

Nachweis einer Mismatch-Reparatur-Defizienz in L5178Y Tk^{+/-}-3.7.2C-Mauslymphomzellen

**Dissertation zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Dipl.- Biol. Katja Kampfinger
geboren in Ulm**

Würzburg, 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Erster Vorsitzender

Gutachter

Gutachter

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhalt

Publikationen	8
Nomenklatur	9
1 Einleitung	13
1.1 Der Mauslymphom-Test (Mouse Lymphoma Assay; MLA)	13
1.2 Mismatch-Reparatur (MMR)	14
1.2.1 MMR in <i>E. coli</i>	16
1.2.2 MMR in Eukaryoten	18
1.2.2.1 MMR-Proteine in Eukaryoten	18
1.2.2.2 Funktionelle Domänen von MutS-Homologen	18
1.2.2.3 Funktionelle Domänen von MutL-Homologen	19
1.2.2.4 Mechanismus der MMR in Eukaryoten	19
1.3 Auswirkungen einer MMR-Defizienz	22
1.4 MMR und alkylierende Agenzien	22
1.5 MMR-Defizienz am Beispiel des methylierenden Agenz MNNG	23
1.6 Bedeutung von Veränderungen für die Gentoxizitäts-Testung	25
1.7 Sind L5178Y-Mauslymphomzellen MMR-defizient?	25
1.8 Bedeutung einer möglichen MMR-Defizienz in L5178Y-Mauslymphomzellen	26
1.9 Zielsetzung	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Geräte	28
2.2 Material	29
2.2.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel	29
2.2.2 Enzyme	31
2.2.3 Medien	31
2.2.4 Kits	31
2.2.5 Marker	32
2.2.5.1 DNA-Marker	32
2.2.5.2 Proteinmarker	32
2.2.6 Vektoren	33
2.2.7 Antiseren	33
2.2.8 Oligonukleotidprimer	34
2.2.8.1 Primer für die Amplifizierung von cDNA-Fragmenten	34
2.2.8.2 Oligonukleotide zur Konstruktion des "small-hairpin"-Konstrukts <i>shhmlh1</i>	37
2.2.8.3 Primer zur Überprüfung des <i>shhmlh1</i> -Konstrukts	37

2.2.9	Plasmidkonstrukte	38
2.2.9.1	Konstrukte unter Verwendung des Vektors pGEM-T-Easy	38
2.2.9.2	<i>shhmlh1</i> -Konstrukt unter Verwendung des Vektors pRNATin-H1.2/Neo	41
2.2.10	Zelllinien	42
2.2.10.1	Murine Zelllinien	42
2.2.10.2	Humane Zelllinien	42
2.2.11	Mikroorganismen	43
2.2.11.1	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	43
2.2.12	Computerprogramme	43
2.2.12.1	Software	43
2.2.12.2	Server im Internet	43
2.3	Methoden	44
2.3.1	Bakterienanzucht	44
2.3.1.1	Anzucht von <i>E. coli</i> in Flüssigkulturen (Übernachtskulturen)	44
2.3.1.2	Anzucht von <i>E. coli</i> auf Agarplatten	44
2.3.1.3	Dauerkulturen	44
2.3.2	Zellkulturen	45
2.3.2.1	Suspensionszellen	45
2.3.2.2	Adhärente Zellen	45
2.3.2.3	Halbadhärente Zellen	46
2.3.2.4	Konservierung und Reaktivierung von Zellkulturen	46
2.3.2.5	Zellzahlbestimmung	46
2.3.3	Molekularbiologische Methoden	47
2.3.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen	47
2.3.3.2	Reverse Transkription von mRNA	47
2.3.3.3	Primerdesign	47
2.3.3.4	PCR-Amplifikation von cDNA	48
2.3.3.5	Anhängen eines 3'-terminalen Adenosins an „blunt-ended“ PCR-Produkte	49
2.3.3.6	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	49
2.3.3.7	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	50
2.3.3.8	Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren	50
2.3.3.8.1	Ligation von DNA-Fragmenten mit dem Vektor pGEM-T-Easy	50
2.3.3.8.2	Ligation von DNA-Fragmenten mit dem Vektor pRNATin-H1.2/Neo	50
2.3.3.9	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	51
2.3.3.10	Selektion der Bakterien	51
2.3.3.11	Kolonie-PCR	52
2.3.3.12	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	52

2.3.3.13	Ethanolpräzipitation von DNA	52
2.3.3.14	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	52
2.3.3.14.1	Restriktion mit EcoRI	52
2.3.3.14.2	Restriktion mit BamHI und HindIII	53
2.3.4	Analytische Methoden	53
2.3.4.1	Proteinbestimmung	53
2.3.4.2	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	53
2.3.5	Proteinbiochemische Methoden	54
2.3.5.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Zellkulturen	54
2.3.5.2	Erstellen von SDS-Protein-Proben	54
2.3.5.3	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	55
2.3.5.4	Bestimmung der molekularen Masse denaturierter Proteine	56
2.3.5.5	Western Blotting	56
2.3.6	Immunologische Methoden	57
2.3.6.1	Immundetektion der MMR-Proteine nach Western Blotting	57
2.3.6.2	Entfernung der Antikörper von Membranen: "Strippen"	57
2.3.7	Induktion von Genomschäden und Apoptosen	58
2.3.8	Comet Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese)	59
2.3.9	Mikrokern-Test	61
2.3.9.1	Mikrokern-Test und Zählung von Apoptosen	61
2.3.9.2	Mikrokern-Test und Zytokineseblock-Methode	63
2.3.10	Durchflusszytometrie	63
2.3.10.1	Proliferationsnachweis mittels „BrdU-Quenching“ im Durchflusszytometer	64
2.3.11	Sequenzierung von cDNA	65
2.3.12	„Down-Knocking“ von MLH1 durch RNA-Interferenz	66
2.3.12.1	Konstruktion des Vektors <i>shhmlh1</i>	67
3	Ergebnisse	71
3.1	Optimierung der Versuchsbedingungen für den Nachweis einer MMR-Defizienz	71
3.1.1	Colo205-Zellen	72
3.1.2	TK6-Zellen	74
3.1.3	HCT116-Zellen	75
3.1.4	L5178Y-Zellen	77
3.2	Nachweis der MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen	79
3.2.1	Nachweis der MMR-Defizienz mittels Mikrokern-Test	79
3.2.1.1	Colo205-Zellen	80
3.2.1.2	TK6-Zellen	82
3.2.1.3	HCT116-Zellen	83
3.2.1.4	L5178Y-Zellen	85

3.2.2	Nachweis der MMR-Defizienz mittels Mikrokern-Test mit Cytochalasin B	87
3.2.2.1	TK6-Zellen	88
3.2.2.2	HCT116-Zellen	89
3.2.2.3	L5178Y-Zellen	90
3.2.3	Nachweis der MMR-Defizienz in L5178Y mittels Comet Assay	91
3.2.3.1	TK6-Zellen	92
3.2.3.2	WTK1-Zellen	93
3.2.3.3	HCT116-Zellen	94
3.2.3.4	L5178Y-Zellen	95
3.3	Untersuchung der molekularen Ursache für die MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen	96
3.3.1	Untersuchung der molekularen Ursache der MMR-Defizienz auf Proteinebene	97
3.3.1.1	Expression des MLH1-Proteins in L5178Y-Zellen	97
3.3.1.2	Expression des MSH2-Proteins in L5178Y-Zellen	97
3.3.1.3	Expression des MSH6-Proteins in L5178Y-Zellen	98
3.3.2	Untersuchung der molekularen Ursache der MMR-Defizienz auf DNA-Ebene	99
3.3.2.1	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>msh2</i>	101
3.3.2.2	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>msh6</i>	103
3.3.2.3	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>pms1</i>	105
3.3.2.4	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>mlh3</i>	106
3.3.2.5	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>msh3</i>	108
3.3.2.6	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>mlh1</i>	110
3.3.2.7	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>pms2</i>	113
4	Diskussion	118
4.1	Optimierung der Versuchsbedingungen für den Nachweis einer MMR-Defizienz	118
4.1.1	Geeignete MNNG-Konzentration für Colo205-Zellen	120
4.1.2	Geeignete MNNG-Konzentration für TK6-Zellen	120
4.1.3	Geeignete MNNG-Konzentration für HCT116-Zellen	121
4.1.4	Geeignete MNNG-Konzentration für L5178Y-Zellen	121
4.2	Nachweis der MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen	122
4.2.1	Nachweis der MMR-Defizienz mittels Mikrokern-Test	122
4.2.2	Nachweis der MMR-Defizienz mittels Mikrokern-Test mit Cytochalasin B	123

4.2.2.1	Angleichung der Induktionsraten	123
4.2.2.2	Testen geringerer MNNG-Konzentrationen	124
4.2.3	Nachweis der MMR-Defizienz mittels Comet Assay	125
4.3	Untersuchung der molekularen Ursache für die MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen	127
4.3.1	Untersuchung der molekularen Ursache der MMR-Defizienz auf Proteinebene	127
4.3.2	Untersuchung der molekularen Ursache der MMR-Defizienz auf cDNA-Ebene	127
4.3.2.1	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>msh2</i> -cDNA	129
4.3.2.2	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>msh6</i> -cDNA	129
4.3.2.3	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>pms1</i> -cDNA	130
4.3.2.4	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>mlh3</i> -cDNA	130
4.3.2.5	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>msh3</i> -cDNA	131
4.3.2.6	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>mlh1</i> -cDNA	133
4.3.2.7	Mutationssuche in den codierenden Bereichen von <i>pms2</i> -cDNA	135
5	Zusammenfassung	140
6	Summary	142
7	Anhang	144
7.1	Erstellen isogenetischer Zellen mit unterschiedlichem MMR-Status	144
7.2	Konstruktion des Vektors	144
8	Referenzen	148
Lebenslauf		156
Ich danke		157
Ich erkläre		158

Publikationen

Journals

Vukicevic, V., Kampfinger K. and Stopper, H. (2004). Influence of altered apoptosis in human lymphoblastoid cell lines on micronucleus frequency. *Toxicology Letters* **147**, 187-195

Poster

45th DGPT's Spring Meeting, Mainz, March 09th. – 11th. 2004. Does a deficiency in mismatch repair influence the response to genomic damage in L5178Y mouse lymphoma cells? (K. Kampfinger, S. Scherer, H. Stopper)

8th. DNA-Repair-Meeting, Ulm, September 28th. – October 01st. 2004. Investigation of the mismatch-repair system of L5178Y mouse lymphoma cells. (K. Kampfinger, S. Scherer, H. Stopper)

21st. GUM Meeting, Würzburg, October 05th. – 08th. 2004. Efficiency of mismatch-repair influences the response to genotoxic agents in L5178Y mouse lymphoma cells. (K. Kampfinger, S. Scherer, H. Stopper)

13th. AEK/AIO Cancer Congress, Würzburg, March 13th. – 16th. 2005. Investigation of the L5178Y mouse lymphoma cell line concerning its mismatch-repair. (K. Kampfinger, H. Stopper)

Nomenklatur

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A.bidest	zweifach destilliertes Wasser
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure
BER	Basenexzisions-Reparatur
BN	binukleäre Zellen
Bp	Basenpaar
BSA	engl. bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
Bsp.	Beispiel
cDNA	engl. complementary DNA (komplementär-DNA)
Cyt.B	Cytochalasin B
dATP	Deoxyadenosin-Triphosphate
dNTP	Deoxyribonukleotid-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleinsäure)
DSB	engl. double strand break (Doppelstrangbruch)
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E _t	Elongationszeit
EtBr	Ethidiumbromid
Exo	Exonuklease
G418	G418 disulfate salt
GFP	engl. green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HNPPC	engl. hereditary non-polyposis colorectal cancer (erblicher nichtpolypöser Darmkrebs)
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
IgG	Immunglobulin G
IDL	engl. insertion/deletion loop (Insertions/Deletions-Schleufe)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
lacZ	Gen für die β-Galaktosidase
LB	Luria-Bertani

MCS	engl. multiple cloning site (Multiple Schnittstelle)
MGMT	engl. methylguanine DNA methyltransferase (Methylguanin-DNA-Methyltransferase)
min	Minuten
Mio.	Millionen
MK	Mikrokern
MMR	engl. mismatch repair (Fehlpaarungs-Reparatur)
MN	mononukläre Zellen
MNNG	<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -Nitro- <i>N</i> -Nitrosoguanidin
mRNA	engl. messenger RNA (Boten-RNA)
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MW	Molekulargewicht
NCBI	engl. National Center for Biotechnology Information
neg.	negativ
O ⁶ -BG	O ⁶ -Benzylguanin
O ⁶ -meG	O ⁶ -Methylguanin
OD	optische Dichte
ORF	engl. open reading frame (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PI	Propidiumiodid
Pol	Polymerase
pos.	positiv
RefSeq	Referenz Sequenz
RNA	engl. ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNA _i	RNA-Interferenz
RPA	engl. replicating binding protein A
rpm	engl. rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	engl. sodiumdodecylsulfate
siRNA	engl. short interfering RNA (kurze Interferenz-RNA)
s.o.	siehe oben
Ssb	engl. single strand binding protein
Tab.	Tabelle
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Temp.	Temperatur
TFT	Trifluorthymin
T _A	engl. annealing temperature (Anlagerungstemperatur)
TK	Thymidinkinase
T _m	engl. melting temperature (Schmelztemperatur)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

U	´Unit´ (Einheit für enzymatische Aktivität)
ü.N.	über Nacht
Verd.	Verdünnung
v/v	engl. ´volume per volume´ (Volumengehalt)
w/v	engl. ´weight per volume´ (Gewichtsprozent)
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

Bezeichnungen von Nukleinsäuresequenzen sind mit kleinen Buchstaben und kursiv gekennzeichnet, die von ihnen abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit großen Buchstaben und aufrechter Schrift.

Bezeichnung von Mutationen (T.Strachan, 1996)

Nukleotidsubstitutionen

Bsp.: 1162(G→A): Austausch von Guanin zu Adenin an Position 1162 der cDNA-Sequenz

Deletion/Insertion

Bsp.: nt409(insC): Insertion eines Cytidins nach der Nukleotidposition 409

Aminosäuresubstitution

Verwendung des Einbuchstabencodes: A, Alanin; C, Cystein; D, Asparaginsäure; E, Glutaminsäure; F, Phenylalanin; G, Glycin; H, Histidin; I, Isoleucin; K, Lysin; L, Leucin; M, Methionin; N, Asparagin; P, Prolin; Q, Glutamin; R, Arginin; S, Serin; T, Threonin; V, Valin; W, Tryptophan; Y, Tyrosin; X, Stopcodon.

Bsp.: R117H: Austausch von Arginin gegen Histidin an Aminosäureposition 117

Bsp.: G542X: Umwandlung des Glycincodons an Position 542 in ein Stopcodon

Aminosäuresymbole			Nukleotidsymbole	
A	Ala	Alanin	A	Adenosin
C	Cys	Cystein	C	Cytidin
D	Asp	Aspartat	G	Guanidin
E	Glu	Glutamat	T	Thymidin
F	Phe	Phenylalanin		
G	Gly	Glycin		
H	His	Histidin		

I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

Bei der toxikologischen Bewertung von umwelt- und arbeitsplatzrelevanten Noxen sowie im Rahmen von Anmelde- und Zulassungsverfahren von Chemikalien und Arzneimitteln nimmt die Bestimmung des gentoxischen Potentials eine zentrale Stellung ein. Zur Abschätzung des gentoxischen Potentials von Substanzen stehen eine Vielzahl etablierter Methoden zur Verfügung, die in der Routine- Gentoxizitätstestung Anwendung finden. Unter den *in-vitro*-Testsystemen, die in der Anfangsphase von Substanztestungen zum Tragen kommen, nimmt der Mauslymphom-Test (MLA, Mouse Lymphoma Assay) aufgrund seiner Fähigkeit, sowohl Genmutationen (Punktmutationen) als auch chromosomale Ereignisse (Deletionen, Translokationen, mitotische Rekombinationen/ Genkonversionen und Aneuploidy) aufzuzeigen (Sawyer et al., 1985; Sawyer et al., 1989; Applegate et al., 1990; Combes et al., 1995; Mitchell et al., 1997; Liechty et al., 1998), eine besondere Stellung ein.

1.1 Der Mauslymphom-Test (Mouse Lymphoma Assay; MLA)

L5178Y 3.7.2C *tk*^{+/-}-Mauslymphomzellen (in Folgenden: L5178Y) sind weltweit die am häufigsten eingesetzten Säugerzellen in der Routine-Gentoxizitätstestung und dienen als Grundlage für den sogenannten Mauslymphom-Test. Der Mauslymphom-Test wurde 1972 erstmals als *in-vitro*-Säugerzell-Genmutationstest beschrieben (Clive et al., 1972), und in den folgenden Jahren hinsichtlich seiner Durchführungsbedingungen optimiert (Clive, 1973; Clive et al., 1979). Er beruht auf einer Resistenz thymidinkinase-defizienter Zellen gegenüber des Pyrimidinanalogons Trifluorthymidin (TFT). In Zellen mit intakter Thymidinkinase (TK) führt Trifluorthymidin zu einer Hemmung des Zellstoffwechsels und damit zu einer Blockierung der Zellproliferation (Moore-Brown et al., 1981).

L5178Y-Mauslymphomzellen sind aufgrund einer Mutation in einem der Allele für Thymidinkinase heterozygot und eignen sich damit für die Gentoxizitätstestung mittels Trifluorthymidin (Moore et al., 1985; Applegate et al., 1990; Mitchell et al., 1997; Honma et al., 2001). Verlust der Heterozygotie durch die mutagene Wirkung von Testsubstanzen führt zum Verlust der Thymidinkinase und damit zur Proliferation der Zellen trotz TFT. Ein weiterer Vorteil von L5178Y-Mauslymphomzellen gegenüber

anderen Testsystemen besteht außerdem in ihrer Fähigkeit, auf Agar-Platten zu wachsen. Dieses ermöglicht, dass homozygote Zellen ($tk^{-/-}$ -Zellen) aufgrund ihrer Bildung von Kolonien auf trifluorthymidinhaltigen Platten von den heterozygoten $tk^{+/-}$ -Zellen unterschieden werden können. Dabei gibt die Zahl der Mutantenkolonien Aufschluss über die Gentoxizität der betreffenden Testsubstanz.

1.2 Mismatch-Reparatur (MMR)

Um die Integrität des Genoms zu gewährleisten, muss die DNA fehlerfrei von einer Generation zur nächsten weitergegeben werden. Fehler, die bei der Replikation, der homologen Rekombination oder durch äußere gentoxische Einwirkungen entstehen, müssen vor der Weitergabe an die Tochterzellen behoben werden. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Mismatch-Reparatur. Sie sorgt für die Erkennung und Korrektur fehlgepaarter Nukleotide, die entweder spontan entstehen oder der "Proofreading"-Funktion der Polymerase entgehen (Aquilina and Bignami, 2001). Zusätzlich eliminiert sie fehlende oder zusätzliche Nukleotide, sogenannte Insertions-Deletions-Schlaufen (Insertions-Deletions-Loops; IDLs), die während der Rekombination nicht-identischer Sequenzen oder durch ein "Verrutschen" der Polymerase, besonders während der Replikation repetitiver Sequenzen, hervorgehen (Umar et al., 1994). Außerdem führt sie zu einem Zellzyklusarrest, der den geschädigten Zellen die nötige Zeit für die Reparatur der Schäden zur Verfügung stellt. Bei irreparablen Schäden dagegen bewirkt ein intaktes MMR-System die Induktion von Apoptosen und damit die Eliminierung stark geschädigter Zellen (Ochs and Kaina, 2000; Meyers et al., 2004). Infolgedessen führt eine Störung der MMR zu einer Anhäufung von Mutationen innerhalb der Zellen und zum Überleben geschädigter Zellen im Organismus.

Kenntnisse über die MMR stammen überwiegend aus Untersuchungen an *E. coli*-Bakterien, in denen die daran beteiligten Proteine isoliert und charakterisiert wurden (Modrich and Lahue, 1996) (siehe Tab. 1). Eukaryotische MMR-Proteine konnten anschließend über Homologien zu den *E. coli*-MMR-Proteinen identifiziert werden (Buermeyer et al., 1999) (siehe Tab. 1). Der Prozess der MMR ist noch nicht in allen Teilen geklärt, kann aber in drei grundsätzliche Schritte unterteilt werden, in die sowohl spezifische MMR-Proteine als auch Proteine, die in anderen Prozessen der Zel-

le eine Rolle spielen, involviert sind (Schofield and Hsieh, 2003; Stojic et al., 2004; Kunkel and Erie, 2005):

- 1) Die Erkennung und Bindung der Fehlpaarungen oder der IDLs
- 2) Den Abbau der neu synthetisierten DNA, die den Fehler enthält
- 3) Die Resynthese des abgebauten DNA-Strangs

E. coli-Protein	Homologe in Säugern	Funktion
MutS	MSH2-MSH6 (MutS α)	erkennt einzelne Fehlpaarungen und IDLs von 1 bp (-4 bp in <i>E. coli</i>)
	MSH2-MSH3 (MutS β)	erkennt IDLs von 1-16 bp
MutL	MLH1-hPMS2 (MutL α)	verbindet die Schritte von Bindung an Fehlpaarung bis zur Neusynthese
	MLH1-hPMS1 (MutL β)	Funktion unbekannt
	MLH1-MLH3 (MutL γ)	vermutlich in Reparatur einer Untergruppe von IDLs involviert
MutH	keine	erkennt den neu synthetisierten Strang in <i>E. coli</i> und schneidet ihn an hemimethylierten GATC-Sequenzen
β -clamp	PCNA	interagiert mit MutS- und MutL-Homologen; rekrutiert MMR-Proteine zu Fehlpaarungen; Verstärkt die Bindungsspezifität von Msh2-Msh6; ist in Exzision und DNA-Synthese involviert
Helikase II	keine	ist in <i>E. coli</i> für die DNA-Entwindung verantwortlich
Exo I	Exo I	schneidet dsDNA
Exo X	(Rth1)	schneidet dsDNA
Rec J	3'Exo der Pol δ	schneidet ssDNA
Exo VII	3'Exo der Pol ϵ	schneidet ssDNA
DNA-Pol III	DNA-Pol δ	ist für Resynthese der DNA zuständig
SSB	RPA	ist in Exzision und Resynthese involviert; stabilisiert einzelsträngige DNA
DNA-Ligase	DNA-Ligase	verbindet die Lücke nach der DNA-Synthese

Tab. 1: MMR-Proteine und ihre Funktion. Gezeigt sind die MMR-Proteine aus *E. coli* und die Homologe in Säugern. Die Funktion der einzelnen MMR-Proteine ist kurz wiedergegeben.

