reparaturfrequenz mit HDR-Subsrtat HR-EGFP/3´EGFP.

3.2.3.1 Untersuchung der DSB Reparatur Regulation durch hMSH2 bei Knockdown von hRad52 und Überexpression von dominant negativem Rad51 Protein

Das Rekombinationssubstrat HR-EGFP/3´EGFP weist Reparaturereignisse nach, welche sowohl durch HR als auch durch SSA entstehen. SSA benötigt Rad52, jedoch nicht Rad51 (Van Dyck *et al.*, 2001). Rad52 bindet beim SSA die DNA Enden als Ringstruktur und unterstützt die Assoziation zwischen komplementären DNA Termini. Rad51 und seine Paraloge unterstützen zusammen mit RPA (dem humanen

single strand binding (SSB) Protein), Rad52 und Rad54 die ATP abhängige homologe DNA Paarung und den Strangaustausch bei der HR (Baumann *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 1997).

Um zu untersuchen, welche Reparaturform von hMSH2 beeinflusst wird, folgten Experimente in KMV(HR-EGFP/3´EGFP) Zellen, unter Expression des dominant negativen Rad51 Proteins bzw. Knockdown von Rad52.

Die KMV(HR-EGFP/3´EGFP) Zellen wurden mit pRScontrol oder einem Mix aus pRSMSH2 5/8 elektroporiert. Nach 72 h erfolgte eine weitere Elektoporation mit dem I-*Sce*I Expressionsplasmid und den shRNA Vektoren pSuper oder pSuperRad52 bzw. pcDNA3.1 oder pcDNA3.1Rad51 SM. Indirekte Effekte, welche von Unterschieden in der Zellzyklusverteilung oder Zelltod herrühren, konnten anhand durchflusszytometrischer Analysen weitgehend ausgeschlossen werden (Abbildung 39).

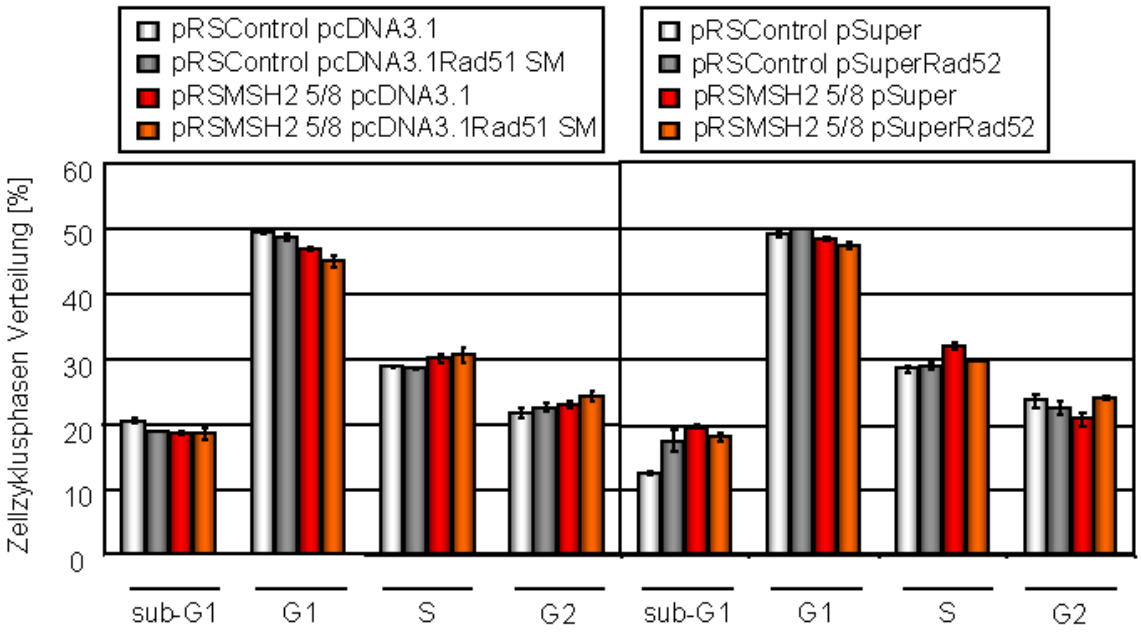

Abbildung 39: Zellzyklusanalyse an Zellen mit chromosomal integriertem DSB Reparatursubstrat.
Zellzyklusanalyse. Der DNA Gehalt der Zellen wurde nach PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die sub-G1-Phase indiziert DNA-haltige apoptotische Zellen. Die Angabe der einzelnen Phasen erfolgte in Prozent. Säulen entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen, Fehlerbalken den Standardabweichungen.

Die shRNA Plasmide pRSMSH2 5/8 bewirkten eine Abnahme der hMSH2 Proteinmenge bei den Rad51 SM Untersuchungen von 40 % – 60 %. Zudem konnte das Rad51 SM Fusionsprotein als Rad51-Molekül mit höherer Molekularmasse per Western Blot detektiert werden (siehe Abbildung 40). Bei den Untersuchungen zu

Rad52 war ein hMSH2 Knockdown von 70 % – 80 % nachweisbar (siehe Abbildung 40). Der Knockdown von hRad52 bei normaler hMSH2 Expression bewirkte eine Reduktion der Proteinmenge um 20 % und bei Knockdown beider Proteine um 35 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Proteinmengen wurden jeweils verglichen mit den Leervektorkontrollen, normalisiert gegen die Auftragskontrolle.

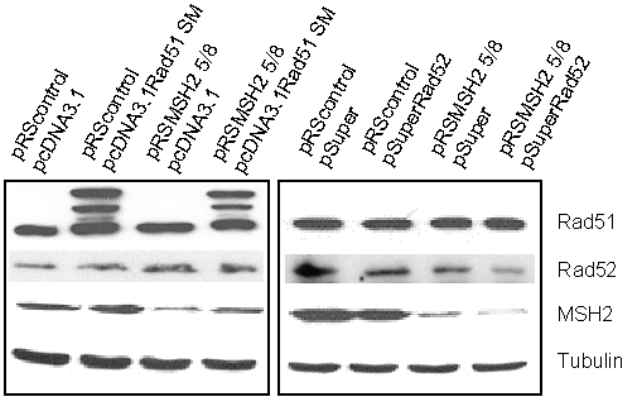

Abbildung 40: Western Blot von Zellen mit chromosomal integriertem DSB Reparatursubstrat nach Knockdown von hMSH2 und hRad52 oder Überexpression von dominant negativem Rad51 SM.
Protein Expressionsanalyse. Für die Immundetektion von hMSH2, hRad52 und hRad51 wurden Lysate eingesetzt. Die Auftragsmenge wurde überprüft durch Reinkubation der Western Blots mit Anti-Tubulin Antikörper. Die zusätzlichen Banden nach Überexpression von dominant negativem Rad51 SM entstehen durch das Fusionsprotein Rad51 SM.

Bei den DSB Reparatur Messungen unter Knockdown von hMSH2 und Überexpression von dominant negativem Rad51 Protein, gezeigt in Abbildung 41a, konnte nach Knockdown von hMSH2 erneut eine Verringerung der Reparaturfreqenz nachgewiesen werden (1,6-fach, P = 0,0068). Bei Überexpression von Rad51 SM verringerte sich die Reparaturfrequenz um den Faktor 2,1 (P = 0,0001) im Vergleich zur Kontrolle (100 % Wert). Nach Knockdown von hMSH2 und Überexpression von Rad51 SM konnte insgesamt eine 4,22-fache Verringerung (P = 0.0001) der DNA Reparaturfrequenz nachgewiesen werden, ebenfalls verglichen mit der Kontrolle. Das heisst die beiden Effekte waren additiv wirksam und damit unabhängig voneinander. Dies bedeutet, dass sich bei Überexpression von Rad51 SM, dass Knockdown von hMSH2 eine weitere, statistisch signifikante Halbierung der Reparatur (P = 0,045) verursachte.

Die Reparatur Messungen unter Knockdown von hMSH2 und hRad52 Protein, gezeigt in Abbildung 41b, konnten nach Knockdown von hMSH2 die Verringerung der Reparaturfreqenz erneut bestätigten (2,3-ach, P = 0,001). Bei Knockdown von hRad52 steigerte sich die Reparaturfrequenz um das 1,9-fache (P > 0,05), im

Vergleich zur Kontrolle. Nach Knockdown von hMSH2 und hRad52 konnte eine insgesamt 2,1-fache Steigerung (P = 0.012) der DNA Reparaturfrequenz nachgewiesen werden, ebenfalls verglichen mit der Kontrolle. Interessanterweise war jedoch nach Knockdown von hMSH2 in Zellen mit hRad52 Knockdown keine hMSH2-abhängige Reduktion der DSB-Reparatur Frequenz mehr zu beobachten.

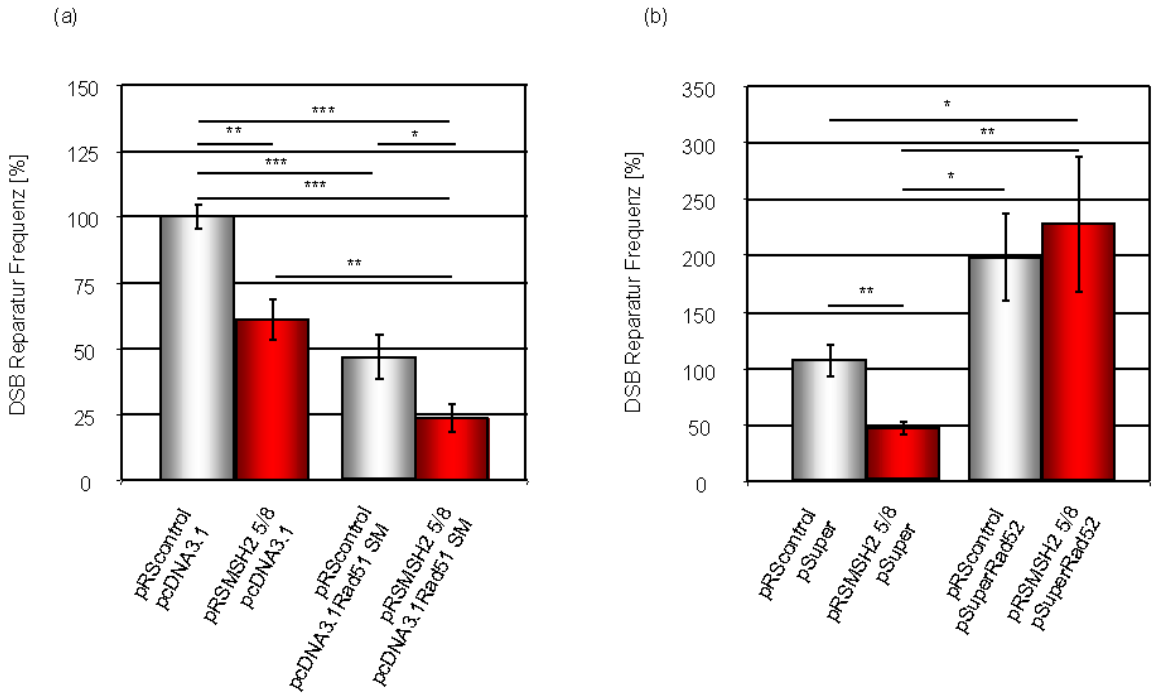

Abbildung 41: DSB Reparatur Analyse an Zellen mit chromosomal integriertem DSB Reparatursubstrat nach Knockdown von hMSH2 und hRad52 oder Überexpression von dominant negativem Rad51 SM.
KMV(HR-EGFP/3'EGFP) Zellen wurden mit pRSMSH2 5/8 per Elektroporation transfiziert und 72 h kultiviert. Anschließend wurde erneut per Elektroporation transfiziert mit dem Meganuklease Expressionsplasmid pCMV-I-*Sce*I und mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1Rad51 SM oder dem Leervektor pcDNA3.1 (a) bzw. dem shRNA Vektoren pSuperRad52 oder dem Leervektor pSuper (b). Zum besseren Vergleich der DSB Reparatur Frequenzen wurden die Werte mit den Kontrollplasmiden pRScontrol bzw. pcDNA3.1 auf 100 % gesetzt, die Frequenzen nach Knockdown oder Überexpression der Proteine wurden jeweils darauf bezogen. (absolute Werte für pRScontrol und pcDNA3.1: 6 x 10^{-4}). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von 9 Messungen (P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001).

Die Ergebnisse zeigen, dass hMSH2 für die Regulation der DSB Reparatur seine Komplexpartner hMSH3 und hMSH6 benötigt. Die MutS Komplexe fördern die DSB Reparatur durch HDR. Die Untersuchungen zur hRad51 und hRad52 Abhängigkeit zeigen, dass die Regulation unabhängig von hRad51 stattfindet. Bei Reduktion von hRad52 geht der Effekt von hMSH2 verloren. Dies lässt darauf schließen, dass die MutS Komplexe bei der Regulierung des SSA in hRad52-abhängiger Weise mitwirken.

