

GSI

GSI-90-30
REPORT
DEZEMBER 1990
ISSN 0171-4546

**ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR DETEKTION
STRAHLENINDUZIRTER DOPPELSTRANGBRÜCHE
IN EUKARYONTISCHER DNA**

C. Wiese

(Diplomarbeit, TH Darmstadt)

Gesellschaft für Schwerionenforschung mbH
Planckstr. 1 · Postfach 11 05 52 · D-6100 Darmstadt 11 · Germany

ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR DETEKTION
STRAHLENINDUZierter DOPPELSTRANGBRÜCHE IN
EUKARYONTISCHER DNA

Dem Fachbereich 10
Biologie
der Technischen Hochschule Darmstadt
als

Diplomarbeit

vorgelegt von

Claudia Wiese
aus Frankfurt am Main

Darmstadt, im August 1990

Referenten : Dr. G. Kraft
Prof. Dr. H.G. Gassen
Prof. Dr. U. Stewart

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes the need for transparency and accountability in financial reporting.

2. The second part of the document outlines the various methods and techniques used to collect and analyze data. It highlights the importance of using reliable sources and ensuring the accuracy of the information gathered.

3. The third part of the document focuses on the interpretation and analysis of the collected data. It discusses the various statistical tools and techniques used to draw meaningful conclusions from the data.

4. The fourth part of the document discusses the importance of communication and reporting. It emphasizes the need for clear and concise communication of the findings and conclusions to the relevant stakeholders.

5. The fifth part of the document discusses the importance of ethical considerations in research. It highlights the need for researchers to adhere to ethical guidelines and ensure the integrity and confidentiality of the data.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	4
2	Einleitung	6
2.1	Wirkung ionisierender Strahlen	6
2.2	Relative Biologische Wirksamkeit und Inaktivierungsquerschnitt	8
2.3	Medizinische Bedeutung schwerer Ionen	9
2.4	Ionisierende Strahlung und DNA - Läsionen	9
2.4.1	DNA - Doppelstrangbrüche	10
2.4.2	Reparatur von DNA - Strangbrüchen	10
2.4.3	Unterschiede in der Reparatur nach Schwerionen- und Röntgen- bestrahlung	11
2.4.4	Pulsfeldelektrophorese zur Trennung hochmolekularer DNA - Frag- mente	12
2.5	Aufgabenstellung	13
3	Materialien und Methoden	14
3.1	Materialien	14
3.1.1	Materialien und Bezugsquellen	14
3.1.2	Bakterienstämme und Plasmide	17
3.1.3	Zelllinien	18
3.1.4	Allgemeine Puffer und Medien	18
3.1.5	DNA - Längenstandards	20
3.2	Methoden	22
3.2.1	Sterilisation von Lösungen und Geräten	22
3.2.2	Kultivierung von <i>E.coli</i> und Herstellung von Dauerkulturen	22
3.2.3	Kultivierung von Säuger - Zellen	22

3.2.4	Besondere Behandlung der Hybrid - Zelllinie 2Fur-1	22
3.2.5	Untersuchung der Zelllinien auf Kontamination durch Mycoplasmen	23
3.2.6	Bestrahlung von Säuger - Zellen und Aufnahme von Überlebenskurven	24
3.2.7	Techniken zur Präparation von extrachromosomaler und von genomischer DNA	27
3.2.8	Reinigung und Präzipitation von Nucleinsäuren	30
3.2.9	Konzentrationsbestimmung präparierter DNA	31
3.2.10	Gelelektrophorese und Färbung von Nucleinsäuren	31
3.2.11	Präparation von DNA - Fragmenten	33
3.2.12	Sequenzspezifische Hydrolyse von Plasmid - DNA und chromosomaler DNA	33
3.2.13	Transfer von DNA auf Nylon- und Nitrozellulosemembranen . . .	34
3.2.14	Hybridisierung gegen haptenmarkierte DNA - Fragmente	35
3.2.15	Einsatz radioaktiv - markierter DNA zur Hybridisierung	35
4	Ergebnisse	37
4.1	Restriktion genomischer DNA in Agarose	37
4.2	Trennung hochmolekularer DNA im alternierenden Feld	39
4.3	Southern - Transfer von DNA - Fragmenten eines Größenbereiches von 200 bis 1500 kbp	41
4.4	Vergleich der Hybridisierungstechniken	43
4.4.1	Überprüfung der DNA - Sonden	43
4.4.2	DNA - Markierung durch 'random-primed' - Einbau	43
4.4.3	Einbau markierter Nucleotide durch 'nick' - Translation	45
4.5	Hybridisierung mit Digoxigenin - dUTP - markierter DNA	45
4.5.1	Test der Methode im konventionellen Southern - Blot	45
4.5.2	PFG - Blot humaner DNA und Nachweis repetitiver Sequenzen .	47
4.5.3	Nachweis humaner Alu - Sequenzen in 2Fur-1 - Hybridzellen . .	48
4.6	Hybridisierung durch Einsatz radioaktiv - markierter Sonden	49
4.6.1	Detektion humaner Alu - Sequenzen in 2Fur-1 - Hybridzellen . .	49
4.7	Nachweis des Gens für die schwere Kette des humanen β - Myosins (MYH6)	51
4.7.1	Test der Sonde durch Hybridisierung gegen humane Plazenta - DNA	51
4.7.2	Detektion des β - Myosin - Gens im PFG - Blot	51
4.8	Inaktivierung von 2Fur-1 - Hybridzellen	52

5 Diskussion	56
5.1 Sedimentation im Saccharosegradienten	57
5.2 Filterelution	57
5.3 Sedimentation bei reduzierter Geschwindigkeit	58
5.4 Gelelektrophorese	58
5.5 Alternierende Elektrophorese	59
5.5.1 Induktion und Reparatur von DSB in Hefechromosomen	59
5.5.2 Detektion von Doppelstrangbrüchen in CHO - Zellen	60
5.6 Quantifizierung DSB - geschädigter DNA durch Hybridisierung	61
6 Literatur	65
A Abkürzungsverzeichnis	70

Kapitel 1

Zusammenfassung

Eines der Hauptprobleme der Strahlenbiologie ist es, die Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Säugetier-DNA experimentell zu erfassen. Die Schwierigkeiten liegen insbesondere darin, bei Applikation relativ niedriger Bestrahlungsdosen eine kleine Anzahl von Läsionen in Genomen hoher Komplexität zu detektieren und ihre biologischen Folgen zu ermitteln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein System erstellt, mit dessen Hilfe die Induktion von Doppelstrangbrüchen in Säugetier-DNA durch ionisierende Strahlen nachgewiesen werden kann. Dabei lag der Schwerpunkt in der Trennung hochmolekularer DNA eines Größenbereiches von 200 kbp bis 1,5 Mbp, die es erlaubt, von den üblichen, auf hohe Dosen beschränkten Analyseverfahren Abstand zu nehmen. Basierend auf der Elektrophorese im alternierenden Feld fand die Entwicklung der Methode Anlehnung an die von Contopoulou *et al.* (Yeast (1987) 3, 71) durchgeführten Experimente zur Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in *Saccharomyces cerevisiae*.

Die in Agarose eingebettete genomische DNA wurde aus humanen Zellen und aus Hamsterzellen isoliert. Sie wurde auf Integrität und Nucleasefreiheit überprüft. Die enzymatische DNA-Hydrolyse erfolgte mit selten schneidenden Restriktionsendonucleasen. Es wurden Tests zur Bestimmung der für eine vollständige Fragmentierung der DNA erforderlichen Enzymmenge durchgeführt. Bei Hydrolyse mit *Mlu* I mußten 5 U, mit *Sal* I 10 U und mit *Sac* II mußten 15 U pro μ g DNA eingesetzt werden.

Die beste Auftrennung im transvers-alternierenden Feld ergab sich nach 20 h Elektrophorese bei einer 2mal 10stündigen Pulsfrequenz von 45 bzw. 65 s. Auftrennung und Restriktion wurden anhand des nach Ethidiumbromidfärbung auftretenden Bandenmusters qualifiziert.

Konventioneller DNA-Transfer auf Nitrozellulose- bzw. Nylonmembranen wurde auf besonders große Fragmente optimiert. Die Hybridisierung erfolgte gegen radioaktiv-markierte oder gegen Digoxigenin-markierte Sonden. Vergleich der Nachweisgrenze von radioaktiv und nicht-radioaktiv durchgeführter Hybridisierung ergab eine 5fach höhere Sensitivität für die mit [α - 32 P] - dNTP markierte DNA.

Als Sonden wurden repetitive humane Sequenzen (Vertreter der Alu-Familie) und als nicht repetitive Probe Teile des Gens für die schwere Kette des humanen β - Myosins (Exon 24-36) getestet. Die Hybridisierung humaner DNA gegen Alu-Sequenzen ergab sowohl bei radioaktiv als auch bei nicht-radioaktiv durchgeführtem Nachweis deutliche, jedoch ineinander übergehende Signale. Eine Reduktion der Ziel-DNA wurde durch Arbeiten mit einer Hybridzelle erreicht (CHO - K1 mit Translokation des langen Arms des humanen Chromosoms 21 an ein Hamsterchromosom). Dabei war die Voraussetzung einer nicht stattfindenden Kreuzhybridisierung humaner Alu-Sequenzen gegen repetitive DNA im Nagergenom gegeben.

Nach Optimierung der experimentellen Methoden wurde bei Hybridisierung gegen eine radioaktiv-markierte Alu-Sonde ein definiertes Bandenmuster erhalten, wie von Gardiner bei Verwendung sequenzähnlicher Alu-Sonden beschrieben (persönliche Mitteilung). Innerhalb dessen wurden nach Hydrolyse der Hybridzell-DNA mit *Sal I* zwei intensivere Banden einer ungefähren Fragmentlängengröße von 450 kbp bzw. 1,1 Mbp detektiert. Sie können zur Untersuchung der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen herangezogen werden. Dabei wird nach Schädigung der DNA durch Doppelstrangbrüche eine Abschwächung dieser Hybridisierungssignale erwartet. In Korrelation dazu sollte ein Hintergrundsignal erscheinen, welches sich auf die erzeugten kleineren DNA-Fragmente zurückführen läßt.

Zur Quantifizierung der induzierten Doppelstrangbrüche ist jedoch die Trennung aller hybridisierenden Banden nicht vollständig genug. Aus diesem Grunde wurde als Alternative eine humane β - Myosin - Sonde gegen humane genomische DNA hybridisiert. Das erhaltene Signal könnte nach Auswahl geeigneter 'single - copy' - Sonden durch weitere, in einem höheren Fragmentgrößenbereich erscheinende, Signale ergänzt werden.

Die Strahlensensitivität der Hybridzelle wurde durch Inaktivierung sowohl nach Bestrahlung mit beschleunigten schweren Ionen als auch nach Röntgenbestrahlung mittels Koloniebildungstest ermittelt und mit den für andere Zelllinien gemessenen Wirkungsquerschnitten verglichen. Der höhere Inaktivierungsquerschnitt im Falle der Hybridzelle im Vergleich zu den bereits untersuchten Linien des Chinesischen Hamsters ist vermutlich auf den hohen Anteil polyploider Zellen und den damit verbundenen größeren Zellkern zurückzuführen.

Kapitel 2

Einleitung

2.1 Wirkung ionisierender Strahlen

Unter ionisierender Strahlung faßt man, neben der Teilchenstrahlung, im Bereich der elektromagnetischen Strahlung UV-, Röntgen- und γ - Strahlen zusammen.

Obschon die Wirkung ionisierender Strahlen auf den gleichen Primärvorgängen beruht, nämlich der Anregung und Ionisation von Atomen und Molekülen des bestrahlten Materials, bestehen hinsichtlich der räumlichen Anordnung der deponierten Energie im durchstrahlten Volumen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Elektronen auf der einen und schweren geladenen Teilchen auf der anderen Seite große Unterschiede. Sie manifestieren sich in den ungleichen Wirksamkeiten der verschiedenen Strahlenarten.

Der lineare Energietransfer (LET) quantifiziert den vom Medium im Mittel absorbierten Energiebetrag pro Wegstrecke ($\text{keV}/\mu\text{m}$) und spiegelt die Ionisationsdichte im Targetmaterial (Elektronen-Ionenpaare pro μm) wieder. Unter Einbeziehung aller Ionisationsereignisse entspricht der Energieverlust dE/dx eines schweren geladenen Teilchens dem LET. Da im Mittel ca. 30 eV zur Erzeugung eines Elektron-Ionenpaares benötigt werden, läßt sich, für einen gegebenen LET-Wert, die Anzahl der Ionisationsereignisse pro Weglänge berechnen. Der LET gibt jedoch nicht die radiale Verteilung der Energiedeposition um das passierende schwere Ion wieder.

Die biologische Wirkung unterschiedlicher Strahlenqualitäten wird annäherungsweise in Abhängigkeit vom LET beschrieben. Da ein Teilchen jedoch bei zwei verschiedenen Energien den gleichen LET aufweisen kann (Abb. 2.1), verschiedene Energien aber zu unterschiedlichen Ionisationsquerschnitten und damit andersartiger biologischer Wirkung führen, läßt sich die biologische Wirkung nicht allein durch den LET quantifizieren.

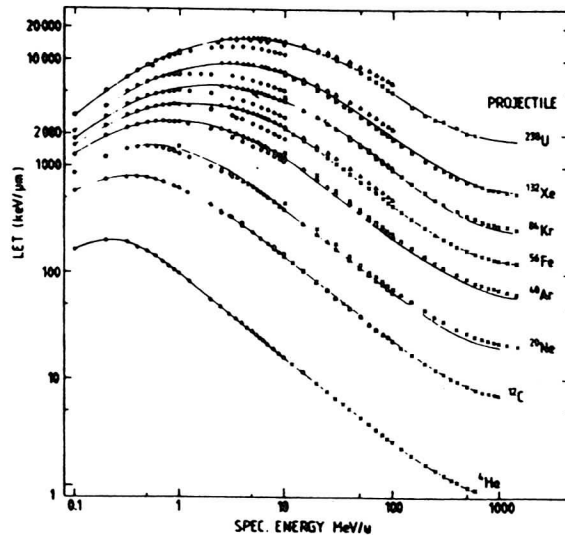


Abbildung 2.1: LET verschiedener Ionen in Kohlenstoff in Abhängigkeit der spezifischen Energie (aus Kraft, 1987).

Gemäß der unterschiedlichen Energieabsorption im durchstrahlten Volumen bei ionisierenden Strahlen verschiedener Art und gleicher Dosis lassen sich zwei Hauptgruppen unterscheiden :

Dünn ionisierende Strahlung entspricht LET-Werten von bis zu $10 \text{ keV}/\mu\text{m}$ (ca. 300 Ionenpaare pro μm). Hierzu zählen Röntgen- und γ -Strahlen, Elektronen- und β -Strahlung sowie leichte Ionen extrem hoher Energien.

Dicht ionisierende Strahlung faßt niederenergetische leichte Teilchen wie Protonen und α -Strahlen und schwerere Ionen niederer und hoher Energien zusammen.

Im Falle der elektromagnetischen Strahlung läßt sich die von der Quantenenergie abhängige Wechselwirkung mit dem durchstrahlten Material in drei wesentliche Prozesse unterteilen. Der Photoeffekt dominiert im Bereich kleiner Energien, der Comptoneffekt bei mittleren Energien, und bei Energien oberhalb $1,02 \text{ MeV}$ überwiegt die Paarbildung. Die in diesen Prozessen erzeugten primären Elektronen – sowohl räumlich als auch zeitlich unabhängig voneinander produziert – können bei ausreichend hoher Energie weitere Ionisationen hervorrufen und zur Produktion von Sekundärelektronen führen. Die Produktion dieser ist lokal dichter, die Wahrscheinlichkeit ihrer Bildung ist jedoch seltener als die der primären Elektronen. Erst bei hohen Dosen kommt es zur lokalen Akkumulation molekularer Schäden und deren Interaktion.

Die Wechselwirkung geladener Teilchen mit der Materie wird durch Ladung und Geschwindigkeit des Projektils bestimmt. Dabei kommt es zur Ausbildung einer Teilchenspur aus Elektronen und positiven Ionen. Der Durchmesser der Spur wird durch die maximale Reichweite der erzeugten Elektronen definiert und hängt nur von der spezifischen Energie des Primärteilchens ab. Je langsamer das Ion, desto kleiner ist der Spurdurchmesser. Die Ordnungszahl des Ions bestimmt über die effektive Kernladungszahl die Ionisationsdichte.

Im Inneren der Spur ist die deponierte Energie (Dosis) am höchsten. Sie fällt mit dem Quadrat des Abstandes vom Zentrum nach außen ab.

Die Bereiche hoher Ionisations- und Elektronendichte sind für die höhere biologische Wirksamkeit der Teilchenstrahlung gegenüber dünn ionisierender verantwortlich.

Die Wechselwirkung des Projektils mit den Targetatomen und -molekülen führt zu einer definierten Reichweite des Teilchens im Absorber. Am Ende der Bahnspur kommt es zu der für Teilchenstrahlung charakteristischen sehr hohen Energiedeposition in Form des Bragg-Peaks (Abb. 2.2).

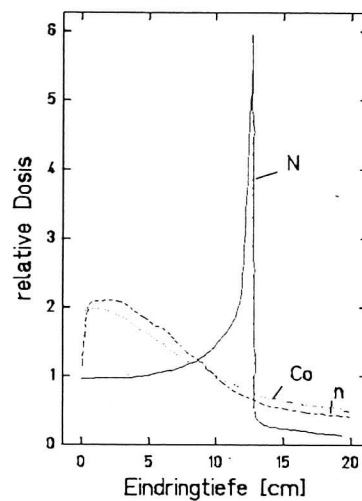


Abbildung 2.2: Tiefendosisverteilung verschiedener Strahlenarten. Co: Cobald-60 γ -Strahlen, n: Neutronen, N: Stickstoffionen (Bragg-Peak)

2.2 Relative Biologische Wirksamkeit und Inaktivierungsquerschnitt

Die unterschiedliche Wirkung von Ionen hängt von der lokalen Energiedeposition in der Teilchenspur ab. Die Relative Biologische Wirksamkeit (RBW) quantifiziert die verschiedenartigen biologischen Effekte der Teilchen und wird ausgedrückt durch das Verhältnis der Dosen von Vergleichs- zur Teststrahlung mit dem gleichen biologischen Effekt. Die RBW zeigt Abhängigkeit von der Ionisationsdichte der getesteten Strahlenart und steigt bis zu LET-Werten von $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$, bei schweren beschleunigten Ionen bis zu $200 \text{ keV}/\mu\text{m}$, an. Der Abfall zu höheren LET-Werten wird oft durch eine Überproduktion von Schäden erklärt: Es wird mehr Energie an das Targetsystem übertragen als zur Auslösung des beobachteten Effektes benötigt. Die erzeugten Schäden können sich nicht getrennt manifestieren (over-kill Effekt). Eine Bestätigung

des over-kill Effektes kann allein durch Bestimmung der zu biologischen Endpunkten führenden molekularen Schadensereignisse erfolgen. Eine erhöhte Ausbeute sowohl an Einzelstrangbrüchen wie auch an Doppelstrangbrüchen konnte jedoch bei LET-Werten oberhalb von $200 \text{ keV}/\mu\text{m}$ bislang nicht gezeigt werden.

Neben der Charakterisierung der Strahlenqualität durch die auf die Dosis bezogene RBW wird häufig die Effektivität pro Teilchen als Inaktivierungsquerschnitt (σ) angegeben. Jener hat die Dimension einer Fläche (μm^2) und kann als diejenige Querschnittsfläche verstanden werden, die beim Durchgang eines Teilchens geschädigt wird.

2.3 Medizinische Bedeutung schwerer Ionen

Schwere geladene Teilchen bieten bei Anwendung in der Strahlentherapie den Vorteil einer besseren Dosisverteilung sowie einer erhöhten biologischen Wirksamkeit im Tumorzellenvolumen.

Für Photonen und Neutronen nimmt die Dosis exponentiell mit der Eindringtiefe ab. Für schwere Ionen steigt sie zum Bragg-Peak hin an (Abb. 2.2).

Die günstige Tiefendosisverteilung schwerer Ionen in Form hoher Energiedeposition in großer Tiefe und ihre hohe RBW haben seit 1975 verstärkt zu ihrem Einsatz in der Radiotherapie geführt. Ein günstiges Verhältnis zwischen Strahlenbelastung des gesunden zu der des kranken Gewebes ist hier besonders wichtig. Die höhere Energiekonzentration innerhalb der Teilchenspur schwerer geladener Teilchen bewirkt ferner eine Reduktion des Sauerstoffeffektes und schränkt somit den Überlebensvorteil hypoxischer, im Inneren des Tumors befindlicher Zellen ein.

2.4 Ionisierende Strahlung und DNA - Läsionen

Infolge ihrer Targetgröße sowie der Einzigartigkeit ihres Informationsgehaltes stellt die DNA das kritische Ziel des Strahlenschadens in biologischen Systemen dar. Die molekularen Veränderungen werden dabei nicht nur durch den direkten sondern auch durch den indirekten Effekt bewirkt. Als direkten Effekt bezeichnet man die unmittelbare Schädigung der DNA entweder durch das Primärteilchen oder durch die produzierten Sekundärelektronen. Der indirekte Effekt resultiert aus der Reaktion hochreaktiver, strahleninduzierter Radikale an der DNA. Er spielt bei sehr schweren Ionen eine untergeordnete Rolle.

In beiden Fällen kommt es zur Ausbildung verschiedener Typen von DNA-Läsionen. Strangbrüche und Basenschäden treten häufiger auf, DNA-Protein-Vernetzungen sowie DNA-DNA-Vernetzungen sind seltener.

Unter diesen Läsionen scheint der Doppelstrangbruch (DSB) die wichtigste in der Ausprägung des biologischen Schadens. Mittels verschiedener Analyseverfahren versucht man, einen Zusammenhang zwischen der Induktion von Doppelstrangbrüchen

und dem überlebenden Anteil bestrahlter Zellen zu erstellen. Geschwindigkeitssedimentation und Filterelution sowie Gelelektrophorese und Viskoelastometrie zählen zu den gängigen Methoden. Das hohe Molekulargewicht des Säugergenoms macht jedoch genaue Messungen zur DSB-Induktion mit diesen Methoden schwierig. Ihre Anwendung führt zu widersprüchlichen Ergebnissen.

2.4.1 DNA - Doppelstrangbrüche

Die biologische Bedeutung des DSB wurde durch Untersuchung DSB - reparaturdefizienter Mutanten gezeigt. Entsprechende Hefe- (Ho, 1975) und Säugerzellen (Jeggo *et al.*, 1983; Kemp *et al.*, 1984; Costa und Bryant, 1988) sind extrem sensitiv gegenüber ionisierender Strahlung. Bei Säugern wurde eine erhöhte Aberrationsrate festgestellt (Kemp und Jeggo, 1986; Bryant *et al.*, 1987).