1.2.1 MMR in *E. coli*

Das bisher bestuntersuchte Mismatch-Reparatur-System ist das methyl-gerichtete MutHLS-System in *E. coli* (Modrich, 1991; Kunkel and Erie, 2005). Durch dieses Reparatursystem können die meisten Fehlpaarungen und IDLs bis zu vier Nukleotiden erkannt und repariert werden. Proteine, die in die Mismatch-Reparatur involviert sind, sind in Tab. 1 aufgelistet, die grundlegenden Schritte der Mismatch-Reparatur in Abb. 1 dargestellt.

In *E. coli* werden Fehlpaarungen oder IDLs, die während zellulärer Prozesse oder durch äußere Einwirkung entstehen, durch das Homodimer MutS erkannt und gebunden. Die Bindung von ATP an MutS führt zu einer Konformationsänderung, die für die Interaktion von MutS mit MutL, einem weiteren Homodimer, verantwortlich gemacht wird. Die Hydrolyse von ATP führt anschließend zur Aktivierung von MutH durch MutS-MutL. MutH erkennt den transient methylierten Tochterstrang, schneidet diesen an hemimethylierten GATC-Sequenzen und stellt damit sicher, dass Fehler immer im neu synthetisierten Tochterstrang behoben werden (Modrich, 1991; Modrich and Lahue, 1996). Dieser Einschnitt, der bis zu tausend Basenpaaren weit entfernt von der Fehlpaarung liegen kann, dient der Helikase II als Eintrittspunkt zur Entwindung der DNA (Dao and Modrich, 1998; Mechanic et al., 2000). Je nachdem, ob die GATC-Sequenz mit dem "Nick" auf der 3'- oder 5'-Seite des Fehlers liegt, wird der Abschnitt von 5'-3'-Exonucleasen (RecJ und Exo VII) oder von 3'-5'-Exonucleasen (Exo I, Exo X, Exo VII) ausgeschnitten (Burdett et al., 2001). Die MMR ist demnach bidirektional (Cooper et al., 1993). Der resultierende Einzelstrang wird während der Resynthese des Tochterstrangs durch die Polymerase III durch Anlagerung von Ssb-Proteinen (single-strand binding proteins) stabilisiert. Nach abgeschlossener Synthese wird die verbleibende Lücke durch die DNA-Ligase verschlossen (Modrich and Lahue, 1996).

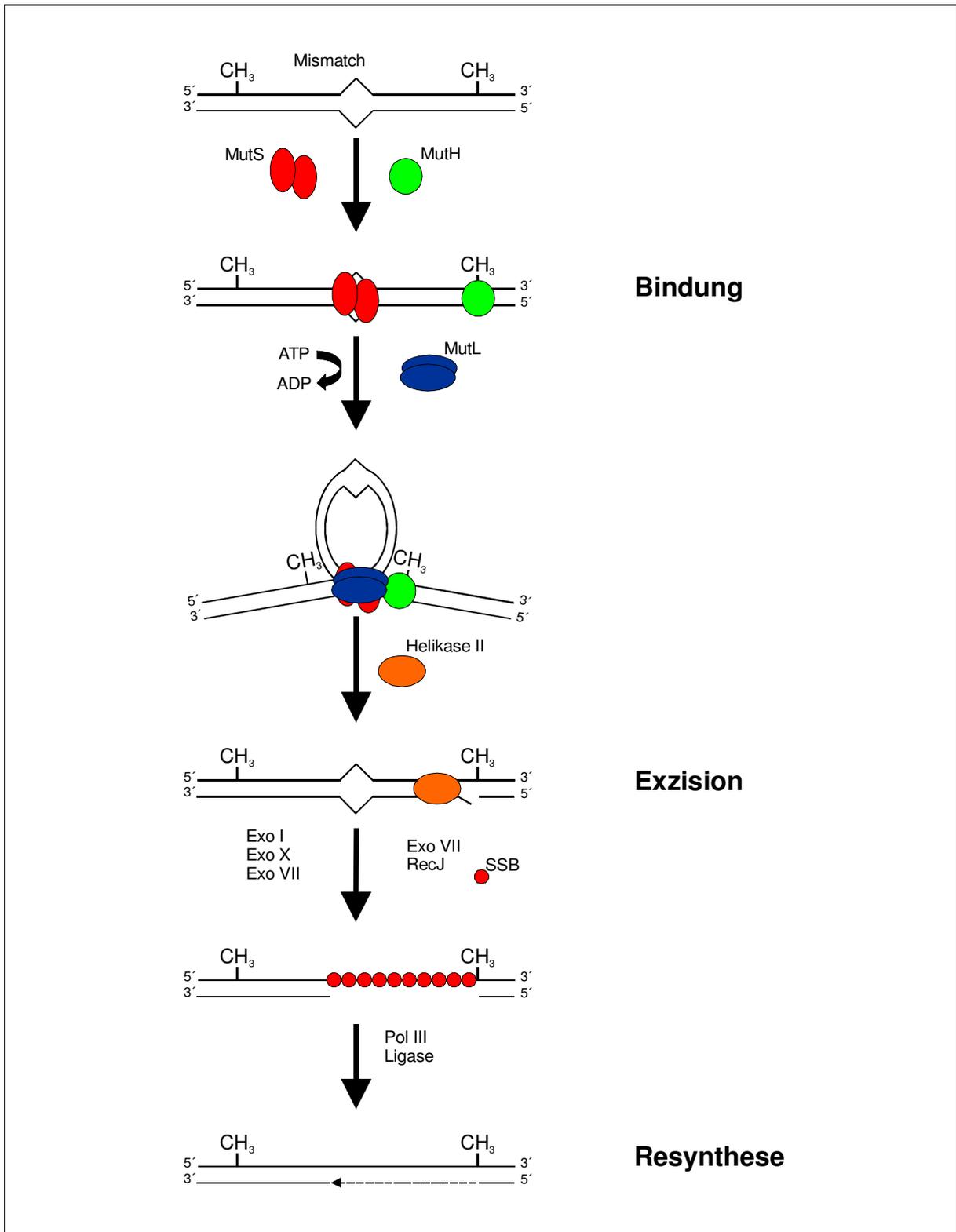


Abb. 1: Mechanismus der MMR in *E. coli*: Fehlpaarungen und/oder IDLs werden von MutS erkannt und gebunden. MutL wird rekrutiert und MutH aktiviert. Der Einschnitt der hemimethylierten GATC Sequenz durch MutH dient der Helikase II als Eintrittspunkt zur Entwindung der DNA. Je nachdem ob der Einschnitt auf der 3'- oder 5'-Seite des Fehlers lokalisiert ist, wird der Tochterstrang von einer 5'-3'- oder 3'-5'-Exonuklease ausgeschnitten. Der resultierende Einzelstrang wird während der Resynthese des Tochterstrangs durch die Polymerase III durch die Anlagerung von Ssb-Proteinen stabilisiert. Nach abgeschlossener Synthese wird die verbleibende Lücke durch die DNA-Ligase verschlossen.

1.2.2 MMR in Eukaryoten

1.2.2.1 MMR-Proteine in Eukaryoten

In Eukaryoten konnten bisher fünf Mismatch-Reparatur-Proteine identifiziert werden, die sicher in die Reparatur von Fehlpaarungen und sogenannten IDLs involviert sind. Die Bezeichnungen in dieser Arbeit beziehen sich auf MMR-Proteine in Säugern. Die MutS-Homologe MSH2, MSH3 und MSH6 agieren als Heterodimere (Kolodner and Marsischky, 1999), wobei MSH2 das zentrale Protein darstellt, das mit MSH6 den MutS α -Komplex, und mit MSH3 den MutS β -Komplex bildet (Drummond et al., 1995). MutS α (MSH2/MSH6) erkennt und bindet einzelne fehlgepaarte Basen und IDLs, die durch eine fehlende oder eine zusätzliche Base entstehen, während MutS β (MSH2/MSH3) mit IDLs mit einem bis zu 16 extrahelikalen Basen interagiert (Marsischky et al., 1996; Genschel et al., 1998; Guerrette et al., 1998; Umar et al., 1998; Edelmann et al., 2000).

MutL-Homologe werden momentan als „Vermittlerproteine“ angesehen, die die Erkennung und Bindung von Fehlpaarungen und IDLs mit den anschließenden Schritten der Reparatur verbinden. Bisher konnte nur für die MutL-Homologe MLH1 und PMS2 gezeigt werden, dass sie als Heterodimer MutL α (MLH1/PMS2) in der Reparatur einer Reihe von Fehlpaarungen eine Rolle spielen (Li and Modrich, 1995). Zwei weitere MutL-Homologe, PMS1 und MLH3, die ebenfalls mit MLH1 ein Heterodimer bilden, sind identifiziert, die Funktion dieser Komplexe bisher aber nicht geklärt. Während die Funktion für MutL β (MLH1/PMS1) gänzlich unbekannt ist (Raschle et al., 1999), wird vermutet, dass MutL γ (MLH1/MLH3) in die Reparatur von Fehlpaarungen und einzelner IDLs involviert ist (Lipkin et al., 2000; Cannavo et al., 2005) und eine Rolle bei der meiotischen Rekombination spielt (Kolas et al., 2005). Neben den für die MMR-spezifischen Proteinen (MutS- und MutL-Homologen) sind auch Proteine beteiligt, die in andere Prozesse der Zelle, wie Replikation, Reparatur oder Rekombination, involviert sind. Proteine, die in die MMR involviert sind und deren Funktion sind in Tab. 1 aufgelistet.

1.2.2.2 Funktionelle Domänen von MutS-Homologen

Für eine funktionierende MMR ist zum einen die Dimerisierung der MutS-Homologe zu Heterodimeren zum anderen die Bindung der DNA essentiell (Obmolova et al., 2000). Die Interaktionsdomänen zur Dimerisierung befinden sich sowohl im C- als

auch im N-terminalen Bereich. Eine Nukleotid-Bindestelle ist ebenfalls im C-Terminus lokalisiert (Guerrette et al., 1998). Für beide Mechanismen, Dimerisierung und DNA-Interaktion ist die ATP-Bindung und –hydrolyse von ausschlaggebender Bedeutung (Kariola et al., 2002).

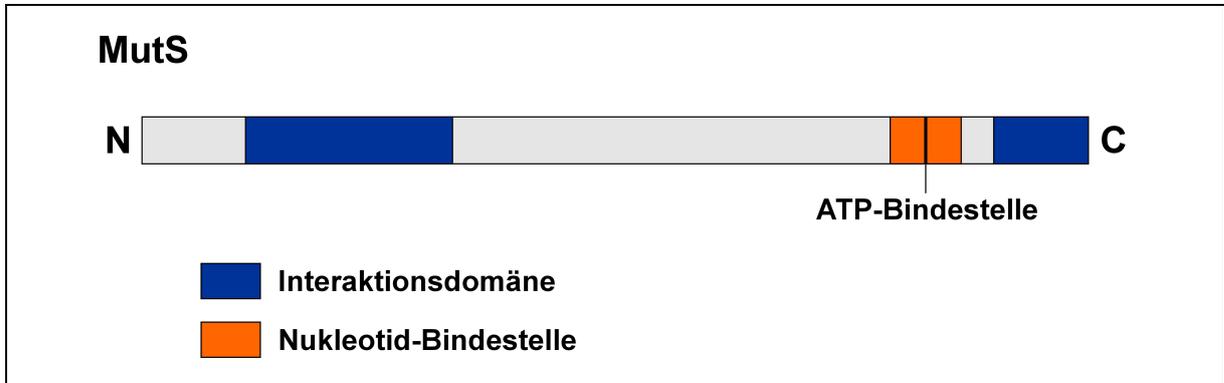


Abb. 2: Schematische Darstellung eines MutS- Homologos: Gezeigt sind die Interaktionsdomänen, die Nukleotid-Bindestelle sowie die in ihr lokalisierte ATP-Bindestelle.

1.2.2.3 Funktionelle Domänen von MutL-Homologen

Während der C-Terminus der MutL-Homologe für die Dimerisierung (Kondo et al., 2001; Wu et al., 2003) und die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich ist (Schmutte et al., 2001), beherbergt der N-Terminus sowohl ATPase aktive Stellen als auch einige Reste, die für die Interaktion mit DNA und anderen Proteinen essentiell sind (Guarne et al., 2001). Auch für die Funktion der MutL-Homologe ist die ATPase-Aktivität ausschlaggebend (Raschle et al., 2002; Tomer et al., 2002).

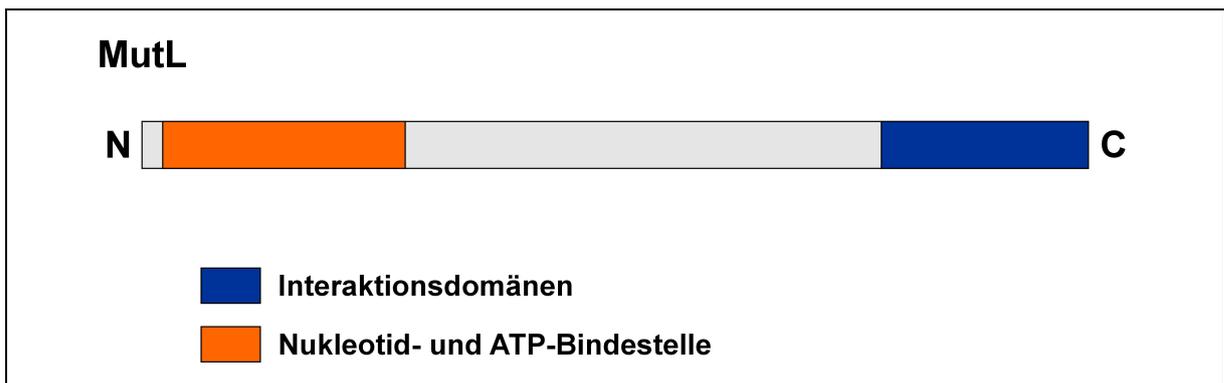


Abb. 3: Schematische Darstellung eines MutL- Homologos: Gezeigt ist die Interaktionsdomäne, die Nukleotid- und ATP-Bindestelle.

1.2.2.4 Mechanismus der MMR in Eukaryoten

Die Schritte der MMR in Eukaryoten sind in Abb. 4 dargestellt. Für die Erkennung und Bindung von Fehlpaarungen ist der Komplex MutS α (für IDLs MutS β) verantwortlich, der ATP-abhängig mit dem Fehler interagiert und anschließend MutL α , e-

benfalls ATP-abhängig, rekrutiert (Gu et al., 1998; Habraken et al., 1998). Eine für die MMR wichtige Voraussetzung ist sicherzustellen, dass Fehler im neu synthetisierten DNA-Strang und nicht fälschlicherweise im Elternstrang behoben werden. Das heißt, die Unterscheidung der beiden Stränge und die Direktion der Reparatur zum neu synthetisierten Tochterstrang muss gewährleistet sein. In *E. coli* wird diese Aufgabe von MutH übernommen, das aufgrund von Methylierungsunterschieden die neu synthetisierte DNA erkennt und an hemimethylierten GATC-Sequenzen einschneidet (Kunkel and Erie, 2005). Dieser Einschnitt stellt den Angriffspunkt für die Helikase II und Exonukleasen dar, wobei erstere die DNA an der Stelle entwindet und letztere die DNA-Sequenz mit dem Fehler ausschneidet (Tishkoff et al., 1997; Schmutte et al., 2001). In Eukaryoten wurde weder ein Homolog zu *E. coli*-MutH noch zur Helikase II gefunden. Der Mechanismus, wie die Unterscheidung der beiden Stränge in Eukaryoten stattfindet, ist bisher nicht geklärt. Lücken („gaps“) zwischen Okazaki-Fragmenten des „lagging“-Strangs oder das freie 3'-Ende des „leading“-Strangs werden als mögliche Unterscheidungsmerkmale diskutiert. Aber auch PCNA (Proliferating Cell Nuklear Antigen), ein Protein, das in der Replikation der DNA eine Rolle spielt und sowohl mit MutS- als auch mit MutL-Homologen interagiert (Umar et al., 1996; Clark et al., 2000; Flores-Rozas et al., 2000), könnte die Unterscheidung und damit die gerichtete Reparatur gewährleisten. Während der Replikation bindet PCNA die DNA, wobei es eine asymmetrische Struktur annimmt, durch die es möglicherweise in der Lage ist, MMR-Proteine zum neu synthetisierten Tochterstrang zu dirigieren. Der Abbau des Tochterstrangs mit der Fehlpaarung erfolgt durch die Aktivierung der Exonuklease I oder durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase δ und/oder ϵ . Der resultierende Einzelstrang wird durch die Anlagerung von RPA-Proteinen (replicating binding protein A) stabilisiert, während der Tochterstrang durch eine aphidicolin-sensitive Polymerase, wahrscheinlich Polymerase δ , resynthetisiert wird. Nach abgeschlossener Synthese wird die verbleibende Lücke durch die DNA-Ligase verschlossen.

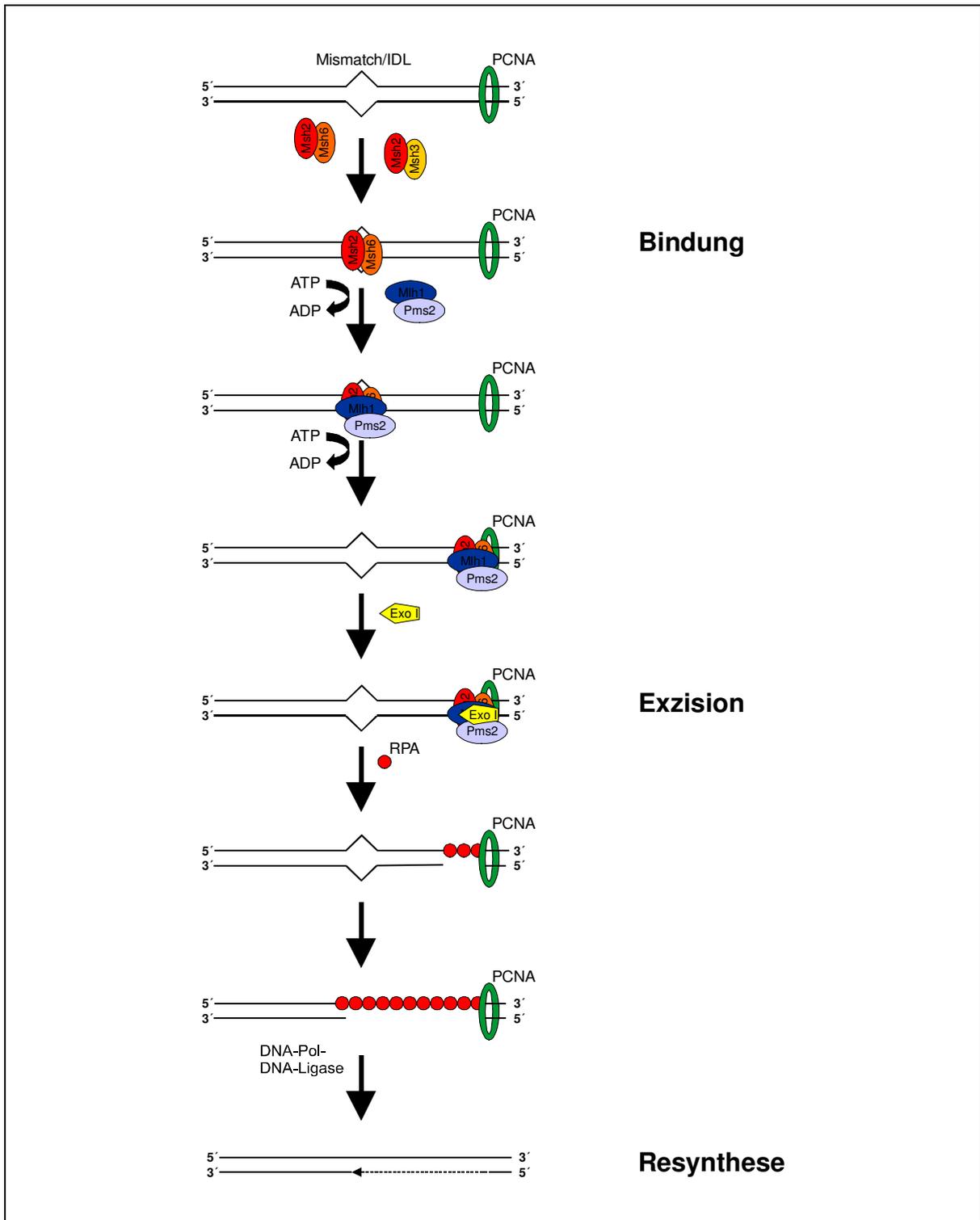


Abb. 4: Mechanismus der MMR in Eukaryoten: Fehlpaarungen und/oder IDLs werden von MutS α oder MutS β erkannt und gebunden. MutL α wird rekrutiert. PCNA ist ebenfalls beteiligt und ermöglicht wahrscheinlich die Unterscheidung der beiden Stränge. Der Abbau des Tochterstrangs erfolgt abhängig von der Lage des Fehlers durch die Aktivierung der Exonuklease I oder durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase δ und/oder ϵ . Der resultierende Einzelstrang wird durch die Anlagerung von RPA-Proteinen stabilisiert, während der Tochterstrang durch eine aphidicolin-sensitive Polymerase, wahrscheinlich Polymerase δ , resynthetisiert wird. Nach abgeschlossener Synthese wird die verbleibende Lücke durch die DNA-Ligase verschlossen.