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte der spezifische Effekt der MMR Komplexe auf die DSB Reparatur in verschiedenen humanen Zelllinien charakterisiert werden. Die Zelllinien stammten aus Darm, Niere, von lymphoiden oder myeloiden Zellen oder von Fibroblasten ab. Der Proteinstatus wurde beeinflusst durch induzierbare oder transiente Rekonstitution oder Knockdown der Expression. Durch Vermeidung von Langzeiteffekten konnte der Einfluss von indirekten Effekten wie die Entstehung und Manifestation von *frameshift* Mutationen in DNA Reparatur Genen reduziert werden (Mohindra *et al.*, 2002).

4.1 hMLH1 moduliert DSB Reparaturmechanismen

Die Ergebnisse aus den Analysen der DSB Reparaturwege in dieser Arbeit zeigten keine Beteiligung der hMutL Komplexe bei der Regulation des NHEJ. Weder die Beeinflussung der hMLH1 Proteinmenge, noch die der Komplexpartner hPMS1 und hPMS2 zeigten einen Effekt auf das NHEJ.
Es wurde jedoch klar nachgewiesen, dass der hMutL Status bevorzugt auf die konservative HDR, die HR (Genkonversion), wirkt. Die nicht-konservative HDR erfährt durch Änderung der hMutL-Menge keine Effekte. Der deutlichste Einfluss der hMutL Komplexe auf die DSB Reparatur konnte hier bei HR an kurzen Bereichen der Sequenzhomologie nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Rolle bei der Kontrolle der Genauigkeit der HR hin.

4.1.1 Fehlende Effekte des hMLH1 Proteins auf das NHEJ

Der Einfluss von hMLH1 auf das NHEJ wurde bisher in zwei Studien untersucht. Übereinstimmend zu meinen Ergebnissen, diskutieren Jacob *et al.* (Jacob *et al.*, 2005), dass keine Beeinflussung des NHEJ bei linearisierten Plasmiden in hMLH1 defizienten Zellen vorliegt, weder bzgl. Effizienz noch bzgl. Genauigkeit. Lin *et al.* (Lin *et al.*, 2001) berichteten, dass in hMLH1 defizienten Zellen vermehrt illegitime Rekombination stattfindet. Dies wurde geschlossen aus der Zunahme willkürlicher Integrationsereignisse mit linearisierter DNA ins Genom. Die illegitime Integration findet bevorzugt über das NHEJ statt. Dies erscheint zunächst widersprüchlich zu den hier gezeigten Ergebnissen. Die Resultate von Lin *et al.* wurden jedoch durch

Rekonstitution eines Hygromycin B Resistenz Genes erhalten. Diese Untersuchungsmethode beruht auf Überleben und Wachstum von Zellen unter mehrwöchigem Selektionsdruck. Das hMLH1 Protein übt bei Langzeitkultur aber einen Einfluss auf Zellzyklus und Zelltod aus (O'Brien und Brown, 2006). Ein indirekter Effekt von MLH1 auf die Regulierung des Wachstums und damit der Ergebnisse Werte von Lin *et al.* kann daher nicht ausgeschlossen werden.

4.1.2 hMLH1 reguliert HR-Prozesse insbesondere für kurze Homologie-Bereiche

Durch Analyse verschiedener DSB Reparaturwege konnte bei hMLH1 Verlust eine Erhöhung der HR nachgewiesen werden. Bei limitierenden Homologielängen (∆-EGFP Substrate) war dieser Effekt deutlicher ausgeprägt, als bei ausreichenden Homologielängen (HR-EGFP Substrate).

In der Literatur wurde die stärkste Verringerung der HR Frequenz nach einer Reduzierung der Homologiebereiche von 197 auf 163 bp beschrieben (Rubnitz und Subramani, 1984). In Säugetierzellen ist ein Bereich von mindestens ~ 200 bp notwendig, um eine vollständig effiziente HR zu ermöglichen. Bei Unterschreitung dieser Homologielänge werden antirekombinogene Mechanismen aktiv.

In dieser Arbeit wurden DSB Reparatursubstrate unter Variation der Homologielängen verwendet. Im Falle der ∆-EGFP Substrate war ein kontinuierlicher Homologiebereich von mindestens 164 – 168 bp vorhanden. Bei HR-EGFP wurden mindestens 191 – 195 bp angeboten. Diese limitierenden Homologiebereiche sind neben dem der 5´-Ende der I-*Sce*I Erkennungssequenz lokalisiert Homologiebereiche am 3´-Ende der Erkennungssequenz liegen weit der Grenze von 200 bp(Akyüz *et al.*, 2002).

DSB Reparatur Frequenzen für die ∆-EGFP Substrate, lagen in allen Zellen, mit Ausnahme der 293T-Tet-Off-hMLH1 Zellen unter den Frequenzen für HR-EGFP Substrate.

Insgesamt indiziert dies eine Rolle des hMLH1 Proteins bei der Genauigkeitskontrolle der HR. Die Genauigkeitskontrolle vermindert die HR zwischen divergierenden DNA Sequenzen mit kurzen kontinuierlichen Homologiebereichen.

In dieser Arbeit wurden die Messungen zum frühest möglichen Zeitpunkt nach Transfektion durchgeführt, um erfolgreiche DSB Reparatur Ereignisse, nachgewiesen

über rekonstituiertes, exprimiertes EGFP-Protein,möglichst unabhängig von Wachstums-Pzu detektieren. In HCT116/HCT116+chr3 Zellen war tatsächlich eine hMutL-vermittelte Regulation der HR nach 24 h, aber nicht mehr so deutlich nach 48 h festzustellen. Der Verlust der HR-Regulation ging einher mit Veränderungen in der Zellzyklusverteilung. Da sich im Verlauf des Zellzyklus die Präferenz der DSB Reparaturmechanismen in der Zelle ändert, kann also die Abnahme der HR-Regulation zu späteren Zeitpunkten auf die indirekte Beeinflussung durch die Zellzyklusverschiebung zurückgeführt werden. In Zellen, welche sich in der S- oder G2-Phase befinden, wird die HR bevorzugt. Nach 48 h war eine Zunahme der Zellen in der G2-Phase für HCT116 +chr3 versus HCT116 Zellen nachweisbar. Dies kann den Verlust der hMLH1 vermittelten Regulierung der HR erklären. Zum Zeitpunkt der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen war der Zellzyklus der hMLH1 positiven und negativen Zellen identisch. Dadurch konnten Zellzyklus- und Zelltodefekte ausgeschlossen werden.

Bei Vergleich der Reparatur-Substrate ∆-EGFP/5´EGFP und HR-EGFP/5´EGFP mit ∆-EGFP/3´EGFP und HR-EGFP/3´EGFP wurde der stärkste antirekombinogene Einfluss der hMutL Komplexe auf die 5´EGFP Substrate festgestellt. Diese DSB Reparatursubstrate weisen spezifisch den konservativen, hRad51 abhängigen Mechanismus der HR (größtenteils Gen- Konversion) nach. Die 3´EGFP Substrate detektieren zusätzlich das hRad51 unabhängige SSA (Akyüz *et al.*, 2002). Die Ergebnissen zeigen somit, dass die hRad51 abhängige Genkonversion stärker durch die hMutL Komplexe kontrolliert wird als das SSA. Die hier gemachten Beobachtungen sind kompatibel mit den Beschreibungen von Sugawara *et al.* (Sugawara *et al.*, 2004). Denn in *S. cerevisiae* konnte von diesen Autoren gezeigt werden, dass SSA zwischen divergierenden Sequenzen durch Erkennung der Heteroduplex durch MSH2 und MSH6 unterdrückt wird. Für die MutL Homologen konnte hierbei jedoch nur ein geringer oder kein Beitrag nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte somit erstmals ein Einfluss der hMutL Komplexe auf die Regulation der HR in humanen Zellen gezeigt werden. Die Ergebnisse stimmen überein mit vorangehenden Berichten über eine Erhöhung der Frequenzen der Gen Amplifikation in humanen HCT116 Zellen, verglichen mit HCT116+chr3 Zellen (Lin *et al.*, 2001). Der Rekombination wird nämlich verbunden mit einer Überreplikation eine

fördernde Rolle bei Prozessen der Gen Amplifikation zugewiesen (Schimke *et al.*, 1986).

Die Ergebnisse untermauern Studien in Bakterien und Hefen. Hier wird den MMR Proteinen eine Schutzfunktion zugewiesen, welche die Rekombination zwischen divergierenden Sequenzen verhindert (Surtees *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde in Kreuzungen aus entfernt verwandten Maus Fibroblasten eine Unterdrückung der interchromosomalen, mitotischen Rekombination nachgewiesen. Diese Unterdrückung wurde hervorgerufen durch DNA Sequenzheterologien. Knockout von MLH1 führte zu einer Abschwächung des antirekombinogenen Effekts (Shao *et al.*, 2004).

In Bakterien und Hefen benötigen die MutL Proteine zur Verhinderung des homeologen Strangaustausches eine Interaktion mit den MutS Proteinen, welche Basenfehlpaarungen erkennen (Surtees *et al.*, 2004). *In vitro* Studien deuten an, dass das MutS Protein aus *E. coli* einen Strang Austausch nach Fehlpaarungserkennung blockiert und dass der Effekt durch MutL gesteigert wird (Worth *et al.*, 1998). Im Gegensatz hierzu zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass in humanen Zellen der Verlust von hMutL Komponenten ausreicht, um die Unterdrückung der Rekombination zu verringern. Dies konnte in einer hMSH2 negativen Zelllinie nach Expression von hMSH2 und nach Knockdown von endogenem hMSH2 nachgewiesen werden.

Ein vollständiger oder teilweiser Verlust des hMLH1 Proteins erzeugt eine Verringerung der Unterdrückung der HR (diese Arbeit), wohingegen die hMLH1 Restproteinmenge für die MMR Funktion ausreicht (Yoshioka *et al.*, 2006). Dies unterstützt die Theorie, dass der Effekt von hMLH1 auf die HR von der MMR unabhängig ist.

Interessanterweise benötigt die hMLH1 vermittelte DNA-Schaden-Signalkaskade die komplette hMLH1 Proteinmenge (Yoshioka *et al.*, 2006), was darauf hindeuten könnte, dass hMLH1 über diese Signalkette HR reguliert (siehe 4.1.3).

Neueste Untersuchungen deckten eine endonukleolytische Aktivität des hMutLα Komplexes auf. Diese Aktivität ermöglicht einen endo- und exonukleolytischen Abbau eines DNA-Stranges, falls dieser eine Basenfehlpaarung enthält. Der Abbau erfolgt unabhängig von der Position der Fehlpaarung in Bezug auf den nächsten DNA Einzelstangbruch (Kadyrov *et al.*, 2006).

In eukaryotischen Zellen entstehen bei der HDR 3´ Einzelstrang Enden. Diese wandern während der Gen-Konversion in die homologe Donor Sequenz ein (Lin *et al.*, 1984; Sun *et al.*, 1991; White und Haber, 1990). Verlängerte, nicht homologe 3´ Enden, werden durch die Endonukleasen Rad1/Rad10 entfernt. Diese Endonukleasen werden von MSH2 und MSH3 zu den 3´ Überhängen rekrutiert (Sugawara *et al.*, 1997). Der hMutLα Komplex agiert während der MMR als Endonuklease am diskontinuierlichen Strang, bevorzugt fern der Fehlpaarung (Kadyrov *et al.*, 2006). Es ist bisher noch nicht beschrieben, ob hMutLα mit anderen Co-Faktoren interagiert, welche bei der Rekombination mitwirken. Eine Beteiligung der endonukleolytischen Aktivität des MutLα Komplexes bei der Regulierung der HR durch Destabilisierung von Heteroduplex Intermediaten ist jedoch vorstellbar.
Die endonukleolytische Domäne besteht aus einem Metall-Binde-Motiv. Dies konnte in hPMS2, nicht jedoch in hMLH1 oder hPMS1 nachgewiesen werden (Kosinski *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde die gleiche regulatorische Stimulierung der HR nach Knockdown von endogenem hMLH1, hPMS1 und hPMS2 festgestellt. Dies spricht gegen eine spezifische Funktion von hPMS2 bei der Regulierung der DSB Reparaturmechanismen. hMLH1 ist jedoch notwendig für die Stabilisierung von hPMS1 und hPMS2. In geringerem Ausmaß werden auch hPMS1 und hPMS2 zur Stabilisierung von hMLH1 benötigt. Es ist daher schwierig, die unterschiedlichen Aufgaben der MutL Homologe bei der Regulation der HR zu unterscheiden. Die Regulation wird bereits durch kleinste Veränderungen der Protein Expressionen beeinflusst.