Bryant (1984, 1985) sowie Natarajan und Obe (1984) beobachteten, daß die Induktion von Doppelstrangbrüchen durch Restriktionsenzyme in permeabilisierten Zellen bei Abwesenheit anderer DNA-Schadensformen zu Chromosomenaberrationen führte. *Pvu II* behandelte Zellen zeigten Chromosomen- und Chromatidaberrationen; die Brüche blieben entweder unrepariert oder - nach Interaktion mit anderen DNA-Strängen und illegitimer Rekombination - kam es zur Ausbildung von Austauschfiguren. Dabei müsse bei den durch Restriktionsendonucleasen erzeugten Doppelstrangbrüchen jedoch bedacht werden, daß durch die Bildung einer 3'OH - bzw. 5'Phosphatgruppe allein Ligaseaktivität zur Instandsetzung ausreichen könnte (Bryant, 1984). Dies könnte auch die im Verhältnis zur Röntgenstrahlung geringere Effektivität *Pvu II* induzierter Doppelstrangbrüche bei der Ausbildung von Chromosomenaberrationen erklären.

Natarajan *et al.* (1980) zeigten ferner, daß bei zusätzlicher DSB-Induktion in mit Röntgenstrahlen bestrahlten Säuger-Zellen durch einzelstrangspezifische Endonucleasen (Konversion von SSB zu DSB) eine Zunahme an Chromosomen- und Chromatidaberrationen zu verzeichnen ist.

2.4.2 Reparatur von DNA - Strangbrüchen

Die Mechanismen des durch ionisierende Strahlung erzeugten biologischen Schadens wie Mutation, Chromosomenaberration, onkogene Transformation und Zelltod sind noch nicht verstanden. Sie sollen das Ergebnis einer falschen bzw. unvollständigen Reparatur sein. Einzelstrangbrüche sind mit der zytogenetischen Schädigung meist nicht korreliert (Ganassi *et al.*, 1986) und können nur zur Initiierung von Chromosomenschäden beitragen, sofern sie Bestandteil einer irreparablen Komponente sind.

Im Gegensatz zum Einzelstrangbruch sind Doppelstrangbrüche nur beschränkt reparierbar und können damit zur Inaktivierung der Zelle führen.

Eine Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist sowohl in *S. cerevisiae* als auch in verschiedenen Säuger-Zellen untersucht worden (Corry und Cole, 1973; Karsin und Hutchinson, 1977; Lehman und Stevens, 1977; Blöcher und Pohlit, 1982). Nach Resnick (1976)

soll sie durch Rekombination erfolgen. In Säuger-Zellen wurde eine Rekombinationsreparatur allerdings noch nicht beobachtet. Resnick (1976) beschrieb die Letalität eines Doppelstrangbruches in haploiden, rekombinationsdefekten Hefezellen; er zeigte ferner, daß im Wildtyp ein Rekombinationsereignis pro repariertem DSB erfolgte.

2.4.3 Unterschiede in der Reparatur nach Schwerionen- und Röntgenbestrahlung

Quantitative Studien zur Induktion und Reparatur von Strangbrüchen waren stets abhängig von der Entwicklung fortschreitend sensitiver Techniken.

Untersuchungen von DNA-Schäden und deren Reparatur wurden mit den erwähnten Methoden bis zu LET-Werten von $5000 \text{ keV}/\mu\text{m}$ von Ritter *et al.* (1977), Roots *et al.* (1979, 1985), Kampf und Eichhorn (1983) und Rydberg (1985) durchgeführt. Für nicht transformierte, diploide Zellen liegen Daten bis zu $16200 \text{ keV}/\mu\text{m}$ von Aufderheide (1987) und Heilmann (1987) vor.

Die Erzeugung von Strangbrüchen nimmt mit der Teilchenenergie zu. Bei Ionen gleicher Geschwindigkeit nimmt die Strangbruchinduktion mit der Ordnungszahl des Projektils zu.

Nach Röntgenbestrahlung beträgt das Verhältnis induzierter SSB zu DSB ca. 20, nach Bestrahlung mit beschleunigten schweren Ionen kann es bis auf 2 absinken.

Rate und Ausmaß der Reparatur nehmen mit Dosis bzw. Teilchenfluenz ab. Dies kann bedingt sein durch die erzeugten, strukturell unterschiedlichen Läsionen oder aber durch Schädigungen im Reparatursystem.

Bezüglich der Reparatur von Strangbrüchen nach Röntgenbestrahlung und Teilchenstrahlung lassen sich zwei wesentliche Unterschiede feststellen :

Die Reparatur nach Schwerionenbestrahlung ist deutlich verlangsamt. Bei Röntgenstrahlen ist der Anteil des ursprünglich induzierten Schadens nach 5 min auf die Hälfte gesunken, bei Schwerionenbestrahlung ist dies erst nach ca. 15 min der Fall (Heilmann, 1987). Dies kann auf den höheren Anteil erzeugter DNA-Doppelstrangbrüche zurückzuführen sein. Gegebenenfalls spielen jedoch auch andere, komplexere Läsionen eine Rolle. Allein für die erstere von beiden Annahmen bestehen bislang experimentelle Beweise.

Bei 5-15% des ursprünglich induzierten Schadens erfolgt im Falle der Schwerionenbestrahlung auch nach 20 h Inkubation nach Bestrahlung keine Reparatur (Aufderheide *et al.*, 1987). Dieser Anteil ist damit deutlich höher als der nach Röntgenbestrahlung und 20stündiger Inkubation gemessene Restschaden von 0,6% (200 Gy). Roots *et al.* (1979) und Ritter *et al.* (1977) ermittelten bei einer erlaubten Reparaturzeit von 8-14 h nach Schwerionenbestrahlung einen Restschaden von 20-25% (20-450 Gy). Nach den Ergebnissen von Roots *et al.* und Ritter *et al.* würden 50 unreparierte Brüche zu einer Inaktivierung der Zelle führen. Blöcher und Pohlitz (1982) ermittelten lediglich einen nicht reparierten DSB pro inaktivierter Zelle.

Aus den bisher durchgeführten Experimenten kann nicht eindeutig geschlossen werden, ob der Anteil am Restschaden eine Folge erzeugter DNA-Läsionen ist. Auch Effekte im Reparatursystem könnten bei den benötigten hohen Dosen eine wesentliche Rolle spielen (Fritz - Niggli *et al.*, 1988).

2.4.4 Pulsfeldelektrophorese zur Trennung hochmolekularer DNA - Fragmente

Um die biologische Bedeutung verschiedener DNA-Schadensformen aufzuklären, müssen spezifische Läsionen gemessen werden können. Die Korrelation zwischen erzeugten Doppelstrangbrüchen und Zellinaktivierung wurde bereits angesprochen. Außerdem muß durch Reduktion der Bestrahlungsdosen eine Schädigung des Reparatursystems der Zelle ausgeschlossen werden können.

Die Einführung der Pulsfeldelektrophorese erlaubt es, DNA-Fragmente bis zu einer Größe von mehreren Mbp durch elektrische Felder mit periodischer Richtungsänderung zu trennen (Anand, 1986; Carle *et al.*, 1986). Die Spezifität dieses Systems für die Detektion DSB-geschädigter DNA wurde bereits untersucht (Stamato und Denko, 1990). Die Trennung hochmolekularer DNA-Fragmente erlaubt eine Annäherung der Bestrahlungsdosen an solche innerhalb des Überlebensbereiches. Von den mittels Sedimentation und Filterelution nur bei supra-letalen Dosen verlässlich erfolgenden Bestimmungen kann Abstand genommen werden.

Die Größe der zu trennenden DNA-Fragmente ist von der gewählten Pulsfrequenz, der angelegten Spannung sowie der Gesamtelektrophoresedauer abhängig. Inzwischen sind verschiedene Systeme der alternierenden Elektrophorese entwickelt worden. Sie unterscheiden sich im wesentlichen in der geometrischen Anordnung der elektrischen Felder (Lai *et al.*, 1989; Anand, 1986).

Das in dieser Arbeit eingesetzte System – die einzige dreidimensionale Entwicklung – ist die Elektrophorese im transvers-alternierenden Feld (TAFE).

In diesem Elektrophoresesystem überspannen die Elektroden die gesamte Breitseite des Gels und führen damit infolge der homogenen elektrischen Felder zu einer gleichmäßigen Trennung in allen Gelspuren. Die beiden elektrischen Felder verlaufen transvers zum vertikal positionierten Agarosegel. Durch wechselseitiges Anlegen einer Spannung kommt es sowohl zu einer zum Gelende erfolgenden vertikalen als auch zu einer senkrecht zur Geloberfläche verlaufenden horizontalen Bewegung der DNA (Winter und Driesel, 1988). Dabei überwiegt nach Überschreitung der Gelmitte die horizontale Komponente. Dies führt zu einer Fokussierung der DNA-Fragmente gleicher Größe. Alle Fragmente, welche kleiner sind als das untere Limit des Trennbereiches, werden in einer Bande am unteren Gelende angesammelt (Gardiner und Patterson, 1989).

2.5 Aufgabenstellung

Entsprechend den von Contopoulou *et al.* (1987) durchgeführten Analysen zur Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen in Hefechromosomen sollte ein äquivalentes System für die um zwei Größenordnungen komplexere Säugetier-DNA erstellt werden. Das von Contopoulou *et al.* gewählte Pulsfeldelektrophoresesystem umfaßt einen Trennbereich von 200-3000 kbp. Die ganzen Hefechromosomen können damit voneinander getrennt werden. Nach Bestrahlung der Hefe beobachteten die Autoren eine Abnahme der Fluoreszenzintensitäten der Chromosomenbanden. Gleichzeitig wurde eine Hintergrundfärbung im Agarosegel infolge erzeugter DNA-Fragmente detektiert. Wurde die Hefe nach Bestrahlung zur Reparatur inkubiert, nahmen die Intensitäten der Chromosomenbanden wieder zu.

Im Falle der zu untersuchenden Säugetier-DNA mußte nach Isolation zunächst die Integrität des Gesamtgenoms überprüft werden. Die sich anschließende Hydrolyse mit selten schneidenden Restriktionsendonucleasen führte zu einer durchschnittlichen Fragmentlängengröße von 10^6 bp. Zur Trennung im alternierenden Feld sollten die Elektrophoresebedingungen auf einen Fragmentgrößenbereich von ca. 200 bis 1500 kbp optimiert werden. Nach Transfer dieser hochmolekularen DNA-Fragmente sollte gegen repetitive humane DNA-Sonden hybridisiert werden. Bei Einsatz von Hybridzell-DNA als Ziel-DNA wurde der Erhalt eines bandenartigen Hybridisierungsmusters angestrebt.

Mit diesem System erhöht sich die Fragmentlänge der zu analysierenden DNA im Vergleich zu den gängigen Methoden zur Bestimmung Doppelstrangbruch-geschädigter, hochmolekularer DNA von ca. 50 auf 1000 kbp. Dadurch wird neben der selektiven Erfassung von Doppelstrangbrüchen auch eine Reduktion der Bestrahlungsdosen möglich.

Kapitel 3

Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Materialien und Bezugsquellen

Enzyme

E.coli DNA Polymerase I (Klenow)
Proteinase K aus *Tritirachium album*

Lysozym aus Hühnereiweiß
Trypsin - EDTA für Zellkultur
Trypsin aus Rinderpankreas
Restriktionsendonucleasen

Ribonuclease A aus Rinderpankreas
E.coli DNA Polymerase I /DNase I

Boehringer, Mannheim
Merck, Darmstadt
Sigma, Deisenhofen
Serva, Heidelberg
Boehringer, Mannheim
Flow, Meckenheim
Serva, Heidelberg
Beckman, München
BRL, Eggenstein
Boehringer, Mannheim
Serva, Heidelberg
BRL, Eggenstein

Sonstige Materialien

Acrylamid, 2×krist.
Adenosin - 5'- triphosphat

Serva, Heidelberg
Boehringer, Mannheim

Agarose (LE)	Beckman, München
Agarose (standard low)	Bio Rad, Richmond
Agarose Typ VII	Sigma, Deisenhofen
Albumin aus Rinderserum Frakt.V	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin, Na - Salz	Boehringer, Mannheim
Bisbenzimid H.33258	Serva, Heidelberg
Brij 58	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau, Na - Salz	Serva, Heidelberg
Bykomycin	Byk - Gulden, Konstanz
Cäsiumchlorid	Boehringer, Mannheim
Desoxyribonucleinsäure, Na - Salz (Salmon testes)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol	Merck, Darmstadt
DMSO	Serva, Heidelberg
DNA - Markierungskit mit Digoxigenin - dUTP	Boehringer, Mannheim
Entwickler für Röntgenfilme	Adefo - Chemie, Nürnberg
Ethidiumbromid krist.	Boehringer, Mannheim
EDTA	Sigma, Deisenhofen
F - 12 - Medium	Flow, Meckenheim
Fetales Kälberserum	Boehringer, Mannheim
Ficoll Typ 400	Sigma, Deisenhofen
Filterpapier GB 002	Schleicher u. Schuell, Dassel
Fixierer für Röntgenfilme	Adefo - Chemie, Nürnberg
Hefechromosomen - DNA (St. 334)	Beckman, München
N - 2 - Hydroxyethylpiperazin	Flow, Meckenheim
Hybond N	Amersham, Braunschweig
L - Glutamin	Boehringer, Mannheim
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Löfflers Methylenblau	Merck, Darmstadt
MEM - Medium	Boehringer, Mannheim
MEME - Medium	Flow, Meckenheim
β - Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Nähragar Standard I	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat	Sigma, Deisenhofen
Na - 7 - desoxycholat	Sigma, Deisenhofen
'nick' - Translations - System	BRL, Eggenstein
Nitrocellulose BA 83	Schleicher u. Schuell, Dassel

Nytran N 13	Schleicher u. Schuell, Dassel
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin	Serva, Heidelberg
Paraffin	Roth, Karlsruhe
PBS	Boehringer, Mannheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polaroidfilme Typ 665, 55, 54	Polaroid, Offenbach
Polyethylenglykol 6000	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon	Sigma, Deisenhofen
Röntgenfilme X-OMAT AR 5	über Siemens, Frankfurt
Sephadex G50 medium	Pharmacia, Freiburg
Spermidin	Sigma, Deisenhofen
Standard I - Nährbouillon	Merck, Darmstadt
Uridin	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Radiochemikalien

[α - ³² P]-dATP (3000 Ci/mmol)	NEN, Dreieich
[α - ³² P]-dCTP (3000 Ci/mmol)	NEN, Dreieich

Allgemeine Laborchemikalien und Lösungsmittel in p.a. Qualität	Merck, Darmstadt
	Roth, Karlsruhe
	Serva, Heidelberg

Geräte

Apparatur zur Elektroelution	Schleicher u. Schuell, Biotrap BT 1000
Coulter Counter	Coulter Electronics LTD.
Pipettierhilfe	Hamilton Microlab 1000
Sofortbildkamera	Polaroid
Spektralphotometer	Beckman DU - 64
TAFE - Elektrophoresesystem	Beckman
UV - Transilluminator	Camag Reprostar
Zentrifugen (Rotoren)	Sorvall RC 5B (SS 34, GSA, HB-4)
	Beckman L7 55 (55,2-Ti)
	Heraeus Minifuge RF
	Eppendorftischzentrifuge 5415
	Hettich Universal 2S

3.1.2 Bakterienstämme und Plasmide

Stämme :

Stamm	Genotyp
C 600	F ⁻ , thi-1, thr-1, leu B6, lac Y1, ton A21, sup E44, λ ⁻
JM 103	Δ (lac pro), thi, str A, sup E, end A, sbc B, hsdR, F'[tra D36, pro AB, lac I ^s , ZΔ M15]
DH 2	F ⁻ , rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hsdR 17, sup E 44, rel A1, λ ⁺

Plasmide :

Plasmid	Größe(kbp)	Resistenzgen	Bemerkungen	Herkunft/Referenz
Blur 11	4,6 kbp	amp ^r	pBR 322 mit 300 bp Alu - Insert in <i>Bam</i> HI - Schnittstelle	Deininger <i>et al.</i> , 1981
Blur 2	3,0 kbp	amp ^r	pUC 18 mit 300 bp Alu - Insert in <i>Bam</i> HI - Schnittstelle	Deininger <i>et al.</i> , 1981
pBR 328	4,9 kbp	amp ^r , tet ^r , cam ^r	pBR 322 mit cam ^r	Boehringer, Mannheim
pC 14	10,6 kbp	amp ^r , tet ^r	pBR 325 mit Exon 24 - 36 der schweren Kette des humanen β - Myosins in <i>Eco</i> RI - Schnittstelle	H.P. Vosberg, MPI Heidelberg

3.1.3 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Chromosomen	Bemerkungen	Herkunft/Referenz
T1	Mensch, Niere	46 (2n)	etablierte Zelllinie	LBL, Berkeley
V79	Chin. Hamster, Lunge	22 - 24 (2n)	etablierte Zelllinie	LBL, Berkeley
2Fur-1	Chin.Hamster, Ovar	22 - 24 (2n)	CHO - K1 mit Translokation des langen Arms des humanen Chromosoms 21	K. Gardiner
Al	Chin. Hamster, Ovar	22 - 24 (2n)	CHO - K1 plus humanes Chromosom 11	C.A. Waldren

T1 - Zellen sowie V79 - Zellen wurden als Monolayer - Stammkulturen gehalten.

Die beiden Hybridzelllinien wurden nur zu Versuchszwecken aufgetaut, um stets mit Zellen niedriger Passagehöhe zu arbeiten.

3.1.4 Allgemeine Puffer und Medien

TAE - Puffer (50×) : 2 M Tris - Base
 1 M Essigsäure
 50 mM EDTA
 pH 8,3 mit Essigsäure einstellen

TBE - Puffer (20×) : 1 M Tris - Base
 1 M Borsäure
 20 mM EDTA

TE - Puffer (10×) : 100 mM Tris - Base
 10 mM EDTA

SSC (20×) : 3 M NaCl
 0,3 M Na₃citrat×2H₂O
 pH 7,0 mit 1N HCl einstellen

TAFE - Elektrophoresepuffer (20×) :	200 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 88 mM Essigsäure pH 8,0 ergibt sich
Denhardt's Lösung (50×) :	5 g Ficoll 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g BSA Fkt. V ad 500 ml, steril filtrieren
Nährboullion Standard I :	2,8 g/l Hefeextrakt 7,8 g/l Pepton aus Casein 7,8 g/l Pepton aus Fleisch 1,0 g/l Glucose 5,6 g/l NaCl pH 7,5 (37°C)
Standard I Nähragar :	Standard I Nährboullion + 15 g/l Agar
Selektionsmedium, Ampicillin :	Vorkultur : 100 µg/ml Anzucht : 50 µg/ml
Ampicillin :	25 mg/ml in H ₂ O steril filtrieren bei -20°C lagern
Trypsin (0,05%ig) :	4,4 g Na ₃ citrat × 2H ₂ O 10,0 g KCl 0,5 g Trypsin 0,2 g EDTA 2 ml Phenolrot pH 7,3 ad 1000 ml, steril filtrieren
Methylenblau - Farblösung :	50 ml Löfflers Methylenblau 45 ml 0,1%ige KOH ad 500 ml, filtrieren

F - 12 Medium (8%(v/v)FKS) :	45,0 ml FKS
	5,6 ml Uridin (3mM)
	3,0 ml Glutamin (200mM)
	0,55 ml Bykomycin (0,1g/ml)
MEM - Medium (10%(v/v)FKS) :	56 ml FKS
	5 ml Glutamin (200mM)
	0,6 ml Bykomycin (0,1g/ml)
MEME - Medium (15%(v/v)FKS) :	80 ml FKS
	5 ml Glutamin (200mM)
	0,6 ml Bykomycin (0,1g/ml)

3.1.5 DNA - Längenstandards

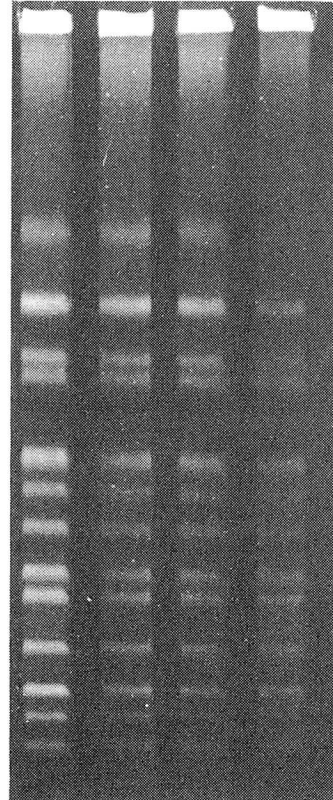
Zur Abschätzung der Fragmentlängengröße hydrolysierter DNA wurde im Falle konventioneller Agarosegele mit *Hin* dIII restringierte DNA des Phagen λ eingesetzt. Es ergeben sich Fragmente folgender Größe :

- * 23,13 kbp
- * 9,42 kbp
- * 6,68 kbp
- * 4,36 kbp
- * 2,32 kbp
- * 2,03 kbp
- * 0,56 kbp

Als Längenvergleich im Pulsfeldgel diente Hefechromosomen-DNA (Stamm 334). Die Elektrophorese erfolgte entsprechend den in 3.2.10 für die alternierende Elektrophorese beschriebenen Bedingungen.

Die 16 Chromosomen wurden unter diesen Bedingungen in 13 Banden getrennt. Chromosom XII wandert nicht in das Gel ein. Die Chromosomen VII und XV sowie II und XIV können nicht voneinander getrennt werden.

Chromosom	kbp
XII	2200
⋮	⋮
⋮	⋮
IV	1500 →
VII, XV	1285 →
XVI	1047 →
XIII	991 →
II, XIV	864 →
X	835 →
XI	763 →
V	650 →
VIII	580 →
IX	460 →
III	370 →
VI	290 →
I	260 →



In PAGE wurde mit *Bam* HI, *Bgl* I und *Hinf* I hydrolysiertes pBR328 verwendet. Es ergeben sich Fragmente folgender Größe :

- | | |
|-----------|---------------|
| * 4907 bp | * 453 bp |
| * 2176 bp | * 394 bp |
| * 1766 bp | * 298 bp (2×) |
| * 1230 bp | * 234 bp (2×) |
| * 1033 bp | * 220 bp |
| * 653 bp | * 154 bp (2×) |
| * 517 bp | |

3.2 Methoden

3.2.1 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Medien und Lösungen wurden 25 min bei 2 bar und 120°C autoklaviert. Wärmeempfindliche Lösungen wurden durch Sterilfilter von 0,2µm Porengröße filtriert. Die Sterilisation von Glasgeräten erfolgte 6 h bei 180°C im Trockensterilisator.