1.3 Auswirkungen einer MMR-Defizienz

Funktionsverluste von MutS und/oder MutL-Homologen führen zu schwerwiegenden Konsequenzen für die betreffende Zelle und den Gesamtorganismus (Fedier and Fink, 2004). Fehlpaarungen sowie fehlende oder zusätzlich inserierte Basen, die zu Insertions-Deletions-Loops (IDLs) führen, können nicht mehr erkannt und repariert werden.

Vor allem Bereiche aus kurzen repetitiven Sequenzen, sogenannte Mikrosatelliten (MS), sind von einem „Verrutschen“ der Polymerase und den daraus hervorgehenden IDLs betroffen. Können diese nicht repariert werden, so führen sie zu einer starken Längenvariation dieser Sequenzen, der sogenannten Mikrosatelliteninstabilität (MSI) (Boyer et al., 1995; Umar and Kunkel, 1996; Buermeyer et al., 1999). Ein MMR-Funktionsverlust bewirkt außerdem, dass geschädigte Zellen nicht mehr arretiert und somit nicht mehr zuverlässig repariert werden können. Zudem sind MMR-defiziente Zellen nicht mehr in der Lage geschädigte Zellen durch MMR-abhängige Apoptosen zu eliminieren. Sie überleben trotz gravierender DNASchäden und akkumulieren diese. Typische Substanzen, auf die MMR-defiziente Zellen mit einer Akkumulation von Genomschäden reagieren, während MMR-profiziente Zellen in der Lage sind die Schäden durch Apoptose zu eliminieren, sind alkylierende Agenzien.

1.4 MMR und alkylierende Agenzien

Alkylierende Agenzien stellen eine Gruppe mutagener und kanzerogener Chemikalien dar, deren Wirkung stark vom MMR-Status der jeweiligen Zelle (Kat et al., 1993) und der Dosis (Stojic et al., 2005), der die Zelle ausgesetzt ist, abhängig ist. Neben einer Vielzahl von Veränderungen an der DNA (vor allem N⁷-Methylguanin und N³-Methyladenin), die überwiegend von der Basenexzisions-Reparatur (BER) behoben werden (Kaina et al., 2001), bewirken sie die Bildung von O⁶-Methylguanin (O⁶-meG), das für den zytotoxischen Effekt von Alkylantien verantwortlich gemacht wird (Bignami et al., 2000). O⁶-Methylguanin wird normalerweise effizient durch direkte Demethylierung durch das Enzym Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) eliminiert. Erst bei Verlust oder Überlastung der MGMT bleibt O⁶-Methylguanin in der DNA bestehen, um während der nächsten Synthesephase mit Thymin eine Fehlpaarung auszubilden. Diese Fehlpaarung ist Angriffspunkt für den MutS α -Komplex der

MMR. Durch die gerichtete Reparatur wird der neu synthetisierte Tochterstrang an der Stelle ausgeschnitten, bei der Resynthese aber wiederum Thymin mit O⁶-Methylguanin gepaart, da das methylierte Guanin im Elternstrang bestehen bleibt. Dieser Fehler kann durch MMR nicht behoben werden. Stattdessen führt ein intaktes MMR-System zu einer Induktion von Apoptosen und damit zur Eliminierung der Schäden (Hickman and Samson, 1999, 2004). Der Mechanismus, wie alkylierende Substanzen MMR-abhängig Apoptosen auslösen, ist nicht geklärt. Es wird vermutet, dass der fortwährende Versuch der MMR, den Fehler zu korrigieren, das dauernde Ausschneiden und Resynthetisieren, zu sekundären Läsionen führt, die dann direkt für die Apoptoseinduktion verantwortlich sind (Ceccotti et al., 1996; Kaina et al., 1997). Es scheint, dass Doppelstrangbrüche (DSBs) diese sekundären Läsionen darstellen, die für die Initiierung der Apoptosen sorgen.

Neben der Induktion von Apoptosen kann in MMR-profizienten Zellen nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien außerdem ein Arrest der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus beobachtet werden (Aquilina et al., 1999; Cejka et al., 2003).

1.5 MMR-Defizienz am Beispiel des methylierenden Agens MNNG

Zellen mit einer MMR-Defizienz zeigen eine sogenannte Alkylierungstoleranz (Bignami et al., 2000). Das heißt, sie sind aufgrund ausbleibender Apoptosen resistent gegenüber des zytotoxischen Effekts alkylierender Substanzen (Karran, 2001; Kaina and Christmann, 2002). Werden solche Zellen mit dem alkylierenden Agens N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) behandelt, führt das zur Bildung von O⁶-Methylguanin. Dieses O⁶-Methylguanin verbleibt in der DNA, wenn keine funktionelle MGMT vorhanden, diese überlastet oder durch einen MGMT-Inhibitor (O⁶-Benzylguanin) blockiert ist. Während der Synthesephase bildet O⁶-Methylguanin mit Thymin eine Fehlpaarung aus, die Angriffspunkt für die MMR ist. Abhängig vom MMR-Status führt der Eingriff der MMR nach MNNG-Behandlung daher zur Induktion von Apoptosen und damit zur Eliminierung der Schäden oder zum Überleben geschädigter Zellen. Abb. 5 zeigt die unterschiedlichen Effekte MMR-profizienter und -defizienter Zellen nach MNNG-Behandlung.

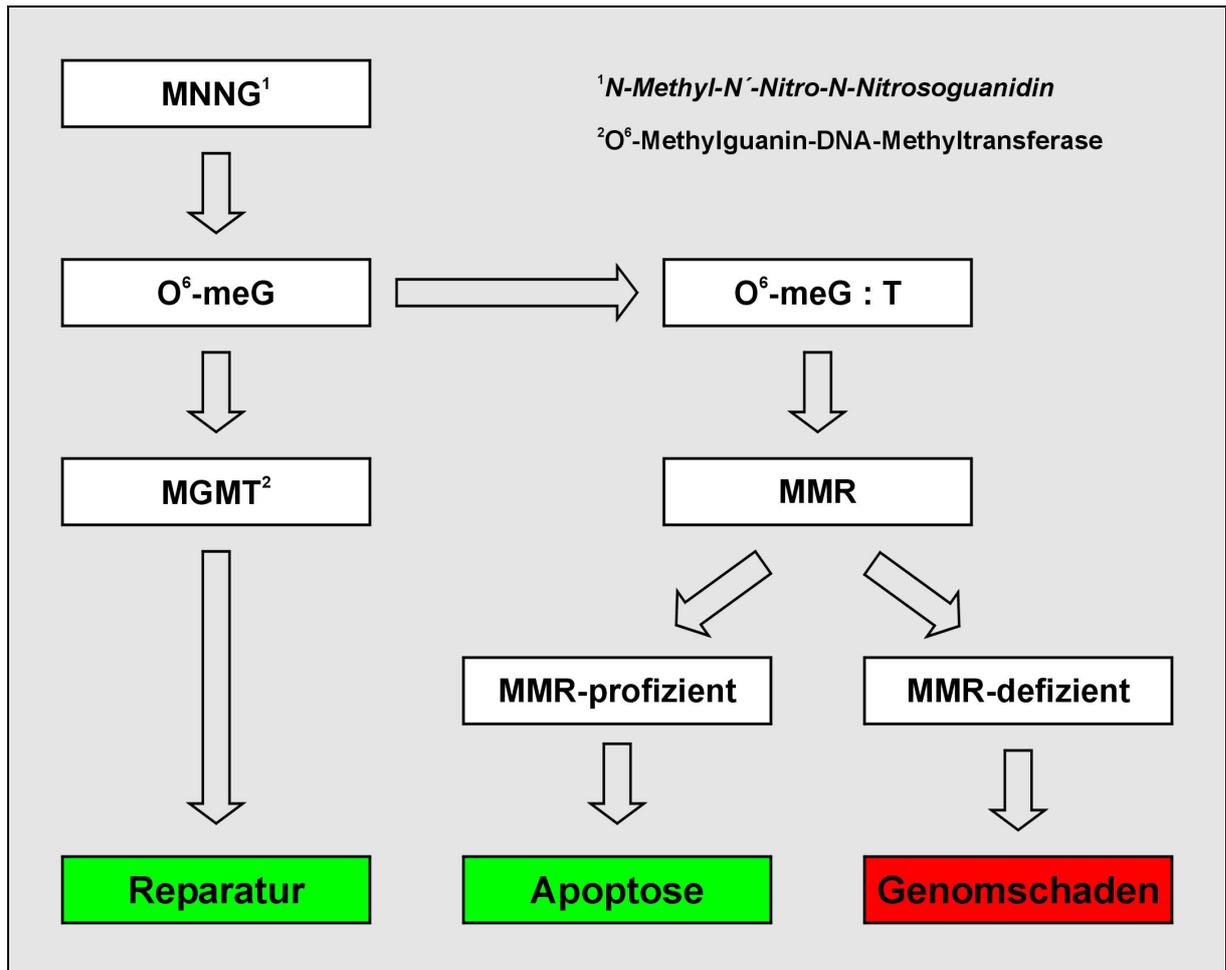


Abb. 5: Reaktionen von MMR-profizienten und –defizienten Zellen auf MNNG: MNNG führt zur Bildung von O⁶-Methylguanin (O⁶-meG), das normalerweise effizient von der Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) eliminiert wird. Ist die MGMT in ihrer Funktion gestört oder überlastet, bleibt O⁶-meG in der DNA bestehen und führt in der folgenden Synthesephase zu einer Fehlpaarung. In MMR-profizienten Zellen wird diese Fehlpaarung durch das MMR-System erkannt und ausgeschnitten. Während der Resynthese wird aber wiederum die falsche Base eingesetzt, da das methylierte Guanin im Elternstrang bestehen bleibt. Das führt zu wiederholten Zyklen von Exzision und Resynthese, ohne dass der Fehler behoben werden kann. Es resultieren sekundäre Läsionen, wahrscheinlich Doppelstrangbrüche, die die Induktion von Apoptosen und damit die Eliminierung der geschädigten Zellen bewirken. MMR-defiziente Zellen dagegen sind nicht in der Lage die geschädigten Zellen durch Apoptosen zu eliminieren. Sie überleben trotz gravierender Genomschäden.

1.6 Bedeutung von Veränderungen für die Gentoxizitäts-Testung

Zelllinien, die zur Testung potentiell gentoxischer Substanzen zum Einsatz kommen, müssen in der Regel mehrere Fähigkeiten vereinen. Sie müssen in der Lage sein, unbegrenzt zu proliferieren, um fortwährend in Kultur gehalten werden zu können und sie müssen bestimmte Mutationen aufweisen, die für die Testung nutzbar gemacht werden können, wie zum Beispiel die Mutation in einem der Thymidinkinase-Allele in L5178Y-Zellen. Außerdem sollten sie eine Stabilität der Spontanmutationshäufigkeit zeigen. Neben den für die Testung erwünschten Veränderungen, tragen solche aus Tumoren isolierte Zellen aber meist auch unerwünschte Veränderungen, die die Testergebnisse beeinflussen können. Das heißt, Testzellen reagieren auf Substanzen unter Umständen anders als die ungeschädigten Primärzellen im Organismus, für die das gentoxische Potential des Agens eigentlich ermittelt werden soll. Die Abschätzung des Verhaltens der Testzellen im Vergleich zu unveränderten Zellen auf bestimmte Reagenzien ist deshalb von großer Bedeutung. Die Kenntnis des genetischen Hintergrunds ist außerdem von Vorteil, wenn Agenzien getestet werden sollen, die in Zellen mit bestimmten Veränderungen eine spezifische Reaktion hervorrufen, wie zum Beispiel alkylierende Agenzien in MMR-defizienten Zellen. Es kann dann eine Testzelllinie gewählt werden, die diese Veränderung nicht trägt und das Verhalten unveränderter Zellen im Organismus besser widerspiegelt.

1.7 Sind L5178Y-Mauslymphomzellen MMR-defizient?

Die Frage nach einer potentiellen MMR-Defizienz in L5178Y-Mauslymphomzellen wurde durch die im Vergleich zu anderen in der Mutagenitätstestung gebräuchlichen Zelllinien abweichende Reaktion dieser Zellen aufgeworfen. Besonders die Exposition mit alkylierenden Substanzen zeigt eine starke Diskrepanz der zellulären Antwort dieser Zellen zu der anderer Testzelllinien. Während die meisten Zellen unter dem Einfluss von Alkylantien mit einer starken Apoptoseinduktion reagieren, akkumulieren L5178Y-Zellen Genomschäden.

Dieses Phänomen der Induktion von Genomschäden bei gleichzeitigem Fehlen von Apoptosen unter Einwirkung alkylierender Agenzien ist charakteristisch für Zellen, die in ihrer Mismatch-Reparatur gestört sind (Bignami et al., 2000). Diese Erkenntnis

fürte zu der Vermutung, dass L5178Y-Mauslymphomzellen MMR-defizient sein könnten.

1.8 Bedeutung einer möglichen MMR-Defizienz in L5178Y-Mauslymphomzellen

Im Falle einer MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen muss unter Exposition mit bestimmten Agenzien mit einer stark abweichenden Reaktion im Vergleich zu unveränderten Zellen des Organismus oder anderen Testzelllinien gerechnet werden. Das Verhalten der L5178Y-Zellen würde nicht die tatsächliche Reaktion von ungeschädigten Zellen widerspiegeln, sondern im Falle von Alkylantien, einen Genomschaden anzeigen, der in ungeschädigten Zellen des Organismus nicht entsteht. Die MMR-Defizienz und deren Auswirkung auf Behandlung mit alkylierenden Agenzien muss bei der Interpretation solcher Testergebnisse miteinbezogen werden, um das wirkliche gentoxische Potential solcher Substanzen abschätzen zu können. Für weitere Testungen gleicher und ähnlicher Agenzien kann außerdem die Verwendung einer anderen, besser geeigneten Testzelllinie in Erwägung gezogen werden.

1.9 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, einen potentiellen Funktionsverlust der MMR in L5178Y-Mauslymphomzellen nachzuweisen sowie die molekulare Ursache für einen gefundenen Funktionsverlust zu klären. Für den Nachweis einer MMR-Störung sollen die zellulären Antworten von L5178Y-Mauslymphomzellen mit denen MMR-profizienter und -defizienten Zellen verglichen werden. Als gentoxisches Agenz, das in Zellen mit unterschiedlichem MMR-Status unterschiedliche Reaktionen auslöst, soll MNNG eingesetzt werden. Zu Beginn der Arbeit werden MNNG-Konzentrationen ermittelt, die in den unterschiedlichen Zelllinien MMR-abhängige Reaktionen hervorrufen ohne die Proliferation der Zellen zu beeinträchtigen. Die zellulären Antworten auf MNNG sollen durch unterschiedliche Endpunkte, Mikrokern-Test und Comet-Assay, nachgewiesen werden. Mögliche Expressionsunterschiede der wichtigsten MMR-Proteine in Mauslymphomzellen im Vergleich zu MMR-profizienten und -defizienten Kontrollzellen sollen untersucht werden. Sequenzierungen der kodierenden Bereiche der be-

kannten MMR-Gene sollen Aufschluss über die molekulare Grundlage eines gefundenen MMR-Defekts geben.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Autoklav	Melag Autoklav 23, Berlin, BRD
Coulter Counter	Z1 bzw. Z2, Coulter Electronics, UK
Durchflusszytometer	BD FACS LSR, 2 Laser, H0108, Becton Dickinson, Heidelberg, BRD
Elektrophoreseapparaturen	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA Gießstände: Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster Glasplatten 10 x 8 cm Aluminiumplatten 10 x 10 cm Spacer 0,75 mm Elektrophoreseapparatur: SE 250 Mighty Small II Electrophoresis Unit Horizontale Elektrophoreseapparaturen für Agarosegele: wurden in der institutseigenen Werkstatt in folgenden Größen gefertigt: 10,5cm x 8cm 13,5cm x 12cm Horizontale Elektrophoreseapparaturen für Comet Assay-Präparate: wurden ebenfalls in der institutseigenen Werkstatt in folgenden Größen gefertigt: 13,5cm x 13,5cm 21cm x 13,5cm
Geldokumentationsanlage	GelDoc2000, BioRad, München, BRD
Heizplatte	Gerhardt H22 electronic, Bonn, BRD
Inkubator	Typ B, 5060 EK-CO ₂ , Heraeus, BRD
Kamera	Cohn-High Performance, CCD Camera, INTAS
Magnetleiste	Dynal, Hamburg, BRD
Mikroskope	Nikon, Labphot 2 A/L, Nikon, BRD (Floureszenzmikroskop) Zeiss (Lichtmikroskop) Leitz, Labovert (Lichtmikroskop)
Mikrowelle	Phillips M630
Netzgeräte	Model 1000/500 Power Supply, Bio Rad Model 200/2,0 Power Supply, Bio Rad Electrophoresis Power Supply EPS 3500, Pharmacia D.C. Volts, KM66, Kyoritsu
pH-Meter	pH-Meter pH 526, Multical WTW, Weilheim, BRD

Photometer	Hitachi, U-2000, Spektralphotometer 100 µl Quarz-Küvette (QS 10.00), Schichtdicke 10 mm, Zentrum 8,5 mm
Pipetten	Gilson, Frankreich Eppendorf, Hamburg, BRD
Printer für Geldokumentationen	Mitsubishi P90
Schüttler	KL2, Edmund Büchler
Sterile Werkbänke	Gruppo Flow , Gelaire BH 26, Flow Laboratories, BRD AntairBSK, BSK4, Antair
Sterilisator	Heraeus, BRD
Thermocycler	PTC-100 (Programmable Thermal Controller), MJ Research, USA PTC-200 (Peltier Thermal Cyler), MJ Research, USA
Vortex	Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waagen	Mettler Toledo, PB602, Schweiz (Grobwaage) Sartorius, BP 210D, Göttingen, BRD(Feinwaage)
Wasserbäder	Kottermann, BRD GFL, Typ 1012, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel GFL, Typ 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel Heizgerät: WTE var 3185, Harteinstein, Würzburg, BRD
Western Blotting Apparatur	Trans Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, BioRad, München, BRD
Zentrifugen	Hettich Universal /K2S Laborfuge 400e, Heraeus Spectralfuge 24D, Abimed (Tischzentrifuge) Universal 16R, Hettich (Kühlzentrifuge)
Zytozentrifuge	Cytospin 3, Shandon, UK

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

6-Thioguanin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
6-well Platten (Nunclon)	Nunc Products, Roskilde, Dänemark
Acridine Orange	Serva, Heidelberg, BRD
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, BRD
Agarose MEE0	Roth, Karlsruhe, BRD
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe, BRD
Agarose Type VII	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
APS	Serva, Heidelberg, BRD

Bacto Agar	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Michigan, USA
BrdU	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
BSA (albumine from bovine serum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
BSA (Albumine Standard)	Pierce, Rockford, USA
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
dATP	MBI Fermentas, St. Leon Roth, BRD
Deckgläser (24x24 mm und 24x60mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, BRD
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
dNTP Mix	MBI Fermentas, St. Leon Roth, BRD
ECL Detektionssystem (Western Blotting Luminol Reagent)	Santa Cruz, Heidelberg, BRD
Entwickler (Kodak processing chemicals for autoradiography films, GBX developer/ replenisher)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Essigsäure	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., BRD
Ethanol	AppliChem, Darmstadt, BRD
Ethidiumbromid	BioRad, München, BRD
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
FACS Röhrchen (BD Falcon)	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Falcons	Sarstedt, Nümbrecht, BRD
fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin, BRD
Filterspitzen (20 µl; 200 µl; 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, BRD
Filterspitzen (20µl; 200µl; 1000µl)	Peqlab, Erlangen, BRD
Fixierer (Kodak processing chemicals for autoradiography films, GBX fixer/ replenisher)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
G418 (G418 disulfate salt)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Glycerin (Glycerol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt, BRD
HEPES 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., BRD
Hoechst 33256	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Insulinspritzen, Micro-Fine 12,7 mm	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Isopropanol (2-Propanol)	AppliChem, Darmstadt, BRD
Isoton II Diluent	Beckam Coulter, Krefeld, BRD
Kryoröhrchen	Greiner, Solingn-Wald, BRD
L-Glutamin (L-Glutamine 200mM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Magermilchpulver	Heirler, Radolfzell, BRD
Mannitol (D-Mannitol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Mercaptoethanol, (2-Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Methanol absolut	AppliChem, Darmstadt, BRD
MNNG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
N,N'-Dimethylformamid	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., BRD
Na-Azid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
NaCl	AppliChem, Darmstadt, BRD
NaOH	AppliChem, Darmstadt, BRD
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Nitrocellulosemembran (Protran Nitrocellulose Transfer Membrane)	Schleicher & Schuell, Dassel, BRD
Nondidet-P40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
O6- Benzylguanin (O6- Benzylguanine)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Objekträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen, BRD
Objekträger Super Frost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg, BRD
PCR-Wasser	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Penicillin-Streptomycin (10x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Pepton from Casein	Fluka BioChemica, Buchs SG, Schweiz
Pferdeserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Probenpuffer (6x loading dye)	MBI Fermentas, St. Leon Roth, BRD

Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Röntgenfilme, (Hyperfilm ECL)	Amersham, Freiburg, BRD
Saccharose	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., BRD
SDS	Roth, Karlsruhe, BRD
Sterilfilter FP30/0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel, BRD
TEMED	Roth, Karlsruhe, BRD
Tetracyclin (Tetracycline hydrochloride)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Transfektionsreagenz (Lipofectamine 2000)	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Tris	Roth, Karlsruhe, BRD
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Trypsin-EDTA Lösung 10x (Trypsin-EDTA solution from porcine pancreas Cell Culture Tested)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
Whatman 3 mm-Papier	Whatman, Maidstone, UK
X-Gal	Roth, Karlsruhe, BRD
Zellkulturflaschen (25cm ² ; und 75cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, BRD