4.1.3 Die hMutL-vermittelte Regulation der HR ist nicht vollständig aber möglicherweise teilweise abhängig von ATM, BLM oder BACH1

Den MutL Komplexen wird eine wichtige Rolle bei der Stimulierung von ATM zugeschrieben (Duckett *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2004; O'Brien und Brown, 2006). Von Interesse war daher eine Beteiligung von ATM auf den antirekombinogenen Effekt der MutL-Komplexe.
ATM löst in Abhängigkeit von DSBen die Checkpoint-Signalkaskade aus (Shiloh, 2003). DSBe wurden in dieser Arbeit durch die Meganuklease I-*Sce*I induziert.
Die Aufgabe von ATM bei der DSB Reparatur in Säugetierzellen wird widersprüchlich diskutiert (Bishop *et al.*, 2000; Drexler *et al.*, 2004; Golding *et al.*, 2004; Morrison *et*

al., 2000). Klar ist jedoch, dass ATM fehlerhafte Reparaturereignisse vermindert. Das Protein ist daher ein potenzieller Partner für die hMLH1 vermittelte Genauigkeitskontrolle der HR.

Nach Knockdown von hMLH1 zeigte sich in A-T Zellen eine Verminderung der Repression der HR. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die hMLH1 Kontrollmechanismen bei der HR ausschließlich ATM und damit Phosphorylierung/Aktivierung weiterer DSB Reparatur Faktoren durch ATM benötigen. Eine jeweils partielle Beteiligung von ATM und der verwandten Kinase ATR ist jedoch möglich, da gleichzeitiger Knockdown von ATM und ATR den Effekt von hMLH1 in der HR aufhob.

Ein Phosphorylierungsprotein von ATM und ATR ist p53. Dieses wirkt ebenfalls einer Rekombination zwischen divergierenden Sequenzen entgegen (Akyüz *et al.*, 2002; Dudenhöffer *et al.*, 1998). Diese Funktion von p53 ist unabhängig von dessen Aufgaben in der Transkription und Checkpoint Kontrolle (Gatz und Wiesmüller, 2006). An Serin 15 phosphoryliertes p53 kolokalisiert mit DSB Reparatur Proteinen wie hRad51, hRad54, hMRE11 und BLM. Desweiteren ist die Regulation der HR durch p53 vermindert, wenn dieses an Serin 15 mutiert ist. Dies deutet eine Funktion bei der HR an, insbesondere für die ATM/ATR phosphorylierte Fraktion der p53 Proteine (Restle *et al.*, 2008; Restle *et al.*, 2005; Sengupta *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass p53 für die hMLH1 vermittelte Unterdrückung der HR nicht benötigt wird, da p53-negative Zellen (KMV(Δ-EGFP/3´EGFP) abgeleitet von K562 (Akyüz *et al.*, 2002)) für einen Teil der Untersuchung herangezogen wurden. Die Ergebnisse mit 293T Zellderivaten und GM08505 Zellen, in welchen p53 durch das SV40 T-Antigen inaktiviert ist (Yoshioka *et al.*, 2006), unterstützen weiterhin dieses Ergebnis. Obwohl hMutL Komplexe und beide bei der Genauigkeitskontrolle der HR agieren, ist deren Wirkungsweise nicht epistatisch sondern Komplementär, da in Zellen ohne funktionsfähiges p53 die Regulation der HR durch hMLH1 ebenfalls nachweisbar war.

Ein erst kürzlich beschriebener Interaktionspartner von hMLH1 ist die Helikase FANCJ (Cannavo *et al.*, 2007). Dieses Protein, auch BACH1 oder BRIP1 genannt, wurde zunächst aufgrund seiner direkten Interaktion mit BRCA1 mit hereditärem Brustkrebs in Verbindung gebracht (Pedrazzi *et al.*, 2001). BACH1 hemmt den Rad51 vermittelten Strangaustauch. Dies deutet auf eine Kontrollfunktion des Proteins bei der HR. Hierfür spricht auch seine ATPase Aktivität, welche eine

Destabilisierung von Protein-DNA-Komplexen und Entwindung von DNA-Triplexen katalysiert (Sommers *et al.*, 2009).
hMLH1 interagiert weiterhin mit der RecQ Helikase BLM (Pedrazzi *et al.*, 2001), welches in Bloom-Syndrom Patienten mutiert ist. Das Bloom-Syndrom beinhaltet ein höheres Risiko für Krebserkrankungen und zeichnet sich durch eine ungewöhnlich hohe Rate an Schwester-Chromatid Austäuschen aus (Cheok *et al.*, 2005). BLM erkennt verschiedene DNA Strukturen, z. B. gegabelte Duplexe, *Holliday Junctions* und Duplexe mit internen Blasen.

BLM interagiert zudem mit hRad51, hMSH2/hMSH6 und p53 (Cheok *et al.*, 2005). Es unterstützt die Wanderung der DNA-Verzweigung (*branch migration*) der *Holliday junction* und unterbricht DNA Versatzschleifen (*displacement loops*), welche zu Beginn der HR gebildet werden (Bachrati *et al.*, 2006). In einem Multienzymkomplex, bei welchem Topoisomerase IIIα integriert ist, vermittelt BLM die Auflösung und Ausbreitung anormaler Rekombinationsintermediate (Cheok *et al.*, 2005). Trotz dieser Verknüpfung mit Kontrollmechanismen der HR, zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass weder BLM noch BACH1 für die Regulation der HR durch die hMutL Komplexe absolut notwendig sind. Dennoch konnte bei Vergleich von BLM-negativen mit BLM-positiven Zellen eine Abnahme der hMLH1 vermittelten Unterdrückung der homologen Rekombination nachgewiesen werden, was auf einen partiellen Beitrag hinweist. In ähnlicher Weise reduzierte Knockdown von BACH1 den antirekombinativen Effekt von hMLH1.
Wichtig ist in direktem Zusammenhang auch, dass es bei gleichzeitigem Knockdown von ATM und ATR zu einer signifikanten Abnahme des hMLH1 Effektes in der HR kam. Sowohl BLM als auch BACH1 sind Komponenten der ATM/ATR-Signalkaskade, da BLM direkt von ATM phosphoryliert wird (Beamish *et al.*, 2002) und BACH1 mit dem ATM/ATR-Substrat BRCA1 (Cortez *et al.*, 1999; Tibbetts *et al.*, 2000) interagiert. Weitere mit hMLH1 interagierende Proteine, welche eine Verknüpfung mit der DSB Reparatur belegen, wurden durch Massen Spektroskopie identifiziert (Cannavo *et al.*, 2007). Es ist deshalb vorstellbar, dass die regulatorische Funktion der hMutL Komplexe bei der HR durch einen kombinierten Effekt mehrerer Komponenten des ATM/ATR Signalweges, darunter von BLM und BACH1, hervorgerufen wird.

Aus der Literatur geht hervor, dass in MSH2 defizienten Zellen die Hemmung der Rekombination zwischen divergierenden Sequenzen nicht völlig aufgehoben ist. Dies deutet auf alternative Möglichkeiten hin, um die Genauigkeit der HR zu garantieren (Elliott und Jasin, 2001). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Rolle der hMutL Proteine bei der Limitierung der Rekombination zwischen divergierenden Sequenzen, d. h. bei vorliegen von nur kurzen DNA-Bereichen ununterbrochener Homologie, gibt neue Anhaltspunkte über die Art dieser alternativen Mechanismen. Daher können für humane Zellen mehrere Möglichkeiten für die Beeinflussung der Rekombination angenommen werden. Für manche Prozesse sind die hMutS Komplexe notwendig, andere Prozesse hingegen benötigen die hMutL Komplexe.
Interessanterweise war in MLH1$^{-/-}$ Mäusen keine Erniedrigung der mitotischen Rekombination in T-Zellen nachweisbar, obwohl Punkt-Mutationen sowohl in Fibroblasten als auch in T-Zellen als Folge des MLH1-Verlustes zunahmen. Dies deutet auf eine gewebespezifische Aktivierung der Funktionen von MLH1 bei der MMR und der Regulierung der HR (Shao *et al.*, 2004).
Bislang wurde ausschließlich der MMR Defekt für die Tumorsuppressorwirkung verantwortlich gemacht (HNPCC, MSI, etc.) (Kolodner *et al.*, 1999). Durch diesen Befund wurde aber eine neue genomstabilisierende Wirkung von hMutL Komplexen beschrieben, welche z. B. für Ovarialkarzinome von Bedeutung sein kann, da hier wie bei Brustkrebs DSB Reparaturdefekte eine besondere Rolle spielen. hMLH1 wird häufig in 15 – 20 % der Ovarialkarzinome epigenetisch stillgelegt (Brown, 1997; Chappell *et al.*, 2002)

4.2 Involvierung des hMSH2 Proteins beim SSA

MSH2 erfüllt Funktionen bei der post-replikativen MMR und ist beteiligt an der Aufrechterhaltung der Genomstabilität. Auch bei der Reaktion auf DNA-Schäden in der Zelle ist MSH2 durch Aktivierung einer Signal-Kaskade und Beeinflussung der Zellzyklus Kontrollpunkte und der Apoptose beteiligt (Aquilina und Bignami, 2001; Bellacosa, 2001; Bernstein *et al.*, 2002; Buermeyer *et al.*, 1999; Fedier und Fink, 2004; Harfe und Jinks-Robertson, 2000; Schofield und Hsieh, 2003; Wei *et al.*, 2002).

Um den Einfluss von Zellzyklusverschiebungen und Apoptose auf die DSB Reparaturmessungen auszuschließen, wurden die Untersuchungen stets parallel zu Zellzyklusanalysen durchgeführt. Zudem fanden Messungen der Reparatur-frequenzen zum frühest möglichen Zeitpunkt nach Transfektion statt. Unterschiede in der S- und G2-Phasenverteilung einiger Klone nach stabiler hMSH2 Expression konnten vernachlässigt werden, da die HDR sowohl während der späten S- als auch der G2-Phase stattfindet (Jackson und Jeggo, 1995; Lee *et al.*, 1997; Takata *et al.*, 1998).

Zudem waren in dieser Arbeit nach transienter MSH2 und mutMSH2 Expression keine deutlichen Unterschiede in der Zellzyklusverteilung nachweisbar. Bei hMSH2 Knockdown Experimenten und bei Doppelknockdown Experimenten konnten 24h bzw. 72h nach Repression der hMSH2 Expression ebenfalls keine deutlichen Unterschiede in der Zellzyklusphasenverteilung festgestellt werden.

Eine Beteiligung von MSH2 am *BRCA-1-associated genom surveillance complex* (BASC) ist beschrieben (De la Torre *et al.*, 2003; Jhanwar-Uniyal, 2003; Wang *et al.*, 2000). Damit ist MSH2 höchstwahrscheinlich bei der Erkennung und zellulären Antwort auf abnormale DNA-Strukturen involviert. Desweiteren entfernt MSH2 in Hefen bei der DSB Reparatur die nicht homologen DNA Überhänge und unterstützt möglicherweise die Suche nach homologen DNA-Bereichen (Evans und Alani, 2000; Evans *et al.*, 2000; Kijas *et al.*, 2003; Saparbaev *et al.*, 1996; Sugawara *et al.*, 2004; Sugawara *et al.*, 1997). In den Chromosomen der Säugetiere ist die akkurate konservative Rekombination ein zentrales Element der DSB Reparatur und zwar unabhängig vom MSH2 Status.

MSH2 unterdrückt den Austausch zwischen divergierenden DNA Sequenzen, also die homeologe Rekombination. In *E. coli* wurde nachgewiesen, dass die MMR die homeologe Rekombination während der Konjugation verhindert, falls die Divergenz zwischen den DNA Sequenzen 20 % übersteigt (Feinstein und Low, 1986; Rayssiguier *et al.*, 1989). Die MutS-Komplexe blockieren den homeologen Strang Transfer während der Wanderung der DNA-Verzweigung (*branch migration*) der *Holliday junction*, dieser Effekt wird von den MutL-Komplexen verstärkt (Worth *et al.*, 1994). In Hefen konnte die homeologe Rekombination zwischen transformierten Plasmiden, Chromosomen oder intra- und interchromosomalen Sequenz Austauschereignissen nachgewiesen werden (Alani *et al.*, 1994; Mezard *et al.*, 1992; Modrich und Lahue, 1996; Priebe *et al.*, 1994). Die Analysen in *E. coli* und Hefen zeigen, dass Proteinfaktoren der homologen Rekombination auch bei der homeologen Rekombination beteiligt sind. In *E. coli* sind homeologe Ereignisse abhängig von *recA* und *recBC*, Homologe zum humanen hRad51 Protein (Matic *et al.*, 1995; Rayssiguier *et al.*, 1991; Shen und Huang, 1986). Für die homeologe Genkonversion in der Hefe wird Rad52 benötigt (Bailis und Rothstein, 1990). Auch in Säugetierzellen konnte eine Unterdrückung der homeologen Rekombination nachgewiesen werden. Die intrachromosomale Genkonversion zwischen Sequenzen, welche über 19 % voneinander abweichen, ist dramatisch verringert (Abuin *et al.*, 2000; de Wind *et al.*, 1995; Elliott und Jasin, 2001; Waldman und Liskay, 1987). Treten während eines Strangaustausches Basenfehlpaarungen auf, werden diese von den MMR Proteinen erkannt. Der weitere Ablauf der Unterdrückung der homeologen Rekombination ist nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass die Wanderung der DNA-Verzweigung unterbrochen und aufgelöst wird (Radman, 1989), wobei die MMR Proteine nach Erkennung von Basenfehlpaarungen den Ablauf des Strangaustausches hemmen oder die Auflösung der Rekombinationsintermediate stimulieren (Alani *et al.*, 1994; Worth *et al.*, 1994). In *E. coli* werden Basenfehlpaarungen unter Beteiligung von MutH und DNA Helikase II entfernt (Feinstein und Low, 1986).