3.2.2 Kultivierung von *E.coli* und Herstellung von Dauerkulturen

5 ml Selektionsmedium (3.1.4) wurden als Vorkultur mit einer Einzelkolonie der ausgestrichenen Bakterien angeimpft und 14–16 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Zur Anzucht von *E.coli* wurden 200 ml Selektionsmedium im Verhältnis 1:200 mit der stationären Vorkultur beimpft. Die Zellsuspension wurde entsprechend der Vorkultur inkubiert.

Die Herstellung von Dauerkulturen erfolgte durch Einstellen einer Vorkultur auf 40% Glycerin. Sie wurden bei -70°C gelagert.

3.2.3 Kultivierung von Säuger - Zellen

Alle Zelllinien wurden in 75 cm² Gewebekulturflaschen bei 37°C und 95% Luftfeuchte in CO₂ - Brutschränken bei 5% CO₂ (V79 bei 2% CO₂) kultiviert. V79-Zellen wurden in MEM-, T1-Zellen in MEME- und 2Fur-1-Hybridzellen in F-12 - Medium gehalten (3.1.4). Die A1-Zellen wurden in F-12 - Medium ohne Uridin kultiviert.

Alle 4-5 Tage wurden die Zellen subkultiviert. Nach Entnahme des Mediums wurde der Zellrasen mit 1 ml 0,05%igem Trypsin (mit 0,02% EDTA) gespült und anschließend mit dem gleichen Volumen kurzzeitig bei 37°C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen erfolgte sofortiges Abstoppen mit der 5-10fachen Menge des betreffenden Mediums und Bestimmung der Zelldichte im Coulter Counter. Die Zellen wurden dann in einer Zelldichte von 3,2 - 6,6 × 10³/cm² ausgesät.

3.2.4 Besondere Behandlung der Hybrid - Zelllinie 2Fur-1

Einfrieren von Zellen aus Kultur

Nach Sedimentation der Zellen aus Kultur wurde die Zelldichte im Coulter Counter bestimmt. Die Zellen wurden in DMSO-Medium in einer Konzentration von 1 × 10⁶ Zellen pro ml aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt.

Die Temperaturabsenkung während des Einfrierens erfolgte schrittweise (ca. 0,1°C pro min). Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Auftauen der eingefrorenen Zellen ergab ein Überleben von 80%.

DMSO - Medium : 5% (v/v) DMSO
 15% (v/v) FKS
 80% (v/v) F-12 - Medium

Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit von 2Fur-1 - Hybridzellen

Aus einer Zellsuspension bekannter Zelldichte wurden verschiedene Aliquots entnommen. Die Zellen wurden in Dichten von 2-4 Zellen pro cm^2 ausgesetzt. Zur Ausbildung von Kolonien wurden sie 10 Tage unter den entsprechenden Bedingungen (3.2.3) in 25 cm^2 Gewebekulturflaschen kultiviert. Nach Entnahme des Mediums und 15minütiger Anfärbung in 4 ml Methylenblaulösung wurde der prozentuale Anteil angewachsener Kolonien (mehr als 50 Zellen) an ausgesäten Zellen ermittelt. Die Koloniebildungsfähigkeit (plating efficiency) betrug für 2Fur-1-Hybridzellen 83%. Zur Erstellung von Überlebenskurven wurde eine plating efficiency (PE) von 80% angenommen.

3.2.5 Untersuchung der Zelllinien auf Kontamination durch Mycoplasmen

Auf gereinigte und sterilisierte Objektträger wurden ca. 5×10^4 Zellen ausgesät und 5-7 Tage unter den entsprechenden Bedingungen (3.2.3) inkubiert. Die Zellen wurden in Methanol/Eisessig (4:1) 15 min fixiert. Anschließend wurden die Objektträger luftgetrocknet. Sie wurden dann in Färbelösung für mindestens 30 min gefärbt. Im Anschluß mußten die Objektträger mehrmals in $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ gewaschen werden. Zur Herstellung der Präparate wurde das beschriebene Eindeckmittel verwendet.

Die Anregung des interkalierten Fluoreszenzfarbstoffes H 33258 erfolgte bei einer Wellenlänge von 350 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 465 nm.

Bei Kontamination der Zellen mit Mycoplasmen sind fluoreszierende Bereiche außerhalb der Zellkerne zu erkennen.

Bisbenzimid H 33258 - Stammlösung : ad 100 μ g/ml Puffer
steril filtrieren
bei 4⁰C lagern
zum Färben auf 1 μ g/ml verdünnen

Puffer für Bisbenzimid H 33258 - Lösung : 8000mg NaCl
1000mg Glc
400mg KCl
200mg MgSO₄ × 7H₂O
140mg CaCl₂
60mg Na₂HPO₄ × 2H₂O
60mg KH₂PO₄
ad 1 l

Eindeckmittel : 46,6mg Citronensäure
82,5mg Na₂HPO₄
+5 ml Glycerin
ad 10ml

3.2.6 Bestrahlung von Säuger - Zellen und Aufnahme von Überlebenskurven

Dosimetrie

Die Dosimetrie erfolgte durch Integration des aus Kohlenstofffolien emittierten Sekundärelektronenstromes. Dabei wurde die Teilchenfluenz durch Bestrahlung von Kernspurdetektoren bestimmt.

Zur Bestimmung der Dosis wurde folgende Relation benutzt:

$$\text{Dosis (Gy)} = 1,6 \times 10^{-9} * \text{LET (keV}/\mu\text{m)} * \text{Teilchenfluenz (P/cm}^2\text{)}$$

Die LET-Werte wurden den Tabellenwerken von Northcliffe und Schilling (1970) und von Hubert *et al.* (1980) entnommen.

Schwerionenbestrahlung der 2Fur-1 - Kulturen

Die Bestrahlung mit beschleunigten schweren Ionen erfolgte am Linearbeschleuniger UNILAC der Gesellschaft für Schwerionenforschung (Angert und Schmelzer, 1977; Kraft-Weyrather *et al.*, 1989).

24 h vor Versuchsbeginn wurden die Zellen in 35 mm Plastikpetrischalen ausgesetzt. 7×10^4 Zellen / 0,2 - 0,5 ml Medium wurden in die Mitte der Petrischale pipettiert und 2 h bei 37°C und 5% CO₂ zum Anheften gebracht. Anschließend wurde 5 ml Medium zugesetzt und weiter inkubiert. Eine gleichmäßige Bestrahlung der Zellen wurde durch diese besondere Form der Kultivierung erreicht. Zum Bestrahlungszeitpunkt befanden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase.

Röntgenbestrahlung als Vergleichsexperiment

24 h vor Bestrahlung wurden 4×10^5 Zellen in 25 cm² Gewebekulturflaschen ausgesät und entsprechend 3.2.3 inkubiert.

Die Bestrahlung erfolgte mit einer Röntgenröhre (Typ TR 300 F, mit Kupfer- und Aluminiumfilter von 1 mm Dicke) bei 250 kV Erzeugerspannung und 20 mA Röhrenstrom. Die Dosisleistung betrug bei einem Fokusobjektabstand von 250 mm 2,5 Gy/min. Es wurde eine Dosis von 0,3 bis 7 Gy appliziert.

Aufarbeitung bestrahlter Zellproben und Auswertung

Die Aufarbeitung und Auswertung der Experimente zur Inaktivierung von Säugerzellkulturen erfolgte nach dem Kolonietest von Puck und Marcus (1955).

Die bestrahlten Proben wurden abtrypsiniert, ihre Zelldichte im Coulter Counter bestimmt und mit dem für die spezifische Dosis erwarteten Überlebensanteil sowie der PE multipliziert. Mit Hilfe einer automatischen Pipettierhilfe (Microlab 1000) wurde der Zellsuspension dasjenige Aliquot entnommen, welches nach Einrechnung der oben beschriebenen Parameter genau 100 Zellen enthielt und in eine 25 cm² - Gewebekulturflasche überführt. Pro Kurvenpunkt wurden drei Parallelproben angefertigt und 10 Tage unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert (3.2.3). Die Kolonien wurden dann mit Methylenblau - Lösung (3.1.4) gefärbt. Kolonien mit mehr als 50 Zellen wurden als 'überlebende Zellen' gezählt.

Der prozentuale Anteil angewachsener Kolonien an ursprünglich ausgesäten Zellen ergibt bei unbestrahlten Proben die plating efficiency unter den gegebenen Versuchsbedingungen und für bestrahlte Proben die Überlebensfraktion.

Die Ausgleichskurven (Abb. 4.13 u. 4.14) wurden durch Anwendung eines Auswertprogrammes nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate bestimmt (Ledermann, 1984).

Die Überlebensfraktion hängt exponentiell von der Dosis ab. Die sich ergebenden Fluenz- bzw. Dosiseffektcurven zeigen exponentiellen Verlauf der allgemeinen Form :

nach Schwerionenbestrahlung :

$$S_{(F)} = N/N_0 = e^{-\sigma F}$$

nach Röntgenbestrahlung :

$$S_{(D)} = N/N_0 = e^{-\alpha D + \beta D^2}$$

- N_0 : Anzahl der Zellen vor Bestrahlung
- N : Anzahl der Zellen nach Bestrahlung mit der Strahlendosis D bzw. Teilchenfluenz F
- σ : Wirkungsquerschnitt (μm^2); entspricht der Steigung der Fluenzeffektkurve; sofern Fluenzeffektkurve rein exponentiell : $\sigma = 1/F_{37}$
- D : Dosis (Gy)
- F : Teilchenfluenz (Teilchen / cm^2)
- α : entspricht der Steigung der Dosiseffektkurve
- β : stellt ein Maß für die Schulterausdehnung dar

3.2.7 Techniken zur Präparation von extrachromosomaler und von genomischer DNA

Präparative Plasmidisolierung nach Hillen *et al.* (1981)

Die Anzucht der Bakterien erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben.

Alle folgenden Arbeiten wurden auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt.

Nach Überführung der Bakteriensuspension in GSA-Zentrifugenbecher und Abkühlung auf Eis wurden die Zellen in der Sorvall RC 5B Zentrifuge (GSA Rotor, 4°C, 6000rpm) sedimentiert. Die Zellen wurden in 5 ml 20%iger Saccharoselösung resuspendiert. Nach Vereinigung jeweils zweier Suspensionen, Einleiten der Protoplastierung durch Zusatz von 3 ml 0,5 M EDTA und 3 ml Lysozymlösung und 30minütiger Inkubation auf Eis erfolgte limitierter Brij/Doc-Aufschluß. Die Abtrennung der Protoplastenreste wurde in der Beckman L7 55 Zentrifuge (55,2-Ti Rotor, 40000 rpm, 30 min, 4°C) durchgeführt. Die Überstände wurden mit 170µl RNase A - Stammlösung versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Nach PEG - Fällung (3.2.8) wurde das gewaschene und getrocknete Sediment in 2,5 ml Proteinase K - Puffer aufgenommen, auf 10µg/ml Proteinase K eingestellt und 1-2 h bei 50°C inkubiert. Nach Phenolextraktion und Diethyletherextraktion erfolgte weitere Reinigung über Cäsiumchlorid - Dichtegradientenzentrifugation (3.2.8). Nach Abtrennung der superhelicalen Plasmid - DNA wurde diese im Agarosegel analysiert. Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen wurden spektralphotometrisch durchgeführt.

20%ige Saccharoselösung: 20%(w/v)Saccharose
10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA, pH 8,0

Lysozym Stammlösung: 20 mg/ml in H₂O

Brij/Doc - Lösung: 10%(w/v)Brij in H₂O
10%(w/v)Doc in H₂O
beide Lösungen im Verhältnis 2:1 mischen

RNase A - Stammlösung: 10 mg/ml in 0,1 M NaOAc, pH 5,2
15 min bei 70°C inkubieren
Lagerung bei -20°C

Proteinase K - Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA, pH 8,0
0,5% SDS

Proteinase K - Stammlösung: 25 mg/ml in H₂O
30 min bei 37⁰C vorinkubieren
Lagerung bei -20⁰C

Präparation hochmolekularer Säugetier - DNA durch Einbetten in Agarose

Die Isolation hochmolekularer eukaryontischer DNA zur Trennung im alternierenden Feld erfolgte nach dem Protokoll von Gardiner *et al.* (1986).

Die in 75 cm² Gewebekulturflaschen angewachsenen, in fast konfluentem Stadium befindlichen Säugetier-Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit 1 ml 0,05%igem Trypsin (mit 0,02% EDTA) gespült und anschließend mit gleichem Volumen abtrypsinieren. Nach Ablösen der Zellen erfolgte die Zugabe von 10 ml FKS und Zentrifugation der Zellsuspension in der Heraeus Minifuge RF (700 rpm, 8 min, 4⁰C). Nach Aufnahme der Zellen in 5 ml eiskaltem PBS und Vereinigung jeweils zweier dieser Suspensionen wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Eine zweite, den obigen Angaben entsprechende Sedimentation und Aufnahme der Zellen in Konzentrationen von 0,5 - 3×10⁷ Zellen/ml Lyse - Puffer folgten. Nach kurzer Inkubation bei 37⁰C wurde gleiches Volumen flüssiger, auf 40⁰C abgekühlter 1%iger LMP - Agarose zugesetzt und sofort gut gemischt. Die Suspension wurde nun in die Aussparungen eines Plexiglasblockes pipettiert und bei 4⁰C zum Erstarren gebracht. Nach Entnahme der 2,5 cm langen Agaroseplugs (≡ 0,162 ml) wurde jedes dieser in 800µl Lyse - Puffer, eingestellt auf 1% (w/v) Natrium - Laurylsarkosinat und 1 mg/ml Proteinase K, inkubiert. Einer 3stündigen Proteolyse bei 50⁰C folgte eine ÜN - Proteolyse bei gleicher Temperatur. Zur Entfernung von Enzym- und Salzresten aus dem Agaroseplug wurde letzteres anschließend 2-5 Tage gegen 1×TE mit mehrmaligem Pufferwechsel bei 4⁰C dialysiert. Die 'plugs' konnten dann zur Restriktion eingesetzt werden.

Lyse -Puffer: 200 mM EDTA
40 mM NaCl
20 mM Tris-HCl
pH 7,8 mit 1 N HCl einstellen

Berechnung des DNA-Gehaltes des zum Probenauftrag erwünschten 0,5 cm langen (\cong 0,032 ml) Agaroseplugs:

2Fur-1: 6,25 pg DNA / Zelle
 $\Rightarrow 5 \cdot 10^6$ Zellen / ml
für 1 μ g DNA / 0,5 cm 'plug'

T₁ : 7,19 pg DNA / Zelle
 $\Rightarrow 4,35 \cdot 10^6$ Zellen / ml
für 1 μ g DNA/0,5 cm 'plug'

Es wurden DNA-Mengen von 0,5 - 3 μ g / 0,5 cm 'plug' verwendet.

Präparation genomischer DNA aus Säugetier - Zellkultur nach Davis *et al.*, 1986

Die Zellen wurden, wie unter 3.2.3 beschrieben, abtrypsiniert, in eiskaltem PBS gewaschen und sedimentiert. Die Aufnahme der Zellen erfolgte in 10fachem Volumen Proteinase K - Lösung. Zur Proteolyse wurde zunächst 15 min bei 65°C und anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Lysate P/C/I - extrahiert und die wässrigen Phasen ethanolpräzipitiert (3.2.8). Resuspension des Sedimentes erfolgte in 3 ml 1 \times TE bei 37°C und unter Schütteln, gegebenenfalls über Nacht. Die Nucleinsäurelösung wurde dann auf 5,5 μ g/ml RNase A eingestellt und 30 min bei 37°C inkubiert. Es erfolgte der Zusatz von 1/9 Volumen 3 M NaOAc und P/C/I - Extraktion (3.2.8). Die Präzipitation wurde dann durch Zugabe des 2,5fachen Volumens Ethanol p.a. fortgesetzt. Zur Aufnahme des Pellets in 1 \times TE wurde bei 37°C inkubiert. Nach photometrischer (3.2.9) und gelelektrophoretischer Bestimmung (3.2.10) wurde die hochmolekulare DNA (\geq 30 kbp) zur Restriktion eingesetzt.

Proteinase K - Lösung:	10mM	Tris-HCl, pH 7,4
	10mM	EDTA
	150mM	NaCl
	0,4%	SDS
	1mg/ml	Proteinase K

Präparation hochmolekularer DNA aus humaner Plazenta

Die aus humaner Plazenta isolierte DNA wurde bereits im Rahmen des Biochemie - Praktikums III präpariert.

4 g humanes Plazentagewebe wurden unter flüssigem Stickstoff zermörsert. Es wurden 30 ml Lyse - Puffer zugesetzt und 3 h bei 50°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 8-10mal mit dem gleichen Volumen P/C/I extrahiert (3.2.8). Phasentrennung erfolgte in der Sorvall RC 5B Zentrifuge (Sorvall HB-4 Rotor, 5000 rpm, 5 min, 4°C). Die DNA-Lösung wurde dann über Nacht gegen 1 l 1×TE bei 4°C dialysiert und am folgenden Tag auf 100µg/ml RNase A eingestellt und 4 h bei 37°C inkubiert. Es wurde noch dreimal P/C/I extrahiert und zweimal mit Diethylether ausgeschüttelt (3.2.8). Anschließend erfolgte PEG - Präzipitation (3.2.8) und Aufnahme des Sedimentes im geeigneten Volumen 1×TE.

Lyse - Puffer: 500mM EDTA, pH 8,0
 0,5% SDS
 100µg/ml Proteinase K

3.2.8 Reinigung und Präzipitation von Nucleinsäuren

Phenolisierung

Die zu reinigenden DNA-Lösungen wurden mehrmals mit dem gleichen Volumen TE-gesättigtem Phenol versetzt und anschließend gut durchmischt. Zur Phasentrennung wurde 5 min in der Sorvall RC 5B Zentrifuge (SS-34 Rotor) bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde weiterbehandelt, die phenolische verworfen.

P/C/I - Extraktion

Die ebenfalls zur Reinigung von Nucleinsäurelösungen durchgeführte P/C/I - Extraktion erfolgte entsprechend dem Phenolisierungsprotokoll.

Diethyletherextraktion

Phenolisierte und P/C/I - extrahierte wässrige Phasen wurden anschließend noch zweimal mit Diethylether ausgeschüttelt, um Reste organischen Lösungsmittels zu entfernen.

Cäsiumchlorid - Dichtegradientenzentrifugation

Die durch limitierten Brij/Doc-Aufschluß im präparativen Maßstab gewonnene Plasmid-DNA wurde über Cäsiumchlorid - Dichtegradientenzentrifugation in Gegenwart von Ethidiumbromid gereinigt (Maniatis *et al.*, 1982). Die Zentrifugation erfolgte im 55,2-Ti Rotor bei 35000 rpm für mindestens 36 h bei 18°C. Nach Abziehen der Plasmidbande unter UV-Beleuchtung (365 nm) wurde restliches Ethidiumbromid durch 5-7malige Extraktion mit TE-gesättigtem 1-Butanol entfernt. Anschließend wurde 48 h gegen 3× 1,5 l TE - Puffer dialysiert.

Ethanolpräzipitation

Die zu fällenden Nucleinsäuren wurden zunächst auf 0,3 M NaCl oder 0,3 M NaOAc, pH 5,7, eingestellt und dann mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol p.a. versetzt. Die DNA wurde mindestens 2 h bei -20°C gefällt. Hochmolekulare chromosomale DNA wurde stets über Nacht präzipitiert. Nach 30 min Zentrifugation in der Sorvall RC 5B Zentrifuge (SS-34 Rotor, 14000 rpm, 4°C) wurde das Sediment der Plasmid-DNA mit 70%igem, das der genomischen mit 80%igem Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde anschließend 5-10 min im Vakuum - Exsikkator getrocknet und im geeigneten Volumen Wasser aufgenommen.

PEG - Fällung

DNA-Lösungen wurden mit dem 0,5fachen Volumen 30%igem PEG in 1,5 M NaCl versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Es wurde 30 min in der Sorvall RC 5B Zentrifuge (SS-34 Rotor, 12000 rpm, 4°C) zentrifugiert. Auch hier wurden die Sedimente mit 70%igem bzw. 80%igem Ethanol gewaschen.

3.2.9 Konzentrationsbestimmung präparierter DNA

Bestimmungen des Reinheitsgrades sowie der Konzentration von Nucleinsäurelösungen erfolgten im DU - 64 Spektralphotometer unter Anwendung eines DNA / RNA - Auswertungsprogrammes (Beckman).

Zur Messung im UV-Bereich wurden Mikroküvetten aus Quarzglas verwendet.

Für die Konzentration einer DNA-Lösung gilt:

$$1A_{260} - E/ml = 50\mu g/ml \text{ ds DNA}$$

Der Wert des Quotienten A_{260}/A_{280} macht eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA-Lösung. Er lag stets im Bereich von 1,8 bis 2,0.

3.2.10 Gelelektrophorese und Färbung von Nucleinsäuren

Konventionelle Agarosegele

Die Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in 0,8%igen Agarosegelen und 1×TAE - Puffer. Es wurden Flachbettapparaturen von 13,0×14,0 cm und 9,0×8,0 cm Größe verwendet. Die polymerisierten Gele hatten eine Dicke von 5 mm. Vor dem Auftrag wurde den Proben 1/3 bis 1/5 des Probenvolumens an Auftragspuffer zugesetzt. Die Elektrophorese wurde bei Minigelen für 2-3 h bei 60-80 V und bei großen Flachbettgelen bei 25 V über Nacht durchgeführt.

Auftragspuffer: 0,025% Bromphenolblau
0,025% Xylencyanol
2,5% Ficoll Typ 400
in H₂O

Präparative Agarosegelelektrophorese erfolgte ebenfalls in großen Flachbettgelapparaturen und in 1×TAE - Puffer. Abweichend wurden zur Trennung und Isolation des 4,6 kbp pC 14 - Inserts 0,6%ige Agarosegele eingesetzt. Nach Ethidiumbromidfärbung wurde die interessierende DNA-Bande auf dem UV-Transilluminator (254 nm) ausgeschnitten.