2.2.2 Enzyme

BamH1 Restriktionsendonuklease und zugehöriges Puffersystem	MBI Fermentas, St. Leon Roth, BRD
Deep Vent DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt, BRD
EcoRI Restriktionsendonuklease und zugehöriges Puffersystem	Boehringer, Mannheim, BRD
HindIII Restriktionsendonuklease und zugehöriges Puffersystem	MBI Fermentas, St. Leon Roth, BRD
Readymix RedTaq PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
RedTaq DNA Polymerase mit 10x Reaktionspuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
RNAse	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD
T4-DNA Ligase	Promega, Mannheim, BRD
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD

2.2.3 Medien

Gibco Dulbecco`s Mod. Eagle Medium, Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
RPMI 1640 Phenolrot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, BRD

2.2.4 Kits

Bio-Rad Protein Assay	BioRad, München, BRD
Dyna Beads (CELLlection Pan Mouse IgG Kit)	Dynal, Hamburg, BRD
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas, St. Leon Roth, BRD
DNA Gel Extraction Kit	Millipore Corporation, Bedford, USA
pGEM-T-Easy Vector System	Promega, Mannheim, BRD
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden, BRD
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden, BRD
MinElute Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden, BRD

2.2.5 Marker

2.2.5.1 DNA-Marker

100bp DNA Ladder
GeneRuler 100bp Ladder Plus

New England Biolabs, Frankfurt, BRD
MBI Fermentas, St. Leon Roth, BRD

2.2.5.2 Proteinmarker

Prestained Protein Molecular Weight Marker

MBI Fermentas, St. Leon Roth, BRD

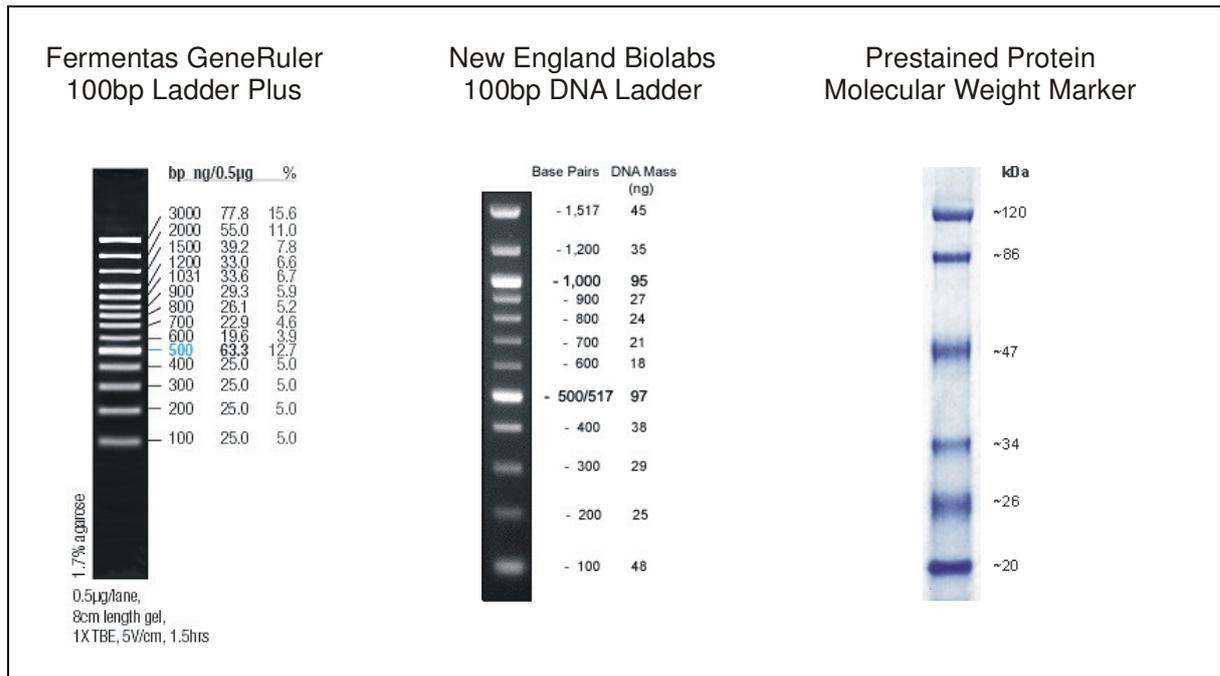


Abb. 6: Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten DNA- und Proteinmarker: Gezeigt sind die DNA-Marker „GeneRuler 1000bp Ladder Plus“ von Fermentas (links) und „1000bp DNA Ladder“ von New England Biolabs (mitte) sowie der Proteinmarker „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ von Fermentas (rechts).

2.2.6 Vektoren

Vektor	Resistenz	Marker	Referenz, Bezugsquelle
pGEM-T-Easy	Ampr	lacZ'	(Zhou et al., 1995) Promega, Mannheim, BRD
pRNATin-H1.2/Neo	Ampr, Neor	cGFP	(van de Wetering et al., 2003) GeneScript, Scotch Plains, USA

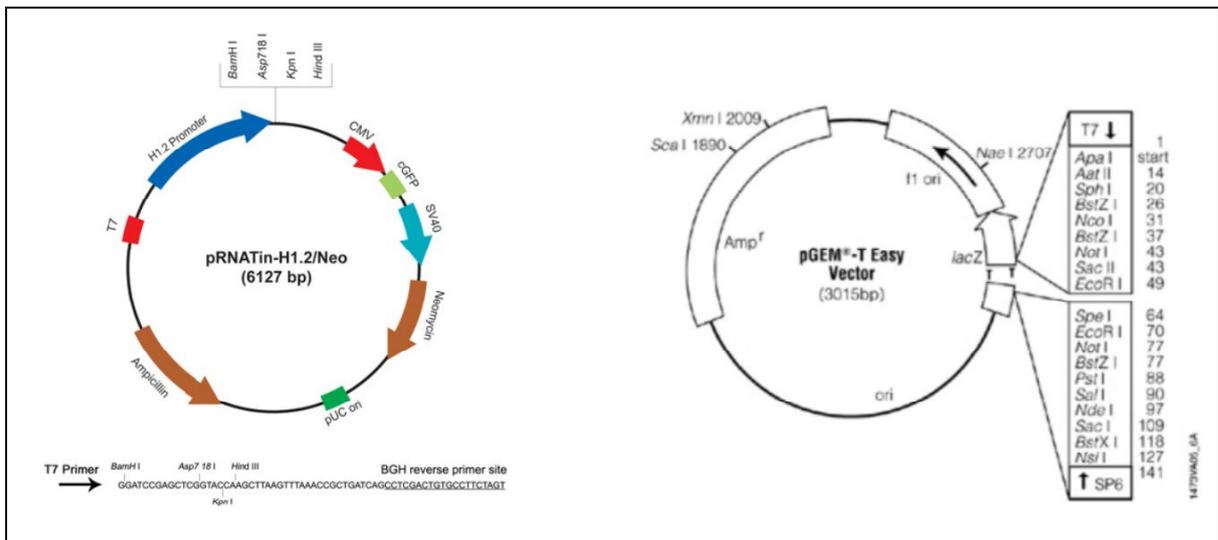


Abb. 7: Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren: Gezeigt ist der Vektor pGEM-T-Easy von Promega (rechts) und der induzierbare Vektor pRNATin-H1.2/Neo der Firma GeneScript (links).

2.2.7 Antiseren

Antikörper	Charge	Anwendung	Bezugsquelle
Anti-MLH1 (Ab-2), Human (Rabbit)	D05940-13	1:500; 4 °C; ü.N.	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts., BRD
Anti-MSH2		1:500; 4 °C; ü.N	Dr. Stefan Scherer, Albert-Einstein-College, New York, USA
Anti-MSH6/GTBP		1:500; 4 °C; ü. N.	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
Anti-PMS2 (Ab-1), Human, Mouse	D02922-11	1:100; 1h; RT	Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach, BRD
Anti-PMS2	012402A	1:500; 1h; RT	Imgenex, San Diego, USA
Anti- α -Tubulin FITC conjugate	015K4849	1:5000; 1h; RT	Sigma, Taufkirchen, BRD
goat-anti-mouse-IgG-HRP	I2704	1:3333; 1h; RT	Santa Cruz, Heidelberg, BRD
goat-anti-rabbit-IgG-HRP	H302	1:3333; 1h; RT	Santa Cruz, Heidelberg, BRD

2.2.8 Oligonukleotidprimer

2.2.8.1 Primer für die Amplifizierung von cDNA-Fragmenten

Die für die Amplifizierung von cDNA verwendeten Oligonukleotidprimer wurden auf Grundlage der bei NCBI veröffentlichten cDNA-Referenzsequenzen konstruiert und von MWG Biotech, Ebersberg, BRD synthetisiert.

Referenzsequenzen: MLH1: NM_026810
 MLH3: XM_484162
 MSH2: NM_008628
 MSH3: NM_010829
 MSH6: NM_010830
 PMS1: NM_153556
 PMS2: NM_008886

<u>verwendete Oligonukleotidprimer</u>	<u>GC-Anteil in %</u>	<u>T_m in °C</u>
<i>mlh1</i>		
<i>mlh1A_for</i> 5'-GCT CGA GTG ATT GGC TGA CGG G- 3'	63,6	65,8
<i>mlh1A_rev</i> 5'-CCT GGA GGA ATT GGA GCC CAG C- 3'	63,6	65,8
<i>mlh1B_for</i> 5'CCA ATG CCA CAA CCG TGG AC- 3	60,0	61,4
<i>mlh1B_rev</i> 5'-CCA AGG CCC ACT GAG GAT TC-3'	60,0	61,4
<i>mlh1C_for</i> 5'-GGA GAC TTC AGA CAC AGC CCA G- 3'	59,1	64,0
<i>mlh1C_rev</i> 5'-CCA CTT CCA GGG CTT TGA CGT G- 3'	59,1	64,0
<i>mlh1D_for</i> 5'-AAG AAA GCG GAG ATG CTT GCA G- 3'	50,0	64,0
<i>mlh1D_rev</i> 5' -ATT TGC AGC CAA TCC ACA GGT G- 3'	50,0	64,0

<u>verwendete Oligonukleotidprimer</u>	<u>GC-Anteil in %</u>	<u>T_m in °C</u>
<i>mlh3</i>		
<i>mlh3A_for</i> 5'-TGG TCG GTG AGA GTT GAT GG- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3A_rev</i> 5'-AGC TTC TAC CCT CTG CCG AA- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3B_for</i> 5'-TTC GGC AGA GGG TAG AAG CT- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3B_rev</i> 5'-TCT TCT GAC ACC CTC GGT TC- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3C_for</i> 5'-GAA CCG AGG GTG TCA GAA GA- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3C_rev</i> 5'-CAG GTT TGT TCT CTG TCC CG- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3D_for</i> 5'-CGG GAC AGA GAA CAA ACC TG- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3D_for2</i> 5'-AAT CCA GTC AAC CGC CCA AC- 3'	55,0	59,4

<i>mlh3D_rev</i> 5'-CTC TGT GGC AGA ATC TGC CA- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3D_rev2</i> 5'-ACA GGG GAA CAG CAA AGG AG- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3E_for</i> 5'-TTC TGC CAC AGA GGA TGG TC- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3E_rev</i> 5'-AGC AGC AGC ATC CAC AGC AT- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3F_for</i> 5'-ATG CTG TGG ATG CTG CTG CT- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3F_rev</i> 5'-GCA GCT CCA CTT GTT CTC GA- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3G_for</i> 5'-TCG AGA ACA AGT GGA GCT GC- 3'	55,0	59,4
<i>mlh3G_rev</i> 5'-CAA TAG CTG CGC CCC TCA AA- 3'	55,0	59,4

verwendete Oligonukleotidprimer	GC-Anteil in %	T_m in °C
<i>msh2</i>		
<i>msh2A_for</i> 5'-GTT GGT GTG GAG CGG CTC GGA A-3'	63,6	65,8
<i>msh2A_rev</i> 5'-GAG CGG CTG CTT GAT CCA CTG G-3'	63,6	65,8
<i>msh2B_for</i> 5'-TCA GTC TCT GGC CGC ATT ATT G-3'	50,0	60,3
<i>msh2B_rev</i> 5'-CCG ACT CGA GCA AGG ATG CAA T-3'	54,5	62,1
<i>msh2C_for</i> 5'-TAC TCA TGG CCC AAA TCG GGT G-3'	54,5	62,1
<i>msh2C_rev</i> 5'-CAT AGT GCT CAC AGT TGC CCG T-3'	54,5	62,1

verwendete Oligonukleotidprimer	GC-Anteil in %	T_m in °C
<i>msh3</i>		
<i>msh3_for</i> 5'-TGT TTC CCA CAC TAG CTG GC- 3'	55,0	59,4
<i>msh3_for3</i> 5'-TGT CAC ACT TGT TCA GGG- 3'	50,0	53,7
<i>msh3_rev2</i> 5'-GGT GGC TCT TTG GAT GAG CA- 3'	55,0	59,4
<i>msh3_rev3</i> 5'-AAC CTG ACA TTG GTG GCT- 3'	50,0	53,7
<i>msh3_reva</i> 5'-GGG TAG GTA TGC TTG CAG TC- 3'	55,0	59,4
<i>msh3_for a</i> 5'-GAC TGC AAG CAT ACC TAC CC- 3'	55,0	59,4

verwendete Oligonukleotidprimer	GC-Anteil in %	T_m in °C
<i>msh6</i>		
<i>msh6_H</i> 5'-ACA GTG GGT ATA ACA GCC TG- 3'	50,0	57,3
<i>msh6H_rev3</i> 5'-ATC CGT TAA TCA AGG CCA GC- 3'	50,0	57,3
<i>msh6A_for</i> 5'-GCG CGG TGG ATG CGA TCC TT- 3'	65,0	63,5
<i>msh6A_rev</i> 5'-GCT GTC CCC AAC TCC ACT GC- 3'	65,0	63,5
<i>msh6A2_for</i> 5'-CGA TCC TTG TAG GCG CTC GG- 3'	65,0	63,5
<i>msh6A_for3</i> 5'-GCA CCT TGT ACA GCT TCT TC- 3'	50,0	57,3
<i>msh6B_for</i> 5'-ACT CAG AGC AAT GCA ACG TG- 3'	50,0	57,3

<i>msh6B_rev 5'-TTC TGC ACC AAG GAA TCC GA- 3'</i>	50,0	57,3
<i>msh6C_for 5'-CAG GCT CAG CCA AAC GAG CA- 3'</i>	60,0	61,4
<i>msh6C_rev 5'-CAC CAG AGG CAG CAC TGT AC- 3'</i>	60,0	61,4
<i>msh6D_for 5'-TCG GAT TCC TTG GTG CAG AA- 3'</i>	50,0	57,3
<i>msh6D_rev 5'-AGA GGT CTG CAA CTT CAG TG- 3'</i>	50,0	57,3
<i>msh6E_for 5'-GTA GAG TGC TGC CTC TGG TG- 3'</i>	60,0	61,4
<i>msh6E_rev 5'-CGG TCT TCC GAG CCT TCT CA- 3'</i>	60,0	61,4
<i>msh6F_for 5'-CAC TGA AGT TGC AGA CCT CT- 3'</i>	50,0	57,3
<i>msh6F_rev 5'-ACA CTC TGT GAA CTG GTG TG- 3'</i>	50,0	57,3
<i>msh6G_for 5'-TGA GAA GGC TCG GAA GAC CG- 3'</i>	60,0	61,4
<i>msh6G_rev 5'-CCG CAT TGG CTA TCG CTG TC- 3'</i>	60,0	61,4
<i>msh6H_for 5'-CAC ACC AGT TGA CAG AGT GT- 3'</i>	50,0	57,3
<i>msh6H_rev 5'-ACA GCC TGA AAG TGT ATG CA- 3'</i>	45,0	55,3

<u>verwendete Oligonukleotidprimer</u>	<u>GC-Anteil in %</u>	<u>T_m in °C</u>
<i>pms1</i>		
<i>pms1-A for 5'-AAG GAC GTC CAG CGA AGT AG-3'</i>	55,0	59,4
<i>pms1-A rev 5'-CAT CAG GTT TCA GGA CAC CG- 3'</i>	55,0	59,4
<i>pms1-B for 5'-CGG TGT CCT GAA ACC TGA TG- 3'</i>	55,0	59,4
<i>pms1-B rev 5'-TGT AGT GGG TAG TGG TCC GT- 3'</i>	55,0	59,4
<i>pms1-C for 5'-ACG GAC CAC TAC CCA CTA CA-3'</i>	55,0	59,4
<i>pms1-C rev 5'-TAG GCT GTA AGC CGT CCA GA- 3'</i>	55,0	59,4
<i>pms1-D for 5'-TCT GGA CGG CTT ACA GCC TA- 3'</i>	55,0	59,4
<i>pms1-D rev 5'-GCT TCC TCC ACT CTG TAT GG- 3'</i>	55,0	59,4
<i>pms1-E for 5'-CCA TAC AGA GTG GAG GAA GC- 3'</i>	55,0	59,4
<i>pms1-E rev 5'-AAT GGG CGG CCA TGA ACA CA- 3'</i>	55,0	59,4

<u>verwendete Oligonukleotidprimer</u>	<u>GC-Anteil in %</u>	<u>T_m in °C</u>
<i>pms2</i>		
<i>pms2A_for 5'-GAA TTC CGG TGA AGG TCC TG-3'</i>	55,0	59,4
<i>Pms2a_for 5'-CAG AAT GTG CTA AGG CCA TC-3'</i>	50,0	57,3
<i>pms2A_for2 5'-CCT GAG TAT CAT TGG AGG AG-3'</i>	50,0	57,3
<i>pms2A_for3 5'-GTG AAG GTC CTG AAG AAT-3'</i>	44,4	51,4
<i>pms2A_rev 5'-ACT GCC TGT CTG TTG CAC TC-3'</i>	55,0	59,4
<i>pms2A_rev2 5'-TGC TCA GGC CGT ACT CTT CA-3'</i>	55,0	59,4
<i>pms2A_rev3 5'-TGA CTG TGG TTC CTT TAG-3'</i>	44,4	51,4

<i>pms2B_for</i> 5'-GAA GCT CTG AGC TCT CTG TG-3'	55,0	59,4
<i>pms2B_rev</i> 5'-CCG TGT CAG TTC AGC AGT CT-3'	55,0	59,4
<i>pms2C_for2</i> 5'-GAT AAC TCT CCT TCA CTG-3'	44,4	51,4
<i>pms2C_rev2</i> 5'-TTA TGG CTA CAT CGA CCT-3'	44,4	51,4
<i>pms2C_for1</i> 5'-GAG TGC AAC AGA CAG GCA GT-3'	55,0	59,4
<i>pms2c_for</i> 5'-GAG GTC TTA CAG GCG TAC TG-3'	55,0	59,4
<i>pms2C_rev1</i> 5'-TGG CTA CAT CGA CCT CAG CT-3'	55,0	59,4
<i>pms2D_for</i> 5'-AGC TGA GGT CGA TGT AGC CA-3'	55,0	59,4
<i>pms2D_rev</i> 5'-CAT GAA TGT GGC TCG GAG TG-3'	55,0	59,4

2.2.8.2 Oligonukleotide zur Konstruktion des "small-hairpin"-Konstrukts *shhmlh1*

Zur Erstellung des "small-hairpin"-Konstrukts *shhMLH1* wurden die Oligonukleotidprimer *shhmlh1(1)* und *shhmlh1(2)* (Luo et al., 2004) bei GeneScript, Scotch Plains, USA synthetisiert.

<i>shhmlh1(1)</i> 5'-GATCCGGTTCACTACTAGTAAACTTTCAAGAGAAGTTTACTAGTAGTGAACCTTTTTTGAAA-3'
<i>shhmlh1(2)</i> 5'-AGCTTTTCCAAAAAGGTTCACTACTAGTAAACTTCTCTTGAAAGTTTACTAGTAGTGAACCG-3'

2.2.8.3 Primer zur Überprüfung des *shhmlh1*-Konstrukts

Die zur Überprüfung des *shhMLH1*-Konstrukts nötigen Primer *pRNA_for* und *pRNA_rev* wurden unter Verwendung der *pRNATin-H1.2/Neo*-Sequenz gewählt und von MWG-Biotech, Ebersberg, BRD synthetisiert.