Der Verlust von MSH2 Homologen in Prokaryoten, Hefen, Arabidopsis und embryonalen Stammzellen aus Säugern führen zu einer Zunahme der homeologen Rekombination (Trouiller *et al.*, 2006; Worth *et al.*, 1994).

MSH2 Defizienz führt zu einer Längenzunahme der DNA Bereiche bei der Genkonversion und steigert allgemein die DSB induzierte Rekombination (Smith *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit waren nach stabiler Expression des MSH2 Proteines Unterschiede in der Präferenz der DSB Reparaturwege im Vergleich zu den MSH2-negativen Parentalzellen nachweisbar. So wurde eine Verringerung des NHEJ und eine Steigerung des SSA mit ausreichenden Homologiebereichen nach MSH2-Expression beobachtet. Limitierende Homologiebereiche haben während der Reparatur vermehrt divergierende DNA Sequenzen zur Folge. Auch beim NHEJ entstehen DNA-Duplexe mit divergierenden Sequenzen. Die Steigerung des SSA mit ausreichenden Homologiebereichen stimmt mit der Literatur überein, hier wird bei MSH2 Expression über eine Abnahme homeologen Rekombination berichtet.

Die ∆-EGFP/3´EGFP Konstrukte zeigten keine Zunahme der DSB Reparatur in den MSH2-Klonen. Dies kann durch einen kombinierten Effekt aus der Repression der HR und Stimulation des SSA erklärt werden, was eine Neutralisation zur Folge hat.

Bei Vergleich der 5´-Reparatur-Substrate (∆-EGFP/5´EGFP und HR-EGFP/5´EGFP) mit den 3´-Reparatur-Substraten (HR-EGFP/3´EGFP und ∆-EGFP/3´EGFP) konnte nur für Klon 8 das aus der Literatur beschriebene Verhalten der HR-Repression bei gleichzeitiger Stimulation des SSA gezeigt werden. Die gleiche Tendenz für die HR zeigte auch Klon 6, es konnte jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden.

Die Unterschiede zwischen ∆-EGFP/5´EGFP und HR-EGFP/5´EGFP sind mit den Literaturdaten nicht in Einklang zu bringen, welche eine Unterdrückung der homeologen Rekombination beschreiben. Jedoch waren die DSB-Reparatur-Frequenzen nahe an der Nachweisgrenze. Die Unterschiede der Reparaturfrequenzen waren, hervorgerufen durch starke Schwankungen, statistisch kaum signifikant.

Nach transienter Expression des MSH2 Proteins war eine allgemeine Steigerung der DSB Reparatur feststellbar. Dies kann begründet werden durch die starke Überexpression des Proteines mittels CMV-Promotor. Doch auch bei der transienten Expression des MSH2 Proteines konnte der deutlich stimulierende Einfluss auf das SSA mit ausreichenden Homologiebereichen bestätigt werden. Nach stabiler MSH2 Expression in der MSH2 negativen Zelllinie Lovo, konnte hier der Effekt in allen drei

MSH2 exprimierenden Zellklonen nachgewiesen werden, während alle anderen Effekte nur in einem Teil der Klone zu beobachten waren.

Es wurde in der Literatur beschrieben, dass eine Inaktivierung der ATPase-Aktivität von MSH2 keinen Einfluss auf die Signalweiterleitung während des programmierten Zelltodes oder die Erkennung von Basenfehlpaarungen hat. Die Beseitigung einer Basenfehlpaarung ist jedoch nach Inaktivierung der ATPase-Aktivität nicht mehr möglich (Martin *et al.*, 2003); (Banerjee und Flores-Rozas, 2005).
In dieser Arbeit wurde deswegen auch der Einfluss der ATPase-Aktivität von MSH2 auf die Regulation der DSB Reparatur untersucht. Es zeigte sich, dass hMSH2 sowohl mit intakter als auch mit mutierter ATP Bindestelle ein ähnliches Reparaturmuster zeigen. Die Berechnung der statistischen Signifikanzen für die beobachteten Unterschiede zwischen den Parental- und MSH2 rekonstituierten Zellen ergab jedoch, dass SSA von wtMSH2 statistisch nicht signifikant stimuliert wird. Ein Mitwirken der ATP-Hydrolyse bei der Regulation der DSB Reparatur durch hMSH2 kann somit nur für SSA, und auch hier nur partiell, gefordert werden.

Für Zellen aus MSH2 defizienten Mäusen wurde das Auftauchen chromosomaler Defekte beschrieben. Nach Bestrahlung sind sie nicht mehr in der Lage MRE11 oder Rad51 Foci im Zellkern zu bilden, also HR-Reparaturkomplexe zu assemblieren. Ohne induzierten DNA Schaden von außen zeigen Mäusezellen und humane Zellen jedoch eine erhöhte Anzahl von Rad51 Foci, was auf eine Akkumulation von Schäden oder Fehlpaarungen an Replikationsgabeln schließen lässt (Franchitto *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004). Tatsächlich kolokalisiert MSH2 mit MSH6, p53, BLM und Rad51 an DSBen entstanden an blockierten Replikationsgabeln. Hier unterstützt es möglicherweise die Auflösung von aberranten Rekombinationsintermediaten und verhindert damit die Entstehung von Chromosomenaberrationen, insbesondere Schwesterchromatidaustäusche (Alani *et al.*, 1997a; Yang *et al.*, 2004; Zink *et al.*, 2002). Der Einfluss des MSH2 Proteines auf die Ausbildung der Rad51 Foci ist vereinbar mit einer kontrollierenden Rolle von MSH2 bei der DSB Reparatur, auch der hier demonstrierten förderlichen Rolle beim SSA. Weitere Literaturdaten bezeugen eine hohe Affinität von MSH2 für *Holliday junction* ähnliche DNA Strukturen (Alani *et al.*, 1997b), eine Beobachtung die wiederum eine Involvierung beim HR und / oder SSA unterstützt.

Daten der vorliegenden Arbeit aus Knockdown-Experimenten der Komplexpartner von hMSH2 im chromosomalen Kontext zeigen, dass hMSH2 für die Regulation der HDR hMSH3 und hMSH6 benötigt. Die Regulation der HDR erfolgt durch eine Verschiebung der Reparatur von fehlerbehafteter HR zum SSA.
Diese Schlussfolgerung beruht zum einen auf dem Vergleich der Aktivitäten von MSH2 mit unterschiedlichen Reparatur-Substraten und zum anderen auf dem Vergleich der Aktivitäten nach Inaktivierung der zentralen Faktoren der HR (Rad51) und des SSA (Rad52).
Hier stellt sich die Frage nach der biologischen Bedeutung der Förderung des SSA, welche ja im Vergleich zur HR als nicht konservativer DSB Reparatur Mechanismus gilt, also mit Risiken für die Genomstabilität behaftet ist. Eine denkbare Erklärung ist hier dass MSH2 den der SSA ähnlichen *break induced replication* (BIR) Mechanismus fördert. DSBe, welche an der Replikationsgabel entstehen, können mit Hilfe homologer Donor Sequenzen repariert werden, welche sich auf demselben Allel oder ektopisch im Chromosom befinden. Die HR benötigt als Matrize eine intakte DNA Sequenz. Während der S- und G2-Phase des Zellzyklus werden DNA Brüche eines Chromatids durch Schwester Chromatid Rekombination (SCR) repariert. Aufgrund der zueinander identischen Schwester Chromatide ist die SCR akkurat. Sie stellt den auf Rekombination basierenden bevorzugten DSB Reparatur Mechanismus dar (Gonzalez-Barrera *et al.*, 2003; Johnson und Jasin, 2000; Kadyk und Hartwell, 1992). Beim BIR Mechanismus dient das stranginvasierende DNA Ende als Primer für die DNA Synthese. Hierbei kann es zu Verlust oder Reorganisation der genetischen Information kommen, die DSB Reparatur ist fehlerbehaftet. Wie SSA ist BIR unabhängig von Rad51. Bei fehlendem Rad51 nimmt die SCR dramatisch ab, wohingegen sich die BIR verdoppelt (Cortes-Ledesma *et al.*, 2007). Dies bedeutet, dass BIR den Bypass von blockierten Replikationsgabeln ermöglichen kann, wenn HR versagt.
Die in dieser Arbeit festgestellte Verschiebung der DSB Reparatur in Richtung SSA kann also möglicherweise durch eine Steigerung der BIR erklärt werden.

Eine weitere biologische Bedeutung dieses MSH2 Effektes könnte eine Stabilisierung der rDNA Sequenzwiederholungen sein. SSA verursacht die meisten Veränderungen zwischen direkten Sequenzwiederholungen (Fishman-Lobell *et al.*, 1992; Ivanov *et*

al., 1996; Lin *et al.*, 1990; Malkova *et al.*, 1996). Die rDNA Sequenzen kodieren die ribosomale RNA. In *S. cerevisiae* wird nur die Hälfte der rDNA Gene transkribiert. Weitere Aufgaben der rDNA in der Zellphysiologie sind zu erwarten. In einem Modell fördert eine zunehmende rDNA Instabilität die Seneszenz und letztendlich den Zelltod (Kobayashi, 2008). Die Stabilität und Kopienanzahl der rDNA erhöht zudem die resistenz gegenüber DNA Schäden.

Die Verschiebung der Reparatur zum fehlerbehafteten SSA kann möglicherweise zu einer Sabilisierung der rDNA beitragen, was positive Auswirkungen auf das Zellüberleben und DNA-Schadensresistenz zur Folge hätte.

5 Zusammenfassung

Die humanen MMR Proteine hMSH2 und hMLH1, isoliert aus HNPCC Patienten sind Homologe der *E. coli* Proteine MutS und MutL, Komponenten der post-replikativen MMR. Das hMSH2 Protein erkennt als Heterodimer mit hMSH3 (MutSβ) oder hMSH6 (MutSα) Basenfehlpaarungen bzw. IDLs (Insertions-, Deletions-*loops*). Heterodimere des hMLH1 Proteins unterstützen die Reparatur, welche durch MutSα oder MutSβ initiiert wird.
In der Literatur wird in Säugetierzellen eine Unterdrückung der Rekombination zwischen divergierenden Sequenzen durch MSH2, MSH3 und MSH6 beschrieben (Abuin *et al.*, 2000; de Wind *et al.*, 1995; Elliott und Jasin, 2001). Aus Prokaryoten und niederen Eukaryoten ist bekannt, dass MutS und MutL bei der DSB Reparatur den Strangaustausch zwischen sehr kurzen Homologiebereichen verhindern. Zudem sind MSH2, MSH3, MSH6, MLH1 und PMS1 in Hefen für die Genauigkeitskontrolle der HR wichtig sind.
In dieser Arbeit wurde der Einfluss des MMR Systems auf die humane DSB Reparatur untersucht.

Analysen der verschiedenen DSB Reparaturwege mit spezifischen Substraten für hMSH2 ergaben eine Stimulierung der Homologie gerichteten DSB Reparaturform des SSA. Für diese Regulation der Homologie gerichteten Reparatur benötigt hMSH2 seine Komplex Partner hMSH3 und hMSH6, so dass hier die Gesamtkomplexe, nämlich die hMutS-Komplexe, beteiligt sind. Übereinstimmend mit den Ergebnissen, welche mit Reaktionsweg-spezifischen Substraten erzielt wurden, zeigte sich, dass die von MutS-Komplexen ausgeübte Aktivierung der Homologie-gerichteten DNA Doppelstrangbruch Reparatur vom zentralen Faktor der homologen Rekombination, hRad51, unabhängig ist. Desweiteren zeigte sich die Abhängigkeit der Aktivierung vom zentralen Faktor des *Single Strand Annealings*, hRad52.

Analysen der verschiedenen DSB Reparaturwege ergaben keine Beteiligung der hMutL Komplexe bei der Regulation des NHEJ. Weder die Beeinflussung der hMLH1 Proteinmenge, noch die der Komplexpartner hPMS1 und hPMS2 zeigten einen Effekt.