Agarosegelelektrophorese im alternierenden Feld

Die Trennung hochmolekularer DNA-Fragmente eines Größenbereiches von 1,5 Mbp bis 150 kbp erfolgte im transvers-alternierenden Feld. Verwendet wurde das TAFE - Elektrophorese - System. Es zeichnet sich durch die vertikale Positionierung des Agarosegels sowie die transvers dazu orientierten elektrischen Felder aus. Die Trennung erfolgte in 1%igen LE - Agarosegelen einer Größe von 7,5×10,0 cm, sowie einer Dicke von 5 mm und in 0,85× TAFE - Puffer bei 140 mA (\equiv Initialspannung von 250 V) und 18°C. Die Dauer der Elektrophorese betrug entsprechend der Auswahl des erwünschten Auftrennungsbereiches 20 h, davon 10 h mit einer wechselseitigen Pulsdauer von 45 s und 10 h mit einer Pulsdauer von 65 s.

Polyacrylamidgele

Es wurden 5%ige Polyacrylamidgele in Vertikalapparaturen der Größe 20×20×0,15 cm verwendet.

10 ml 30%iger AA -/ BA - Stammlösung wurden mit 6 ml 10×TBE und 43,5 ml H₂O versetzt und entgast. Anschließend wurde die Polymerisation durch Zugabe von 0,5 ml 10%igem APS und 30 μ l TEMED eingeleitet. Vor der Elektrophorese wurde den Proben 1/3 des Probenvolumens an Auftragspuffer zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1×TBE - Puffer bei 40 V über Nacht.

Färben von Agarose- und Polyacrylamidgelen

Konventionelle Agarose- und Polyacrylamidgele wurden 10 min in einer Ethidiumbromidlösung einer Konzentration von 0,3 μ g/ml gefärbt und anschließend 15 min in H₂O entfärbt.

Pulsfeldgele wurden mit einer Ethidiumbromidlösung von 0,1 μ g/ml 45 min gefärbt und mehrere Stunden bis über Nacht entfärbt.

Hefechromosomen ließen sich am besten in höher konzentrierten Ethidiumbromidlösungen ($3 \mu\text{g/ml}$) färben.

Auf dem UV-Transilluminator (254 nm) wurden die Gele mit einer Polaroidkamera mit Orange-Rot-Filter bei Blende 5,6 fotografiert. Verwendet wurden Polaroid - Positiv/Negativ-Filme (Typ 665 und 55). Die Belichtungszeit betrug 1-2 min.

3.2.11 Präparation von DNA - Fragmenten

Elektroelution

Die im präparativen Agarosegel getrennte DNA wurde nach Ausschnitt der interessierenden Bande in einer Biotrap - Apparatur elektroeluiert. Der Aufbau der Apparatur und die Entnahme des Eluates erfolgten laut Angaben des Herstellers. Die Elution wurde in $0,5 \times \text{TBE}$ - Puffer bei 100 V (50 mA) über Nacht durchgeführt. Phenolisierung, Diethyletherextraktion und Ethanolpräzipitation folgten (3.2.8). Die Ausbeuten lagen bei 75-95% und wurden spektralphotometrisch bestimmt. Die eluierte DNA konnte in DNA-Markierungsreaktionen eingesetzt werden.

Isolation aus präparativen LMP - Agarosegelen

Die gelelektrophoretische Trennung des zu gewinnenden DNA-Fragmentes erfolgte in 1%iger LMP - Agarose und $1 \times \text{TAE}$ - Puffer bei 100 V für 3 h. Nach Ausschneiden der relevanten Bande wurde die Agarose bei 60°C zum Schmelzen gebracht und anschließend mit vorgewärmtem, TE-gesättigtem Phenol ausgeschüttelt. Die vereinigten Epiphasen wurden nochmals phenolisiert und mehrmals P/C/I - extrahiert (3.2.8). Dabei wurde jede Extraktion von kurzzeitigen Inkubationen des biphasischen Gemisches bei 40°C begleitet, um die Polymerisation noch vorhandener Agarosereste zu verhindern. Ethanolpräzipitation und Agarosegellanalyse der isolierten DNA folgten.

Die Ausbeute betrug ca. 95% der zur Gelelektrophorese eingesetzten DNA-Menge.

3.2.12 Sequenzspezifische Hydrolyse von Plasmid - DNA und chromosomaler DNA

Restriktion von Plasmid - DNA

Die Restriktion erfolgte unter den Puffer- und Inkubationsbedingungen des Herstellers. Gegebenenfalls wurde bis zu 4 h hydrolysiert.

Restriktion chromosomaler DNA

Die Restriktion erfolgte mit $8 \text{ U}/\mu\text{g}$ DNA für 6 h bei 37°C . Anschließend wurde der Restriktionsansatz auf 15 mM EDTA eingestellt, P/C/I - extrahiert und mit Diethylether

ausgeschüttelt (3.2.8). Es erfolgte Ethanolpräzipitation und Aufnahme der gefällten DNA in H₂O. Hierzu wurde kurzzeitig bei 37⁰C inkubiert.

Das Bandenmuster nach Ethidiumbromidfärbung sprach für die Vollständigkeit der Restriktion.

LFRE - Hydrolyse hochmolekularer DNA in Agaroseplugs

Vor der Restriktion wurden die nach der Proteolyse mehrfach gegen 1×TE dialysierten Agaroseplugs (3.2.7) 3 h bis über Nacht bei 0⁰C in frischem TE - Puffer inkubiert. Es erfolgte dann 3stündige Inkubation in 1×Reaktionspuffer (2faches 'plug' - Volumen) bei 4⁰C. Hierdurch sollte die Diffusion der Komponenten des Restriktionsansatzes begünstigt werden. Einheitliche Restriktionsbedingungen sollten neben der Stabilität auch die Aktivität der Restriktionsendonucleasen unterstützen.

Die Restriktion von hochmolekularer DNA in Agarose erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller in Gegenwart von 100 µg/ml BSA, 4-10 mM Spermidin und mit 5-15 U Restriktionsenzym pro µg DNA. Eine Hydrolysedauer von 4 h stellte sich im Verlauf der Experimente als ausreichend heraus.

Nach der Restriktion wurden die Ansätze auf 20 mM EDTA eingestellt und 45 min auf Eis inkubiert. Das Restriktionsvolumen wurde vorsichtig abpipettiert, und das 'plug' wurde zur Entfernung restlichen Enzyms mehrfach gegen 1×TE bei 4⁰C dialysiert. Es erfolgte dann die Trennung der hydrolysierten DNA im alternierenden Feld.

3.2.13 Transfer von DNA auf Nylon- und Nitrozellulosemembranen

Southern - Transfer genomischer, konventionell präparierter und extrachromosomaler DNA

Der Transfer erfolgte nach Maniatis *et al.* (1982), jedoch abweichend in 20×SSC. Dabei wurde das Agarosegel zur Erzeugung von Einzelstrangbrüchen in der zu transferierenden DNA zunächst 5 min auf dem UV-Transilluminator (254 nm) exponiert. 24 h Transferzeit erwiesen sich als ausreichend, was durch Ethidiumbromidfärbung des Gels nach DNA-Transfer bestätigt werden konnte.

Transfer hochmolekularer, im alternierenden Feld getrennter DNA

Vor dem Southern - Blot nach Maniatis *et al.* (1982) wurde das Agarosegel zur Depurinisierung zweimal 5 min in 0,25 N HCl inkubiert (Gardiner *et al.*, 1988). Der Transfer erfolgte in 10×SSC für 48-72 h. Ethidiumbromidfärbung des Agarosegels gab Aufschluß über die Vollständigkeit des Transfers.

Fixierung transferierter DNA auf Nitrozellulose- bzw. Nylonmembranen

Entsprechend den Angaben der Hersteller wurde DNA auf Nylonmembranen durch 3minütige UV-Bestrahlung (302 nm) fixiert. Nitrozellulosemembranen wurden 3 h bei 80°C gebacken.

3.2.14 Hybridisierung gegen haptenmarkierte DNA - Fragmente

'Random primed' - DNA - Markierung mit Digoxigenin - 11 - dUTP und Nachweis des Hybrids durch Enzym - Immunassay erfolgten durch Anwendung eines Standard - Kits.

Grundlagen der Methode

Frisch denaturierte Sonden-DNA wird durch 'random - primed' - Einbau mit Digoxigenin - 11 - dUTP markiert. Nach Hybridisierung an die Ziel-DNA erfolgt Nachweis der Hybride durch 'enzyme - linked - immunoassay'. Der Anti - Dig - Antikörper erkennt das kovalent an Uridin gebundene Hapten. Zusatz von Substrat führt zur Bildung eines Farbpräzipitates in Bereichen hybridisierter DNA.

Durchführung

Die Reaktion wurde - geringfügig modifiziert - nach Anleitung des Herstellers ausgeführt. Die DNA-Markierung erfolgte immer über Nacht. Aufreinigung der Nucleinsäuren wurde, wie im Hersteller - Protokoll beschrieben, durchgeführt. Die Dauer der Prähybridisierung wurde auf 2 h erhöht. Die Konzentration des Blocking - Reagens wurde sowohl in der Prähybridisierungs- als auch in der Hybridisierungslösung auf 1% eingestellt. Hybridisierung erfolgte immer über Nacht. Die Konzentrationen markierter Proben betragen 26-52 ng pro ml Hybridisierlösung. Die im immunologischen Nachweis verwendeten Puffer und Lösungen wurden stets frisch angesetzt. Eine Hintergrundanfärbung der Membran konnte dadurch sowie durch die Verwendung von Glasgefäßen während der Antikörper- und der Farbreaktion vermieden werden.

3.2.15 Einsatz radioaktiv - markierter DNA zur Hybridisierung

'Random primed' - Einbau von [α - 32 P] - dNTP

Die Markierung der denaturierten Sonden-DNA erfolgte nach Papandrikopoulou (1983) und wurde immer über Nacht durchgeführt.

Eingesetzt wurden die *Bam* HI - Fragmente der Plasmide Blur 2 und Blur 11 sowie das *Eco* RI - Insert aus pC 14.

Der Markierungsansatz wurde auf 200 mM Hepes, 0,4 mg/ml BSA, 0,1 mg/ml Hexanucleotidgemisch und 20 μ M Nucleotid (ohne das entsprechende radioaktiv-markierte

Nucleotid) eingestellt. 25 ng frisch denaturierte Sonden-DNA wurden in Gegenwart von 40 μCi [α - ^{32}P] - dNTP und 2,5 U Klenow - Fragment bei Raumtemperatur inkubiert. Markiertes Fragment wurde über eine Sephadex G50 Säule von nicht eingebautem Nucleotid getrennt (Maniatis *et al.*, 1982).

'nick' - Translation

'nick' - Translation von Sonden-DNA wurde mit einem 'nick' - Translations - System entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Eingesetzt wurden *Eco* RI - linearisiertes Blur 2 und das *Eco* RI - Fragment aus pC 14. Die Markierungsreaktion wurde mit bis zu 500 μCi [α - ^{32}P] - dNTP/ μg DNA durchgeführt. Die Abtrennung von nicht eingebautem Nucleotid erfolgte ebenfalls über eine Sephadex G50 Säule.

Prähybridisierung

0,25 ml Prähybridisierlösung / cm^2 Membranfläche wurden zur Prähybridisierung eingesetzt. Sie wurde bei 68 $^{\circ}\text{C}$, in 6 \times SSC, 5 \times Denhardt's, 0,5% SDS und 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Heringssperma-DNA immer über Nacht durchgeführt.

Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte in 0,1 ml Prähybridisierlösung / cm^2 Membranfläche unter Zusatz der markierten, frisch denaturierten Probe bei 68 $^{\circ}\text{C}$ für mindestens 18 h.

Waschen der Membranen und Exposition

Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Membranen zunächst zweimal bei Raumtemperatur mit 2 \times SSC gespült. Anschließend wurden sie 15 min in 2 \times SSC bei 55 $^{\circ}\text{C}$ und zweimal 15 min in 2 \times SSC und 0,1%SDS bei gleicher Temperatur gewaschen. Der Waschvorgang wurde mehrmals bei gleicher SDS-, aber reduzierter SSC- Konzentration wiederholt. Dabei wurde eine Konzentration von 0,5 \times SSC nicht unterschritten.

Die Darstellung hybridisierter DNA-Bereiche erfolgte im Falle radioaktiver Markierung durch Autoradiographie. Hierzu wurden Röntgenfilme (Kodak X - OMAT AR5) auf die gewaschenen Membranen aufgelegt und 2-10 Tage bei -20 $^{\circ}\text{C}$ und ohne Verstärkerfolie exponiert. Durch Einsatz einer Verstärkerfolie hätten die erhaltenen Signale im Bereich hybridisierter DNA intensiviert werden können.

Kapitel 4

Ergebnisse

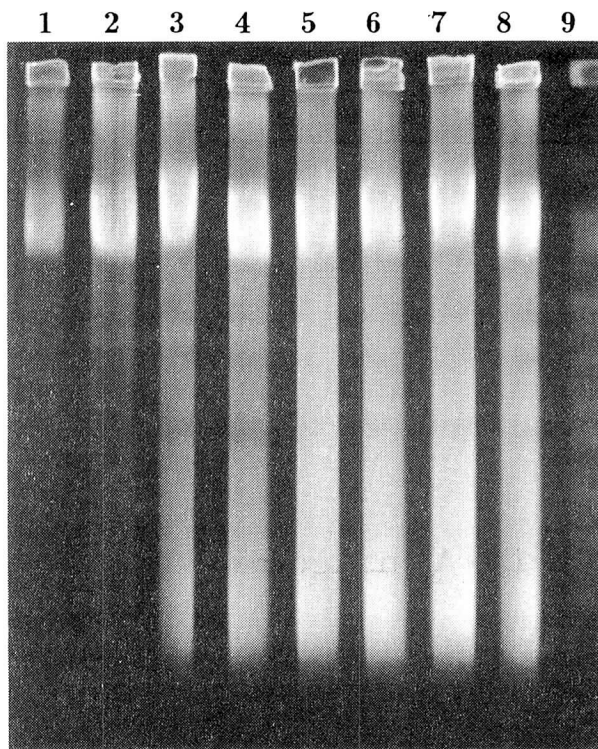
4.1 Restriktion genomischer DNA in Agarose

Die zur Hydrolyse eingesetzten Restriktionsendonucleasen zeigten auffallende Unterschiede in der Restriktionsfrequenz.

Sac II und *Mlu* I wiesen, im Falle vollständiger Hydrolyse (Hell-Dunkel-Bandenmuster nach Färbung mit Ethidiumbromid), einen deutlichen Anteil großer Fragmente (> 1500 kb) auf. *Sal* I - Restriktion führte in diesem Bereich zu einer weniger starken Färbung. Dieses Ergebnis zeigt Übereinstimmung mit den von Levine (1989) publizierten, welcher die Restriktionsfrequenz der selten schneidenden Enzyme auf den Anteil des im Säuger genom selten vorkommenden Dinucleotids CG zurückführt. Dieses liegt ferner oft in methylierter Form vor und bleibt daher der Restriktion unzugänglich. Die Erkennungssequenz von *Sal* I enthält eines, die von *Sac* II bzw. *Mlu* I zwei dieser Dinucleotide. Gleichzeitig hebt Levine die Abhängigkeit der DNA - Hydrolyse von der spezifischen Zelllinie, jede besitzt ihr individuelles Methylierungsmuster, sowie vom entsprechenden Zellzyklus-Stadium hervor. Seine Ergebnisse, durchgeführt mit einer verwandten Hybridzelle (153E7b), welche im Gegensatz zur 2Fur-1-Hybridzelle das gesamte humane Chromosom 21 trägt, können daher nur bedingt als Vergleich herangezogen werden.

Es war deshalb erforderlich, für jede untersuchte Zelllinie die erforderliche Menge einzusetzender Restriktionsendonuclease zu bestimmen.

Das Pulsfeldgel Abb. 4.1 zeigt den mit *Sac* II durchgeführten Restriktionstest. Hydrolysiert wurde die DNA der Hybridzelllinie 2Fur-1. Vollständige DNA-Fragmentierung wurde nach Ethidiumbromidfärbung des Agarosegels bestimmt und ergab sich bei einer Restriktionsdauer von 15 h bei Einsatz von 15 U *Sac* II / μ g DNA. Dieses Ergebnis konnte später durch Hybridisierung gegen humane Alu-Sonden bestätigt werden (Abb. 4.10a).



- 1 : 2Fur-1 (1 μ g)/-
- 2 : 2Fur-1 (1 μ g)/ 2 U *Sac* II
- 3 : 2Fur-1 (1 μ g)/10 U *Sac* II
- 4 : 2Fur-1 (1 μ g)/15 U *Sac* II
- 5 : 2Fur-1 (1 μ g)/20 U *Sac* II
- 6 : 2Fur-1 (1 μ g)/25 U *Sac* II
- 7 : 2Fur-1 (1 μ g)/30 U *Sac* II
- 8 : 2Fur-1 (1 μ g)/40 U *Sac* II
- 9 : *S. cerevisiae*

Abbildung 4.1: *Sac* II - Restriktionstest zur Hydrolyse von 2Fur-1 - DNA; PFG nach Färbung mit Ethidiumbromid.

Mlu I zeigte bei Einsatz von 5 U pro μ g DNA vollständige DNA-Fragmentierung, in Gegenwart von 5 mM Spermidin. Zur vollständigen Hydrolyse durch *Sac* II mußten 15 U dieses Enzyms pro μ g DNA eingesetzt werden. Hingegen reichten im Falle der *Sal* I - Restriktion 10 U pro μ g DNA aus. Wohingegen die Hydrolyse mit *Sac* II stets in Gegenwart von 5 mM Spermidin (nach Beckman) durchgeführt wurde, wurde *Sal* I bei verschiedenen Spermidinkonzentrationen (4-10 mM) getestet. Nachdem unterschiedliche Konzentrationen des DNA-Stabilisators sich auf die Hydrolyse nicht auswirkten, wurde Spermidin nur noch in Konzentrationen von 4 mM eingesetzt.

Die im Anschluß durchgeführten Restriktionskinetiken (2 h, 4 h und 15 h Hydrolysedauer) ergaben nach einer Restriktionszeit von nur 4 h vollständige DNA-Fragmentierung.

Im Folgenden wurde deshalb immer 4 h hydrolysiert. Hierdurch konnte gleichzeitig der Anteil der durch endogene Nucleasen degradierten DNA reduziert werden. Von großer Bedeutsamkeit hierfür ist, neben einer so kurz wie möglich zu haltenden Trypsinierungszeit, auch die zügige Aufbereitung der DNA-Proben. Im Falle einer Kontamination der Zellkulturen mit Mycoplasmen erhöhte sich der Anteil degradiertter Kontroll-DNA drastisch.

4.2 Trennung hochmolekularer DNA im alternierenden Feld

Elektrophoresebedingungen nach Herstellerangaben (Beckman) wurden zu Beginn der Versuche eingesetzt. Die hydrolysierte DNA wurde zunächst 30 min bei 170 mA und einer Pulsfrequenz von 4 s und anschließend 18 h bei 160 mA und einer Frequenz von 60 s getrennt. Die kurze Pulszeit zu Beginn der Elektrophorese führt zu einem 'Vorweglaufen' der DNA-Fragmente, welche eine Größe von ca. 150 kbp unterschreiten. Sie sammeln sich kurz vor dem unteren Gelende in einer Bande an. Es wird deutlich, daß ein Verlust besonders kleiner Fragmente infolge ungünstig gewählter Elektrophoresebedingungen nicht auftreten kann. Die horizontale Komponente der elektrischen Feldstärke bewirkt ihre Akkumulation in der unteren Hälfte des Agarosegels.

Die in (3.2.10) beschriebenen Pulsfrequenzen und Gesamtelektrophoresezeiten wurden als optimal erachtet, nachdem verschiedene Experimente, insbesondere bezüglich der Abfolge und Dauer der einzelnen Pulse, durchgeführt worden waren.

Beste Trennung der DNA-Fragmente im Pulsfeldgel wurde nach Reduktion der Elektrophoresepufferkonzentration von $1 \times \text{TAFE}$ (Beckman) auf $0,85 \times \text{TAFE}$ erreicht. Hierdurch konnte bei einem konstanten Strom von 140 mA die für den gewünschten DNA-Auftrennungsbereich erforderliche Initialspannung von 250 V erhalten werden.

Die Trennung in den üblicherweise verwendeten Elektrophoresepuffern ($0,25 \times \text{TBE}$ bzw. $0,5 \times \text{TBE}$) war weniger zufriedenstellend.

Die Pulsfeldgele in Abb. 4.2a und Abb. 4.2b zeigen das nach Ethidiumbromidfärbung erhaltene, stabile Bandenmuster, welches besonders im Falle niedriger Auftragsmengen hydrolysierter DNA ($0,5\text{-}1 \mu\text{g}$) deutlich wurde. Es zeigt Spezifität sowohl für die ausgewählte Restriktionsendonuclease als auch für die hydrolysierte DNA und damit für die untersuchte Zelllinie.

Die Pulsfeldgele wiesen sowohl nach Färbung mit Ethidiumbromid als auch nach der später erfolgenden Hybridisierung einen deutlichen Rest nicht eingewandeter, in den Geltaschen verbliebener DNA auf. Zur Reduktion dieses Anteils wurden die Agaroseplugs nach erfolgter Restriktion erneut mit Lyse - Puffer, eingestellt auf 1 mg/ml Proteinase K, versetzt. Die bei 50°C für 3 h durchgeführte Proteolyse ergab in der sich anschließenden Agarosegelanalyse keine Veränderung. Bei dem nicht in das Agarosegel einwandernden DNA-Anteil scheint es sich damit weniger um Inhibition durch Restprotein zu handeln. Die Größe dieser DNA-Fragmente überschreitet vermutlich die durch die Pulsfrequenz festgelegte Reorientierungsmöglichkeit im alternierenden Feld. Daneben wurde allerdings auch eine Auswirkung der Trypsinierungsdauer auf den nicht eingewanderten DNA-Anteil beobachtet (Dr. E. Blakely, persönliche Mitteilung).