<u>verwendete Oligonukleotidprimer</u>	<u>GC-Anteil in %</u>	<u>T_m in °C</u>
<i>pRNA_for</i> 5'-TCT GCT TAG GGT TAG GCG-3'	55,6	56,0
<i>pRNA_rev</i> 5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'	55,6	56,0

2.2.9 Plasmidkonstrukte

2.2.9.1 Konstrukte unter Verwendung des Vektors pGEM-T-Easy

Falls nicht anders angegeben, wurde zur Amplifizierung der anteiligen Fragmente die Deep Vent Polymerase (Fermentas) verwendet. Die jeweiligen Annealingtemperaturen (T_A) und Elongationszeiten (E_t) für die unterschiedlichen Fragmente sind angegeben. Die Amplifizierungen wurden unter folgenden PCR-Bedingungen durchgeführt:

- 95°C 1 min
- 95°C 1 min
- x°C 1 min T_A
- 72°C x min E_t
- 72°C 10 min
- 30 Zyklen (wenn nicht anders angegeben)

<u>Bezeichnung</u>	<u>Anteiliges Fragment und Oligonukleotidprimer</u>	<u>PCR-Bedingungen</u>
<i>mlh1</i>		
<i>mlh1A</i>	<i>mlh1</i> bp 1-1061 <i>mlh1A_for/mlh1A_rev</i>	T_A 65°C, E_t 1 min
<i>mlh1B</i>	<i>mlh1</i> bp 661-1671 <i>mlh1B_for/mlh1B_rev</i>	T_A 57/60°C, E_t 1 min
<i>mlh1C</i>	<i>mlh1</i> bp 1403-2192 <i>mlh1C_for/mlh1C_rev</i>	T_A 64°C, E_t 1 min
<i>mlh1D</i>	<i>mlh1</i> bp 1899-2487 <i>mlh1D_for/mlh1D_rev</i>	T_A 57°C, E_t 1 min

<u>Bezeichnung</u>	<u>Anteiliges Fragment und Oligonukleotidprimer</u>	<u>PCR-Bedingungen</u>
<i>mlh3</i>		
<i>mlh3A</i>	<i>mlh3</i> bp 29-656 <i>mlh3A_for/mlh3A_rev</i>	T_A 59°C, E_t 1 min
<i>mlh3B</i>	<i>mlh3</i> bp 637-1552 <i>mlh3B_for/mlh3B_rev</i>	T_A 50°C, E_t 1 min Taq-Polymerase, 35 Zyklen
<i>mlh3C</i>	<i>mlh3</i> bp 1533-2199	T_A 59°C, E_t 1 min

	<i>mlh3C_for/mlh3C_rev</i>	
<i>mlh3D</i>	<i>mlh3 bp 2179-3032</i> <i>mlh3D_for2/mlh3D_rev2</i>	T _A 45°C, E _t 1 min Taq-Polymerase, 35 Zyklen
<i>mlh3E</i>	<i>mlh3E bp 2930-3500</i> <i>mlh3E_for/mlh3E_rev</i>	T _A 59°C, E _t 1 min 35 Zyklen
<i>mlh3F</i>	<i>mlh3 bp 3481-4122</i> <i>mlh3F_for/mlh3F_rev</i>	T _A 59°C, E _t 1 min 35 Zyklen
<i>mlh3G</i>	<i>mlh3 bp 4103-4740</i> <i>mlh3G_for/mlh3G_rev</i>	T _A 59°C, E _t 1 min 35 Zyklen
<i>mlh3EF</i>	<i>mlh3 bp 2930-4122</i> <i>mlh3E_for/mlh3F_rev</i>	T _A 59°C, E _t 1 min 35 Zyklen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Anteiliges Fragment und Oligonukleotidprimer</u>	<u>PCR-Bedingungen</u>
<i>msh2</i>		
<i>msh2A</i>	<i>msh2 bp 18-1089</i> <i>msh2A_for/msh2A_rev</i>	T _A 61°C, E _t 1 min
<i>msh2B</i>	<i>msh2 bp 1008-2177</i> <i>msh2B_for/msh2B_rev</i>	T _A 60°C, E _t 1 min
<i>msh2C</i>	<i>msh2 bp 2096-3023</i> <i>msh2C_for/msh2C_rev</i>	T _A 60°C, E _t 1 min

<u>Bezeichnung</u>	<u>Anteiliges Fragment und Oligonukleotidprimer</u>	<u>PCR-Bedingungen</u>
<i>msh3</i>		
<i>msh3A</i>	<i>msh3 bp 188-1309</i> <i>msh3_for/msh3_rev2</i>	T _A 50°C, E _t 1 min, 30 sec Taq-Polymerase
<i>msh3B</i>	<i>msh3 bp 188-1320</i> <i>msh3_for/msh3_rev3</i>	T _A 50°C, E _t 1 min, 30 sec Taq-Polymerase
<i>msh3C</i>	<i>msh3 bp 820-1309</i> <i>msh3_fora/msh3_rev2</i>	T _A 50°C, E _t 1 min, 30 sec Taq-Polymerase
<i>msh3D</i>	<i>msh3 bp 820-1320</i> <i>msh3_fora/msh3_rev3</i>	T _A 50°C, E _t 1 min, 30 sec Taq-Polymerase

<u>Bezeichnung</u>	<u>Anteiliges Fragment und Oligonukleotidprimer</u>	<u>PCR-Bedingungen</u>
<i>msh6</i>		
<i>msh6AB</i>	<i>msh6</i> bp 78-1489 <i>msh6A3_for/msh6B_rev</i>	T _A 50°C, E _t 1 min, 30 sec, Taq-Polymerase
<i>msh6B</i>	<i>msh6</i> bp 581-1489 <i>msh6B_for/msh6B_rev</i>	T _A 55°C, E _t 1 min
<i>msh6C</i>	<i>msh6</i> bp 1021-2030 <i>msh6C_for/msh6C_rev</i>	T _A 61°C, E _t 1 min
<i>msh6D</i>	<i>msh6</i> bp 1469-2490 <i>msh6D_for/msh6D_rev</i>	T _A 57°C, E _t 1 min
<i>msh6E</i>	<i>msh6</i> bp 2011-2829 <i>msh6E_for/msh6E_rev</i>	T _A 62°C, E _t 1 min
<i>msh6F</i>	<i>msh6</i> bp 2470-3579 <i>msh6F_for/msh6F_rev</i>	T _A 58°C, E _t 1 min
<i>msh6G</i>	<i>msh6</i> bp 2809-3750 <i>msh6G_for/msh6G_rev</i>	T _A 62°C, E _t 1 min
<i>msh6H</i>	<i>msh6</i> bp 3559-4137 <i>msh6H_for/msh6H3_rev</i>	T _A 57°C, E _t 1 min

<u>Bezeichnung</u>	<u>Anteiliges Fragment und Oligonukleotidprimer</u>	<u>PCR-Bedingungen</u>
<i>pms1</i>		
<i>pms1A</i>	<i>pms1</i> bp 31-687 <i>pms1A_for/pms1A_rev</i>	T _A 59°C, E _t 1 min
<i>pms1B</i>	<i>pms1</i> bp 668-1160 <i>pms1B_for/pms1B_rev</i>	T _A 59°C, E _t 1 min
<i>pms1C</i>	<i>pms1</i> bp 1141-1780 <i>pms1C_for/pms1C_rev</i>	T _A 59°C, E _t 1 min
<i>pms1D</i>	<i>pms1</i> bp 1760-2350 <i>pms1D_for/pms1D_rev</i>	T _A 59°C, E _t 1 min
<i>pms1E</i>	<i>pms1</i> bp 2331-2848 <i>pms1E_for/pms1E_rev</i>	T _A 59°C, E _t 1 min

<u>Bezeichnung</u>	<u>Anteiliges Fragment und Oligonukleotidprimer</u>	<u>PCR-Bedingungen</u>
<i>pms2</i>		
<i>pms2A</i>	<i>pms2</i> bp 211-1049 <i>pms2a_for/pms2A_rev</i>	T _A 50°C, E _t 1 min, 30 sec Taq-Polymerase
<i>pms2B</i>	<i>pms2</i> bp 510-1521 <i>pms2B_for/pms2B_rev</i>	T _A 50°C, E _t 1 min, 30 sec Taq-Polymerase
<i>pms2BA₁</i>	<i>pms2</i> bp 510-1049 <i>pms2B_for/pms2A_rev</i>	T _A 50°C, E _t 1 min, 30 sec Taq-Polymerase
<i>pms2BA₂</i>	<i>pms2</i> bp 510-960 <i>pms2B_for/pms2A_rev2</i>	T _A 50°C, E _t 1 min, 30 sec Taq-Polymerase
<i>pms2CB</i>	<i>pms2</i> bp 741-1521 <i>pms2c_for/pms2B_rev</i>	T _A 50°C, E _t 1 min, 30 sec Taq-Polymerase
<i>pms2D</i>	<i>pms2</i> bp 1982-3001 <i>pms2D_for/pms2D_rev</i>	T _A 50°C, E _t 1 min, 30 sec Taq-Polymerase
<i>pms2BC</i>	<i>pms2</i> bp 510-2004 <i>pms2B_for/pms2_Crev2</i>	T _A 50°C, E _t 1 min, 30 sec Taq-Polymerase

2.2.9.2 *shhmlh1*-Konstrukt unter Verwendung des Vektors pRNATin-H1.2/Neo

Das in dieser Arbeit erstellte Konstrukt *shhmlh1* erfolgte unter Verwendung des Vektors pRNATin-H1.2/Neo (2.2.6) und den Oligonukleotidprimern *shhmlh1(1)* und *shhmlh1(2)* (2.2.8.2). Die Oligonukleotidprimer wurden einer „Annealingreaktion“ (2.3.12.1) unterzogen und anschließend in den Vektor ligiert (2.3.3.8.1).

2.2.10 Zelllinien

2.2.10.1 Murine Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Referenz, Bezugsquelle</u>	<u>Generations- zeit</u>
L5178Y TK+/- clone (3.7.2C) Mauslymphomzellen	(Clive et al., 1972) Dr. W. J. Caspary, NIEHS, USA	~8–12h
L929 Mausfibroblasten	(Borden, 1978)	~15h

2.2.10.2 Humane Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Referenz, Bezugsquelle</u>	<u>Generations- zeit</u>
TK6 lymphoblastoide Zellen	(Skopek et al., 1978; Xia et al., 1995) Dr. W. J. Caspary, NIEHS, USA	~18h
WTK1 lymphoblastoide Zellen	(Benjamin et al., 1991; Xia et al., 1995) Dr. W. J. Caspary, NIEHS, USA	~18h
COLO 205 Colonadenocarcinomzellen	(Semple et al., 1978) Dr. Oliver Al-Taie, medizinische Poliklinik, Würzburg, BRD	~14-30h
HCT116 Colonadenocarcinomzellen	(Hawn et al., 1995) Dr. Oliver Al-Taie, medizinische Poliklinik, Würzburg, BRD	~22-24h
HCT15 Colonadenocarcinomzellen	(Liu et al., 1996) Dr. Oliver Al-Taie, medizinische Poliklinik, Würzburg, BRD	~22-24h
HC Colonadenocarcinomzellen	Dr. Stefan Scherer, Albert Einstein- College of Medicine, New York, USA	~22-24h

2.2.11 Mikroorganismen

2.2.11.1 *Escherichia coli* (*E.coli*)

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Referenz, Bezugsquelle</u>
<i>E. coli</i> DH5 α	F ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17(r_K⁻,m_K⁺)phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	(Hanahan, 1983) Invitrogen, Karlsruhe, BRD

2.2.12 Computerprogramme

2.2.12.1 Software

Textverarbeitungsprogramme:	MS Word 2000
Tabellenkalkulation:	MS Excel 2000
Graphikprogramme:	Corel Draw 9 MS Power Point 2000
Bildbearbeitungsprogramme:	Corel PhotoPaint 9 PhotoStudio 5
Sequenzanalysesoftware:	Chromas 2.3
Literaturverwaltungsprogramm:	EndNote 6.0
Comet Assay Analyse Programm:	Komet 5
Geldokumentationsprogramm:	MultiAnalyst 1.0.2
FACS-Analyse Programm:	CellQuest-Pro (BD, Sunnyvale, CA, USA) WINMDI 2.8

2.2.12.2 Server im Internet

Zur Datenrecherche wurde auf folgende im Internet zur Verfügung stehende Server zurückgegriffen:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> National Center for Biotechnology Information:
blast/bl2seq/wblast2.cgi

<http://ca.expasy.org/> ExPASy Proteomics Server: tools/dna.html

2.3 Methoden

2.3.1 Bakterienanzucht

2.3.1.1 Anzucht von *E. coli* in Flüssigkulturen (Übernachtkulturen)

Die mit dem Vektor pGEM-T-Easy oder pRNATin-H1.2/Neo transformierten *E. coli*-Bakterien wurden in 50ml LB-Medium, versetzt mit 100µg/ml Ampicillin in sterilen Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen maximal 1/5 des Gefäßvolumens) auf einem Rundschüttler bei 37°C ü.N. kultiviert. Alle Medien wurden autoklaviert, das Ampicillin sterilfiltriert zugegeben.

LB-Medium:

10g/l Select Peptone
5g/l Hefeextrakt
5g/l NaCl
ad A.bidest 1l
pH 7,0 mit NaOH

Ampicillin-Stammlösung:

100mg/ml Ampicillin in A.bidest
sterilfiltriert

2.3.1.2 Anzucht von *E. coli* auf Agarplatten

Transformierte *E. coli*-Bakterien wurden je nach eingebrachtem Vektor entweder auf LB-Platten versetzt mit 100µg/ml Ampicillin (pRNATin-H1.2/Neo) oder auf LB-Platten versetzt mit 100µg/ml Ampicillin, 0,5mM IPTG und 80µg/ml X-Gal (pGEM-T-Easy) ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert.

Antibiotika und andere Zusätze wurden dem LB-Medium sterilfiltriert zugegeben.

LB-Platten:

1,5% (w/v) Agar in LB-Medium (2.3.1.1)
autoklaviert

IPTG-Stammlösung:

0,1M in A. bidest
sterilfiltriert

X-Gal-Stammlösung:

50mg/ml in N,N'-Dimethylformamid

2.3.1.3 Dauerkulturen

Für eine Lagerung von Bakterienstämmen über mehr als zwei Wochen hinweg wurden Glycerinstammkulturen angelegt. Hierfür wurden 800µl einer Übernachtskultur (2.3.1.1) mit 200µl sterilem Glycerin versetzt, vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.3.2 Zellkulturen

2.3.2.1 Suspensionszellen

L5178Y-Mauslymphomzellen und die humanen lymphoblastoiden Zelllinien TK6 und WTK1 wurden als Suspensionskulturen in RPMI-Medium bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert und dreimal pro Woche passagiert. Für die Passage wurde die Zellzahl der Kultur bestimmt (2.3.2.5) und 50.000 (L5178Y) -200.000 (TK6 und WTK1) Zellen/ml (je nach Generationszeit der Zellen) in neuem Medium ausgesät.

RPMI- Medium:

RPMI 1640, Phenolrot

10% (v/v) Pferdeserum (hitzeinaktiviert)

1% (v/v) 100mM Natrium-Pyruvat-Lösung

1% (v/v) 200mM L-Glutamin-Lösung

0,4% (v/v) 500U/ml Penicillin-5mg/ml Streptomycin-Lösung

bezogen auf 500ml Medium

2.3.2.2 Adhärenente Zellen

Adhärenente humane Colonadenocarcinomzellen HCT116, HCT15 und HC wurden in DMEM-Medium bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert und dreimal pro Woche passagiert. Zum Passagieren wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 2ml (kleine Flaschen; 25cm²), bzw. 4ml (mittlere Flaschen, 75cm²) PBS/CMF gewaschen und durch Zugabe von 0,5ml (kleine Flaschen), bzw. 1ml (mittlere Flaschen) 1xTrypsin/EDTA 5min bei 37 °C abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin/EDTA mit 4,5ml oder 4ml (kleine oder mittlere Flaschen) Medium inaktiviert und 200.000 Zellen/ml in frischem Medium ausgesät.

DMEM- Medium:

DMEM, Phenolrot

10% (v/v) fetales Kälberserum

1% (v/v) 200mM L-Glutamin-Lösung

500U/ml Penicillin-

5mg/ml Streptomycin

bezogen auf 500ml Medium

PBS/CMF, pH 6,9:

8g/l NaCl

0,2g/l KCl

0,575g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O

0,2g/l KH₂PO₄

Trypsin/EDTA-Lösung (1x):

10x Trypsin/EDTA-Lösung (5g/l Trypsin; 2g/l EDTA x 4Na in 0,9% Natriumchlorid)

1/10 verdünnt in PBS/CMF

2.3.2.3 Halbadhärente Zellen

Halbadhärente humane Colonadenocarcinomzellen Colo205 wurden in DMEM-Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert (2.3.2.2) und dreimal pro Woche passagiert. Zum Passagieren wurden die Suspensionszellen bei 1000rpm für 5min abzentrifugiert. Die adhärenen Zellen wurden wie unter 2.3.2.2 beschrieben mit PBS/CMF gewaschen und durch Zugabe von 0,5ml-1ml (je nach Größe der Flasche) Trypsin/EDTA 5 min bei 37°C abgelöst. Das Trypsin/EDTA wurde mit 4,0ml oder 4,5ml Medium (je nach vorher eingesetzter Trypsinmenge) inaktiviert, die zuvor abzentrifugierten Suspensionszellen den adhärenen Zellen wieder zugefügt und anschließend 200.000 Zellen/ml in frischem Medium ausgesät.

2.3.2.4 Konservierung und Reaktivierung von Zellkulturen

Exponentiell wachsende Zellen wurden nach Zentrifugation bei 1000rpm und Abnahme des Überstands in eisgekühltem Kulturmedium mit 10% (v/v) DMSO resuspendiert und in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 1,8 ml Kryoröhrchen pipetiert. Die Zellen wurden zunächst 2-3 Tage bei -80°C gekühlt und anschließend bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Reaktivierung wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, mit 10ml vorgewärmtem Medium vermennt und 5min bei 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 5ml frischem Medium aufgenommen und die Zellen wie gewöhnlich kultiviert (2.3.2.1, 2.3.2.2, 0).

2.3.2.5 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung von Zellen in Suspension wurde ein automatischer Zellzähler der Firma Coulter (Coulter Counter) verwendet. Vor der Zählung wurden die Zellen durch Auf- und Abziehen in Pipetten vereinzelt, 200µl der Einzelzellsuspensionen mit 9,8ml einer isotonischen Lösung (Isoton II) verdünnt und anschließend mittels Coulter Counter gemessen.

Die Zellzahl in ml errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = Z \times f_{\text{Verd.}} / V$$

Z	In der Digitalanzeige des Coulter Counter angegebene Zellzahl
V	Volumen der während des Zählvorgangs durch die Öffnung gesaugten Lösung in ml
$f_{\text{Verd.}}$	Faktor, der sich aus der Verdünnung der Zellzählung errechnet (10/0,2 = 50)

2.3.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Alle Arbeiten mit RNA wurden auf Eis mit sterilen, RNase-freien Plastikwaren und Filterspitzen durchgeführt.

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen erfolgte mit Hilfe des „RNeasy Plant Mini Kits“ von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde im Eisschrank bei -80 °C gelagert.

2.3.3.2 Reverse Transkription von mRNA

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des „First Strand cDNA Synthesis Kits“ von MBI Fermentas nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Das cDNA-RNA-Hybrid wurde bis zu seiner Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.3.3 Primerdesign

Als Grundlage für das Primerdesign diente die jeweilige, von NCBI (National Center for Biotechnology Information) veröffentlichte Referenzsequenz der cDNA der Mismatchreparatur-Gene (*mlh1*, *mlh3*, *msh2*, *msh3*, *msh6*, *pms1* und *pms2*) oder die Sequenz des Vektors pRNATin-H1.2/Neo. Die Primer wurden so gewählt, dass sie eine Länge von 18-22bp und einen Anteil von 40-50% Guanidin und Cytidin aufwiesen. Sie enthielten nicht mehr als vier gleiche Nukleotide nacheinander, um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen zu vermeiden. Wenn möglich wurden die Primer so gewählt, dass am 3'-Ende zweimal Guanidin oder Cytidin sitzt, um eine bessere Bindung und Elongation zu gewährleisten. Die Spezifität der Primer wurde durch den Vergleich der Primerssequenz mit in Datenbanken veröffentlichten

Sequenzen der Maus (*Mus musculus*) verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>), um eine unspezifische Amplifikation auszuschließen. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Primer keine internen Sekundärstrukturen, sogenannte „hairpins“, bilden oder miteinander dimerisieren.

2.3.3.4 PCR-Amplifikation von cDNA

Die Amplifikation der zu klonierenden und zu sequenzierenden cDNA-Fragmente erfolgte mittels PCR unter Verwendung der „Proofreading“-Polymerase Deep-Vent oder der RedTaq-Polymerase. Die PCR-Ansätze hatten ein Endvolumen von 25µl und wurden auf Eis in PCR- Reaktionsgefäße nach folgenden Schemata pipettiert:

<u>für Vent-Polymerase:</u>		<u>für RedTaq-Polymerase:</u>	
cDNA (2.3.3.2)	1µl	cDNA (2.3.3.2)	1µl
Sense-Primer (10pmol/µl)	1µl	Sense-Primer (10pmol/µl)	1µl
Antisense-Primer (10pmol/µl)	1µl	Antisense-Primer (10pmol/µl)	1µl
dNTPs (10mM)	0,5µl	Redymix RedTaq (0,4mM dNTP-Mix, 0,06U/µl Taq)	12,5µl
PCR-Puffer (10x)	2,5µl	PCR-H ₂ O	9µl
PCR-H ₂ O	18,875µl		
Vent-Polymerase (2U/µl)	0,125µl		

Die Reaktionen wurden in Thermocyclern der Firma MJ Research, USA nach folgendem Schema durchgeführt:

Initialer Denaturierungsschritt	95 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	30-35 Zyklen
Primerbindung	45-65 °C	1 min	
Primerextension	72 °C	1-1,5 min	
verlängerte Primerextension	72 °C	10 min	

Die Reaktionsansätze wurden zur Überprüfung in einem 1%-igen Agarosegel

(2.3.3.6) aufgetrennt und die Fragmente mit der erwarteten Größe eluiert (2.3.3.7). Um Fehler der Polymerase bei der Vervielfältigung zu minimieren, wurde für die Amplifikation der zu sequenzierenden Bereiche die „Proofreading“-Polymerase Deep-Vent eingesetzt. In einigen Fällen, in denen eine Gewinnung des erwünschten Bereichs mittels dieser Polymerase nicht möglich war, wurde auf die zuverlässigere Taq-Polymerase zurückgegriffen.

2.3.3.5 Anhängen eines 3`-terminalen Adenosins an „blunt-ended“ PCR-Produkte

Die hohe Ligationseffizienz des Vektors pGEM-T-Easy beruht auf einem 3`-terminalen Thymidin-Überhang, der zum einen die Religation des Vektors verhindert und zum anderen die Inserierung von Fragmenten erleichtert, die an ihren 3´-terminalen Enden ein überhängendes Adenosin (als Bindungspartner zu Thymidin) aufweisen. Während die Taq-Polymerase templateunspezifisch an die 3`-Enden bevorzugt ein Adenosin anhängt, können die mit Taq amplifizierten PCR-Produkte direkt zur Ligation mit dem Vektor eingesetzt werden (2.3.3.8.1). Die Vent-Polymerase dagegen führt zu sogenannten "glatten" Enden („blunt-ends“), die keine 3´-terminalen Überhänge besitzen. Für die Ligation der mit Vent amplifizierten Fragmente in den Vektor pGEM-T-Easy wurde deshalb eine weitere Reaktion mit der Taq-Polymerase angeschlossen. Der Reaktionsansatz hatte ein Endvolumen von 10µl und wurde auf Eis nach folgendem Schema pipettiert:

- gereinigtes PCR-Fragment	7-10 µl
- 10x Reaktionspuffer mit MgCl ₂	1 µl
- dATP	0,2 mM
- Taq DNA Polymerase	5 Units
- PCR-Wasser	ad 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde anschließend bei 70 °C in einem Thermocycler der Firma MJ Research, für 30 min inkubiert. Die so erzeugten Fragmente mit 3´-terminalem Adenosin wurden zur Ligation mit dem Vektor pGEM-T-Easy eingesetzt (2.3.3.8.1).