In dieser Arbeit konnte jedoch klar nachgewiesen werden, dass der hMutL Status die konservative HR (Gen Konversion) beeinflusst, wohingegen die nicht-konservative Homologie-gerichtete DSB Reparatur (SSA) keine Effekte erfährt.
Der größte Einfluss der hMutL Komplexe auf die DSB Reparatur wurde bei Beteiligung von kurzen Bereichen mit Sequenzhomologie deutlich. Dies deutet auf eine Rolle von hMutL-Komplexen bei der Genauigkeitskontrolle der HR.

In dieser Arbeit konnte weiter gezeigt werden, dass hMLH1, hPMS1 und hPMS2 als Bausteine der hMutL Komplexe, tatsächlich die hRad51 vermittelten, hierbei insbesondere die fehlerbehafteten homologen Rekombinations-Prozesse verhindern. Da dieser Einfluss nach Verlust von hMSH2 immer noch nachweisbar war, spielen hierfür Basenfehlpaarungs-erkennung durch die MMR hMutS Komplexe keine Rolle. Weiterhin konnte eine vollständige Abhängigkeit dieser neu entdeckten hMutL-Wirkung von der Kinase ATM und den nachgeschalteten Faktoren p53, Bloom-Syndrom-Protein (BLM) und BACH1 ausgeschlossen werden. Bei Verlust beider komplementär DNA-Schäden signalisierenden Kinasen, ATM und ATR, ging dieser Effekt jedoch verloren. Da weiter quantitative Unterschiede in Gegenwart versus Abwesenheit von BLM und BACH1 zu beobachten waren, ist vorstellbar, dass hMutL-Komplexe homologe Rekombination über ATM/ATR-BLM, ATM/ATR-BACH1 und möglicherweise noch weitere ATM/ATR-abhängige Signalwege kontrollieren.
Insgesamt konnte in dieser Arbeit erstmalig eine von der MMR unabhängige Genauigkeitskontrollfunktion von hMutL-Komplexen bei der Homologen Rekombination und eine Aktivierung von nicht konservativen Homologie gerichtete DNA Doppelstrangbruch Reparatur Prozesse durch hMutS-Komplexe beschrieben werden. Beide Befunde haben Implikationen für die Rolle der beteiligten Faktoren als Tumorsuppressoren beim Menschen, welche bislang nur auf deren MMR Funktionen zurückgeführt wurden.

6 Summary

The human MMR proteins hMSH2 and hMLH1, which had been isolated from patients with HNPCC are homologs of the *E. coli* proteins MutS and MutL and are both components of the post-replicative MMR machinery. The MutS heterodimers in human MutSα and MutSβ recognize base-mispairings and IDLs (insertion, deletion-loops). Heterodimers of hMLH1 support MMR, which was initiated by MutSα or MutSβ complexes.

In the literature it has been described, that MSH2, MSH3 and MSH6 suppress recombination between divergent sequences ibn mammalian cells (Abuin *et al.*, 2000; de Wind *et al.*, 1995; Elliott und Jasin, 2001).

In procaryotic and lower eucaryotic DSB repair processes MutS and MutL are known to repress exchange between short stretches of homology. Furthermore in yeast the proteins MSH2, MSH3, MSH6, MLH1 and PMS1 are critically important for fidelity control of HR.

In this study the importance of the MMR system for mammalian DSB repair was defined.

Analyses of the different DSB repair pathways revealed stimulation of the homology-directed DSB repair pathway single strand annealing. For this type of regulation of homology-directed repair MSH2 needs its complex partners hMSH3 and hMSH6 indicating a rple of the MutS complexes in general.

In agreement with the results obtained by use of pathway-specific substrates it became clear that the activation of the homology-directed repair via the MutS complexes was independent of hRad51, the central factor of homolougous recombination. On the other hand stimulation of homology-directed repair by MutS complexes required hRad52, the central factor of single strand annealing.

Dissection of the different DSB repair pathways as a function of hMutL complexes did not indicate participation in the regulation of the NHEJ pathway. Neither altering the hMLH1 level, nor the level of the hMutL homologs hPMS1 or hPMS2 showed an effect on NHEJ.

However, in this it was clearly demonstrated that the hMutL status modulated conservative but not non-conservative homologous recombination mechanisms.

Thereby, the most pronounced influence on HR was detected for processes involving short stretches of sequence homology. This suggests for fidelity control functions of the MutL-complexes during homologous recombination.

In this work, it was further demonstrated that the components of hMutL complex hMLH1, hPMS1 and hPMS2 antagonize hRad51 mediated inaccurate homologous recombination processes in specific.
This effect was still detectable after loss of hMSH2, indicating that recognition of base mismatches through hMSH2 is not necessary for HR regulation by MutL complexes.
Furthermore, I showed that this novel function of hMutL was neither fully dependent on the kinase ATM nor on the downstream proteins p53, Bloom´s syndrome protein (BLM) or Bach1. However, upon loss of both ATM and ATR i. e. the two complementary DNA-damage signalling kinases the hMutL-dependent effect on HR was lost. Nevertheless, quantitative differences were observed with or without BLM and Bach1. From this it is conceivable that hMutL complexes play a role in regulating homologous recombination via ATM/ATR-BLM, ATM/ATR-Bach1 and possibly other ATM/ATR-mediated signalling pathways.
Altogether, a fidelity control function of hMutL complexes during homologous recombination independently of mismatch repair was demonstrated for the first time. Furthermore, it was firstly demonstrated that hMutS complexes activate non-conservative homology-directed DSB repair processes.
Both findings have major implications for the role of the proteins involved regarding tumor suppresser functions in human beings. Sofar these functions were exclusively, attributed to their mismatch repair function.

7 Literaturangaben

Ababou M, Dutertre S, Lecluse Y, Onclercq R, Chatton B, Amor-Gueret M (2000). ATM-dependent phosphorylation and accumulation of endogenous BLM protein in response to ionizing radiation. *Oncogene* **19:** 5955-63.

Abdullah MF, Hoffmann ER, Cotton VE, Borts RH (2004). A role for the MutL homologue MLH2 in controlling heteroduplex formation and in regulating between two different crossover pathways in budding yeast. *Cytogenet Genome Res* **107:** 180-90.

Abraham RT (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15:** 2177-96.

Abuin A, Zhang H, Bradley A (2000). Genetic analysis of mouse embryonic stem cells bearing Msh3 and Msh2 single and compound mutations. *Mol Cell Biol* **20:** 149-57.

Adair GM, Rolig RL, Moore-Faver D, Zabelshansky M, Wilson JH, Nairn RS (2000). Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination. *EMBO J* **19:** 5552-61.

Adams MD, McVey M, Sekelsky JJ (2003). Drosophila BLM in double-strand break repair by synthesis-dependent strand annealing. *Science* **299:** 265-7.

Akyüz N, Boehden GS, Süsse S, Rimek A, Preuss U, Scheidtmann KH *et al* (2002). DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **22:** 6306-17.

Alani E, Lee S, Kane MF, Griffith J, Kolodner RD (1997a). Saccharomyces cerevisiae MSH2, a mispaired base recognition protein, also recognizes Holliday junctions in DNA. *J Mol Biol* **265:** 289-301.

Alani E, Reenan RA, Kolodner RD (1994). Interaction between mismatch repair and genetic recombination in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **137:** 19-39.

Alani E, Sokolsky T, Studamire B, Miret JJ, Lahue RS (1997b). Genetic and biochemical analysis of Msh2p-Msh6p: role of ATP hydrolysis and Msh2p-Msh6p subunit interactions in mismatch base pair recognition. *Mol Cell Biol* **17:** 2436-47.

Anderson CW, Lees-Miller SP (1992). The nuclear serine/threonine protein kinase DNA-PK. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **2:** 283-314.

Aquilina G, Bignami M (2001). Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage. *J Cell Physiol* **187:** 145-54.

Audebert M, Salles B, Calsou P (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* **279:** 55117-26.

Bachrati CZ, Borts RH, Hickson ID (2006). Mobile D-loops are a preferred substrate for the Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res* **34:** 2269-79.

Bailis AM, Rothstein R (1990). A defect in mismatch repair in Saccharomyces cerevisiae stimulates ectopic recombination between homeologous genes by an excision repair dependent process. *Genetics* **126:** 535-47.

Banerjee S, Flores-Rozas H (2005). Cadmium inhibits mismatch repair by blocking the ATPase activity of the MSH2-MSH6 complex. *Nucleic Acids Res* **33:** 1410-9.

Bassing CH, Swat W, Alt FW (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109 Suppl:** S45-55.

Baum C, Forster P, Hegewisch-Becker S, Harbers K (1994). An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques* **17:** 1058-62.

Baumann P, Benson FE, West SC (1996). Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* **87:** 757-66.

Beamish H, Kedar P, Kaneko H, Chen P, Fukao T, Peng C *et al* (2002). Functional link between BLM defective in Bloom's syndrome and the ataxia-telangiectasia-mutated protein, ATM. *J Biol Chem* **277:** 30515-23.

Bellacosa A (2001). Functional interactions and signaling properties of mammalian DNA mismatch repair proteins. *Cell Death Differ* **8:** 1076-92.

Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* **511:** 145-78.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409:** 363-6.

Bianchi ME, Radding CM (1983). Insertions, deletions and mismatches in heteroduplex DNA made by recA protein. *Cell* **35:** 511-20.

Bishop AJ, Barlow C, Wynshaw-Boris AJ, Schiestl RH (2000). Atm deficiency causes an increased frequency of intrachromosomal homologous recombination in mice. *Cancer Res* **60:** 395-9.

Brown MA (1997). Tumor suppressor genes and human cancer. *Adv Genet* **36:** 45-135.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296:** 550-3.

Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondaneche MC, Sanal O *et al* (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* **124:** 287-99.

Buermeyer AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskay RM (1999). Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* **33:** 533-64.

Callebaut I, Malivert L, Fischer A, Mornon JP, Revy P, de Villartay JP (2006). Cernunnos interacts with the XRCC4 x DNA-ligase IV complex and is homologous to the yeast nonhomologous end-joining factor Nej1. *J Biol Chem* **281:** 13857-60.

Calsou P, Frit P, Humbert O, Muller C, Chen DJ, Salles B (1999). The DNA-dependent protein kinase catalytic activity regulates DNA end processing by means of Ku entry into DNA. *J Biol Chem* **274:** 7848-56.

Campbell TN, Choy FY (2005). RNA interference: past, present and future. *Curr Issues Mol Biol* **7:** 1-6.

Cannavo E, Gerrits B, Marra G, Schlapbach R, Jiricny J (2007). Characterization of the interactome of the human MutL homologues MLH1, PMS1, and PMS2. *J Biol Chem* **282:** 2976-86.

Cao L, Alani E, Kleckner N (1990). A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in S. cerevisiae. *Cell* **61:** 1089-101.

Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* **16:** 2733-42.

Cary RB, Peterson SR, Wang J, Bear DG, Bradbury EM, Chen DJ (1997). DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94:** 4267-72.

Cejka P, Stojic L, Mojas N, Russell AM, Heinimann K, Cannavo E *et al* (2003). Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *EMBO J* **22:** 2245-54.

Cervantes MD, Farah JA, Smith GR (2000). Meiotic DNA breaks associated with recombination in S. pombe. *Mol Cell* **5:** 883-8.

Chan DW, Lees-Miller SP (1996). The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *J Biol Chem* **271:** 8936-41.

Chappell C, Hanakahi LA, Karimi-Busheri F, Weinfeld M, West SC (2002). Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *EMBO J* **21:** 2827-32.

Chen G, Yuan SS, Liu W, Xu Y, Trujillo K, Song B *et al* (1999). Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J Biol Chem* **274:** 12748-52.

Chen J, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G *et al* (1998). Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* **2:** 317-28.

Chen S, Inamdar KV, Pfeiffer P, Feldmann E, Hannah MF, Yu Y *et al* (2001). Accurate in vitro end joining of a DNA double strand break with partially cohesive 3'-overhangs and 3'-phosphoglycolate termini: effect of Ku on repair fidelity. *J Biol Chem* **276:** 24323-30.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K *et al* (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436:** 740-4.

Cheok CF, Bachrati CZ, Chan KL, Ralf C, Wu L, Hickson ID (2005). Roles of the Bloom's syndrome helicase in the maintenance of genome stability. *Biochem Soc Trans* **33:** 1456-9.

Chiu YL, Rana TM (2002). RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell* **10:** 549-61.

Chu G (1997). Double strand break repair. *J Biol Chem* **272:** 24097-100.

Collis SJ, Swartz MJ, Nelson WG, DeWeese TL (2003). Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Res* **63:** 1550-4.

Constantinou A, Tarsounas M, Karow JK, Brosh RM, Bohr VA, Hickson ID *et al* (2000). Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. *EMBO Rep* **1:** 80-4.

Cooper MP, Machwe A, Orren DK, Brosh RM, Ramsden D, Bohr VA (2000). Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes Dev* **14:** 907-12.