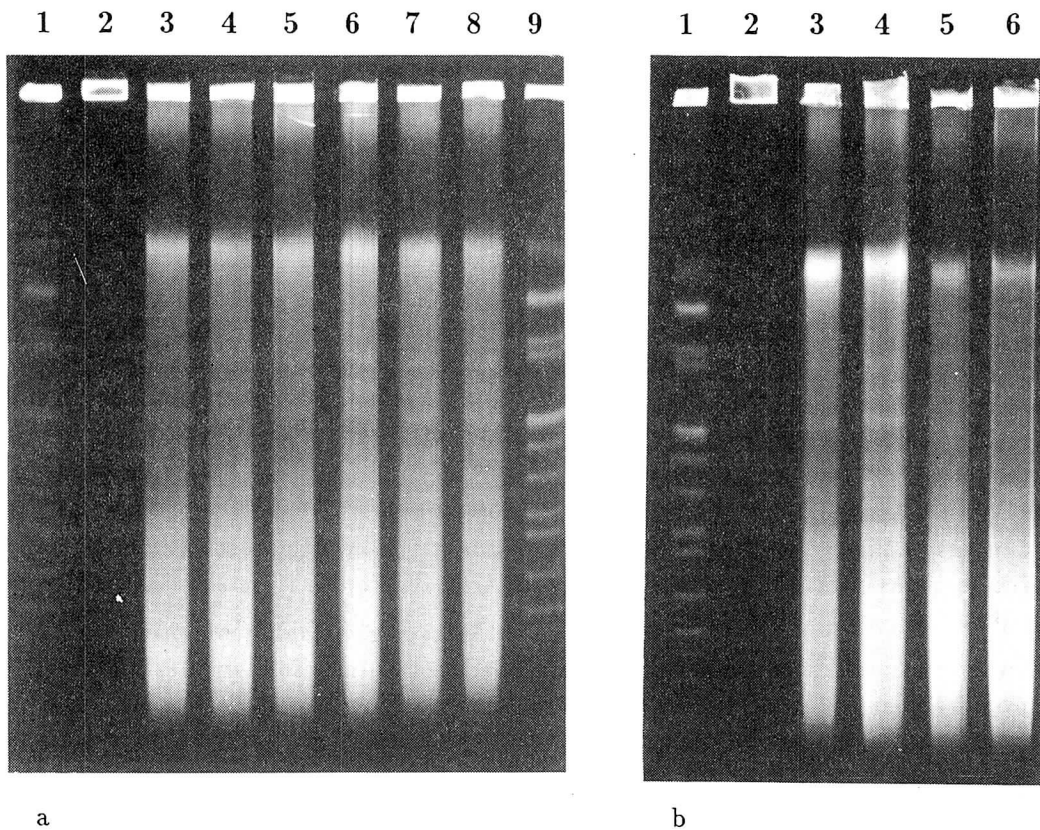


Abbildung 4.2: Trennung von T1 - und 2Fur-1 - DNA im PFG nach *Sal* I - Hydrolyse

- | | | | | | |
|-----|-----|--------------------------|-----|-----|----------------------------|
| a : | 1 : | <i>S. cerevisiae</i> | b : | 1 : | <i>S. cerevisiae</i> |
| | 2 : | T1 (0,5µg)/ - | | 2 : | T1 (0,5µg)/- |
| | 3 : | T1 (0,5µg)/ <i>Sal</i> I | | 3 : | T1 (0,5µg)/ <i>Sal</i> I |
| | 4 : | T1 (0,5µg)/ <i>Sal</i> I | | 4 : | T1 (0,5µg)/ <i>Sal</i> I |
| | 5 : | T1 (0,5µg)/ <i>Sal</i> I | | 5 : | 2Fur-1 (1µg)/ <i>Sal</i> I |
| | 6 : | T1 (0,5µg)/ <i>Sal</i> I | | 6 : | 2Fur-1 (1µg)/ <i>Sal</i> I |
| | 7 : | T1 (0,5µg)/ <i>Sal</i> I | | | |
| | 8 : | T1 (0,5µg)/ <i>Sal</i> I | | | |
| | 9 : | <i>S. cerevisiae</i> | | | |

Die Ansammlung von DNA-Fragmenten im Bereich des größten, eingewanderten Hefechromosoms ergibt sich durch die vom Molekulargewicht unabhängige Mobilität derjenigen DNA-Moleküle, welche eine Fragmentlängengröße von ca. 1500 kbp überschreiten. Durch Verlängerung der Pulszeiten konnte diese Akkumulation vermieden werden. Eine Erhöhung der Reorientierungszeit verschiebt den elektrophoretisch zu trennenden Fragmentgrößenbereich in Richtung höherer Molekulargewichte, was am Beispiel der Chromosomen von *S. cerevisiae* und hydrolysiertes Hybridzell-DNA in Abb. 4.3a und Abb. 4.3b dokumentiert wird. Bei einer Pulsdauer von über 75 s kam es dabei gleichzeitig zu einer Stauchung der DNA-Fragmente ab ca. 864 kbp (Chromosom II und XIV von *S. cerevisiae*). Da der interessierende Hybridisierungsbereich eine DNA-Fragmentlängengröße von 200 bis 1500 kbp umfaßt, wurden die Elektrophoresebedingungen an eine optimale Trennung der Hefechromosomen in diesem Bereich angepaßt (3.2.10).

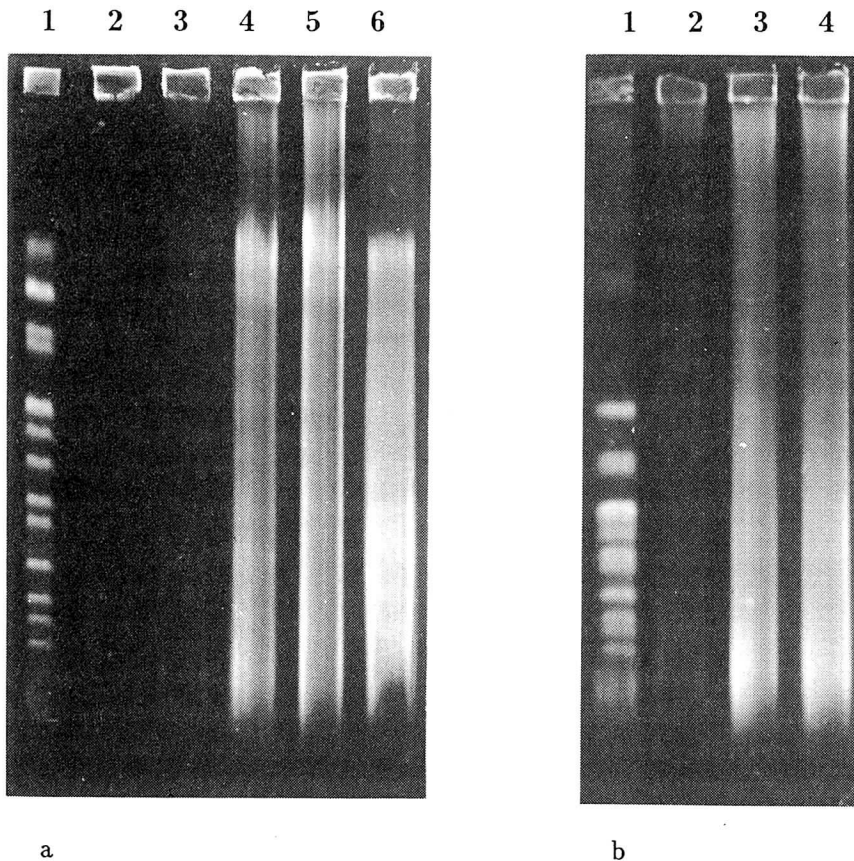


Abbildung 4.3: Unterschiedliche Trennung von Hefechromosomen und hydrolysiertes 2Fur-1 - DNA nach PFGE mit Pulsfrequenzen von 60 s (3a) und 90 s (3b)

a : 1 : *S. cerevisiae*
 2 : 2Fur-1(2µg)/- (4°C)
 3 : 2Fur-1(2µg)/- (37°C)
 4 : 2Fur-1(2µg)/Sac II
 5 : 2Fur-1(2µg)/Sac II
 6 : 2Fur-1(2µg)/Sal I

b : 1 : *S. cerevisiae*
 2 : 2Fur-1(2µg)/-
 3 : 2Fur-1(2µg)/Sac II
 4 : 2Fur-1(2µg)/Sac II

4.3 Southern - Transfer von DNA - Fragmenten eines Größenbereiches von 200 bis 1500 kbp

Zunächst sollten die hochmolekularen DNA-Fragmente durch Elektroblob auf Nylonmembranen transferiert werden. Eingesetzt wurden hierbei die zum TAFE - Elektrophorese - System gehörigen Elektrodenpaareinsätze. Vier sich horizontal gegenüberstehende Elektrodenpaare sollen den DNA-Transfer ermöglichen. Dabei ist der Abstand

von Kathode und Anode eines jeden Paares umgekehrt proportional zur Fragmentgröße der im entsprechenden Gelbereich zu transferierenden DNA. Durch dieses System soll ein gleichmäßiger Transfer über den gesamten Fragmentgrößenbereich gewährleistet werden.

Die Bedingungen für den Transfer wurden nach Angaben des Herstellers ausgeführt. Nachdem ein 2stündiger Transfer bei 100 V unzureichend erschien, wurde die Transferzeit auf 4 h erhöht. Auch in diesem Fall wurde nach Färbung des Agarosegels mit Ethidiumbromid unvollständiger Transfer beobachtet und kein Hybridisierungssignal erhalten. Die Schwierigkeiten beim Transfer hochmolekularer DNA-Fragmente im elektrischen Feld, nach Trennung im alternierenden Feld, konnten von Dr. K. Gardiner bestätigt werden (persönliche Mitteilung). Bei Durchführung des immunologischen Nachweises im Rahmen der Hybridisierung gegen haptenmarkierte DNA-Sonden (3.2.14) wurde starke Hintergrundanfärbung der Membranen beobachtet. Vermutet wird eine Beschädigung der Membranoberfläche während des DNA-Transfers im elektrischen Feld.

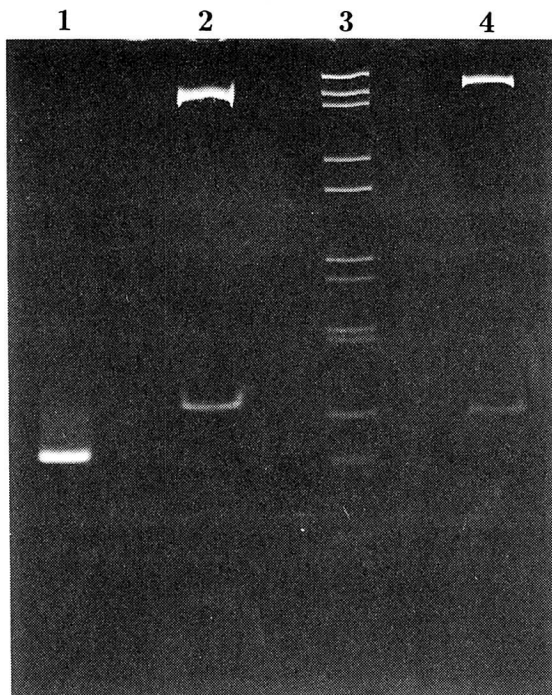
Vollständige Übertragung hochmolekularer DNA-Fragmente wurde bei Durchführung des Southern - Transfers nach Maniatis *et al.* (1982), modifiziert nach Gardiner *et al.* (1988), erhalten.

Wohingegen nach 48 h Transferzeit selten noch DNA-Reste, nach Färbung mit Ethidiumbromid, im Gel detektiert werden konnten, war ein Blot nach 72 h immer vollständig. Es wurde eine zeitliche Abhängigkeit von der gewählten Membran beobachtet. So mußte im Falle der Hybond N (Amersham) immer 72 h geblottet werden, dagegen war der Transfer auf Nytran 13 N sowie auf Nitrozellulose nach 48 h stets vollständig.

4.4 Vergleich der Hybridisierungstechniken

4.4.1 Überprüfung der DNA - Sonden

Zur Hybridisierung gegen repetitive humane DNA wurden die *Bam* HI - Inserts der Plasmide Blur 2 und Blur 11 eingesetzt (3.1.2). Nachdem bei Verwendung des Blur 11 - Fragmentes keine Hybridisierung erfolgte, wurden alle folgenden Hybridisierungen mit dem *Bam* HI - Fragment aus Blur 2 durchgeführt.



- 1 : Marker : 245 bp Fragment von ϕ 18 - DNA
- 2 : Blur 2/*Bam* HI (56 ng Insert)
- 3 : pBR328/*Bam* HI, *Bgl* I, *Hinf* I
- 4 : Blur 11/*Bam* HI (52 ng Insert)

Abbildung 4.4: 5%iges PAA - Gel nach Färbung mit Ethidiumbromid: *Bam* HI - Restriktionsanalyse der Plasmide Blur 2 und Blur 11

4.4.2 DNA - Markierung durch 'random-primed' - Einbau

Radioaktive Hybridisierung mit durch [α - 32 P] - dNTP markierten Sonden und nicht-radioaktive Hybridisierung durch Einbau von Digoxigenin - 11 - dUTP wurden in ihrer Nachweisgrenze verglichen. Beide Markierungsreaktionen erfolgten durch 'random - primed' - Einbau. In beiden Fällen wurde das Blur 2 - *Bam* HI - Insert verwendet.

Durch den bei der Antikörperreaktion gebildeten Farbniederschlag konnten 5 pg homologer DNA detektiert werden (Abb. 4.5). Selten war ein Nachweis homologer DNA bis zu einer Auftragsmenge von 2 pg deutlich.

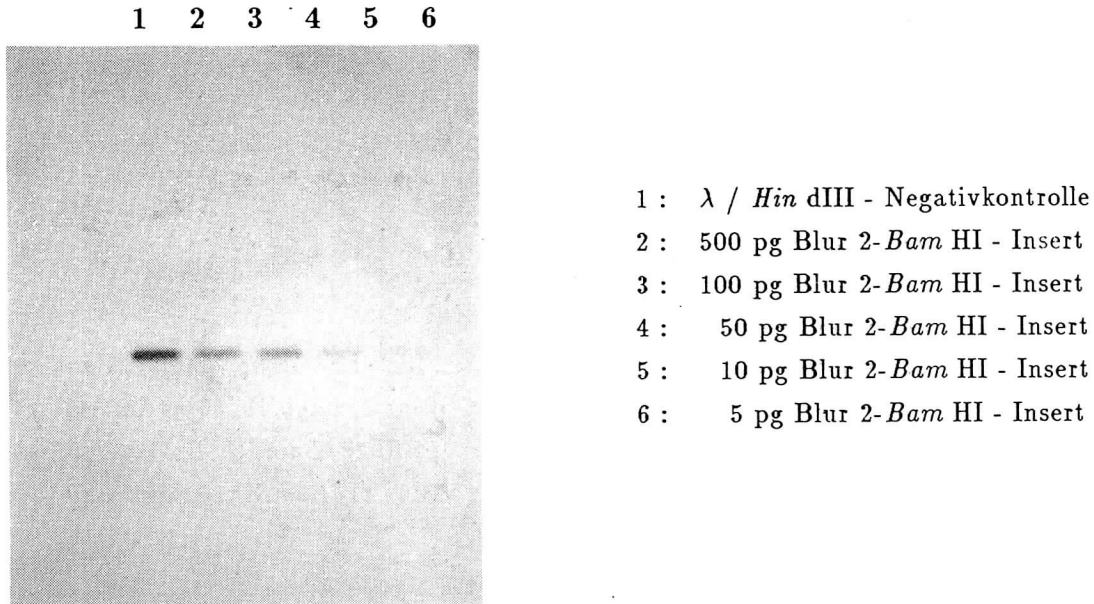


Abbildung 4.5: Southern - Blot von lin. Blur 2 - DNA hybridisiert gegen Dig - dUTP - markiertes Blur 2 - *Bam* HI - Insert

Die Effizienz der durchgeführten DNA-Markierungsreaktionen wurde im direkten 'dot' - Blot mit über Nacht markierter, aufgereinigter und frisch denaturierter DNA überprüft und mit der im Kit mitgelieferten markierten Kontroll-DNA (lin. pBR 328) verglichen. Entgegen den Angaben des Herstellers konnten in direktem 'dot' - Blot der markierten Kontroll-DNA nur 0,25 pg detektiert werden. Im Falle der in dieser Arbeit eingesetzten Sonden wurde sogar nur 1 pg markierter DNA nachgewiesen. Ein Effekt der Fragmentlänge der markierten DNA auf die Nachweisgrenze wurde nicht beobachtet.

Radioaktiver Nachweis lieferte bei 1 pg homologer DNA noch gut zu erkennende Signale bei einer spezifischen Aktivität von $2,2 \times 10^9$ dpm pro μg DNA (\cong 87% Einbau).

4.4.3 Einbau markierter Nucleotide durch 'nick' - Translation

Die durch 'nick' - Translation radioaktiv - markierte DNA lieferte den Nachweis homologer DNA bis zu 1 pg Auftragsmenge. Die spezifische Aktivität wurde aufgrund der Angaben im Markierungsprotokoll (BRL) auf 1×10^8 dpm pro μg DNA abgeschätzt.

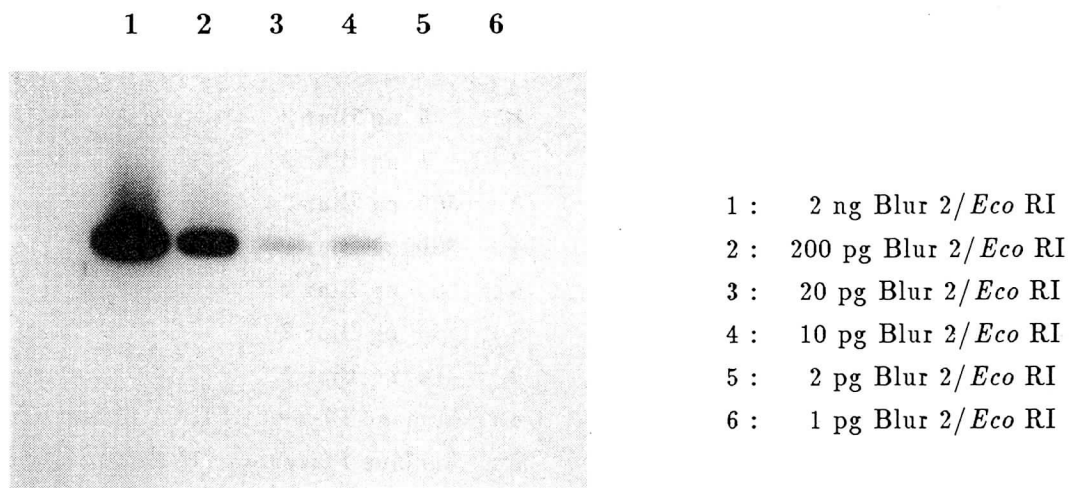


Abbildung 4.6: Southern - Transfer von lin. Blur 2: Bestimmung der Nachweisgrenze nach Hybridisierung gegen $[\alpha -^{32}\text{P}]$ - dCTP - markiertes Blur 2

4.5 Hybridisierung mit Digoxigenin - dUTP - markierter DNA

4.5.1 Test der Methode im konventionellen Southern - Blot

Zur Erprobung der Hybridisierungsbedingungen sowie der Methodik wurde das Plasmid Blur 2 mit *Eco* RI linearisiert und mit Dig - 11 - dUTP markiert. Die Sonde wurde zur Hybridisierung gegen mit *Eco* RI hydrolysierte humane Plazenta - DNA eingesetzt. Das erwartete gleichmäßige Signal bei Auswahl einer repetitiven, humanen Sonde konnte bestätigt werden. Einzelne stärkere Banden innerhalb eines Hintergrundschmiers hybridisierter DNA ließen sich detektieren (Abb. 4.7).

Entsprechend den Erwartungen zeigte sich, daß eine Quantifizierung zusätzlich erhaltenen Hintergrundes durch DSB-geschädigte DNA mit diesem System nicht möglich ist.

Aus Abb. 4.7 geht weiterhin hervor, daß eine Hybridisierung humaner Alu-Sequenzen mit der entsprechenden sequenzähnlichen Familie des Nagergenoms (B1-Familie) nicht erfolgt. Wäre dies der Fall, so müßten innerhalb des Bereiches hydrolysierter V79 - DNA Hybridisierungssignale zu erkennen sein.

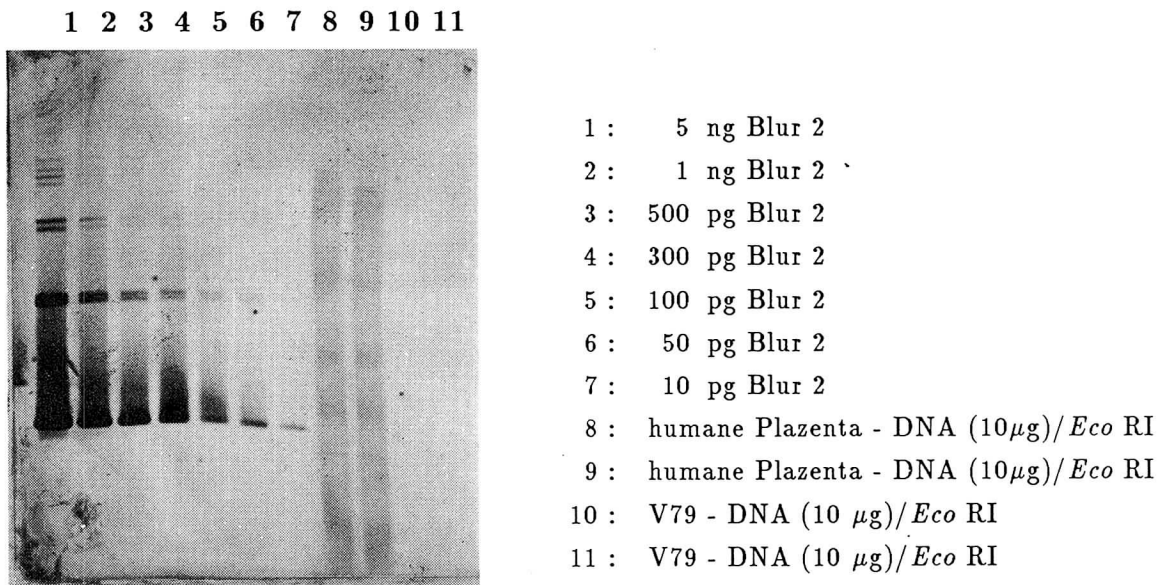


Abbildung 4.7: Southern - Blot von Blur 2 - Plasmid und restringierter genomischer DNA: Hybridisierung erfolgte gegen lin. Blur 2 nach Markierung mit Dig - dUTP. Die Signale in Spur 1-7 entsprechen Multimeren von Blur 2.

Das System sollte nun zunächst auf die im alternierenden Feld getrennte, mit LFRE hydrolysierte humane DNA übertragen werden. Wie schon beschrieben, erlaubt eine Analyse dieser größeren DNA-Fragmente (im Durchschnitt 10^6 bp gegenüber 4×10^3 bp im Falle der *Eco RI* - Restriktion) eine Reduktion der Bestrahlungsdosis im Vergleich zu den gängigen Methoden zur Bestimmung DSB-geschädigter DNA (Untersuchungen bis zu einer Fragmentlängengröße von ca. 50 kbp).

4.5.2 PFG - Blot humaner DNA und Nachweis repetitiver Sequenzen

Humane Nierenzell - DNA (T1) und DNA des Chinesischen Hamsters (V79) wurden mit *Sac* II hydrolysiert und im alternierenden Feld getrennt. Nach Optimierung der Transfer - Bedingungen für hochmolekulare DNA wurde, bei Einsatz des Blur 2 - *Bam* HI - Fragmentes, das in Abb. 4.8 dargestellte Hybridisierungssignal erhalten.