2.3.3.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge erfolgte in horizontalen 1%-igen Agarosegelen. Dafür standen zwei Flachbettgelkammern unterschiedlicher Größe zur Verfügung (2.1).

Die Agarose (NEEO, Roth) wurde in einer Konzentration von 1% (w/v) in 1-fach kon-

zentriertem TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, mit 2µg/50ml Ethidiumbromid versetzt und in die mit einem Gelkamm versehene Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben (25µl) wurden mit je 5µl 6x-Probenpuffer („6x loading dye“) versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei 50 oder 100V (abhängig von der Gelgröße) elektrophoretisch aufgetrennt. Der Laufpuffer war ebenfalls 1xTAE. Als DNA-Größenstandard wurden 3-5µl der 100-Basenpaarleiter (je nach Größe des Gels) aufgetragen. Die Dokumentation erfolgte mit der Geldokumentationsanlage GelDoc 2000 und der Software MultiAnalyst Version 1.0.2.

50x TAE

2M Tris/Acetat

0,5M EDTA

Ethidiumbromid-Stammlösung

1mg/ml in A.bidest

2.3.3.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA in Agarosegelen (2.3.3.6) wurden die zu eluierenden DNA-Fragmente auf der UV-Durchlichtbank (GelDoc 2000, BioRad) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte mit dem „MinElute Gel Extraction Kit“ (Quiagen) oder mit dem „DNA Gel Extraction Kit“ der Firma Millipore nach Anleitung der Hersteller.

2.3.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren

Ligationen von DNA-Fragmenten mit Vektoren wurden mittels T4-DNA-Ligase (Promega) für 1,5h bei RT oder ü.N. bei 4°C durchgeführt.

2.3.3.8.1 Ligation von DNA-Fragmenten mit dem Vektor pGEM-T-Easy

Der Reaktionsansatz für eine Ligation von DNA-Fragmenten mit dem Vektor pGEM-T-Easy setzte sich wie folgt zusammen:

- 2x Puffer	5µl
- PCR-Produkt	3µl
- Vektor	1µl (= 50ng)
- T4-DNA Ligase (3U/µl)	1µl (= 3U)
- A.bidest	ad 10µl

2.3.3.8.2 Ligation von DNA-Fragmenten mit dem Vektor pRNATin-H1.2/Neo

Für die Ligation des "small-hairpin“-Konstrukts *shhmlh1* mit dem Vektor pRNATin-H1.2/Neo wurde der zirkuläre Vektor mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII restringiert (2.3.3.14.1).

Der anschließend verwendete Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 2x-Puffer	5µl
- Vektor	1µl (= 50ng)
- shhMLH1	0,04µl (= 1,55ng)
- T4-DNA Ligase	1µl (= 3U)
- A.bidest	ad 10µl

2.3.3.9 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

25– 50µl der kompetenten *DH5α*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 2µl der Ligation (2.3.3.8) versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen einer Hitzeschockbehandlung unterzogen (42 °C; 45–50s im Wasserbad).

Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 950µl SOC-Medium zugegeben und die Zellen bei 37 °C für 1,5h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand bis auf 100µl abgenommen und 10µl und 90µl der Zellsuspension auf LB-Platten mit Ampicillin (2.3.1.2) (nach Transformation mit pRNATin-H1.2/Neo) oder auf Platten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal (2.3.1.2) (nach Transformation mit dem Vektor pGEM-T-Easy) ausplattiert (2.3.1.2). Die Platten wurden bei 37 °C ü.N. inkubiert.

SOC-Medium (100ml):

2% (w/v) Bacto Pepton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
10mM MgSO₄
10mM NaCl₂
10mM MgCl₂
20mM Glucose
ad A. bidest 100ml

2.3.3.10 Selektion der Bakterien

In der multiplen Schnittstelle (Multiple Cloning Site; MCS) des Vektors pGEM-T-Easy befindet sich das *LacZ*-Gen, das für das Enzym β-Galactosidase codiert. Dieses ist für den Abbau von Laktose zu Glucose und Galaktose zuständig, führt aber auch durch Abbau des Laktoseanaloges X-Galaktose (X-Gal) zu einem dunkelblauem Reaktionsprodukt. Eine Religation des Vektors führt zu einem intakten *LacZ*-Gen und damit zu einer funktionellen β-Galactosidase. Bakterien, die einen solchen religierten

Vektor enthalten, sind in der Lage, auf Agarplatten mit X-Gal und dem β -Galaktosidase-Induktor IPTG blaue Kolonien zu bilden. Die Insertion eines DNA-Fragments innerhalb der *LacZ*-Sequenz führt zum Verlust der β -Galaktosidase und damit zu farblosen/weißen Kolonien. Durch diese sogenannte „Blau-Weiß-Selektion“ können Bakterienkolonien erkannt werden, die einen Vektor mit erfolgreich inseriertem DNA-Fragment beherbergen.

2.3.3.11 Kolonie-PCR

Um die in den Vektor inserierten Fragmente auf ihre Richtigkeit zu überprüfen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurden jeweils 5 weiße Kolonien mit sterilen Zahnstochern gepickt, in 30 μ l PCR-Wasser aufgenommen und 3 μ l davon für die anschließende PCR eingesetzt. Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 95 °C für 5 min wurde eine PCR wie unter 2.3.2.4 beschrieben mit den jeweiligen Primern und der Taq-Polymerase (Readymix RedTaq PCR Reaction Mix) durchgeführt. Die Produkte wurden auf einem Agarosegel (2.3.3.6) überprüft und eine Übernachtskultur (2.3.1.1) mit 3-5 μ l aus der Bakteriensuspension angeimpft.

2.3.3.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Plasmidisolierungen aus Übernachtskulturen erfolgten unter Verwendung des HighSpeed Plasmid-Midi-Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben.

2.3.3.13 Ethanolpräzipitation von DNA

Zur Reinigung und Konzentration von DNA wurde der Nukleinsäurelösung 1/10 Volumen 3M Natriumacetat/Essigsäure pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol zugesetzt. Nach einer Inkubation ü.N. bei RT wurde die DNA bei 13.000rpm und RT für 30min sedimentiert, der Überstand abgenommen und das Präzipitat bei RT auf der Laborbank getrocknet.

2.3.3.14 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die DNA-Restriktion erfolgte in einem Reaktionsansatz von 20 μ l nach den Angaben der Hersteller und in den von ihnen angegebenen Puffersystemen bei 37 °C für 1h .

2.3.3.14.1 Restriktion mit EcoRI

Zur Überprüfung der mit dem Vektor pGEM-T-Easy erstellten Plasmidkonstrukte wurde mit EcoRI nach folgendem Schema verdaut:

- Plasmid-DNA:	0,5 – 1 µg
- 10x Puffer	2,0 µl
- EcoRI (10U/µl)	1,0 µl (=10U)
- A. bidest.	ad 20µl

2.3.3.14.2 Restriktion mit BamHI und HindIII

Zur Überprüfung des mit dem Vektor pRNATin-H1.2/Neo erstellten „small-hairpin“-*mlh1*-Konstrukts *shhmlh1* wurde mit BamHI und HindIII nach folgendem Schema verdaut:

- Plasmid-DNA:	1,0 µg
- 10x Puffer (Tango)	2,0 µl
- BamHI (10U/µl)	1,0 µl (=10U)
- HindIII (10U/µl)	1,0 µl (=10U)
- A. bidest	ad 20 µl

2.3.4 Analytische Methoden

2.3.4.1 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assays der Firma BioRad nach deren Angaben durchgeführt. Als Standardprotein wurde BSA der Firma Pierce verwendet.

2.3.4.2 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von DNA und RNA in wässriger Lösung wurde photometrisch mittels Spektralphotometer in einer 100 µl-Quarzküvette bestimmt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm (A_{260}) entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA oder einzelsträngiger DNA (Ibelgauf, 1993). Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren wurde der Quotient $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ ermittelt, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte (Warburg and Christian, 1942).

2.3.5 Proteinbiochemische Methoden

2.3.5.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Zellkulturen

Konfluent gewachsene adhärenente Zellen bzw. Suspensionszellen in einer Dichte von etwa 1Mio./ml wurden in 50ml-Falcons bei 1000rpm abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet anschließend mit 50–100µl Homogenisationspuffer (je nach Größe des Zellpellets) versetzt. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte durch Vortexen und 10-maliges Auf- und Abziehen der Zellsuspension in Insulinspritzen.

Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 13.000rpm und 4°C wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt und eine Proteinbestimmung (2.3.4.1) durchgeführt

Homogenisationspuffer

0,2M Mannitol

50mM Saccharose

10mM HEPES

in A. bidest

2.3.5.2 Erstellen von SDS-Protein-Proben

Die Proteinextrakte wurden mit Homogenisationspuffer (2.3.5.1) und 6x-SDS-Probenpuffer so versetzt, dass SDS-Proben mit einer Proteinkonzentration von 2µg/µl, 4µg/µl oder 5µg/µl bei 1-facher SDS-Probenpufferkonzentration entstanden, Die Proben wurden anschließend im Wasserbad bei 95°C für 5–10min erhitzt, für 5min bei 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.3.5.3) eingesetzt.

6x-SDS-Probenpuffer

375mM Tris/HCl, pH 6,8

60% (v/v) Glycerin

3% (w/v) SDS

42mM β-Mercaptoethanol

0,15% (w/v) Bromphenolblau

2.3.5.3 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die denaturierende Gelelektrophorese dient der Auftrennung komplexer Proteinmischungen und wurde unter Verwendung diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gele (Dimension: 8cm x 10cm x 0,075cm) nach Laemmli (Laemmli, 1970) unter Verwendung der SE 250 Mighty Small II Electrophoresis Unit (Hoefer) durchgeführt. Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten der Gelapparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Auspolymerisierung (~30min) wurde das Isopropanol abgenommen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Ein in das Sammelgel eingeführter 10-zähliger Kamm bildete Aussparungen, die als Auftragsaschen für die Proben dienten. 20–50µg Protein der zuvor gewonnenen SDS-Proben (2.3.5.2, 2.3.5.2) wurden in die Geltaschen pipettiert. Bei einer konstanten Stromspannung von 100V zum Durchlaufen des Sammelgels und 100-200V zum Durchlaufen des Trenngels betrug die Auftrennungszeit in Elektrophoresepuffer ca. 1-2,5h. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Trenngel, 12,5%

Trenngelpuffer	4,0ml
40% Acrylamid	5,0ml
A.bidest	7,0ml
20% SDS	120µl
10% APS	108µl
TEMED	10,8µl

Sammelgel, 5%

Sammelgelpuffer	2ml
40% Acrylamid	1,0ml
A.bidest	5,0ml
20% SDS	120µl
10% APS	80µl
TEMED	8µl

Die angegebenen Mengen für Trenn- und Sammelgel reichen für jeweils vier Gele.

Trenngelpuffer

1,5M Tris/HCl
pH 8,8

Sammelgelpuffer

0,5M Tris/HCl,
pH 6,8

Elektrophoresepuffer, pH 8,3

0,1% (w/v) SDS
25mM Tris
190mM Glycin

20% SDS

20g SDS
ad 100ml A.bidest
autoklaviert

10%APS

1g APS

ad 10ml A.bidest

sterilfiltriert

50µl Aliquots

Lagerung bei -20°C

2.3.5.4 Bestimmung der molekularen Masse denaturierter Proteine

Zur Bestimmung der molekularen Masse der in den Proteinproben enthaltenen Proteine wurden die von der Firma Fermentas bezogenen Marker-Proteine (2.2.5.2) in einem SDS-Gel elektrophoretisch zusammen mit der Probe aufgetrennt.

2.3.5.5 Western Blotting

Zur Immobilisierung der zuvor in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine (2.3.5.3) wurden diese unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes in einer „Semi-Dry“ Western-Blotting-Apparatur auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membranen wurden entweder gleich im Anschluss zur Immundetektion (2.3.6.1) eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung luftgetrocknet bei RT aufbewahrt.

Blotting-Puffer

10mM NaHCO_3

3mM Na_2CO_3

0,01% (w/v) SDS

20% (v/v) MetOH

2.3.6 Immunologische Methoden

2.3.6.1 Immundetektion der MMR-Proteine nach Western Blotting

Auf einer Membran immobilisierte, spezifische Proteine können mithilfe von Antikörpern und daran gekoppelter Enzyme, die zur Lichtemission angeregt werden können, sichtbar gemacht werden. Zur Detektion der auf die Nitrocellulosemembran transferrierten (2.3.5.5) MMR-Proteine oder Tubulin wurden zuerst unspezifische Bindestellen der Membran durch Inkubation mit Blocking-Puffer bei RT für 1h oder bei 4°C ü.N. unter leichtem Schütteln blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper, gerichtet gegen das jeweilige MMR-Protein oder Tubulin (2.2.7), für 1h bei RT oder 4°C ü.N. inkubiert. Nach Entfernen der nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit je 10ml Waschpuffer (je 10min) wurde 1h bei RT der sekundäre Antikörper (2.2.7) auf der Membran belassen. Die ungebundenen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit je 10ml Waschpuffer entfernt. Bei den sekundären Antikörpern handelte es sich um anti-Maus-IgG- oder anti-Kaninchen-IgG, die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind. Die Detektion erfolgte durch Mischen der beiden Reagenzien des ECL-Detektionssystems und 1-minütiges Beträufeln der Membran mit einer 1000µl-Pipette.

Die TBS-T-Primärantikörper-Lösung wurde nach Gebrauch mit 100µl 10%-iger Na-Azidlösung versetzt und in 10ml-Falcons bei 4°C gelagert. Die so aufbewahrte Antikörperlösung wurde für bis zu drei weitere Immundetektionen eingesetzt.

TBS (Tris buffered saline)

100 mM TrisCl, pH 7,5
0,9% (w/v) NaCl

TBS-T (Waschpuffer)

0,05% Tween 20 in TBS

Blocking-Puffer

0,5% Magermilchpulver in TBS-T

10% Na-Azidlösung

10% (w/v) Na-Azidlösung

2.3.6.2 Entfernung der Antikörper von Membranen: "Strippen"

Um Membranen mit den darauf immobilisierten Proteinen erneut für eine Immundetektion einzusetzen wurden die vorher daran gebundenen Antikörper durch sogenanntes „Strippen“ von den Membranen gelöst. Dafür wurden die Membranen in 50ml Stripping-Puffer bei 50°C im Wasserbad für 30min geschwenkt, anschließend

für 1h bei RT mit Blocking-Puffer geblockt (2.3.6.1) und zur erneuten Detektion (2.3.6.1) eingesetzt.

Stripping-Puffer

345µl Mercaptoethanol

5ml 20% SDS

3,125ml 1M Tris pH 6,8

ad 50ml A.bidest

2.3.7 Induktion von Genomschäden und Apoptosen

Die Zelllinien TK6, WTK1, HCT116, Colo205, und L5178Y wurden in kleinen Zellkulturfラスchen (25cm²) in einer Konzentration von 200.000 Zellen/ml ausgesät und mit 25µM O⁶-Benzylguanin versetzt. Nach einer Stunde wurden unterschiedliche Konzentrationen MNNG (0; 0,316; 1; 3,16; 10, 20, 30, 40µM) zugegeben und die Zellen für weitere 24h inkubiert. Die Kultur ohne MNNG diente als Kontrolle und enthielt nur das Lösungsmittel DMSO. Nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet (1000rpm; 5min) und entweder ein Comet Assay oder ein Mikrokerntest durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass keine Schwankungen in der Zugabe der Substanzen auftraten, wurden zu Anfang der Experimente größere Mengen als Stammlösung hergestellt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Für die Behandlung der Zellen wurden Aliquots aufgetaut, die nicht verbrauchten Reste der Aliquots wurden verworfen. Die MNNG-Stammlösung wurden vor Behandlung so verdünnt, dass 1µl der verdünnten Stammlösung (100-fach konzentriert) zu der gewünschten Konzentrationen in 1ml Kultur führte. Für die MNNG-Konzentrationen 20-40µM zu Beginn dieser Arbeit wurden die Stammlösungen frisch angesetzt.

O⁶-Benzylguanin-Stammlösung

25mM in Methanol

MNNG-Stammlösung

10mM in DMSO

2.3.8 Comet Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese)

Der Comet Assay ist ein sehr einfacher, schneller und empfindlicher Test zur Quantifizierung von DNA-Schäden. Er erfasst ein breites Spektrum verschiedener DNA-Schäden und weist diese auf dem Einzelzellniveau nach. Praktisch jede Zellpopulation ist für diesen Test geeignet. Er ist mit proliferierenden als auch mit nicht proliferierenden Zellen durchführbar, wobei nur eine geringe Zellmenge benötigt wird. Der Test beruht darauf, dass kleine DNA-Fragmente, die durch Chromosomenbrüche entstehen, schneller in einem elektrischen Feld zur Anode wandern als ungeschädigte Chromosomen. Dabei entsteht nach Anfärbung mit einem DNA-Farbstoff, im Mikroskop das Bild eines „Kometen“. Der prozentuale Anteil der DNA im "Schweif" dient als Maß für den Grad der DNA-Schädigung. Zur Durchführung des Tests werden Zellen auf einen mit Agarose beschichteten Objektträger aufgebracht, lysiert und anschließend einem elektrischen Feld ausgesetzt.

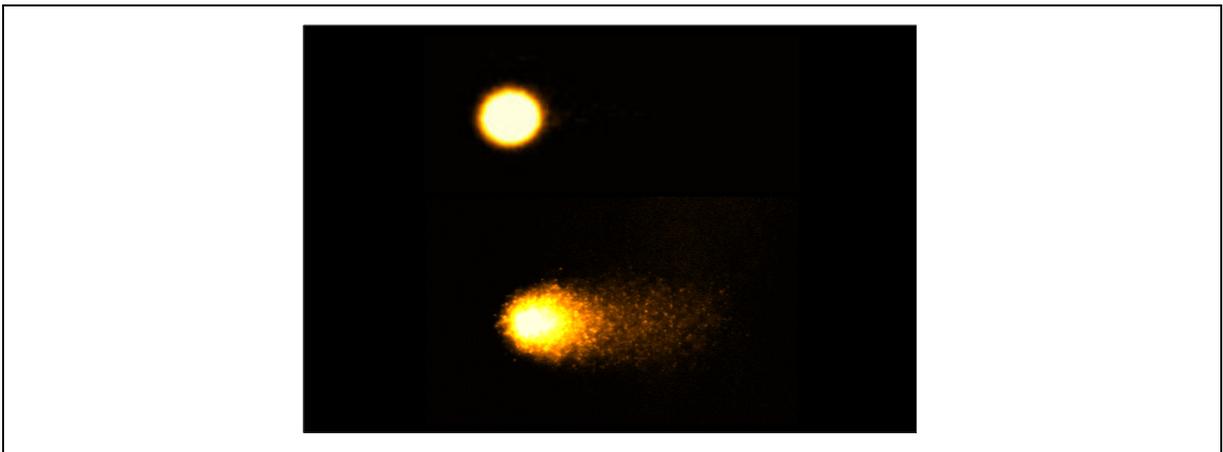


Abb. 8: Erscheinungsbild der DNA einer unbehandelten Kontrollzelle (oben) und einer behandelten Zelle mit DNA-Schäden (unten) im Comet Assay.

Präparation der mit Agarose beschichteten Objektträger:

1,5%ige Agaroselösung I wurde zweimal aufgekocht und in 50ml-Falcons gefüllt. Anschließend wurden Superfrost-Plus-Objektträger in die noch heiße Agarose (>60 °C) getaucht, die Unterseiten dieser mit einem Tuch abgewischt und zum Trocknen ausgelegt. Nach einem Tag wurden die mit Agarose beschichteten Objektträger zur Durchführung des Comet Assays eingesetzt. Die beschichteten Objektträger können mehrere Wochen bei RT gelagert werden.

Durchführung des Comet Assays:

Nach Behandlung der Zellen mit O⁶-Benzylguanin und MNNG (2.3.7) wurden diese auf eine Zellzahl von 1 Million pro ml eingestellt. 20µl der Zellsuspension wurden mit 180µl warmer Agaroselösung II (37°C) vermischt, 45µl der Mischung auf die beschichteten Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas (24 x 24mm) abgedeckt. Nach etwa 3-5min wurde das Deckglas entfernt und die Präparate zur Lyse der Zellen für 1h bei 4°C lichtgeschützt in Lysepuffer inkubiert. Während der Lyse wurde die Elektrophoresekammer mit Eis umgeben und mit gekühltem Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Präparate wurden nach der Lyse horizontal mit der Agarose-schicht nach oben auf die Plattform der Elektrophoresekammer gelegt und mit Puffer leicht überschichtet. Leere Plätze auf der Plattform wurden mit unbeschichteten Objektträgern aufgefüllt. Zur Entwindung und Trennung der doppelsträngigen DNA wurden die Objektträger 20min lichtgeschützt in der Elektrophoresekammer im Elektrophoresepuffer belassen. Die Elektrophorese wurde anschließend bei einer Spannung von 25V und 300mA durchgeführt, wobei die 300mA über die Puffermenge eingestellt wurden. Nach der Elektrophorese wurden die Präparate in TRIS-Neutralisationspuffer für 5min neutralisiert und nach Abtropfen der Objektträger mit 15µl der Propidiumiodidlösung gefärbt und eingedeckt. Die Präparate wurden in einer feuchten Kammer bei 4°C bis zur Auswertung, maximal eine Woche, aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte an einem Nikon-Floureszenzmikroskop bei 200-facher Vergrößerung mittels der Komet 5 (Kinetic Imaging) Software, wobei der Prozentsatz der DNA im Schweif (% DNA in tail) als Maß für die Schädigung ermittelt wurde. Die Zellen wurden in Schadensklassen unterteilt und die Verteilung der Zellen auf die Schadensklassen grafisch dargestellt.