Corneo B, Wendland RL, Deriano L, Cui X, Klein IA, Wong SY *et al* (2007). Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature* **449:** 483-6.

Cortes-Ledesma F, Tous C, Aguilera A (2007). Different genetic requirements for repair of replication-born double-strand breaks by sister-chromatid recombination and break-induced replication. *Nucleic Acids Res* **35:** 6560-70.

Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* **286:** 1162-6.

Cox MM (1997). Recombinational crossroads: eukaryotic enzymes and the limits of bacterial precedents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94:** 11764-6.

Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20:** 448-55.

Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY (1999). DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* **18:** 7883-99.

De la Torre C, Pincheira J, Lopez-Saez JF (2003). Human syndromes with genomic instability and multiprotein machines that repair DNA double-strand breaks. *Histol Histopathol* **18:** 225-43.

de Wind N, Dekker M, Berns A, Radman M, te Riele H (1995). Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell* **82:** 321-30.

Demple B, Harrison L (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* **63:** 915-48.

Desai-Mehta A, Cerosaletti KM, Concannon P (2001). Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol* **21:** 2184-91.

Devroe E, Silver PA (2002). Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol* **2:** 15.

Dickinson (2000) Immuncytometry Systems. BD LSR Manual.

Drexler GA, Wilde S, Beisker W, Ellwart J, Eckardt-Schupp F, Fritz E (2004). The rate of extrachromosomal homologous recombination within a novel reporter plasmid is elevated in cells lacking functional ATM protein. *DNA Repair (Amst)* **3:** 1345-53.

Dronkert ML, Beverloo HB, Johnson RD, Hoeijmakers JH, Jasin M, Kanaar R (2000). Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol* **20:** 3147-56.

Duckett DR, Bronstein SM, Taya Y, Modrich P (1999). hMutSalpha- and hMutLalpha-dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 12384-8.

Dudenhöffer C, Rohaly G, Will K, Deppert W, Wiesmüller L (1998). Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol Cell Biol* **18:** 5332-42.

Durocher D, Jackson SP (2001). DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol* **13:** 225-31.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411:** 494-8.

Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26:** 199-213.

Elliott B, Jasin M (2001). Repair of double-strand breaks by homologous recombination in mismatch repair-defective mammalian cells. *Mol Cell Biol* **21:** 2671-82.

Elliott B, Jasin M (2002). Double-strand breaks and translocations in cancer. *Cell Mol Life Sci* **59:** 373-85.

Elliott B, Richardson C, Winderbaum J, Nickoloff JA, Jasin M (1998). Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **18:** 93-101.

Evans E, Alani E (2000). Roles for mismatch repair factors in regulating genetic recombination. *Mol Cell Biol* **20:** 7839-44.

Evans E, Sugawara N, Haber JE, Alani E (2000). The Saccharomyces cerevisiae Msh2 mismatch repair protein localizes to recombination intermediates in vivo. *Mol Cell* **5:** 789-99.

Fedier A, Fink D (2004). Mutations in DNA mismatch repair genes: implications for DNA damage signaling and drug sensitivity (review). *Int J Oncol* **24:** 1039-47.

Feinstein SI, Low KB (1986). Hyper-recombining recipient strains in bacterial conjugation. *Genetics* **113:** 13-33.

Fishman-Lobell J, Rudin N, Haber JE (1992). Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Mol Cell Biol* **12:** 1292-303.

Fousteri M, Mullenders LH (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res* **18:** 73-84.

Fox ME, Smith GR (1998). Control of meiotic recombination in Schizosaccharomyces pombe. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **61:** 345-78.

Franchitto A, Pichierri P (2002). Bloom's syndrome protein is required for correct relocalization of RAD50/MRE11/NBS1 complex after replication fork arrest. *J Cell Biol* **157:** 19-30.

Franchitto A, Pichierri P, Piergentili R, Crescenzi M, Bignami M, Palitti F (2003). The mammalian mismatch repair protein MSH2 is required for correct MRE11 and RAD51 relocalization and for efficient cell cycle arrest induced by ionizing radiation in G2 phase. *Oncogene* **22:** 2110-20.

Fuchs R, Blakesley R (1983). Guide to the use of type II restriction endonucleases. *Methods Enzymol* **100:** 3-38.

Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B *et al* (2000). Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res* **60:** 3299-304.

Gatz SA, Wiesmüller L (2006). p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ* **13:** 1003-16.

Golding SE, Rosenberg E, Khalil A, McEwen A, Holmes M, Neill S *et al* (2004). Double strand break repair by homologous recombination is regulated by cell cycle-independent signaling via ATM in human glioma cells. *J Biol Chem* **279:** 15402-10.

Gonzalez-Barrera S, Cortes-Ledesma F, Wellinger RE, Aguilera A (2003). Equal sister chromatid exchange is a major mechanism of double-strand break repair in yeast. *Mol Cell* **11:** 1661-71.

Gottlich B, Reichenberger S, Feldmann E, Pfeiffer P (1998). Rejoining of DNA double-strand breaks in vitro by single-strand annealing. *Eur J Biochem* **258:** 387-95.

Gupta RC, Bazemore LR, Golub EI, Radding CM (1997). Activities of human recombination protein Rad51. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94:** 463-8.

Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Laine S, Sack R, Gatignol A *et al* (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* **6:** 961-7.

Haber JE (2000). Partners and pathwaysrepairing a double-strand break. *Trends Genet* **16:** 259-64.

Hakem R (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J* **27:** 589-605.

Harfe BD, Jinks-Robertson S (2000). DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet* **34:** 359-399.

Hickson ID, Davies SL, Li JL, Levitt NC, Mohaghegh P, North PS *et al* (2001). Role of the Bloom's syndrome helicase in maintenance of genome stability. *Biochem Soc Trans* **29:** 201-4.

Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* **30:** 1757-66.

Hoss M, Robins P, Naven TJ, Pappin DJ, Sgouros J, Lindahl T (1999). A human DNA editing enzyme homologous to the Escherichia coli DnaQ/MutD protein. *EMBO J* **18:** 3868-75.

Huang J, Dynan WS (2002). Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res* **30:** 667-74.

Huang S, Beresten S, Li B, Oshima J, Ellis NA, Campisi J (2000). Characterization of the human and mouse WRN 3'-->5' exonuclease. *Nucleic Acids Res* **28:** 2396-405.

Huang S, Li B, Gray MD, Oshima J, Mian IS, Campisi J (1998). The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'-->5' exonuclease. *Nat Genet* **20:** 114-6.

Inamdar KV, Pouliot JJ, Zhou T, Lees-Miller SP, Rasouli-Nia A, Povirk LF (2002). Conversion of phosphoglycolate to phosphate termini on 3' overhangs of DNA double strand breaks by the human tyrosyl-DNA phosphodiesterase hTdp1. *J Biol Chem* **277:** 27162-8.

Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96:** 23-8.

Ivanov EL, Haber JE (1995). RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **15:** 2245-51.

Ivanov EL, Sugawara N, Fishman-Lobell J, Haber JE (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **142:** 693-704.

Jackson SP (2001). Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks. *Biochem Soc Trans* **29:** 655-61.

Jackson SP, Jeggo PA (1995). DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends Biochem Sci* **20:** 412-5.

Jacob S, Miquel C, Sarasin A, Praz F (2005). Effects of camptothecin on double-strand break repair by non-homologous end-joining in DNA mismatch repair-deficient human colorectal cancer cell lines. *Nucleic Acids Res* **33:** 106-13.

Jasin M (1996). Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet* **12:** 224-8.

Jasin M (2002). Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene* **21:** 8981-93.

Jhanwar-Uniyal M (2003). BRCA1 in cancer, cell cycle and genomic stability. *Front Biosci* **8:** s1107-17.

Johnson RD, Jasin M (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J* **19:** 3398-407.

Johnson RD, Jasin M (2001). Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* **29:** 196-201.

Kabotyanski EB, Gomelsky L, Han JO, Stamato TD, Roth DB (1998). Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Res* **26:** 5333-42.

Kadyk LC, Hartwell LH (1992). Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **132:** 387-402.

Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P (2006). Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell* **126:** 297-308.

Kamath-Loeb AS, Shen JC, Loeb LA, Fry M (1998). Werner syndrome protein. II. Characterization of the integral 3' --> 5' DNA exonuclease. *J Biol Chem* **273:** 34145-50.

Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC (1998). Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol* **8:** 483-9.

Karagiannis TC, El-Osta A (2004). Double-strand breaks: signaling pathways and repair mechanisms. *Cell Mol Life Sci* **61:** 2137-47.

Karow JK, Constantinou A, Li JL, West SC, Hickson ID (2000). The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97:** 6504-8.

Karran P (2000). DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* **10:** 144-50.

Kawasaki H, Taira K (2003). Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res* **31:** 700-7.

Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans. *Genes Dev* **15:** 2654-9.

Kijas AW, Studamire B, Alani E (2003). Msh2 separation of function mutations confer defects in the initiation steps of mismatch repair. *J Mol Biol* **331:** 123-38.

Kim K, Lee YS, Carthew RW (2007). Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. *RNA* **13:** 22-9.

Kobayashi T (2008). A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus--rDNA instability maintains genome integrity. *Bioessays* **30:** 267-72.

Koi M, Umar A, Chauhan DP, Cherian SP, Carethers JM, Kunkel TA *et al* (1994). Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res* **54:** 4308-12.

Kolodner RD (1995). Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem Sci* **20:** 397-401.

Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J *et al* (1999). Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* **59:** 5068-74.

Kosinski J, Plotz G, Guarne A, Bujnicki JM, Friedhoff P (2008). The PMS2 subunit of human MutLalpha contains a metal ion binding domain of the iron-dependent repressor protein family. *J Mol Biol* **382:** 610-27.

Kunath T, Gish G, Lickert H, Jones N, Pawson T, Rossant J (2003). Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol* **21:** 559-61.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:** 680-5.

Lambert S, Lopez BS (2000). Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. *EMBO J* **19:** 3090-9.

Leber R, Wise TW, Mizuta R, Meek K (1998). The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **273:** 1794-801.

Lee SE, Mitchell RA, Cheng A, Hendrickson EA (1997). Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol Cell Biol* **17:** 1425-33.

Li B, Comai L (2001). Requirements for the nucleolytic processing of DNA ends by the Werner syndrome protein-Ku70/80 complex. *J Biol Chem* **276:** 9896-902.

Liang F, Romanienko PJ, Weaver DT, Jeggo PA, Jasin M (1996). Chromosomal double-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93:** 8929-33.

Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JH *et al* (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* **404:** 613-7.

Lin CT, Lyu YL, Xiao H, Lin WH, Whang-Peng J (2001). Suppression of gene amplification and chromosomal DNA integration by the DNA mismatch repair system. *Nucleic Acids Res* **29:** 3304-10.

Lin FL, Sperle K, Sternberg N (1984). Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol Cell Biol* **4:** 1020-34.

Lin FL, Sperle K, Sternberg N (1990). Intermolecular recombination between DNAs introduced into mouse L cells is mediated by a nonconservative pathway that leads to crossover products. *Mol Cell Biol* **10:** 103-12.

Luo Y, Lin FT, Lin WC (2004). ATM-mediated stabilization of hMutL DNA mismatch repair proteins augments p53 activation during DNA damage. *Mol Cell Biol* **24:** 6430-44.

Ma Y, Pannicke U, Lu H, Niewolik D, Schwarz K, Lieber MR (2005). The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human Artemis. *J Biol Chem* **280:** 33839-46.

Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108:** 781-94.

Mahajan KN, Nick McElhinny SA, Mitchell BS, Ramsden DA (2002). Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **22:** 5194-202.

Maliyekkel A, Davis BM, Roninson IB (2006). Cell cycle arrest drastically extends the duration of gene silencing after transient expression of short hairpin RNA. *Cell Cycle* **5:** 2390-5.

Malkova A, Ivanov EL, Haber JE (1996). Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93:** 7131-6.

Marra G, Iaccarino I, Lettieri T, Roscilli G, Delmastro P, Jiricny J (1998). Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the MSH3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 8568-73.

Martin A, Li Z, Lin DP, Bardwell PD, Iglesias-Ussel MD, Edelmann W *et al* (2003). Msh2 ATPase activity is essential for somatic hypermutation at a-T basepairs and for efficient class switch recombination. *J Exp Med* **198:** 1171-8.

Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110:** 563-74.

Matic I, Rayssiguier C, Radman M (1995). Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. *Cell* **80:** 507-15.

Mazur DJ, Perrino FW (1999). Identification and expression of the TREX1 and TREX2 cDNA sequences encoding mammalian 3'-->5' exonucleases. *J Biol Chem* **274:** 19655-60.

Medema RH (2004). Optimizing RNA interference for application in mammalian cells. *Biochem J* **380:** 593-603.

Mezard C, Pompon D, Nicolas A (1992). Recombination between similar but not identical DNA sequences during yeast transformation occurs within short stretches of identity. *Cell* **70:** 659-70.