Das im Falle der T1 - DNA erhaltene gleichmäßige Hybridisierungssignal erstreckt sich infolge des hohen Anteils an Ziel-DNA über die gesamte Länge des Pulsfeldgels. Das Ergebnis bestätigte damit die Durchführung des Transfers für hochmolekulare DNA-Fragmente nach Trennung im alternierenden Feld.

V79 - DNA hybridisiert nicht gegen die humane Alu-Sonde.

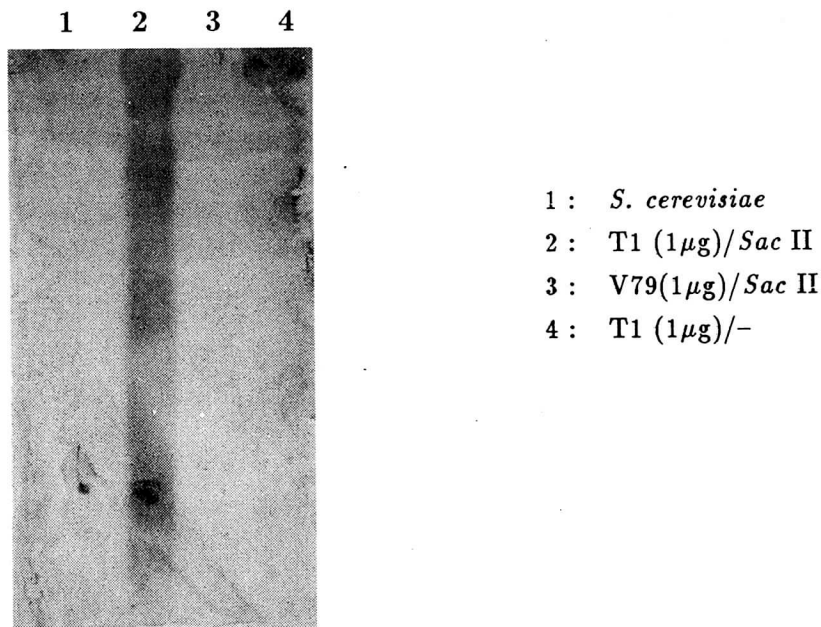


Abbildung 4.8: Detektion von Alu-Sequenzen im Southern - Blot *Sac* II - hydrolysiertes genomischer DNA nach PFGE: Hybridisierung erfolgte gegen Dig - dUTP - markiertes Blur 2 - *Bam* HI - Fragment.

Es wurde vorgeschlagen, das gewünschte Bandenmuster durch Reduktion der zu detektierenden DNA zu erhalten. In Anlehnung an die von Levine (1989) durchgeführten Experimente mit verwandten Alu-Sonden wurde im Folgenden mit der beschriebenen 2Fur-1-Hybridzelle gearbeitet. Eine Kreuzhybridisierung humaner Alu-Sequenzen mit der sequenzähnlichen B1-Familie des Hamstergenoms konnte aufgrund der Ergebnisse in 4.5.1 und 4.5.2 ausgeschlossen werden.

4.5.3 Nachweis humaner Alu - Sequenzen in 2Fur-1 - Hybridzellen

Signale im konventionellen Southern Blot

Die Hybridisierung konventionell präparierter (3.2.7), mit *Eco* RI restringierter 2Fur-1 - DNA gegen das mit Digoxigenin markierte *Bam* HI - Insert aus Blur 2 ergab kein Signal. Starke Signale wurden bei Einsatz humaner, *Eco* RI - restringierter Plazenta - DNA als Ziel-DNA unter Verwendung der gleichen Sonde erhalten (Abb. 4.9). Im gleichen Southern - Blot konnten 2 pg homologer DNA bei Auftrag von linearisiertem Blur 2 detektiert werden.

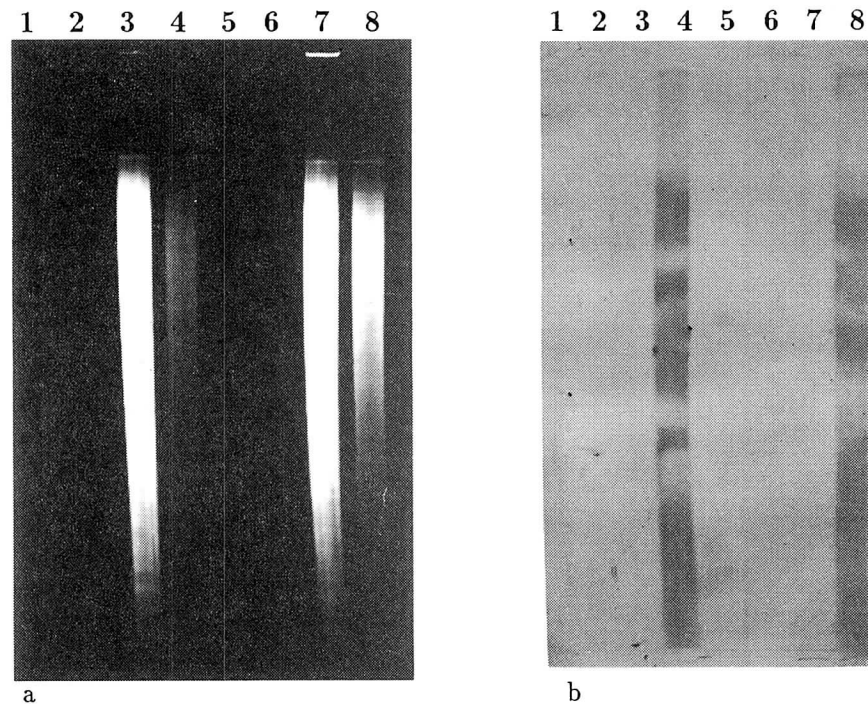


Abbildung 4.9: a : Trennung hydrolysiertes, genomischer DNA im 0,8%igen Agarosegel

b : Southern -Blot des Gels in 9a nach Hybridisierung gegen das Dig - dUTP - markierte Blur 2 - *Bam* HI - Fragment.

- 1 : Blur 2 / *Eco* RI (10pg, entsprechend 1 pg Alu - DNA)
- 2 : Blur 2 / *Eco* RI (20pg, entsprechend 2 pg Alu - DNA)
- 3 : 2Fur-1 - DNA / *Eco* RI (15 μ g)
- 4 : humane Plazenta -DNA / *Eco* RI (10 μ g)
- 5 : Blur 2 / *Eco* RI (10pg, entsprechend 1 pg Alu - DNA)
- 6 : Blur 2 / *Eco* RI (20pg, entsprechend 2 pg Alu - DNA)
- 7 : 2Fur-1 - DNA / *Eco* RI (15 μ g)
- 8 : humane Plazenta - DNA / *Eco* RI (10 μ g)

Hybridisierungssignale nach Auftrennung im alternierenden Feld

Ein Hybridisierungssignal verschiedener PFG - Blots mit LFRE - restringierter Hybridzell - DNA durch Verwendung Hapten - markierter Sonden wurde nicht erhalten.

Zur Erhöhung der Menge zu detektierender DNA wurde zunächst der DNA-Gehalt pro Agaroseplug auf 5 μg DNA / 0,5 cm 'plug' erhöht. Aufgrund der unzulänglichen Zell-Lyse infolge der hohen Zellkonzentration im Agaroseplug wurde nur schlechte Auftrennung der DNA im Pulsfeldgel beobachtet. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine verwandte Hybridzelle (A1) eingesetzt, welche neben allen Chromosomen des Chinesischen Hamsters das gesamte humane Chromosom 11 beinhaltet. Der Anteil nachzuweisender humaner Alu-Sequenzen pro Hybridzelle erhöht sich damit um ca. 250%. Doch wurde auch bei Einsatz dieser Zelllinie kein Hybridisierungssignal erhalten.

Die Nachweisgrenze bei Hybridisierung gegen Dig - markierte Sonden sollte zur Detektion humaner Alu-Sequenzen in hydrolysiertes 2Fur-1 - DNA ausreichen. Berechnungen ergeben einen Gehalt an Ziel-DNA von ca. 10-30 pg pro erwarteter Hybridisierungsbande. Es besteht damit ein deutlicher Unterschied in der noch nachzuweisenden Auftragsmenge gereinigter und transferierter DNA-Fragmente im Vergleich zu der im alternierenden Feld getrennter, genomischer und transferierter DNA. Eine wichtige Rolle könnte hierbei das Ausmaß der vor dem Transfer genomischer DNA erfolgenden Depurinisierung spielen. Zu starke Hydrolyse kann zu einer Verminderung der Intensitäten der Hybridisierungssignale führen, was auch von Dr. K. Gardiner (persönliche Mitteilung) angeführt wurde.

4.6 Hybridisierung durch Einsatz radioaktiv - markierter Sonden

4.6.1 Detektion humaner Alu - Sequenzen in 2Fur-1 - Hybridzellen

Die Alu-Sequenzen in humaner und Hybridzell-DNA wurden nach Trennung im alternierenden Feld durch Einsatz radioaktiv-markierter Sonden nachgewiesen.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Autoradiogramme der PFG - Blots nach Hybridisierung des Blur 2 - *Bam* HI - Fragmentes gegen Human - und Hybridzell - DNA. Die Sonden wurden durch 'random - primed' - Einbau von [α - ^{32}P] - dCTP markiert. Die spezifische Aktivität wurde auf 5×10^8 dpm pro μg DNA geschätzt. In beiden Versuchen wurde im Falle der 2Fur-1 - DNA ein bandenartiges Hybridisierungsmuster erhalten, das Spezifität für das verwendete Restriktionsenzym zeigt. Das Signal bei Auftrag rein humaner DNA entspricht den beschriebenen Erwartungen (4.5.2) und diente allein der Kontrolle der durchgeführten Hybridisierung.

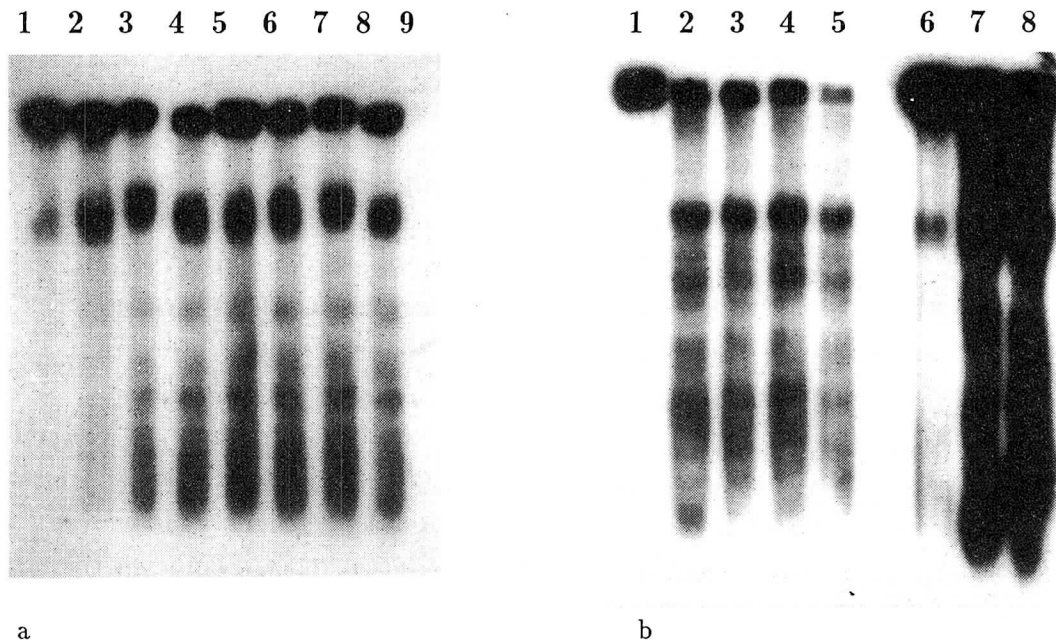


Abbildung 4.10: Detektion humaner Alu - Sequenzen in 2Fur-1 - Hybridzellen nach Trennung im alternierenden Feld: hybridisiert wurde gegen das [32 P] - Blur 2 - Bam HI - Fragment.

- | | | | | | |
|-----|-----|------------------------|-----|-----|--------------------|
| a : | 1 : | 2Fur-1(1µg)/- | b : | 1 : | 2Fur-1(2µg)/- |
| | 2 : | 2Fur-1(1µg)/ 2 USac II | | 2 : | 2Fur-1(2µg)/ Sal I |
| | 3 : | 2Fur-1(1µg)/10 USac II | | 3 : | 2Fur-1(2µg)/ Sal I |
| | 4 : | 2Fur-1(1µg)/15 USac II | | 4 : | 2Fur-1(2µg)/ Sal I |
| | 5 : | 2Fur-1(1µg)/20 USac II | | 5 : | 2Fur-1(2µg)/ Sal I |
| | 6 : | 2Fur-1(1µg)/25 USac II | | 6 : | T1(0,5µg)/- |
| | 7 : | 2Fur-1(1µg)/30 USac II | | 7 : | T1(0,5µg)/ Sal I |
| | 8 : | 2Fur-1(1µg)/40 USac II | | 8 : | T1(0,5µg)/ Sal I |
| | 9 : | <i>S. cerevisiae</i> | | | |

Die erhaltenen Banden bei Nachweis von Alu-Sequenzen in 2Fur-1 - DNA können zur Bestimmung der Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen herangezogen werden. Würde ein solches Schadensereignis innerhalb der DNA einer beobachteten, hybridisierten Bande gesetzt, käme es zu einer Intensitätsabnahme des Signals dieser Bande. Parallel sollte eine Verstärkung des Hintergrundes durch Hybridisierung im Bereich kurzzeitigerer DNA-Fragmente auftreten. Durch Analyse rückläufiger Prozesse können ebenso Studien zur DSB-Reparatur durchgeführt werden. Die Beobachtung hybridisierter Banden innerhalb definierter Bereiche unterschiedlicher Fragmentlängengröße würde die Erstellung eines Zusammenhangs zwischen DSB-Induktion und Targetgröße ermöglichen.

Zur Bestimmung der Frequenz gesetzten Schadens wäre es angebrachter, mit stärker voneinander abgegrenzten hybridisierten Banden zu arbeiten. Signale infolge beschädigter DNA könnten eindeutiger von denen unbeschädigter DNA getrennt werden.

Neben der Detektion repetitiver Sequenzen wurde deshalb der Nachweis von 'single-copy' - Genen nach Trennung hochmolekularer DNA im alternierenden Feld angestrebt.

4.7 Nachweis des Gens für die schwere Kette des humanen β - Myosins (MYH6)

4.7.1 Test der Sonde durch Hybridisierung gegen humane Plazenta - DNA

Das *Eco* RI - Insert des pC 14 - Vektors wurde zunächst im konventionellen Southern - Blot erprobt. Die DNA-Markierung erfolgte hier durch 'nick' - Translation. Die spezifische Markierung wurde bei Einsatz von 500 μ Ci [α - 32 P] - dCTP pro μ g DNA auf 5×10^8 dpm pro μ g DNA geschätzt. Hybridisierung gegen die mit *Eco* RI hydrolysierte humane Plazenta - DNA ergibt eine Bande im Größenbereich von ca. 6,5 kbp.

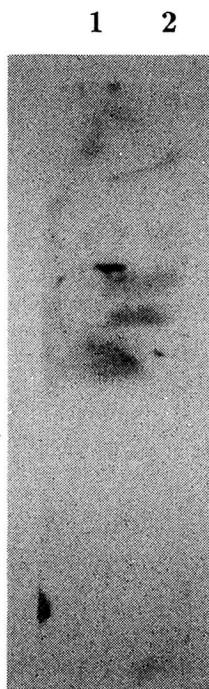


Abbildung 4.11: Nachweis des Gens für die schwere Kette des humanen β - Myosins in *Eco* RI - hydrolysiertes humaner Plazenta - DNA : Die Trennung erfolgte im 0,8%igem Agarosegel. Nach Transfer wurde gegen [32 P] - markiertes pC 14 - *Eco* RI - Fragment hybridisiert.

1 : humane Plazenta(10 μ g)/*Eco* RI

2 : Blur 2/*Eco* RI (10 ng)

4.7.2 Detektion des β - Myosin - Gens im PFG - Blot

Das in Abb. 4.12 dargestellte Autoradiogramm zeigt die hybridisierten Banden im PFG - Blot. Die mit *Sal* I hydrolysierte humane Nierenzell - DNA (isoliert aus T1-Zellen) zeigt eine deutliche Bande einer ungefähren Größe von ca. 400 kbp.

Durch Erhöhung der auf das Pulsfeldgel aufgetragenen DNA-Menge ließe sich das Signal vermutlich noch verstärken. Verwendung einer Verstärkerfolie sowie Exposition bei -80° C würden weiterhin zu einer Intensivierung beitragen.

1 2 3 4 5

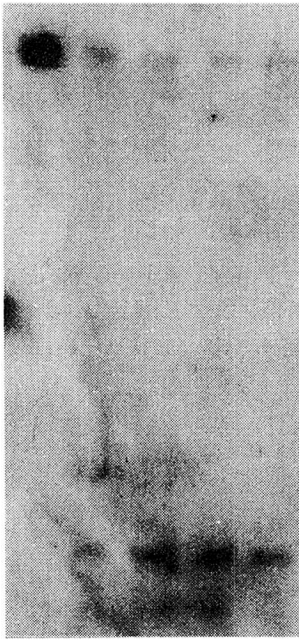


Abbildung 4.12: Nachweis des Gens für die schwere Kette des humanen β - Myosins in humaner Nierenzell - DNA nach Trennung im alternierenden Feld, Transfer und Hybridisierung gegen [^{32}P] - markiertes pC 14 - *Eco* RI - Fragment

- 1 : T1(0,5 μg)/-
- 2 : T1(0,5 μg)/*Sal* I
- 3 : T1(0,5 μg)/*Sal* I
- 4 : T1(0,5 μg)/*Sal* I
- 5 : T1(0,5 μg)/*Sal* I

4.8 Inaktivierung von 2Fur-1 - Hybridzellen

Der Einfluß der Strahlenqualität auf die Inaktivierung der Hybridzelllinie 2Fur-1 wurde untersucht und mit den für V79-Zellen vorliegenden Daten verglichen.

Die in Abb. 4.13 und Abb. 4.14 dargestellten Dosis- bzw. Fluenzeffektkurven zeigen die überlebende Fraktion S/S_0 als Funktion der Dosis bzw. Teilchenfluenz.

Dabei wurde zuerst die Inaktivierung der Hybridzelle 2Fur-1 nach Röntgenbestrahlung gemessen (3.2.6). Die Dosiseffektkurve zeigt den für locker ionisierende Strahlung typischen, schulterförmigen Verlauf. Erst bei höheren Dosen geht die Dosiseffektkurve in einen exponentiellen Teil über. Kleinere Strahlendosen sind zunächst weniger wirksam. Allgemein wird innerhalb des nicht linearen Teils der Überlebenskurve eine Kompensation gesetzter Strahlenschäden durch einsetzende DNA-Reparatur angenommen.

Anschließend wurden Fluenzeffektkurven nach Bestrahlung mit verschiedenen Ionen unterschiedlicher Energien erstellt (3.2.6). Im Fall dieser rein exponentiellen Fluenz - Wirkungsbeziehung verursacht jedes Dosisintervall gleichen Effekt. Die überlebende Fraktion hängt dabei vom Inaktivierungsquerschnitt (σ) ab. Er entspricht der Steigung der Kurve und beschreibt die Effektivität eines Teilchens.

Nach der in 3.2.6 dargestellten Formel kann der Inaktivierungsquerschnitt aus der Überlebensmessung berechnet werden.

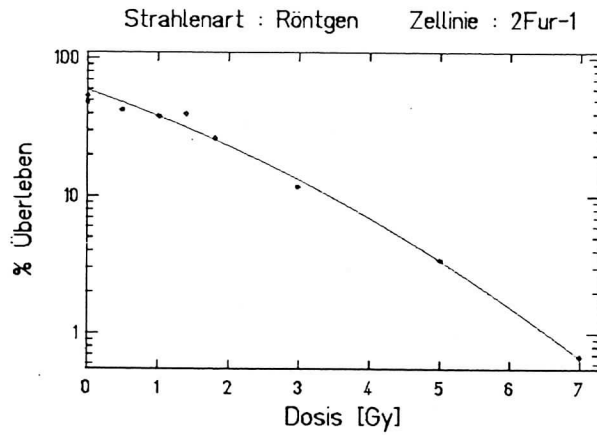


Abbildung 4.13: Inaktivierung von 2Fur-1 - Zellen nach Röntgenbestrahlung

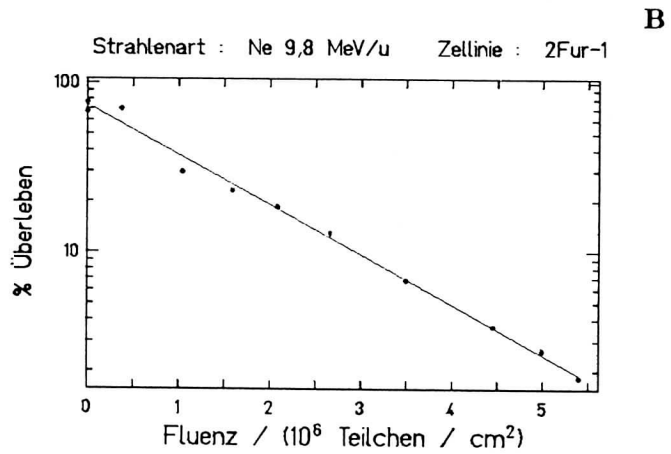
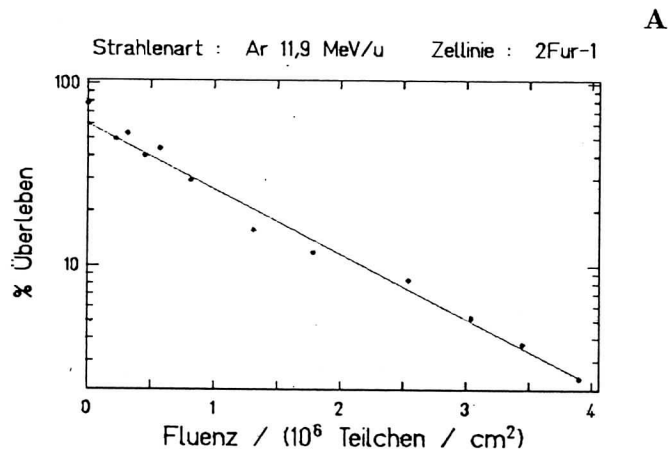


Abbildung 4.14: Überlebende Fraktion nach Bestrahlung von 2Fur-1 - Zellen mit beschleunigten schweren Ionen : (A) ^{40}Ar , (B) ^{20}Ne

Die Teilchenparameter der zur Bestrahlung verwendeten Ionen und die erhaltenen Wirkungsquerschnitte (σ) werden in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Ion	Energie (MeV/u)	LET (keV/ μm)	σ (μm^2)
^{20}Ne	13,9	310	53
^{20}Ne	9,8	410	68
^{20}Ne	9,0	430	70
^{20}Ne	4,7	700	74
^{20}Ne	4,7	700	79
^{40}Ar	11,9	1100	82
^{238}Pb	3,8	16000	83

Vergleich der Inaktivierungsquerschnitte

Abb. 4.15 zeigt einen Vergleich der für V79- und 2Fur-1-Zellen gemessenen Inaktivierungsquerschnitte. Dabei sind die für die Hybridzelle ermittelten Werte durch das betreffende Symbol des zur Inaktivierungsmessung verwendeten Ions gekennzeichnet. Die für 2Fur-1-Zellen aus der Überlebensmessung berechneten Wirkungsquerschnitte (3.2.6) liegen ca. 30% höher als die für V79-Zellen ermittelten.