Lysepuffer

2,5M NaCl

100mM EDTA

10mM Tris

1% (w/v) Na-Sarcosinat

pH 10,0 mit NaOH-Plätzchen eingestellt

Lyselösung:

0,75ml Triton

7,5ml DMSO

66,75ml Lysepuffer

Elektrophoresepuffer:

120ml 5M NaOH
10ml EDTA
ad 2l H₂O bidest.

Agarose-Lsg. I:

1,5% Agarose (MEEO, Roth)
in PBS-CMF

PBS-CMF:

8g/l NaCl
0,2g/l KCl
0,575g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O
0,2g/l KH₂PO₄

Agaroselösung II:

0,5% LMP-Agarose (Type VII, Sigma)
in PBS-CMF

Propidiumiodid-Lösung

20µg Propidiumiodid in 1ml H₂O

TRIS-Neutralisationspuffer, 0,4M

48,452g TRIS
ad 1l H₂O bidest.
pH 7,5 mit konz. HCl
autoklaviert

2.3.9 Mikrokern-Test

2.3.9.1 Mikrokern-Test und Zählung von Apoptosen

Mit dem Mikrokern-Test können genschädigende Ereignisse detektiert werden, die mit Chromosomenbrüchen oder dem Verlust ganzer Chromosomen einhergehen. Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen, die während der Mitose nicht an die Spindelfasern angeheftet werden, befinden sich nach der Kernteilung abseits des Chromosomensatzes und werden bei der Neubildung der Kernmembran nicht in den Kern integriert, sondern von einer eigenen Membran umschlossen. Dies führt zur Entstehung kleinerer Nebenkerne, sogenannter Mikrokerne. Nach Anfärbung der Zellen mit einem DNA-Farbstoff können diese Mikrokerne von den Hauptkernen aufgrund ihrer Größe leicht unterschieden werden. Der DNA-Farbstoff Acridinorange bindet interkalativ an einzel- und doppelsträngige Nukeinsäuren, wobei es bei Blaulichtanregung unterschiedlich fluoresziert. Die Bindung von Acridinorange an doppelsträngige DNA (Kern) führt zu einer Grünfluoreszenz, während einzelsträngige RNA (im Zytoplasma) rot fluoresziert (Abb. 9).

Mikrokerne können nur während der Mitose entstehen, das heißt, nur in sich teilenden Zellen. Deshalb muss, um falsch negative Befunde aufgrund fehlender Proliferation der Zellen auszuschließen, sichergestellt werden, dass sich diese während der Versuche in Teilung befinden.

Durchführung des Mikrokern-Tests:

Je 20.000 – 30.000 Zellen wurden nach der Behandlung mit O^6 -Benzylguanin und MNNG (2.3.7) mittels Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht und in eiskaltem Methanol für mindestens 2h bei -20°C fixiert. Anschließend wurden die Objektträger 3– 5min in Acridinorange-Färbelösung gefärbt und 2x für jeweils 5min in Soerensen-Puffer entfärbt. Die Präparate wurden mit Soerensen-Puffer eingedeckt und in einer feuchten Kammer bei 4°C für höchstens eine Woche gelagert. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop bei 500-facher Vergrößerung. Die Präparate (Mikrokerne, Apoptosen und Nekrosen) wurden nach den bei Fenech (Fenech, 2000) beschriebenen Kriterien ausgewertet.

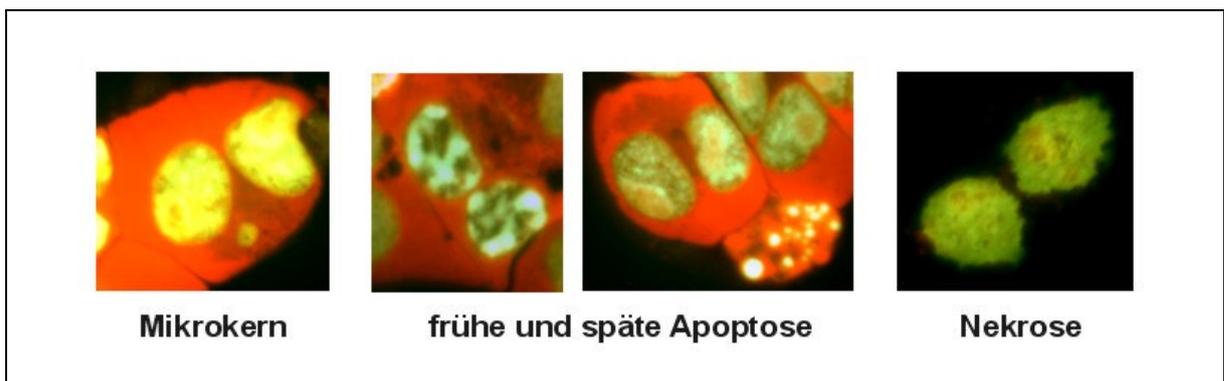


Abb. 9: Mikrokern-Bilder nach Anfärbung von Zellen mit Acridinorange: Gezeigt sind ein typischer Mikrokern in einer doppelkernigen Zelle, eine frühe und eine späte Apoptose und eine doppelkernige nekrotische Zelle.

Soerensen-Puffer, pH 6,8

15mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

15mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

autoklaviert

Acridinorange-Stammlösung

0,1% in A. bidest

Acridinorange-Färbelösung

0,006% in Soerensen-Puffer

2.3.9.2 Mikrokern-Test und Zytokineseblock-Methode

Durch Zugabe eines Zytokineseinhibitors (Cytochalasin B) kann eine Zellteilung nach abgeschlossener Kernteilung verhindert werden. Es entstehen doppelkernige oder mehrkernige Zellen, je nachdem, wie oft sich der Kern der Zelle geteilt hat. Fehlinterpretationen aufgrund fehlender Proliferation der Zellen oder unterschiedlicher Generationszeiten können ausgeschlossen werden, wenn Zellen nach genau einer Kernteilung, also nur doppelkernige Zellen, ausgewertet werden.

Für den Mikrokerntest mit Blockierung der Zytokinese wurde den Zellen während der Behandlung mit 25µM O⁶-Benzylguanin und 0-10µM MNNG (2.3.7) Cytochalasin B (TK6 und HCT116 2µg/ml, L5178Y 5µg/ml) zugegeben. Anschließend wurde der Mikrokern-Test wie unter 2.3.9 beschrieben durchgeführt. Ausgewertet wurden je zwei Objektträger und je 1000 doppelkernige Zellen. In einem ersten Zählvorgang wurden die ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen als Maß für die Proliferation der Zellen ermittelt, während in einem zweiten Zählvorgang nur doppelkernige Zellen gezählt und die Zahl der Mikrokerne pro 1000 doppelkerniger Zellen bestimmt wurde. Apoptosen wurden parallel zu den ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen gezählt.

Cytochalasin B-Stammlösung

1mg/ml in DMSO

2.3.10 Durchflusszytometrie

Mit einem Durchflusszytometer können physikalische Eigenschaften von Einzelzellen, wie relative Größe, relative Granularität (oder interne Komplexität) und relative Fluoreszenzintensität detektiert werden. Während die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom, hydrodynamisch fokussiert, einen Laserstrahl passieren, werden Merkmale durch ein optisch-elektronisches System bestimmt, das ermittelt, wie die Zelle das einfallende Laserlicht streut und die Fluoreszenzen emittiert. Generell besteht ein Durchflusszytometer aus drei Hauptkomponenten:

- Das Flüssigkeitssystem transportiert die Partikel und führt sie in einem laminaren Strom zur Analyse durch den Laserstrahl.
- Das optische System besteht aus einem (oder mehreren Lasern), der die Partikel in dem Flüssigkeitsstrom anstrahlt und aus optischen Filtern, die die austretenden Lichtsignale zu den Detektoren leiten.

- Das elektronische System wandelt die Lichtsignale in den Detektoren zuerst in elektronische Signale und dann in digitale Signale um, die vom Computer bearbeitet werden können.

2.3.10.1 Proliferationsnachweis mittels „BrdU-Quenching“ im Durchflusszytometer

Die Anfärbung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff *bis*-Benzimidazol (Hoechst 33258 und Hoechst 33342) führt zu einer Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer, die durch den Einbau des Thymidinanalogons 5-Bromodeoxyuridin (BrdU) in die DNA abgeschwächt („gequenchet“) wird. Wird Zellkulturen BrdU im Überschuss zugegeben, so kann aufgrund dieser Abschwächung eine Aussage über die Proliferation der Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen ohne BrdU getroffen werden. Nur Zellen, die proliferieren, können BrdU während der Synthesephase in ihre DNA einbauen und zeigen damit eine abgeschwächte Fluoreszenzintensität, die sich in einer Linksverschiebung der Zellen in der Dot-Blot-Darstellung äußert (siehe Abb. 10).

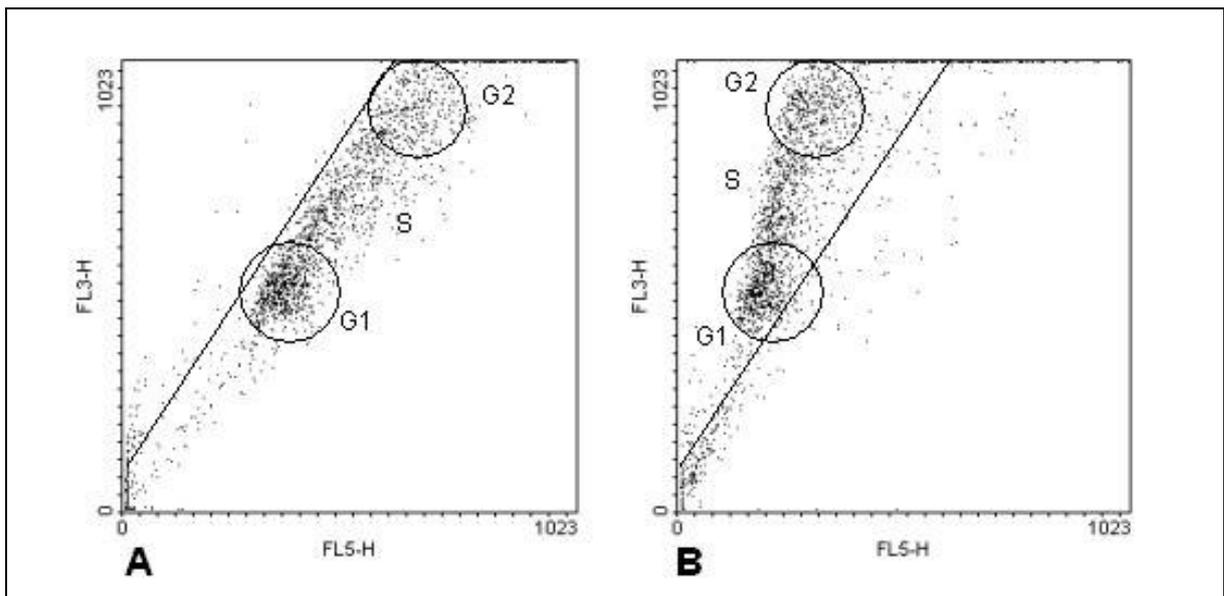


Abb. 10: Darstellung von Zellen aus einer Kultur ohne und mit BrdU: Teil A zeigt ohne BrdU kultivierte Zellen, die in die G1-, in die S- und die G2-Phase unterteilt werden können. Teil B dagegen zeigt die mit BrdU kultivierten Zellen. Auch hier sind G1-, S- und G2-Phase zu erkennen. Im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen zeigen sie aber eine starke Linksverschiebung aller Zellzyklusphasen (Zellen, die vorher rechts der eingezeichneten Linie lagen sind komplett auf die linke Seite gewandert). Das bedeutet, dass alle Zellen BrdU in ihre DNA inseriert haben und die Fluoreszenzintensität dadurch soweit abgeschwächt ist, dass sich die Population im „Dot-Blot“ nach links verschiebt. Für den Proliferationsnachweis in dieser Arbeit wurde um die unbehandelten Zellen ein „Gate“ gesetzt und anschließend die Wanderung der mit BrdU behandelten Zellen aus dem „Gate“ als Maß für die Proliferation eingesetzt.

Um die Proliferation der behandelten Zellen nachzuweisen, wurde das von Ormerod (Ormerod, 1997) beschriebene Protokoll verfolgt. Während der Behandlungsdauer

mit O⁶-BG und MNNG (2.3.7) wurden Zellen in einem Parallelansatz zusätzlich mit der zuvor ermittelten Konzentration von 50µM BrdU inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und mit „Staining Buffer“ auf eine Zellzahl von 1 Million pro ml eingestellt. Anschließend wurden 50µl Hoechst-Stammlösung pro ml „Staining Buffer“ zu der Zellsuspension zugegeben und diese für 15min dunkel auf Eis inkubiert. Je ml wurden 10µl PI-Stammlösung zupipettiert und wieder für 15min im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden anschließend an einem Becton-Dickinson (BD-LSR) unter Verwendung eines HeCd 325nm UV-Lasers und der Langpassfilter LP 424/44 (Hoechst) und LP 670 (PI) analysiert. Die Hoechst- und PI-Signale wurden mittels der CellQuest Pro Software analysiert. Es wurden je 2000 Zellen („events“) gemessen.

Staining Buffer, pH 7,4:

100mM Tris

154 mM NaCl

1 mM CaCl₂

0,5 mM MgCl₂

0,1% (v/v) Nonidet P40

0,2% (w/v) BSA

wöchentlich mit A. bidest aus einer

10fach-konzentrierten Stammlösung

hergestellt

Hoechst-Stammlösung (20x):

1mg Hoechst 33258

in 42ml A. bidest (steril)

PI-Stammlösung (100x)

200µg/ml A. bidest (steril)

2.3.11 Sequenzierung von cDNA

Für die Suche nach Mutationen in kodierenden Bereichen der MMR-Gene wurde die RNA der L5178Y-Zellen isoliert (2.3.3.1) und die mRNA in cDNA umgeschrieben (2.3.3.2). Mit spezifischen Primern (2.2.8.1) wurden 500-2500bp große Bereiche der MMR-cDNA amplifiziert (2.3.3.4) und diese anschließend durch Gelelektrophorese auf ihre Größe überprüft (2.3.3.6). Die PCR-Produkte wurden entweder direkt im Agarosegel zur Sequenzierung zu Eurofins Medigenomix, Martinsried geschickt oder

aus dem Gel eluiert (2.3.3.7). Die eluierten Fragmente wurden mit dem Vektor pGEM-T-Easy ligiert (2.3.3.8.1), die ligierten Plasmide in *E. coli* transformiert (2.3.3.9), auf LB-Platten ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert (2.3.1.2). Die durch „Blau-Weiß-Selektion“ (2.3.3.10) ermittelten positiven Klone wurden anschließend durch eine Kolonie-PCR überprüft (2.3.3.11) und die positiven Kolonien in einer Übernachtskultur angezogen (2.3.1.1). Die Plasmide wurden isoliert (2.3.3.12) und 10µg nach einer Plasmidkonzentrationsbestimmung (2.3.4.2) gefällt (2.3.3.13). Die gefällten und luftgetrockneten Plasmide wurden anschließend zur Sequenzierung zu MWG-Biotech nach Ebersberg geschickt. Die DNA-Sequenzen wurden via E-Mail übermittelt und anschließend mit den Referenzsequenzen von NCBI verglichen.

2.3.12 „Down-Knocking“ von MLH1 durch RNA-Interferenz

Kurze doppelsträngige RNA-Fragmente, small interfering RNAs (siRNAs), die eine komplementäre Sequenz zu mRNA aufweisen, führen zum Abbau der betreffenden mRNA und damit zur Blockierung der Expression des zugehörigen Proteins (Elbashir et al., 2001; Martinez et al., 2002; Meister et al., 2004; Paddison et al., 2004). Längere doppelsträngige RNA-Fragmente oder „hairpin“-Konstrukte werden durch sogenannte Dicer (Bernstein et al., 2001) zu überwiegend 21 Nukleotid langen siRNAs geschnitten. Diese assoziieren mit einem Proteinkomplex zum sogenannten RNA Induced Silencing Complex (RISC-Komplex), wo sie als einzelsträngige RNA mit der komplementären mRNA hybridisieren. Diese Hybridisierung führt zum Abbau der mRNA.

Werden Zellen direkt mit kurzen doppelsträngigen siRNAs transfiziert, so spricht man von einer transienten Transfektion. Das heißt, die siRNAs sind nur solange in der Lage die Expression eines Proteins zu unterdrücken, wie sie in der Zelle vorhanden sind. Sind sie aufgebraucht, wird das Protein wieder normal exprimiert.

Eine andere Methode, um Proteine dauerhaft auf einem niedrigen Expressionslevel zu halten, ist die stabile Transfektion. Bei dieser werden Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das so konstruiert ist, dass bei der Transkription ein sogenanntes „hairpin“-Konstrukt entsteht, das anschließend von Dicer zu siRNAs gespalten wird (Paddison et al., 2002). Durch ein Resistenzgen auf dem Vektor kann durch Selektionsdruck das Plasmid in den Zellen dauerhaft gehalten werden („stabile Transfektion“). Neben dem Resistenzgen kann der Vektor außerdem noch ein Markergen (zum

Beispiel GFP) enthalten, das es ermöglicht die Transfektion der Zellen zu überprüfen und eine Aussage über die Transfektionseffizienz zu treffen.

2.3.12.1 Konstruktion des Vektors *shhmlh1*

Verwendeter Vektor

Für die Herstellung isogenetischer Zellen, die sich nur in der Expression von MLH1 unterscheiden wurde der Vektor pRNATin-H1.2/Neo der Firma Genescript gewählt.

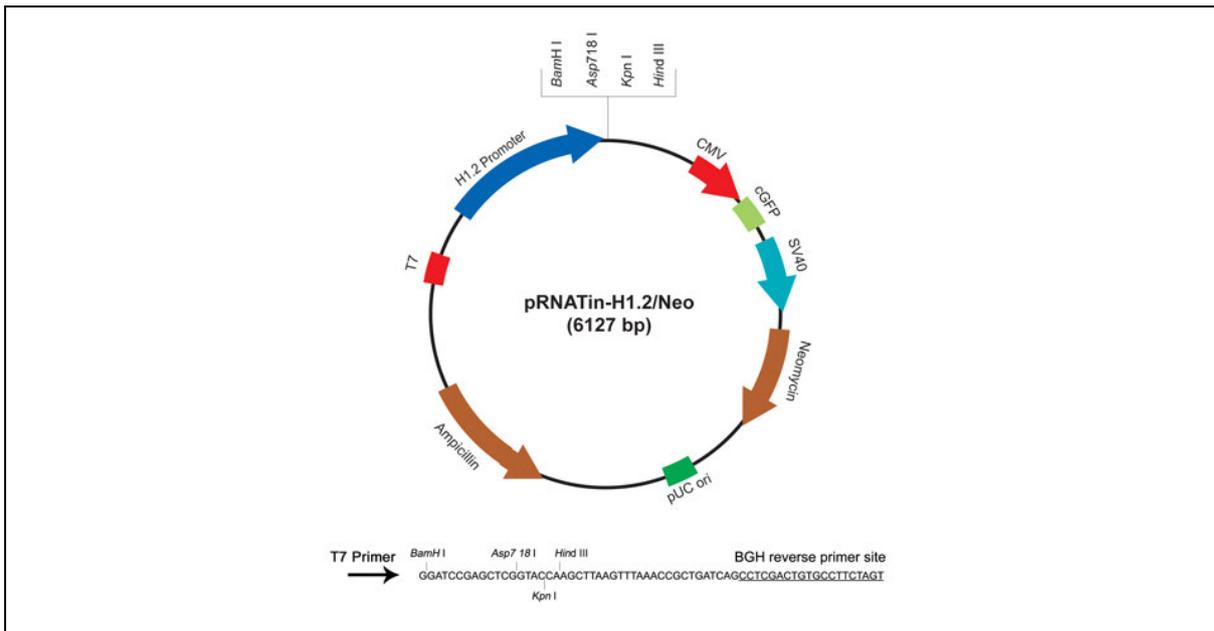


Abb. 11: pRNATin-H1.2/Neo: Gezeigt ist der Vektor pRNATin-H1.2/Neo mit den Schnittstellen, BamHI und HindIII, dem H1.2-Promotor (blau), dem Gen für GFP (green fluorescent protein) (grün) und den Neomycin- und Ampicillinresistenzgenen (braun). Beschrieben sind nur die Schnittstellen und Marker, die für diese Arbeit relevant sind.

pRNATin-H1.2/Neo ist ein Vektor, der für Transfektionen in Säugerzellen konstruiert ist (siehe Abb. 11). Er trägt ein Neomycin-Resistenzgen, das es ermöglicht, transfizierte Zellen zu selektionieren und unter Selektionsdruck dauerhaft in Kultur zu halten. pRNATin-H1.2/Neo ist außerdem ein induzierbarer siRNA-Expressions-Vektor. Das heißt, der H1.2-Promotor enthält einen Tetrazyklin-Operator (TetO1), der von einem Tetrazyklinrepressor (TetR) gebunden wird. Dies führt zu einer Blockierung der Transkription. Wird TetR von Tetrazyklin (oder Doxozyklin) gebunden, löst sich der Repressor TetR vom Operator TetO1 und die Blockierung der Transkription ist aufgehoben (siehe Abb. 11). Die Expression des „small-hairpin“-Konstrukts kann somit über Tetrazyklin „an- und abgeschaltet“ werden.