Micura R (2002). Small interfering RNAs and their chemical synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **41:** 2265-9.

Mimori T, Hardin JA (1986). Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem* **261:** 10375-9.

Miquel C, Jacob S, Grandjouan S, Aime A, Viguier J, Sabourin JC *et al* (2007). Frequent alteration of DNA damage signalling and repair pathways in human colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncogene* **26:** 5919-26.

Modrich P (2006). Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem* **281:** 30305-9.

Modrich P, Lahue R (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* **65:** 101-33.

Mohaghegh P, Karow JK, Brosh Jr RM, Jr., Bohr VA, Hickson ID (2001). The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res* **29:** 2843-9.

Mohindra A, Hays LE, Phillips EN, Preston BD, Helleday T, Meuth M (2002). Defects in homologous recombination repair in mismatch-repair-deficient tumour cell lines. *Hum Mol Genet* **11:** 2189-200.

Mol CD, Arvai AS, Sanderson RJ, Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE *et al* (1995a). Crystal structure of human uracil-DNA glycosylase in complex with a protein inhibitor: protein mimicry of DNA. *Cell* **82:** 701-8.

Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, Kavli B, Alseth I, Krokan HE *et al* (1995b). Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell* **80:** 869-78.

Morrison C, Sonoda E, Takao N, Shinohara A, Yamamoto K, Takeda S (2000). The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *EMBO J* **19:** 463-71.

Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M (1999). Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* **4:** 511-8.

Moynahan ME, Cui TY, Jasin M (2001a). Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Cancer Res* **61:** 4842-50.

Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M (2001b). BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* **7:** 263-72.

Namsaraev EA, Berg P (2000). Rad51 uses one mechanism to drive DNA strand exchange in both directions. *J Biol Chem* **275:** 3970-6.

Norbury CJ, Hickson ID (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41:** 367-401.

Novina CD, Sharp PA (2004). The RNAi revolution. *Nature* **430:** 161-4.

O'Brien V, Brown R (2006). Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. *Carcinogenesis* **27:** 682-92.

O'Regan NE, Branch P, Macpherson P, Karran P (1996). hMSH2-independent DNA mismatch recognition by human proteins. *J Biol Chem* **271:** 1789-96.

Oshima J, Huang S, Pae C, Campisi J, Schiestl RH (2002). Lack of WRN results in extensive deletion at nonhomologous joining ends. *Cancer Res* **62:** 547-51.

Osman F, Subramani S (1998). Double-strand break-induced recombination in eukaryotes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **58:** 263-99.

Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16:** 948-58.

Paillard S, Strauss F (1991). Analysis of the mechanism of interaction of simian Ku protein with DNA. *Nucleic Acids Res* **19:** 5619-24.

Pang D, Yoo S, Dynan WS, Jung M, Dritschilo A (1997). Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. *Cancer Res* **57:** 1412-5.

Paques F, Haber JE (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol Mol Biol Rev* **63:** 349-404.

Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* **20:** 505-8.

Paull TT, Cortez D, Bowers B, Elledge SJ, Gellert M (2001). Direct DNA binding by Brca1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 6086-91.

Paull TT, Gellert M (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* **1:** 969-79.

Paull TT, Gellert M (1999). Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* **13:** 1276-88.

Paull TT, Gellert M (2000). A mechanistic basis for Mre11-directed DNA joining at microhomologies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97:** 6409-14.

Pearl LH (2000). Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. *Mutat Res* **460:** 165-81.

Pedrazzi G, Bachrati CZ, Selak N, Studer I, Petkovic M, Hickson ID *et al* (2003). The Bloom's syndrome helicase interacts directly with the human DNA mismatch repair protein hMSH6. *Biol Chem* **384:** 1155-64.

Pedrazzi G, Perrera C, Blaser H, Kuster P, Marra G, Davies SL *et al* (2001). Direct association of Bloom's syndrome gene product with the human mismatch repair protein MLH1. *Nucleic Acids Res* **29:** 4378-86.

Peng M, Litman R, Xie J, Sharma S, Brosh RM, Jr., Cantor SB (2007). The FANCJ/MutLalpha interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells. *EMBO J* **26:** 3238-49.

Pierce AJ, Stark JM, Araujo FD, Moynahan ME, Berwick M, Jasin M (2001). Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* **11:** S52-9.

Plessis A, Perrin A, Haber JE, Dujon B (1992). Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics* **130:** 451-60.

Priebe SD, Westmoreland J, Nilsson-Tillgren T, Resnick MA (1994). Induction of recombination between homologous and diverged DNAs by double-strand gaps and breaks and role of mismatch repair. *Mol Cell Biol* **14:** 4802-14.

Provost P, Dishart D, Doucet J, Frendewey D, Samuelsson B, Radmark O (2002). Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J* **21:** 5864-74.

Radman M (1989). Mismatch repair and the fidelity of genetic recombination. *Genome* **31:** 68-73.

Raschle M, Marra G, Nystrom-Lahti M, Schar P, Jiricny J (1999). Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J Biol Chem* **274:** 32368-75.

Rayssiguier C, Dohet C, Radman M (1991). Interspecific recombination between Escherichia coli and Salmonella typhimurium occurs by the RecABCD pathway. *Biochimie* **73:** 371-4.

Rayssiguier C, Thaler DS, Radman M (1989). The barrier to recombination between Escherichia coli and Salmonella typhimurium is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* **342:** 396-401.

Restle A, Färber M, Baumann C, Böhringer M, Scheidtmann KH, Müller-Tidow C *et al* (2008). Dissecting the role of p53 phosphorylation in homologous recombination provides new clues for gain-of-function mutants. *Nucleic Acids Res* **36:** 5362-75.

Restle A, Janz C, Wiesmüller L (2005). Differences in the association of p53 phosphorylated on serine 15 and key enzymes of homologous recombination. *Oncogene* **24:** 4380-7.

Riballo E, Kuhne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ *et al* (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell* **16:** 715-24.

Riballo E, Woodbine L, Stiff T, Walker SA, Goodarzi AA, Jeggo PA (2009). XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Res* **37:** 482-92.

Roos WP, Kaina B (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* **12:** 440-50.

Rubnitz J, Subramani S (1984). The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **4:** 2253-8.

Saintigny Y, Makienko K, Swanson C, Emond MJ, Monnat RJ, Jr. (2002). Homologous recombination resolution defect in werner syndrome. *Mol Cell Biol* **22:** 6971-8.

Sambrook, J. und Russell, D., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saparbaev M, Prakash L, Prakash S (1996). Requirement of mismatch repair genes MSH2 and MSH3 in the RAD1-RAD10 pathway of mitotic recombination in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **142:** 727-36.

Sargent RG, Meservy JL, Perkins BD, Kilburn AE, Intody Z, Adair GM *et al* (2000). Role of the nucleotide excision repair gene ERCC1 in formation of recombination-dependent rearrangements in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **28:** 3771-8.

Schimke RT, Sherwood SW, Hill AB, Johnston RN (1986). Overreplication and recombination of DNA in higher eukaryotes: potential consequences and biological implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83:** 2157-61.

Schofield MJ, Hsieh P (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol* **57:** 579-608.

Schrauder, M., and Wiesmüller, L. (2006). DNA repair. In Apoptosis and Cancer Therapy (Fulda, S., Debatin, K.M., eds), Vol. 2, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim).

Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J *et al* (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* **88:** 265-75.

Sedgwick B, Bates PA, Paik J, Jacobs SC, Lindahl T (2007). Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair (Amst)* **6:** 429-42.

Sengupta S, Linke SP, Pedeux R, Yang Q, Farnsworth J, Garfield SH *et al* (2003). BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. *EMBO J* **22:** 1210-22.

Shao C, Deng L, Chen Y, Kucherlapati R, Stambrook PJ, Tischfield JA (2004). Mlh1 mediates tissue-specific regulation of mitotic recombination. *Oncogene* **23:** 9017-24.

Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regel E, Dinh C *et al* (1997). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* **386:** 804-10.

Shen P, Huang HV (1986). Homologous recombination in Escherichia coli: dependence on substrate length and homology. *Genetics* **112:** 441-57.

Shiloh Y (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3:** 155-68.

Shinohara A, Ogawa T (1999). Rad51/RecA protein families and the associated proteins in eukaryotes. *Mutat Res* **435:** 13-21.

Singleton MR, Wentzell LM, Liu Y, West SC, Wigley DB (2002). Structure of the single-strand annealing domain of human RAD52 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 13492-7.

Smith GC, Jackson SP (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* **13:** 916-34.

Smith JA, Bannister LA, Bhattacharjee V, Wang Y, Waldman BC, Waldman AS (2007). Accurate homologous recombination is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian chromosomes and is modulated by mismatch repair protein Msh2. *Mol Cell Biol* **27:** 7816-27.

Sommers JA, Rawtani N, Gupta R, Bugreev DV, Mazin AV, Cantor SB *et al* (2009). FANCJ uses its motor ATPase to destabilize protein-DNA complexes, unwind triplexes, and inhibit RAD51 strand exchange. *J Biol Chem* **284:** 7505-17.

Soulas-Sprauel P, Le Guyader G, Rivera-Munoz P, Abramowski V, Olivier-Martin C, Goujet-Zalc C *et al* (2007). Role for DNA repair factor XRCC4 in immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* **204:** 1717-27.

Subramanian D, Griffith JD (2002). Interactions between p53, hMSH2-hMSH6 and HMG I(Y) on Holliday junctions and bulged bases. *Nucleic Acids Res* **30:** 2427-34.

Sugawara N, Goldfarb T, Studamire B, Alani E, Haber JE (2004). Heteroduplex rejection during single-strand annealing requires Sgs1 helicase and mismatch repair proteins Msh2 and Msh6 but not Pms1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101:** 9315-20.

Sugawara N, Paques F, Colaiacovo M, Haber JE (1997). Role of Saccharomyces cerevisiae Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94:** 9214-9.

Suh D, Wilson DM, 3rd, Povirk LF (1997). 3'-phosphodiesterase activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease at DNA double-strand break ends. *Nucleic Acids Res* **25:** 2495-500.

Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 5515-20.

Sun H, Treco D, Szostak JW (1991). Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. *Cell* **64:** 1155-61.

Sung P (1997). Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes Dev* **11:** 1111-21.

Sung P, Krejci L, Van Komen S, Sehorn MG (2003). Rad51 recombinase and recombination mediators. *J Biol Chem* **278:** 42729-32.

Surtees JA, Argueso JL, Alani E (2004). Mismatch repair proteins: key regulators of genetic recombination. *Cytogenet Genome Res* **107:** 146-59.

Swagemakers SM, Essers J, de Wit J, Hoeijmakers JH, Kanaar R (1998). The human RAD54 recombinational DNA repair protein is a double-stranded DNA-dependent ATPase. *J Biol Chem* **273:** 28292-7.

Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H *et al* (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* **17:** 5497-508.

Tan TL, Essers J, Citterio E, Swagemakers SM, de Wit J, Benson FE *et al* (1999). Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Curr Biol* **9:** 325-8.

Thacker J, Chalk J, Ganesh A, North P (1992). A mechanism for deletion formation in DNA by human cell extracts: the involvement of short sequence repeats. *Nucleic Acids Res* **20:** 6183-8.

Thompson LH, Schild D (2001). Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res* **477:** 131-53.

Thompson LH, Schild D (2002). Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* **509:** 49-78.

Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM, Scully R, Livingston D, Elledge SJ *et al* (2000). Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* **14:** 2989-3002.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24:** 145-9.

Trouiller B, Schaefer DG, Charlot F, Nogue F (2006). MSH2 is essential for the preservation of genome integrity and prevents homeologous recombination in the moss Physcomitrella patens. *Nucleic Acids Res* **34:** 232-42.

Trujillo KM, Yuan SS, Lee EY, Sung P (1998). Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem* **273:** 21447-50.

Tsien RY (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67:** 509-44.

Tuschl T (2002). Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* **20:** 446-8.

Tutt A, Bertwistle D, Valentine J, Gabriel A, Swift S, Ross G *et al* (2001). Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *EMBO J* **20:** 4704-16.

Valerie K, Povirk LF (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **22:** 5792-812.

Van Dyck E, Hajibagheri NM, Stasiak A, West SC (1998). Visualisation of human rad52 protein and its complexes with hRad51 and DNA. *J Mol Biol* **284:** 1027-38.

Van Dyck E, Stasiak AZ, Stasiak A, West SC (1999). Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* **398:** 728-31.

Van Dyck E, Stasiak AZ, Stasiak A, West SC (2001). Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single-strand annealing. *EMBO Rep* **2:** 905-9.

Waldman AS, Liskay RM (1987). Differential effects of base-pair mismatch on intrachromosomal versus extrachromosomal recombination in mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84:** 5340-4.

Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412:** 607-14.

Wang M, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H, Iliakis G (2006a). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res* **34:** 6170-82.

Wang Q, Ponomareva ON, Lasarev M, Turker MS (2006b). High frequency induction of mitotic recombination by ionizing radiation in Mlh1 null mouse cells. *Mutat Res* **594:** 189-98.

Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* **14:** 927-39.

Wei K, Kucherlapati R, Edelmann W (2002). Mouse models for human DNA mismatch-repair gene defects. *Trends Mol Med* **8:** 346-53.

Wen Q, Scorah J, Phear G, Rodgers G, Rodgers S, Meuth M (2008). A mutant allele of MRE11 found in mismatch repair-deficient tumor cells suppresses the cellular response to DNA replication fork stress in a dominant negative manner. *Mol Biol Cell* **19:** 1693-705.

Wheeler JM (2005). Epigenetics, mismatch repair genes and colorectal cancer. *Ann R Coll Surg Engl* **87:** 15-20.

White CI, Haber JE (1990). Intermediates of recombination during mating type switching in Saccharomyces cerevisiae. *EMBO J* **9:** 663-73.

Willers H, Xia F, Powell SN (2002). Recombinational DNA Repair in Cancer and Normal Cells: The Challenge of Functional Analysis. *J Biomed Biotechnol* **2:** 86-93.

Worth L, Jr., Bader T, Yang J, Clark S (1998). Role of MutS ATPase activity in MutS,L-dependent block of in vitro strand transfer. *J Biol Chem* **273:** 23176-82.

Worth L, Jr., Clark S, Radman M, Modrich P (1994). Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91:** 3238-41.

Wu L, Davies SL, Levitt NC, Hickson ID (2001). Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51. *J Biol Chem* **276:** 19375-81.

Wu X, Ranganathan V, Weisman DS, Heine WF, Ciccone DN, O'Neill TB *et al* (2000). ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature* **405:** 477-82.

Xia F, Taghian DG, DeFrank JS, Zeng ZC, Willers H, Iliakis G *et al* (2001). Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 8644-9.

Xu B, Kim S, Kastan MB (2001). Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* **21:** 3445-50.

Xu B, O'Donnell AH, Kim ST, Kastan MB (2002). Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res* **62:** 4588-91.

Yan CT, Boboila C, Souza EK, Franco S, Hickernell TR, Murphy M *et al* (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* **449:** 478-82.

Yaneva M, Kowalewski T, Lieber MR (1997). Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J* **16:** 5098-112.

Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH *et al* (2002). BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* **297:** 1837-48.

Yang Q, Zhang R, Wang XW, Linke SP, Sengupta S, Hickson ID *et al* (2004). The mismatch DNA repair heterodimer, hMSH2/6, regulates BLM helicase. *Oncogene* **23:** 3749-56.

Yannone SM, Roy S, Chan DW, Murphy MB, Huang S, Campisi J *et al* (2001). Werner syndrome protein is regulated and phosphorylated by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **276:** 38242-8.

Yoo S, Dynan WS (1999). Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res* **27:** 4679-86.

Yoshioka K, Yoshioka Y, Hsieh P (2006). ATR kinase activation mediated by MutSalpha and MutLalpha in response to cytotoxic O6-methylguanine adducts. *Mol Cell* **22:** 501-10.

Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99:** 6047-52.

Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Utsugisawa T, Kharbanda S *et al* (1998). Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J Biol Chem* **273:** 3799-802.

Zhao S, Weng YC, Yuan SS, Lin YT, Hsu HC, Lin SC *et al* (2000). Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* **405:** 473-7.

Zhong Q, Boyer TG, Chen PL, Lee WH (2002). Deficient nonhomologous end-joining activity in cell-free extracts from Brca1-null fibroblasts. *Cancer Res* **62:** 3966-70.

Zink D, Mayr C, Janz C, Wiesmuller L (2002). Association of p53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S phase. *Oncogene* **21:** 4788-800.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampere
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure
ATM	*Ataxia telangiectasia mutated protein*
A-T	Ataxia telangiectasia
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	*Ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related protein*
BLM	*Bloom's* Syndrom Protein
bp	Basenpaar
BRCA1	breast cancer protein 1
BRCA2	breast cancer protein 2
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C`	Carboxy-Terminus
ca.	circa
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegali Virus
CSB	*Cockayne syndrome group B*
ddH_2O	zweifach destilliertes Wasser
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle´s* Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	dsDNA-Proteinkinase
DNA-PKcs	dsDNA-Proteinkinase *catalytic subunit*
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure
EGFP	*Enhanced green fluorescent protein*
EGTA	Ethylenglykoldiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
F-A	Fanconi Anämie
FACS	*fluorescent activated cell sorter*
FCS	fötales Kälberserum
FSC	*forward scatter*
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
G	Guanin
h	human
h	Stunde
HDR	*homology directed repair*

HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure)
hMLH1	humanes MutL Homolog 1 Protein
hMSH2	humanes MutS-Homolog 2 Protein
hMSH3	humanes MutS-Homolog 3 Protein
hMSH3	humanes MutS-Homolog 6 Protein
HNPCC	*hereditary nonpolyposis colon cancer*
hPMS1	human *postmeiotic segregation increased 1* Protein
hPMS2	human *postmeiotic segregation increased 2* Protein
HR	homologe Rekombination
IgG	Immunglobulin G
IR	ionisierende Strahlung
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luri-Bertani-Medium
LTR	*long terminal repeat*
m	Meter
m	milli
M	Molar (mol/l)
min	Minute
MLH1	MutL Homolog 1
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MRN	MRE11-Rad50-NBS1-Komplex
mRNA	*messenger* Ribonukleinsäure
MSH2	MutS-Homolog 2
MSH3	MutS-Homolog 3
MSH3	MutS-Homolog 6
MW	Molekulargewicht
N’	Amino-Terminus
n	nano
NaOH	Natriumhydroxid
NBS1	*Nijmegen breakage syndrom protein* 1
NHEJ	nicht-homologes *end-joining*
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NP40	Nonidet® P40
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PGS	Protein G-Sepharose
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PI	Propidiumiodid
PIKK	*phosphatidylinositol 3-kinase related kinase*
PMS1	*postmeiotic segregation increased 1*
PMS2	*PMS2 postmeiotic segregation increased 2*
Polα	DNA-Polymerase alpha
Polβ	DNA-Polymerase beta

Puro	Puromycin-Resistenzgen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPA	*replication protein A*
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SCE	S*ister chromatide exchange*
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
sog.	sogenannt
ss	Einzelstrang
SSA	s*ingle strand annealing*
SSB	*single strand binding protein*
SSC	s*ideward scatter*
SV40	Simian Virus 40
SWI/SNF2	*switch/sucrose non-fermenting*
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
T-Ag	großes Tumorantigen des SV40 Virus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N‘,N‘-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
u	*unit*
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumenanteil
w/v	Gewicht pro Volumen
WRN	*Werner´s syndrome protein*
wt	Wildtyp
XPD/XPB	*Xerodema pigmentosum* Faktor D bzw. B
XRCC1	*X-ray cross complementing 1*
XRCC4	*X-ray cross complementing*
z. B.	zum Beispiel

9 Anhang

9.1 Publikationsliste und wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikationen

Role of Acinetobacter baylyi Crc in catabolite repression of enzymes for aromatic compound catabolim. Zimmermann T, Sorg T, Siehler SY, Gerischer U. J Bacteriol. 2009 Apr;191(8):2834-42. Epub 2009 Feb 6.

Human MutL-complexes monitor homologous recombination independently of mismatch repair. Siehler SY, Schrauder M, Gerischer U, Cantor S, Marra G, Wiesmüller L. DNA Repair (Amst). 2009 Feb 1;8(2):242-52. Epub 2008 Nov 29.

Multiple-level regulation of genes for protocetechuate degradation in Acinetobacter baylyi includes cross-regulation. Siehler SY, Dal S, Fischer R, Patz P, Gerischer U. Appl Environ Microbiol. 2007 Jan;73(1):232-42. Epub 2006 Nov 3.

The 'regulatory' beta-subunit of protein kinase CK2 negatively influences p53-mediated allosteric effects on Chk2 activation. Bjørling-Poulsen M, Siehler S, Wiesmüller L, Meek D, Niefind K, Issinger OG. Oncogene. 2005 Sep 8;24(40):6194-200.

Wild-type p53 stimulates homologous recombination upon sequence-specific binding to the ribosomal gene cluster repeat. Boehden GS, Baumann C, Siehler S, Wiesmüller L. Oncogene. 2005 Jun 16;24(26):4183-92.

Vorträge

Human MLH1 monitors homologous recombination independently of mismatch repair and damage signaling. *Siehler SY, Schrauder M, Marra G, Wiesmüller L., DNA repair, damage signaling, and carcinogenesis. First German-French Meeting, Sep 15 - 19, 2007, Toulouse, France

Mismatch repair MutL complexes in double strand break repair. *Siehler S, Schrauder M, Marra G, Wiesmüller L., 9th Meeting of the German Society for Research on DNA Repair (DGDR), Sep 12 – 15, 2006, Hamburg, Germany

Multiple levels of regulation control expressions of genes for protocatechuate degradation in Acinetobacter sp. strain ADP1., Siehler S, Fischer R, Zimmermann T, *Gerischer U. VAAM annual conference, 2005, Göttingen, Germany

MSH2 and p53: Complementary tasks in fidelity control during homologous recombination,. *Siehler S, Wiesmüller L., 25th Symposium on mechanisms of gene regulation Mar 30 – Apr 2, 2005, Blaubeuren, Germany

The regulatory subunit of protein kinase CK2 negatively influebces p53-mediated allosteric effects on CHK2 activity towards p53 actvation. Bjorling-Poulsen M, Siehler S, Wiesmüller L, Meek D, Niefind K, *Issinger O-G., 8th Meeting German Scociety for Research on DNA Repair, Sep 28 – Oct 1, 2004, Ulm, Germany

*Vortragende Person

Poster Präsentationen

The role of p53 for the induction of MCP-1 by TNF-$\tilde{\alpha}$. Hacke K, Buchwalter G, Rösl F, Siehler S, Wasylyk B, Wiesmüller L, Finzer P. International p53 Conference, May 20-24, 2006, New York, USA

Multiple levels of regulation control expression of genes for protocatechuate degradation in Acinetobacter sp. ADP1. Siehler S, Hoffmann H, Fischer R, Gerischer U., 105th ASM Meeting, 2005, Atlanta, USA

Catabolite repression in Acinetobacter: Regulation of the catabolism of aromatic compounds at multiple levels. Siehler S, Gerischer U., VAAM annual conference, 2004, Braunschweig, Germany

9.2 Lebenslauf

15. August 1976	geboren in Geislingen an der Steige
1983 - 1987	Grundschule in Lonsee
1987 - 1988	Hauptschule in Amstetten
1988 - 1991	Daniel - Straub - Realschule, Geislingen an der Steige
1991 - 1994	Elly – Heuss - Realschule, Ulm
1994 - 1997	ernährungswissenschaftliches Gymnasium, Valkenburgschule, Ulm
1997 - 1998	Universität Ulm, MTA Ausbildung, Fachrichtung Radiologie
1998 - 2003	Studium der Biologie, Universität Ulm
2003 - 2004	Diplomarbeit Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm Thema: Beteiligung des Crc-Proteins aus *Acinetobacter* sp. Stamm ADP1 an der Katabolitrepression und Charakterisierung weiterer regulatorisch wirksamer Substrate
01/2004	Diplom der Biologie
05/2004	Beginn der vorliegenden Dissertation: Sektion gynäkologische Onkologie, Universitätsfrauenklinik Ulm

9.3 Danksagung

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. L. Wiesmüller für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, die interessante Aufgabenstellung, die Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit.

Herzlich möchte ich mich bei HD Dr. Ulrike Gerischer für die Übernahme der Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Meinen Dank auch an Prof. Dr. Anita Marchfelder, für Ihre Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Den MitarbeiterInnen des endokrinologischen, onkologischen Labors der Universitätsfrauenklinik danke ich für die gesamte Zeit meiner Promotion.
Cindy Baumann und Marlen Keimling, zusammen waren wir Bob Marleys agiles Vogeltrio. Einer für alle und alle für Einen, unvergesslich. Danke. Ich freu mich auf unsere künftigen Treffen.

Ein großes Danke geht geht an Martin Mosler und Daniel Thaidigsmann. Für das Haarewurzel raufen beim Formatieren.

Bei Anna Lutomska und Rita Fischer möchte ich mich für das Korrekturlesen des Manuskripts sowie ihre Feundschaft bedanken. Auch Heike Göggerle und Marina Wager sollen hier erwähnt werden, Danke für die vielen Male herzlichen Lachens.

Meiner Familie gebührt ein herzliches Dankeschön. Meiner Mutter, Georg Kohn und Florian, Danke dass ihr mich immer bei meinen Vorhaben unterstützt und mir diesen Weg ermöglicht habt.
Ein großes Dankeschön geht an Kai. Du hast immer an mich geglaubt.

Allen nochmals ein großes Danke!

Erklärung
Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, keine anderen als die mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Ulm, November 2009

Simone Siehler