Die erhöhte Strahlensensitivität der Hybridzelle läßt sich auf den im Vergleich zur V79-Zelle größeren Zellkern zurückführen. Die durchschnittlichen geometrischen Kernquerschnitte liegen für V79-Zellen bei $93\mu\text{m}^2$ und für 2Fur-1-Hybridzellen bei $122\mu\text{m}^2$.¹ Der Unterschied in der Größe des strahlenempfindlichen Targets beträgt annähernd 25%. Der Inaktivierungsquerschnitt (σ) steigt damit mit der Kernfläche der Säuger-Zelle an. Die Wahrscheinlichkeit einer Inaktivierung nimmt zu.

¹Die Kerngrößen wurden durch Fluoreszenzfärbung und Bildanalyse von M. Scholz, GSI Darmstadt, bestimmt.

Kapitel 5

Diskussion

Zur Erstellung quantitativer Korrelationen zwischen DSB-geschädigter DNA und Zellinaktivierung müssen Messungen zur DSB-Induktion pro Dosis sowie pro DNA-Längeneinheit erfolgen. Hohe Molekulargewichte im Falle des Säuger-genoms gestalten genaue Bestimmungen der Strangbruchinduktion schwierig und führen zu abweichenden Ergebnissen. Außerdem ist eine ausreichende Fragmentation der zu untersuchenden DNA sowie die damit verbundene Applikation hoher Dosen notwendig.

Innerhalb des Bereiches biologisch bedeutsamer Bestrahlungsdosen von 1-10 Gy ist die Ausbeute molekularen Schadens niedrig und eine ausreichende DNA-Fragmentation nicht gegeben. Die Entwicklung sensitiverer Verfahren zur Analyse induzierter Doppelstrangbrüche in hochmolekularer DNA ist daher besonders interessant. Bei Applikation physiologischer Dosen kann eine Schädigung des Enzymapparates der Zelle noch ausgeschlossen werden. Die Reparatur strahleninduzierter Doppelstrangbrüche kann untersucht werden.

Der in dieser Arbeit erfolgte Einsatz der Hybridzelle 2Fur-1 zur Beschreibung von Reparaturstudien scheint aufgrund verschiedener Hinweise in der Literatur berechtigt. Verschiedene Komplementationsgruppen UV-sensitiver Mutanten der CHO-Zelle sind bislang unter Bestätigung ihrer genetischen Diversität isoliert worden (Thompson *et al.*, 1987). Die Reparaturfähigkeit dieser Zellen konnte durch Transfektion mit humaner DNA wiederhergestellt werden (Rubin *et al.*, 1983; Westerveld *et al.*, 1984). Eine Korrektur der Reparatur erfolgt dabei durch unterschiedliche humane Chromosomen. Die Reparatur von DNA-Schäden verlangt sowohl in Nagetier-Zellen als auch in humanen Zellen das Zusammenspiel von Multienzymkomplexen. Die erfolgreichen Komplementationen implizieren, daß diese Multienzymkomplexe von Nagetier und Mensch einander sehr ähnlich sind.

Es wird angenommen, daß die CHO-Zelle zur Reparatur humaner Chromosomen befähigt ist.

In Rahmen dieser Arbeit wurde hochmolekulare Säugerzell-DNA restringiert. Die entstandenen Fragmente wurden durch Pulsfeldgelelektrophorese getrennt. Der humane DNA-Anteil der eingesetzten Hybridzelle wurde durch spezifische Hybridisierung als definiertes Bandenmuster detektiert.

Hierdurch wird erstmals die Voraussetzung geschaffen, Doppelstrangbrüche innerhalb einzelner, aus Säugetier-Zellen isolierter DNA-Fragmente nachzuweisen. Die Anwendbarkeit dieses Verfahrens im Vergleich zu den gängigen Methoden, welche zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen herangezogen werden, wird diskutiert.

5.1 Sedimentation im Saccharosegradienten

Die Trennung DSB-geschädigter DNA-Moleküle durch neutrale Saccharosegradienten-Sedimentation ist weit verbreitet.

Nach Applikation supra-letaler Bestrahlungsdosen ergeben sich lineare Dosiseffektkurven (Lehmann und Ormerod, 1970).

Eine Erhöhung der Sedimentationsgeschwindigkeit ermöglicht die Sedimentation von DNA-Fragmenten bis zu einem kritischen Molekulargewicht von 5×10^9 Da. Größere DNA-Moleküle zeigen abnormale Sedimentation. Bei Annahme eines DNA-Molekulargewichtes von 10^{11} Da pro Säugetier-Zelle ergibt sich eine minimale Bestrahlungsdosis von 50 Gy.

Die Sedimentation limitiert die Detektion von Doppelstrangbrüchen auf einen Dosisbereich, innerhalb dessen eine funktionelle Reparatur nicht mehr gewährleistet werden kann (100-2000 Gy). Zudem ist die Analyse nicht proliferierender Zellpopulationen durch die in den meisten Fällen erforderliche radioaktive Markierung schwierig.

5.2 Filterelution

Die neutrale Filterelution (Bradley und Kohn, 1979) erlaubt eine Reduktion der Bestrahlungsdosen. Eine DSB-Bestimmung nach Bestrahlung mit Dosen innerhalb des Überlebensbereiches wird möglich. Ein Zusammenhang zwischen induzierten Doppelstrangbrüchen und Zellinaktivierung läßt sich erstellen. Doch ist die Anwendung dieses Verfahrens sehr umstritten. Die Gesamtheit eluierter DNA ist besonders nach Röntgenbestrahlung (höheres Verhältnis von ESB zu DSB) kontaminiert durch ESB-geschädigte Anteile und damit nicht DSB spezifisch (Hutchinson, 1989).

Die durch neutrale Elution ermittelten, biphasischen Reparaturkinetiken in Säugetier-Zellen (Okayasu und Iliakis, 1989) widersprechen den durch neutrale Sedimentation erhaltenen linearen (Blöcher und Pohlitz, 1982; Lehmann und Stevens, 1977). Reparaturstudien durch Anwendung der Elution beschreiben neben einer schnellen Komponente ($t_{1/2} = 2-10$ min) eine langsame Reparaturkomponente ($t_{1/2} = 0,5-2$ h). In Sedimentationsanalysen hingegen wurde nur eine langsame Komponente ($t_{1/2} = 1$ h) beobachtet.

Das Elutionsprofil radiosensitiver Mutanten (Jeggo und Kemp, 1983; Kemp *et al.*, 1984) zeigte keinen Unterschied zum biphasischen Schulterprofil des Wildtyps, welches lange mit ablaufender Reparatur erklärt worden war. Unvollständiges Entfernen der an die

DNA gebundenen Proteine wurde postuliert und verifiziert (Okayasu *et al.*, 1988; Okayasu und Iliakis, 1989). Andere Lysebedingungen ergaben dann sowohl beim Wildtyp als auch bei den strahlensensitiven Mutanten linearen Kurvenverlauf, der damit dem bei der Saccharosegradienten-Sedimentation erhaltenen entspricht.

Dies konnte allerdings von anderen Autoren (Peak *et al.*, 1990) nicht bestätigt werden.

Schwierigkeiten bereitet, neben der Elution partiell replizierter DNA wie im Falle der S - Phasen - Zellen, auch die Analyse sich nicht teilender Zellen. Dies ist bedingt durch die erforderliche radioaktive Markierung der DNA.

Zusammenfassend wird deutlich, daß der Anteil eluierter DNA wesentlich beeinflusst wird durch die gewählten Lysebedingungen (Evans *et al.*, 1987; Bradley und Kohn, 1979), sowie Pufferzusammensetzung (Koval und Kazmar, 1988) und Zellzyklus-Stadium (Okayasu *et al.*, 1988). Das Elutionsverhalten ist damit nicht immer mit der Induktion von Doppelstrangbrüchen korreliert. Es ist daher schwierig, aus den erhaltenen Ergebnissen Rückschlüsse auf das Überleben der Zellen zu ziehen.

5.3 Sedimentation bei reduzierter Geschwindigkeit

Die Anwendung der Sedimentation im Saccharosegradienten bei reduzierter Geschwindigkeit (Blöcher und Pohlit, 1982) zeigte sich im Vergleich zur neutralen Filterelution als deutlich sensitiver das Schadensereignis der sedimentierten DNA betreffend. Die Zentrifugation bei sehr kleinen Geschwindigkeiten erlaubt die Detektion von Doppelstrangbrüchen bis zu einer Bestrahlungsdosis von 5 Gy und liegt damit innerhalb des Überlebensbereiches. Um Abnormalitäten bei der Sedimentation zu umgehen, verabreichte Blöcher sowohl den Kontrollen als auch den Proben unmittelbar vor der Zell-Lyse eine Dosis von 10 Gy. Detektiert wurden mit dieser Methode die Unterschiede im Sedimentationsprofil. Innerhalb des untersuchten Dosisbereiches von 5 - 2000 Gy wurde ebenfalls eine proportional zur Bestrahlungsdosis induzierte Anzahl von Doppelstrangbrüchen ermittelt. Die Induktionsfrequenz wurde auf 70 DSB/Zelle/Gy ermittelt.

Die Sedimentation bei reduzierter Geschwindigkeit erlaubt eine Trennung von DNA-Molekülen bis zu einem maximalen Molekulargewicht von 10^{10} Da. Das äußerst arbeitsintensive Verfahren führt zwar zum Erhalt von DNA-Fragmenten ohne kontaminierende Moleküle, doch sind lange Sedimentationszeiten für eine ausreichende Trennung der zu untersuchenden DNA erforderlich. In den meisten Fällen limitiert auch hier die radioaktive DNA-Markierung die Anwendbarkeit des Systems auf proliferierende Zellen.

5.4 Gelelektrophorese

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung strahleninduzierter Doppelstrangbrüche bietet die konventionelle Gelelektrophorese. Sie erlaubt eine Trennung von DNA-Fragmenten bis zu einem Molekulargewicht von 10^7 Da, im Falle sehr niedrig konzentrierter Agarosegele bis zu 10^8 Da. Die gelelektrophoretische Analyse bietet sich besonders bei

Verwendung niedermolekularer Viren-DNA (SV40, ϕ X) in Bestrahlungsexperimenten an (Roots *et al.*, 1990, Taucher-Scholz *et al.*, 1990). Auch die in diesen Systemen ermittelten Werte zur Induktion von Doppelstrangbrüchen verhalten sich linear zur applizierten Dosis. Die Frequenz liegt etwas höher als für die Sedimentation von Säugerzell-DNA erhalten. Bei Extrapolation der für niedermolekulare Systeme erhaltenen Werte auf Säugerzell-DNA müssen sowohl die Unterschiede in der Chromatinstruktur als auch die zur Induktion von Doppelstrangbrüchen in viralen Genomen erforderlichen sehr hohen Dosen bedacht werden.

5.5 Alternierende Elektrophorese

Contopoulou *et al.* (1987) haben mittels PFGE die Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen in Chromosomen von *S. cerevisiae* untersucht.

Ager *et al.* (1990), Blöcher *et al.* (1989) und Stamato und Denko (1990) haben die alternierende Elektrophorese zur Bestimmung von Doppelstrangbrüchen in CHO-Zellen eingesetzt. Da die Mobilität der DNA-Moleküle im Pulsfeldgel entscheidend von den gewählten Elektrophoresebedingungen abhängt, wurde insbesondere von Ager *et al.* (1990) und Blöcher und Kunhi (1990) die Auswirkung der elektrischen Feldstärke auf den gelelektrophoretisch isolierten Fragmentgrößenbereich untersucht.

5.5.1 Induktion und Reparatur von DSB in Hefechromosomen

Im Falle der von Contopoulou *et al.* (1987) durchgeführten Gelelektrophorese wurden die ganzen Hefechromosomen im orthogonal-alternierenden Feld (OFAGE) getrennt. Erstmals erfolgte Betrachtung der individuellen Chromosomen. Die Autoren beobachteten nach Bestrahlung (48 krad γ -Strahlen) eine Intensitätsabnahme der Chromosomenbanden proportional zur Chromosomengröße und in Korrelation zum gesetzten Strahlenschaden. Unter den reparaturdefizienten Hefemutanten rad 50 - 57 ließen sich diejenigen mit Defekt in der Rekombinations-Reparatur detektieren. Die Zunahme der Fluoreszenzintensitäten der Chromosomenbanden nach Inkubation der Hefe nach Bestrahlung wurde als DSB-Reparatur gedeutet und durch Hybridisierung gegen rad 54 - Sonden bestätigt.

Auch im Falle der reparaturdefizienten Hefemutanten wurde eine Abnahme degradierter DNA beobachtet, sofern Inkubation nach Bestrahlung erfolgte. Parallelanalysen der betreffenden DNA durch neutrale Saccharosegradientensedimentation ergaben eine Erhöhung der durchschnittlichen Fragmentlängengröße, was zunächst fälschlicherweise als Reparatur interpretiert worden war. Stamato und Denko (1990) postulierten jedoch entweder die Degradation der DNA-Fragmente während der Inkubation oder eine Konformationsänderung, welche das Einwandern in das Agarosegel verhindere. Dies belegt die hohe Spezifität der alternierenden Elektrophorese für die Analyse erzeugter Doppelstrangbrüche.

5.5.2 Detektion von Doppelstrangbrüchen in CHO - Zellen

Da eine Auftrennung der ganzen Säugerchromosomen infolge ihrer Komplexität durch Pulsfeldgelelektrophorese nicht möglich ist, wurde ein zur neutralen Elution analoges Verfahren zur Quantifizierung der gesetzten Doppelstrangbrüche von Stamato und Denko (1990), Blöcher *et al.* (1989) und Ager *et al.* (1990) eingesetzt. Die Detektion des Schadens erfolgt hierbei durch Bestimmung des im alternierenden Feld elektrophoretisch eluierten DNA-Anteils. Durch Einbetten der Säugetier-Zellen in Agarose werden mechanische Scherkräfte während des Lysevorgangs stark reduziert. Nach Elution hochmolekularer DNA-Fragmente im diskontinuierlichen Feld erfolgt die Quantifizierung der Fraktion eingewandelter DNA entweder durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität oder durch Radioaktivitätsmessung. Die Elektrophoresebedingungen werden dabei so gewählt, daß alle freigelassenen DNA-Fragmente in einer einzigen Bande akkumuliert werden können. Eine Separierung aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte wird vernachlässigt. Eine genauere und leichtere Quantifizierung der elektrophoretisch eluierten DNA wird hierdurch möglich.

Stamato und Denko (1990) setzten die asymmetrische Feldinversionsgelelektrophorese (FIGE) ein. Durch Auswahl sehr langer Pulszeiten werden die DNA-Moleküle gezwungen, in Richtung der niederen Feldstärke zu wandern. Bestimmt wurde das Verhältnis elektrophoretisch eluierter Radioaktivität zur gesamten Radioaktivität innerhalb einer Gelspur. Die DNA-Analyse wird somit auf proliferierende Zellen beschränkt.

Durch Vorversuche mit Restriktionsendonucleasen konnte gezeigt werden, daß die Fraktion der in das Gel eingewanderten DNA-Fragmente direkt proportional zur Hydrolysedauer ist. Nach Bestrahlung von in Agarose eingebetteten CHO-Zellen mit γ -Strahlen war der Anteil der gelelektrophoretisch eluierten DNA direkt proportional zur Bestrahlungsdosis. Dabei wurden Variationen in Abhängigkeit von den gewählten Elektrophoresebedingungen festgestellt. Unter Bedingungen, unter welchen die größten DNA-Fragmente eluiert wurden, wurde auch der größte Anteil γ -bestrahlter DNA freigelassen. Sehr lange Pulszeiten führten zu einer Erhöhung der freigelassenen Fragmentlängengröße und zu einer Stauchung der Bande eluierter DNA. Hier wurde maximale Sensitivität des Assays erhalten. Eine Quantifizierung der gesetzten Schadensereignisse pro DNA-Fragmentlängengröße kann mit diesem System nicht erfolgen.

Blöcher *et al.* (1989) setzten zur Detektion von Doppelstrangbrüchen in CHO-Zellen die CHEF - Apparatur in Kombination mit einer Bestimmung der Fluoreszenzintensität getrennter Fragmente ein. Alle DNA-Fragmente, die dem periodischen Wechsel des elektrischen Feldes folgen können, wandern in das Gel ein. Auch hier führt die Auswahl langer Pulszeiten zu einer Akkumulation beschädigter DNA in einer definierten Zone.

Das Elektrophoresesystem erlaubt, je nach Elektrophoresebedingungen, die Elution von DNA-Molekülen bis zu einer Größe von 10 Mbp. Dies entspricht dem Effekt von 1 Gy Co-60 γ -Strahlung. Nach Applikation dieser Dosis kommt es zu einer Verdoppelung der extrahierten DNA-Menge im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Es handelt sich damit um eine der sensitivsten Techniken zur Erfassung von Doppelstrangbrüchen. Ein deutliches Signal wurde nach Anfärbung mit Ethidiumbromid bis zu einer Dosis von

2,5 Gy erhalten (Blöcher *et al.*, 1989). Oberhalb einer Dosis von 40 Gy wurde vermutlich bedingt durch Vernetzungs-Effekte weniger DNA pro Gy entlassen. Veränderungen in der DNA-Struktur führen zu einer Reduktion der Mobilität. Flachere Dosiseffektcurven wurden auch bei Untersuchung sich replizierender DNA sowohl nach Bestrahlung von ganzen Zellen als auch von isolierter DNA erhalten. Dies bestätigt Beobachtungen nach Anwendung der neutralen Filterelution.

DSB-Reparatur konnte durch Abnahme der Fluoreszenzintensitäten extrahierter DNA beobachtet werden, sofern Inkubation der Zellen nach Bestrahlung erfolgte. Die Halbwertszeit lag bei 30 bis 35 min.

Die mit dieser Methode abgeschätzte Induktionsfrequenz von Doppelstrangbrüchen liegt in Bereichen von ca. 8×10^{-12} DSB/Da/Gy bzw. 50 DSB/Zelle/Gy. Sie entspricht etwa der durch neutrale Sedimentation erhaltenen Frequenz (Corry und Cole, 1973; Lehman und Stevens, 1977).

Ager *et al.* (1990) ermittelten strahleninduzierte Doppelstrangbrüche mit der transversalternierenden Gelelektrophorese. Eine verbesserte gelelektrophoretische Elution der DNA-Moleküle wurde erreicht durch Reduktion der Agarosekonzentration, Ausdehnung der Gesamtelektrophoresedauer sowie durch Erhöhung der Pulszeiten. Es konnten DNA-Doppelstrangbrüche bis zu einer Bestrahlungsdosis von 3 bis 4 Gy gemessen werden. Eine Quantifizierung des gesetzten Schadens pro applizierter Dosis kann nur bei konstant gehaltenen elektrophoretischen Bedingungen erfolgen. Die Frequenz induzierter Doppelstrangbrüche in Abhängigkeit von der beobachteten Fragmentlängengröße läßt sich auch bei Anwendung dieses Systems nicht bestimmen.

5.6 Quantifizierung DSB - geschädigter DNA durch Hybridisierung

Das in dieser Arbeit erstellte Nachweissystem basiert auf der Detektion repetitiver humaner Sequenzen innerhalb des Gesamtgenoms der Hybridzelllinie 2Fur-1. Es führt im Unterschied zu der von Levine (1989) untersuchten Hybridzelle (153E7b) zum Erhalt eines definierten Bandenmusters, was sich auf den geringeren Anteil humaner DNA in der 2Fur-1-Hybridzelle zurückführen läßt. Das Hybridisierungssignal erlaubt entsprechend den von Contopoulou *et al.* (1987) beschriebenen Experimenten zur Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen in Hefechromosomen die Betrachtung individueller DNA-Fragmente innerhalb des gesamten Säugerzell-Genoms. Diese Fragmente können zur Detektion von Doppelstrangbrüchen und Nachweis erfolgter DSB-Reparatur herangezogen werden. Eine Abschwächung der Signale nach Bestrahlung bzw. ihre Intensivierung nach Reparatur wird erwartet. Innerhalb der Gesamtheit aller Hybridisierungsbanden lassen sich nach *Sal I* - Hydrolyse zwei durch ihr besonders definiertes Signal abgrenzen. Sie liegen im Bereich von ca. 1,1 Mbp bzw. 450 kbp. Ihre Fragmentlängengröße ermöglicht eine Reduktion der Bestrahlungsdosen im Vergleich zu den eingesetzten niedermolekularen Systemen (z.B. SV40) zur Strangbruchuntersuchung.

Im Falle einer Bestrahlung mit ^{40}Ar beträgt die erforderliche Teilchenfluenz zur Detektion erster, nachweisbarer Doppelstrangbrüche innerhalb des intrazellulären SV40 -

Genoms (5243 bp) 5×10^8 Teilchen / cm^2 (Taucher-Scholz *et al.*, 1990). In dem zu betrachtenden DNA-Fragment einer Größe von 1,1 Mbp würde entsprechender Schaden bei Bestrahlung mit dem gleichen Ion bereits bei einer Teilchenfluenz von $2,5 \times 10^6$ T / cm^2 gesetzt. Aus der erstellten Dosiseffektcurve (Abb. 4.14) ermittelt sich bei dieser Teilchenfluenz ein Überleben von 8%. Als überlebende Zellen werden dabei diejenigen bezeichnet, bei welchen sich der mitotische Tod nicht eingestellt hat. Reparatur wird allerdings auch von solchen Zellen erwartet, die sich zwar nicht mehr teilen, aber dennoch für einen begrenzten Zeitraum weiterleben können.

Mit diesem System wird daher eine Bestimmung von Doppelstrangbrüchen nach Applikation von Dosen innerhalb des Überlebensbereiches möglich. Die Integrität des Reparaturenzymapparates kann angenommen werden. Durch ionisierende Strahlung beschädigte Fragmente werden repariert und erreichen teilweise ihre ursprüngliche Fragmentlängengröße wieder. Eine Annäherung des Signals an das der unbestrahlten Kontrollen erfolgt. Das System ermöglicht damit die Untersuchung eines Reparaturprozesses in engerem Sinne. Es basiert auf der Detektion der durch Restriktion erzeugten DNA-Moleküle. Eine Verbindung ursprünglich nicht benachbarter, DSB-geschädigter Fragmente wird nicht als Reparatur nachgewiesen. Analyseverfahren, welche auf einer Bestimmung des veränderten Molekulargewichtes beruhen, können hier nicht differenzieren.

Der Nachweis der häufig vorkommenden repetitiven humanen Sequenzen sollte durch Einsatz steroidmarkierter DNA-Sonden erfolgen. Da im Verlauf der Experimente radioaktiv-markierte DNA-Sonden eingesetzt werden mußten, bietet sich als Alternative auch der Nachweis zweier 'single - copy' - Gene an. Bei Hybridisierung gegen humane DNA könnte die verwendete Sonde der schweren Kette des humanen β - Myosins dabei durch eine im Bereich größerer DNA-Fragmente erscheinende ergänzt werden.

Die Analyse zweier Banden unterschiedlicher Molekulargewichte kann Aufschluß darüber geben, ob die Induktion von Doppelstrangbrüchen proportional zur betrachteten Fragmentlänge erfolgt. Sie bieten den besonderen Vorteil der Präsentation eines internen Standards. Ein Vergleich der Intensitäten dieser Banden führt zur Bestimmung des Anteils restringierter und elektrophoretisch getrennter DNA. Die Absolutmenge der zu betrachtenden DNA läßt sich definieren.

Mit dem entwickelten System entfällt eine radioaktive Markierung der zu untersuchenden Zellen. Dies ist ein Vorteil sowohl gegenüber der neutralen Elution als auch der Sedimentationstechnik. Es erfolgt die eindeutige Bestimmung nur eines spezifischen Schadensereignisses. DNA-Einzelstrangbrüche behindern die Analyse nicht. DNA-Protein-Komplexe, welche die DNA-Mobilität behindern, fallen hier weniger stark ins Gewicht. Kontrollierte hydrodynamische Bedingungen führen zu einem deutlichen Vorteil gegenüber der neutralen Elution (Blöcher und Kunhi, 1990).

Durch diskontinuierliche Anwendung der Trennkräfte wird die Ausbildung von Migrations-Artefakten, wie im Falle der Sedimentation beobachtet, weitgehend vermieden. Eine kurze Trennstrecke erweist sich als ausreichend. Zeitintensive Analysen durch lange Sedimentationen und arbeitsaufwendige Techniken können umgangen werden.

Die elektrophoretische Elution beschädigter DNA durch Pulsfeldgelanalyse bietet sich als schnelles und empfindliches Verfahren zur Detektion von Doppelstrangbrüchen in hochmolekularer DNA an. Sie beruht auf der Bestimmung des aus der Geltasche extrahierten DNA-Anteils und ermöglicht die Analyse zahlreicher Proben nach Bestrahlung mit physiologischen Dosen. Der Nachweis beschädigter DNA erfolgt durch Fokussierung der Fragmente unterschiedlichster Molekulargewichte innerhalb einer Kompressionszone. Höchste Sensitivität dieses Verfahrens wird unter Elektrophoresebedingungen erreicht, unter welchen die Exclusionsgröße eluierter DNA-Fragmente maximal sowie die Bandenbreite der eluierten Zone minimal gehalten wird. Die durchschnittliche Fragmentlängengröße kann demnach nur abgeschätzt werden. Genaue Angaben zur Induktion von Doppelstrangbrüchen pro Zelle und pro Dosis sind mit diesem Verfahren nicht möglich. Die Induktion von Doppelstrangbrüchen in Abhängigkeit von der Fragmentlänge kann nicht ermittelt werden.

Die Gesamtmenge eluierbarer DNA hängt nicht nur von den Elektrophoresebedingungen sondern auch von der Aufarbeitung der Zellen ab (Blöcher und Kunhi, 1990). So wurde beobachtet, daß bei Zellkonzentrationen von mehr als 2×10^6 Zellen pro ml die Elutionsrate unabhängig von der applizierten Dosis ist. Hohe Zellkonzentrationen führen insbesondere bei Bestrahlung mit hohen Dosen zu einer Reduktion der DNA-Mobilität. Eine vollständige Trennung der in das Gel einwandernden DNA von der betreffenden Geltasche ist nicht mehr gegeben. Ferner verändert das Ausmaß des Proteinase K - Verdaus die Menge zu extrahierender DNA (Blöcher und Kunhi, 1990). Eigene Ergebnisse zeigten die Bedeutsamkeit der Trypsinbehandlung auf die Degradation der DNA durch endogene Nucleasen. Hiedurch wird der Einfluß sowohl der verwendeten Zelllinie als auch des spezifischen Zellzyklus-Stadiums auf den Anteil eluierbarer DNA deutlich. Für eine DNA-Analyse durch Gelelution ist der Erhalt undegradierter Kontroll-DNA unerlässlich. Bei Untersuchung restringierter DNA ist der Einfluß durch kontaminierende Nucleasen weniger bedeutsam. Die so erzeugten DNA-Fragmente sind deutlich größer sind als die durch Restriktion erhaltenen.

Ionisierende Strahlung führt zur Ausbildung von DNA-Protein-Vernetzungen, welche die Elution DSB-geschädigter DNA stark inhibieren und die Bestimmung erzeugter Doppelstrangbrüche erschweren. Im Falle der Bestrahlung mit beschleunigten schweren Ionen spielen kovalente Vernetzungen aufgrund der charakteristischen Bahnstruktur der Teilchen vermutlich eine wichtige Rolle. Es werden vermehrt korrelierte Schäden gesetzt (z.B. DSB mit benachbarter Vernetzung). Die Analyse restringierter DNA führt zu einer Reduktion der im Agaroseplug infolge kovalenter Vernetzung zurückgehaltenen Anteile.

Es wird deutlich, daß die Variabilität, welche sich durch den Einfluß dieser Faktoren auf die Gelelution ergibt, eingeschränkt werden kann, sofern die Bestimmung erzeugter Doppelstrangbrüche innerhalb des Anteils restringierter DNA erfolgt. Die Berücksichtigung eines internen Standards ist mit diesem System unbedingt erforderlich. Die bereits angesprochene Alternative einer Hybridisierung gegen 'single - copy' - Gene erweist sich von Vorteil.

Fragmente definierter Größe ermöglichen eine absolute Quantifizierung der erzeugten

Schäden und könnten zur Kalibrierung der elektrophoretischen Elution im alternierenden Feld herangezogen werden. Da die DNA-Analyse durch Hybridisierung von PFG-Blots zur Zeit noch sehr arbeitsintensiv ist und somit nur die Quantifizierung einiger Proben erfolgen kann, wäre eine Kombination beider Methoden durchaus sinnvoll.

Kapitel 6

Literatur

- Ager, D.D., Dewey, W.C., Gardiner, K., Harvey, W., Johnson, R.T. and Waldren C.A. (1990). Measurement of radiation - induced DNA double - strand breaks by pulsed - field gel electrophoresis. *Radiat. Res.* **122**, 181 - 187.
- Anand, A. (1986). Pulsed field electrophoresis: A technique for fractionating large DNA molecules. *TIG* **11**, 278 - 283.
- Angert, N. und Schmelzer, C. (1977). UNILAC, die Beschleunigeranlage für schwere Ionen der GSI. *Kerntechnik* **2**, 57 - 66.
- Aufderheide, E., Rink, H., Hieber, L. and Kraft, G. (1987). Heavy ion effects on cellular DNA : strand break induction and repair in cultured diploid lens epithelial cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **51**, 779 - 790.
- Blöcher, D. and Pohlit, W. (1982). DNA double - strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells at low doses of X - rays. II. Can cell death be attributed to double - strand breaks? *Int. J. Radiat. Biol.* **42**, 329 - 338.
- Blöcher, D., Einspänner, M. and Zajackowski, J. (1989). CHEF electrophoresis, a sensitive technique for the determination of DNA double - strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* **56**, 437 - 448.
- Blöcher, D. and Kunhi, M. (1990). DNA double - strand break analysis by CHEF electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* **58**, 23 - 24.
- Bradley, M.O. and Kohn, K.W. (1979). X - ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution. *Nucleic Acids Res.* **7**, 793 - 804.
- Bryant, P.E. (1984). Enzymatic restriction of mammalian cell DNA using *Pvu* II and *Bam* HI : evidence for the double - strand break origin of chromosomal aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.* **46**, 57 - 65.
- Bryant, P.E. (1985). Enzymatic restriction of mammalian cell DNA : evidence for double - strand breaks as potentially lethal lesions. *Int. J. Radiat. Biol.* **48**, 55 - 60.

- Bryant, P.E., Birch, D. and Jeggo, P.A. (1987). High chromosomal sensitivity of Chinese hamster xrs 5 cells to restriction endonuclease induced double - strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* **52**, 537 - 554.
- Carle, G.F., Frank, M. and Olson, M.V. (1986). Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* **232**, 65 - 68.
- Contopoulou, C.R., Cook, V.E. and Mortimer, R.K. (1987). Analysis of DNA double strand breakage and repair using orthogonal field alternation gel electrophoresis. *Yeast* **3**, 71 - 76.
- Corry, P.M. and Cole, A. (1973). Double - strand rejoining in mammalian cells. *Nature New Biology* **245**, 100 -101.
- Costa, N.A. and Bryant, P.E. (1988). Repair of single - strand and double - strand breaks in the Chinese hamster xrs 5 mutant cell line as determined by DNA unwinding. *Mutation Res.* **194**, 93 - 99.
- Darroudi, F., Natarajan, A.T., van der Schans, G.P. and van Loon, A.A.W.M. (1990). Biochemical and cytogenetical characterization of Chinese hamster ovary X - ray - sensitive mutant cells xrs - 5 and xrs - 6: VI. The correlation of DNA strand breaks and base damage to chromosomal aberrations and sister - chromatid exchanges induced by X - irradiation. *Mutation Res.* **235**, 119 - 127.
- Davis, L.G., Dibner, M.D. and Battey, J.F. (1986). *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Co., New York.
- Deininger, P.L., Douglas, J.J., Rubin, C.M., Friedmann, T. and Schmid, C.W. (1981). Base sequence studies of 300 nucleotide renatured repeated human DNA clones. *J. Mol. Biol.* **151**, 17 - 33.
- Evans H., Ricanati M. and Horng M. (1987). Deficiency in DNA repair in mouse lymphoma strain L5178y-s. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7562 - 7566.
- Fritz-Niggli, H., Schäppi-Büchi, C. and Schäppi, K. (1988). Qualitatively different induction of germ cell mutations by heavy ions. *Radiat. Environ. Biophys.* **27**, 133 - 141.
- Ganassi, Eh.E., Zaihkina, S.I. und Rozanova, O.M. (1986). Die Rolle verschiedener DNA - Läsionen bei der Formierung von Strahlenschädigungen der Chromosomen. *Radiobiologia* **26**, pp 616.
- Gardiner, K., Lass, W. and Patterson, D. (1986). Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed field gradient gelelectrophoresis. *Somat. Cell Molec. Genet.* **12**, 185 - 195.
- Gardiner, K. and Patterson, D. (1988). Transverse alternating electrophoresis. *Nature* **331**, 371 - 372.
- Gardiner, K., Watkins, P., Münke, M., Drabkin, H., Jones, C. and Patterson, D. (1988). Partial physical map of human chromosome 21. *Somat. Cell Molec. Genet.* **14**, 623 - 638.

- Gardiner, K. and Patterson, D. (1989). Transverse alternating field electrophoresis and applications to mammalian genome mapping. *Electrophoresis* **10**, 296 - 302.
- Heilmann, J. (1987). Schwerioneninduzierte DNA - Strangbrüche. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Hillen, W., Klein, R.D. and Wells, R.D. (1981). Preparation of milligram amounts of 21 deoxyribonucleic acid restriction fragments. *Biochemistry* **20**, 3748 - 3756.
- Ho, K.Y. (1975). Induction of DNA double - strand breaks by X - rays in a radiosensitive strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* **30**, 327 - 334.
- Hubert, F., Fleury, A. Rimbot, R., Gardes, D. (1980). Range and stopping power tables for 2,5 - 100 MeV/u heavy ions in solids. *Ann. Phys.* **5** (Supplement).
- Hutchinson F. (1980). On the measurement of DNA double - strand breaks by neutral elution. *Radiat. Res.* **120**, 182-186.
- Jeggo, P.A. and Kemp, L.M. (1983). X - ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell line : isolation and cross - sensitivity to other DNA damaging agents. *Mutation Res.* **112**, 313 - 327.
- Kampf, G. and Eichhorn, K. (1983). DNA strand breakage by different radiation qualities and relations to cell killing. *Stud. Biophys.* **93**, 17 - 26.
- Karsin, F. and Hutchinson, F. (1977). Repair of DNA double - strand breaks in *Escherichia coli* which requires rec A function in the the presence of a duplicate genome. *J. Molec. Biol.* **116**, 81 - 98.
- Kemp, L.M., Sedgwick, S.G. and Jeggo, P.A. (1984). X - ray - sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells defective in double - strand break rejoining. *Mutation Res.* **132**, 189 - 196.
- Kemp, L.M. and Jeggo, P.A. (1986). Radiation - induced chromosome damage in X - ray sensitive mutants (xrs) of the Chinese hamster ovary cell line. *Mutation Res.* **166**, 255 - 263.
- Koval T. and Kazmar E. (1987). Eluting solution composition affects DNA double-strand break analysis by filter elution. *Int. J. Radiat. Biol.* **54**, 739-748.
- Kraft, G. (1987). Radiobiological effects of very heavy ions: Inactivation , induction of chromosome aberrations and strand breaks. *Nuclear Science Applications* **3**, 1 - 28.
- Kraft - Weyrather, W., Kraft, G., Ritter, S., Scholz, M. and Stanton, J.A. (1989). The preparation of biological targets for heavy - ion experiments up to 20 MeV/u. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res.* **A282**, 22 - 27.
- Lai, E., Birren, B.W., Clark, S.M., Simon, M.I. and Hood, L. (1989). Pulsed field gel electrophoresis. *Biotechniques* **7**, 34 -42.
- Ledermann, W. (1984). Handbook of applicable mathematics. **VI, A**. John Wiley and Sons, Chichester.
- Lehmann, A.R. and Ormerod, M.G. (1970). Double - strand breaks in the DNA of a mammalian cell after X - irradiation. *Biochemica et Biophysica Acta* **217**, 268 - 277.

- Lehman, A.R. and Stevens, S. (1977). The production and repair of double - strand breaks in cells from normal humans and from patients with Ataxia Teleangiectatica. *Biochemica et Biophysica Acta* 474, 49 - 60.
- Levine, J.D. (1989). Low frequency restriction enzymes in pulsed field electrophoresis. *Biotechnology* 7, 1033 - 1036.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Natarajan, A.T., Obe, G., van Zeeland, A.A., Palitti, F., Meijers, M. and Verdegaaal - Immerzell, E.A.M. (1980). Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations : II. Utilisation of *Neurospora* endonuclease for the study of aberration production by X - rays in G1 and G2 stages of the cell cycle. *Mutation Res.* 69, 293 - 305.
- Natarajan, A.T. and Obe, G. (1984). Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma* 90, 120 - 127.
- Northcliffe L.C. and Schilling R.F. (1970). Range and stopping power tables for heavy ions, *Nucl. Dat. Tab.* 7, Nr. 3-4.
- Okayasu, R., Blöcher, D. and Iliakis, G. (1988). Variations through the cell cycle in the dose - response of DNA neutral filter elution in X - irradiated synchronous CHO - cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 53, 729 - 749.
- Okayasu, R. and Iliakis, G. (1989). Linear DNA elution dose response curves obtained in CHO cells with non - unwinding filter elution after appropriate selection of the lysis conditions. *Int. J. Radiat. Biol.* 55, 569 - 581.
- Papandrikopoulou, pers.comm., nach: Feinberg, A. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6 - 13
- Peak J.G., Blazek R. and Peak M.J. (1990). On the measurement of DNA double - strand breaks by neutral elution (letter to the editor) *Radiat. Res.* 122, 104-105.
- Puck, T.T. and Marcus, P.I. (1955). A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture : the use of X - irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 41, 432 - 437.
- Resnick, M.A. (1976). The repair of double - strand breaks in DNA : A model involving recombination. *J. Theor. Biol.* 59, 97 - 106.
- Ritter, M.A., Tobias, C.A. and Cleaver, J.A. (1977). High LET radiations induce a large proportion of non rejoining DNA breaks. *Nature* 266, 653 - 655.
- Roots, R., Yang, T.C., Craise, L., Blakely, E.A. and Tobias, C.A. (1979). Impaired repair capacity of DNA breaks induced in mammalian cells by accelerated heavy ions. *Radiat. Res.* 78, 38 - 49.
- Roots, R., Kraft, G. and Gosschalk, E. (1985). The formation of radiation induced DNA breaks: The ratio of double strand breaks to single strand breaks. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 11, 259 - 265.

- Roots, R., Holley, W., Chatterjee, A., Irizarry, M. and Kraft, G. (1990). The formation of strand breaks in DNA after high - LET irradiation: a comparison of data from *in vitro* and cellular systems. *Int. J. Radiat. Biol.* **58**, 55 - 69.
- Rubin, J.S., Joyner, A.L., Bernstein, A. and Whitmore, G.F. (1983). Molecular identification of a human DNA repair gene following DNA - mediated transfer. *Nature* **306**, 206 - 208.
- Rydberg, B. (1985). DNA strand breaks induced by low - energy heavy ions. *Int. J. Radiat. Biol.* **47**, 57 - 61.
- Stamato, T.D. and Denko, N. (1990). Asymmetric field inversion gel electrophoresis: a new method for detecting DNA double - strand breaks in mammalian cells. *Radiat. Res.* **121**, 196 - 205.
- Taucher - Scholz, G., Stanton, J.A., Schneider, M. and Kraft, G. (1990). Induction of DNA breaks in SV40 by heavy ions. *Adv. in Space Res.*, in press.
- Thompson, L.H., Salazark, E.P., Brookman, K.W., Collins, C.C., Stewart, S.A., Busch, D.B. and Weber, C.A. (1987). Recent progress with the DNA repair mutants of Chinese hamster ovary cells. *J. Cell Sci. Suppl.* **6**, 97 - 110.
- Westerveld, A., Hoeijmakers, M., van Duin, de Wit, J., Odijk, H., Pastink, A., Wood, R.D. and Bootsma, D. (1984). Molecular cloning of a human DNA repair gene. *Nature* **310**, 421 - 425.
- Winter, P. und Driesel, A.J. (1988). Auftrennung von DNA - Molekülen in Chromosomengröße durch Gelelektrophorese in alternierenden elektrischen Feldern. *BTF - Biotech - Forum* **5**, 108 - 114.

Anhang A

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AA	Acrylamid
A_{xyz}	Absorption bei xyz nm
$1A_{xyz}$ -E/ml	Diejenige Stoffmenge, die in 1 ml gelöst, eine Absorption von 1 bei xyz nm ergibt.
Amp	Ampicillin
amp^r	Ampicillinresistenzgen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BA	N,N,N',N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bq	Becquerel
Brij	Polyethylenglykolmonolaurylether
C	Cytosin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
cam^r	Chloramphenicolresistenzgen
CHEF	'Countour Clamped Homogeneous Electric Fields'
Ci	Curie ($3,7 \cdot 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde = $3,7 \cdot 10^{10}$ Bq)
Dig	Digoxigenin
Da	Dalton (g/mol)

DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfälle pro Minute
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
Doc	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESB	Einzelstrangbruch
F	Fluenz (Teilchen pro cm ²)
FKS	Fetales Kälber - Serum
FIGE	Feldinversionsgelelektrophorese
G	Guanin
g	Gramm
Glc	Glucose
Gy	Gray
h	Stunde
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin
kbp	1000 Basenpaare
kDal	1000 Dalton
l	Liter
LE	'low endosmotic'
LFRE	selten schneidende Restriktionsenzyme
LMP	'low melting point'
M	mol/l
Mbp	10 ⁶ Basenpaare
MEM	minimal essentielles Medium
MEME	minimal essentielles Medium (nach Eagle)
min	Minute
mA	Milli-Ampere
NaOAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsaz
NC	Nitrozellulose
OD	optische Dichte
OFAGE	Gelelektrophorese im orthogonal - alternierenden Feld
³² P	Phosphorisotop der relativen Masse 32
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	'phosphate buffered saline'

	(Phosphatpuffer)
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
PE	Koloniebildungsfähigkeit
PEG	Polyethylenglykol
PFG	Pulsfeldgel
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TAFE	Gelelektrophorese im transvers - alternierenden Feld
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
<i>tet^r</i>	Tetracyclinresistenzgen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units, Einheit der Enzymaktivität
UNILAC	Linearbeschleuniger
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
XC	Xylencyanol

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Biophysik der **Gesellschaft für Schwerionenforschung** unter der Leitung von Dr. G. Kraft in der Zeit vom 1.12.1989 bis 1.9.1990 durchgeführt.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.G. Gassen für die Betreuung dieser Diplomarbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine unterstützenden fachlichen Anregungen im Verlauf der Arbeit.

Frau Prof. Dr. U. Stewart danke ich für das große Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Kraft für die Überlassung des Themas dieser Diplomarbeit und seine intensive Unterstützung. Seine zahlreichen Ratschläge und großzügigen Hilfestellungen trugen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Für die guten Ideen und die Weitsichtigkeit bei der Themenstellung möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Dr. G. Taucher-Scholz bedanken. Ihre fachlichen Anleitungen, ihr persönliches Engagement und die intensive Betreuung sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit waren für mich besonders wertvoll.

Frau B. Stahlhacke und Herrn J. Heilmann danke ich für die große Hilfsbereitschaft sowie die praktischen Anregungen zur Durchführung der Autoradiographien.

Frau G. Otto bin ich für die große Hilfe bei der Herstellung der Fotos sehr dankbar.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung Biophysik für das besonders herzliche Arbeitsklima und die andauernde Unterstützung während dieser Arbeit.

Von Herzen danke ich meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten.