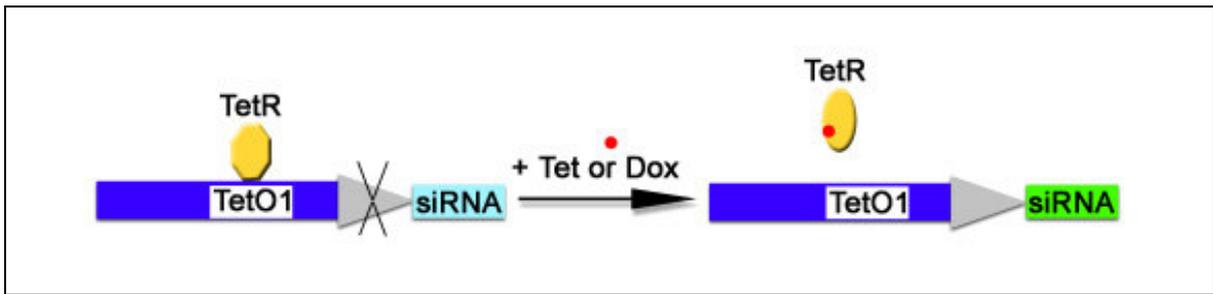


Abb. 12: Gezeigt ist der Tetrazyklin-Operator (TetO1) (weiß) innerhalb des induzierbaren H1.2-Promotors (blau) und der daran gebundene Tetrazyklinrepressor (TetR) (gelb). Diese Bindung verhindert eine Transkription der siRNA (hellblau). Tetrazyklin oder Doxyzyklin (roter Punkt) führen zur Lösung der Bindung und damit zur Transkription der siRNA (grün).

Herstellung des Inserts

Für die Blockierung der Proteinsynthese mittels RNA_i ist die Wahl der RNA-Sequenz von großer Bedeutung. Nicht jede RNA-Sequenz, die komplementär zur gewählten mRNA ist, führt auch tatsächlich zum Abbau dieser. Deshalb wurde in dieser Arbeit auf eine veröffentlichte Sequenz zurückgegriffen, von der gezeigt wurde, dass sie in der Lage ist, die Expression von MLH1 runterzuregulieren (Luo et al., 2004). Die 19-Nukleotid-lange Sequenz lautet:

5'-GGTTCACTACTAGTAAACT-3'

Diese Sequenz wurde mit der bei NCBI veröffentlichten Referenzsequenz NM_000249.2 verglichen und auf seine Richtigkeit überprüft. Die gewählte Sequenz ist identisch mit den bp 296-314 der *mlh1*-Referenzsequenz.

Diese sogenannte Sense-Sequenz wurde anschließend über eine „Linker“-Sequenz mit der Antisense-Sequenz verbunden, die die palindromartige Komplementärsequenz zur Sensesequenz darstellt. Nach der Transkription bildet sich durch diese Anordnung eine „hairpin“-Struktur aus.

Neben einer sich anschließenden PolymeraseIII-Terminationssequenz aus 6x Thyminidin wurde noch eine 5'-BamHI und 3'-HindIII Schnittstelle konstruiert.

Ein zweites Oligonukleotid wurde komplementär zur oben beschriebenen Sequenz konstruiert, wobei darauf geachtet wurde, dass durch eine Annealingreaktion ein Konstrukt mit BamHI- und HindIII-Überhängen entstand, das in den Vektor pRNA-Tin-H1.2/Neo ligiert und auch wieder restringiert werden konnte (2.3.3.8.2).

BamHI	Sense	Linker	Antisense	PollIII-Termination
	5´-GATCC-GGTTCACTACTAGTAAACT-TTCAAGAGA-AGTTTACTAGTAGTGAACC-TTTTTT-GGAAA-3´			
	3´-G-CCAAGTCATGATCATTGA-AAGTTCCTCT-TCAAATGATCATCACTTGG-AAAAAA-CCTTT-TCGA-5´			
				HindIII

Abb. 13: Gezeigt ist das konstruierte Insert zur Erstellung des *shhMLH1*-Konstrukts: Sense- und Antisense-Sequenz sind rot, die Linkersequenz schwarz eingezeichnet. Die Terminationssequenz ist blau, die Überhänge für die Schnittstellen sind grün dargestellt.

Folgende Oligonukleotide wurden von der Firma GeneScript, Scotch Plains, USA synthetisiert:

<i>shhmlh1(1)</i> 5´-GATCCGGTTCACTACTAGTAAACTTTCAAGAGAAGTTTACTAGTAGTGAACCTTTTTTGGAAA-3´
<i>shhmlh1(2)</i> 5´-AGCTTTTCCAAAAAAGGTTCACTACTAGTAAACTTCTCTTGAAAGTTTACTAGTAGTGAACCG-3´

„Annealing“ der beiden Oligonukleotide

Das in dieser Arbeit erstellte Insert *shhmlh1* erfolgte unter Verwendung des Vektors pRNATin-H1.2/Neo und den Oligonukleotidprimern *shhmlh1(1)* und *shhmlh1(2)*. Die bei Scotch Plains, USA synthetisierten Oligonukleotide *shhmlh1(1)* und *shhmlh1(2)* wurden mit PCR-Wasser zu einer Konzentration von 1µg/µl verdünnt und anschließend für folgende 20µl-Annealingreaktion eingesetzt:

<i>shhmlh1(1)</i>	1µl
<i>shhmlh1(2)</i>	1µl
20x SSC	1µl
H ₂ O	17µl

Nach einer Reaktionszeit von 10min bei 95°C und 1h bei RT wurde das erhaltene Konstrukt *shhmlh11* so verdünnt, dass eine Konzentration von 40ng/µl vorlag.

Klonierung

Das Insert wurde wie unter 2.3.3.8.2 beschrieben mit dem Vektor ligiert und anschließend in *E. coli* transformiert (2.3.3.9). Eine anschließende Kolonie-PCR (2.3.3.11) mit den Primern pRNA_for und pRNA_rev wurde durchgeführt um die Inserierung des Inserts in den Vektor zu überprüfen. Positive Klone wurden in einer Übernachtskultur (2.3.1.1) angezogen, die Plasmide aus dieser Kultur isoliert (2.3.3.12)

und diese durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und HindIII nochmals überprüft (2.3.3.14.2). Durch eine Sequenzierung des Konstrukts mit den Primern pRNA_for und pRNA_rev durch MWG Biotech, Ebersberg, BRD wurde die Richtigkeit der inserierten Sequenz überprüft.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Voraussetzungen geschaffen, eine MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen durch den Vergleich mit anderen Zellen mit bekanntem MMR-Status nachzuweisen. Dafür wurden für unterschiedliche MMR-profiziente und -defiziente Zelllinien sowie für L5178Y-Zellen MNNG-Konzentrationen ermittelt, die MMR-abhängige zelluläre Reaktionen auslösen, ohne MMR-unabhängige Antworten zu induzieren und ohne die Proliferation der Zellen zu beeinträchtigen. Es konnte gezeigt werden, dass L5178Y-Zellen sowohl im Mikrokern-Test als auch im Comet-Assay einen MMR-defizienten Phänotyp zeigen. Eine Untersuchung der molekularen Ursache für diesen Phänotyp auf Proteinebene ergab für drei der bisher bekannten MMR-Proteine keine veränderte Expression im Vergleich zu MMR-profizienten Kontrollzelllinien. Die Sequenzierung der kodierenden Bereiche der in die MMR involvierten MMR-Gene führte zu einer Reihe von Veränderungen, von denen eine Insertions-Mutation in *pms2* für die MMR-Defizienz verantwortlich gemacht wird.

3.1 Optimierung der Versuchsbedingungen für den Nachweis einer MMR-Defizienz

Zu Beginn der Arbeit wurden geeignete MNNG-Konzentrationen ermittelt, die Schäden MMR-abhängig in den Zellen auslösen, ohne die Proliferation dieser zu stören. Dafür wurden die MMR-profizienten Zellen (Colo205 und TK6) und die defiziente Zelllinie (HCT116) sowie L5178Y-Mauslymphomzellen mit 25µM O⁶-Benzylguanin für 1h vorbehandelt und anschließend mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle, 10µM, 20µM, 30µM und 40µM MNNG für 24h Stunden inkubiert (2.3.7). Nach der Inkubation wurden die Zellzahlen der einzelnen Kulturen ermittelt (2.3.5.2) und ein Mikrokerntest durchgeführt (2.3.9.1).

3.1.1 Colo205-Zellen

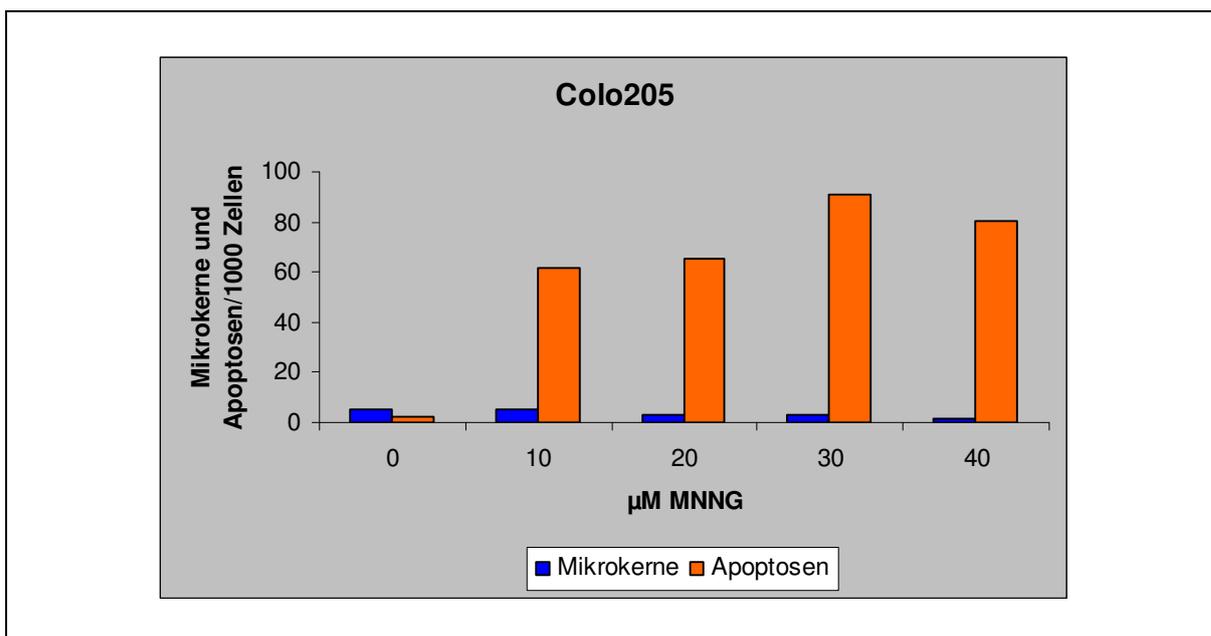


Abb. 14: Zelluläre Antwort der MMR-profizienten Zellen Colo205 nach Behandlung mit MNNG im Mikrokerntest: Colo205-Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle), 10µM, 20µM, 30µM und 40µM MNNG inkubiert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht, mit Acridinorange gefärbt und bei 500-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden zwei Objektträger und 1000 Zellen pro Objektträger gezählt.

Mikrokerne:

Die Behandlung der halbadhärenten und MMR-profizienten Colonadenomcarcinomzellen Colo205 mit MNNG führte in keiner der getesteten MNNG-Konzentrationen zu einer Induktion von Mikrokerneln. Nach Behandlung mit 10µM MNNG zeigten die Zellen eine der Kontrollpopulation vergleichbare Mikrokernelrate, die in den mit höheren MNNG-Konzentrationen inkubierten Zellen unter den Kontrollwert sank (Abb. 14).

Apoptosen:

Eine starke Apoptoseinduktion zeigte sich in allen mit MNNG-behandelten Zellen. Im Vergleich zu 2,5 Apoptosen in der Kontrolle wurde ein maximaler Wert von 91 Apoptosen mit 30µM MNNG erzielt. Dieser Wert ging bei einer Konzentration von 40µM MNNG leicht zurück (Abb. 14).

Nekrosen:

Eine quantitative Auswertung von Nekrosen ist aufgrund des frühzeitigen Auflösens der Zellmembran und des damit verbundenen Verschwindens der Zellen aus der Kul-

tur nicht möglich. Die Aussagen zu nekrotischen Zellen sind daher nur Beobachtungen während der Auszählung von Mikrokernen und Apoptosen und können lediglich als Hinweis auf die Toxizität von MNNG auf die Zellen angesehen werden. Auffallend bei der Auswertung der Mikrokern- und Apoptosen war allerdings eine Zunahme der beobachteten nekrotischen Zellen mit steigender MNNG-Konzentration. Im Vergleich zu der großen Zahl an induzierten Apoptosen fielen die nekrotischen Zellen jedoch nicht ins Gewicht.

Zellzahlen:

Die ermittelten Zellzahlen zeigten eine dosisabhängige Reduktion der behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 2). Die Zellzahl der Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt und die Zellzahlen der behandelten Zellen darauf bezogen.

<u>MNNG-Konzentration</u>	<u>Zellzahl</u>
Kontrolle	100%
10µM	66%
20µM	55%
30µM	45%
40µM	42%

Tab. 2: Zellzahlen der Kontrolle und der mit MNNG behandelten Colo205-Zellen: Die Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin 1h vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle), 10µM, 20µM, 30µM und 40µM MNNG inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellzahlen bestimmt und die Zellzahl der unbehandelten Kontrolle gleich 100% gesetzt. Die Zellzahlen der mit MNNG behandelten Kulturen wurden auf diesen Wert bezogen.

3.1.2 TK6-Zellen

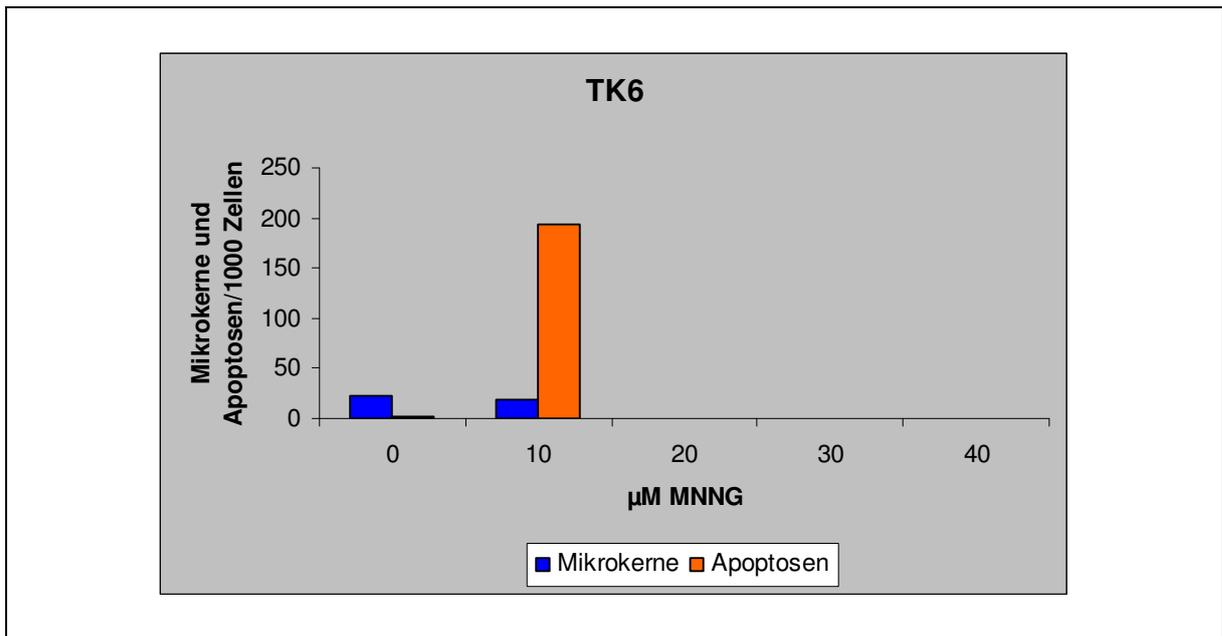


Abb. 15: Zelluläre Antwort der MMR-profizienten Zellen TK6 nach Behandlung mit MNNG im Mikrokerntest: TK6-Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle), 10µM, 20µM, 30µM und 40µM MNNG inkubiert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht, mit Acridinorange gefärbt und bei 500-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden zwei Objektträger und 1000 Zellen pro Objektträger ausgezählt.

Die humanen B-lymphoblastoiden Suspensionszellen TK6 waren ab einer Konzentration von 20µM so geschädigt, dass eine Auswertung dieser und höherer Konzentrationen nicht möglich war.

Mikrokerne:

10µM MNNG zeigten in den MMR-profizienten TK6-Zellen keine Auswirkung auf die Mikrokernelrate. Die Anzahl der Mikrokerne in den behandelten Zellen (19) ist mit dem Kontrollwert (22) vergleichbar (Abb. 15).

Apoptosen:

Die Behandlung mit 10µM MNNG führte zu einer sehr starken Induktion von Apoptosen (~200-fach gegenüber der Kontrolle) (Abb. 15).

Nekrosen:

Neben der großen Anzahl von Apoptosen wurden in den mit MNNG-behandelten Zellen auch viele nekrotische Zellen beobachtet (Abb. 15).

Zellzahlen:

Es zeigt sich dosisabhängig eine Reduktion der Zellzahl der behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 3). Die Zellzahl der Kontrolle wurde gleich 100% ge-

setzt und die Zellzahlen der behandelten Zellen darauf bezogen.

<u>MNNG-Konzentration</u>	<u>Zellzahl</u>
Kontrolle	100%
10 μ M	29%
20 μ M	28%
30 μ M	25%
40 μ M	30%

Tab. 3 Zellzahlen der Kontrolle und der mit MNNG behandelten TK6-Zellen: Die Zellen wurden mit 25 μ M O⁶-Benzylguanin 1h vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle), 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M und 40 μ M MNNG inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellzahlen bestimmt und die Zellzahl der unbehandelten Kontrolle gleich 100% gesetzt. Die Zellzahlen der mit MNNG behandelten Kulturen wurden auf diesen Wert bezogen.

3.1.3 HCT116-Zellen

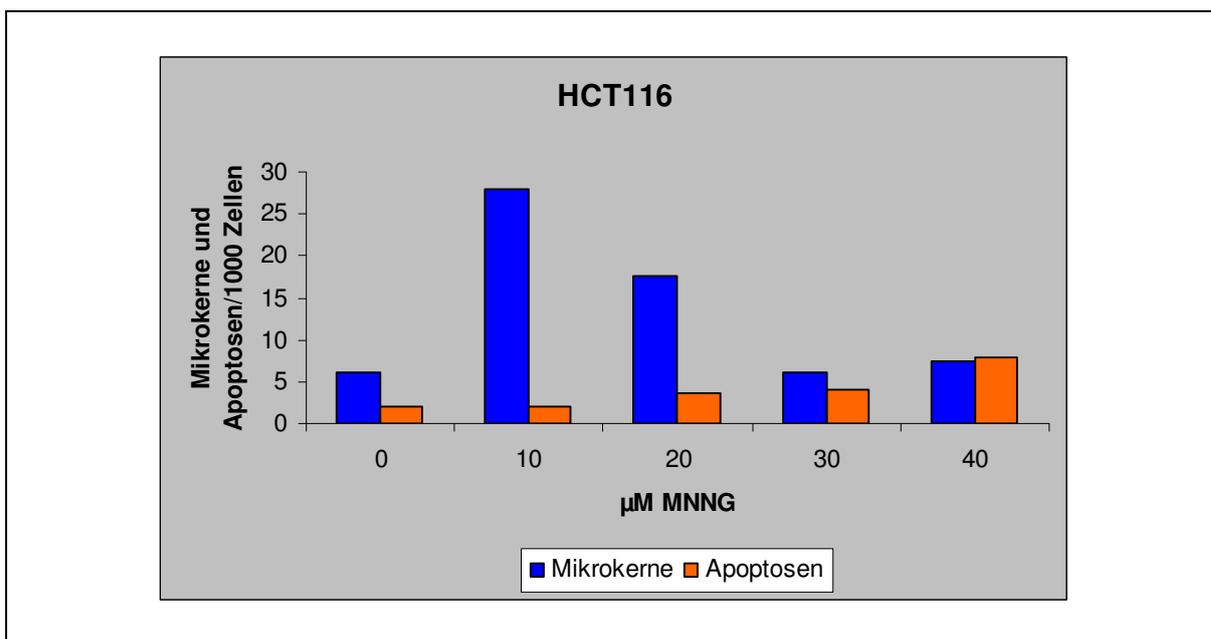


Abb. 16: Zelluläre Antwort der MMR-defizienten Zellen HCT116 nach Behandlung mit MNNG im Mikrokerntest: HCT116-Zellen wurden mit 25 μ M O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle), 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M und 40 μ M MNNG inkubiert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht, mit Acridinorange gefärbt und bei 500-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden zwei Objektträger und 1000 Zellen pro Objektträger ausgezählt.

Mikrokerne:

Die MMR-defizienten, adhärennten Colonadenomcarcinomzellen HCT116 reagierten auf 10 und 20µM MNNG mit einem Anstieg der Mikrokernrate. Behandlung mit höheren MNNG-Konzentrationen führte zu Mikrokernwerten, die der Kontrolle vergleichbar waren (Abb. 16).

Apoptosen:

Eine leichte konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion von 2 Apoptosen in der Kontrolle auf 8 Apoptosen bei 40µM wurde ab einer Konzentration von 20µM MNNG nachgewiesen. Die Behandlung der Zellen mit 10µM MNNG zeigte keinen Unterschied der Apoptosen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 16).

Nekrosen:

Nekrotische Zellen zeigten eine starke Zunahme bei steigender MNNG-Konzentration.

Zellzahlen:

Die ermittelten Zellzahlen nach MNNG-Behandlung sind in Tab.3 dargestellt und zeigen, dass dosisabhängig mit erhöhter MNNG-Konzentration die Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle abnimmt. Die Zellzahl der Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt und die Zellzahlen der behandelten Zellen darauf bezogen.

<u>MNNG-Konzentration</u>	<u>Zellzahl</u>
Kontrolle	100%
10µM	56%
20µM	38%
30µM	31%
40µM	27%

Tab. 4: Zellzahlen der Kontrolle und der mit MNNG behandelten HCT116-Zellen: Die Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin 1h vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle), 10µM, 20µM, 30µM und 40µM MNNG inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellzahlen bestimmt und die Zellzahl der unbehandelten Kontrolle gleich 100% gesetzt. Die Zellzahlen der mit MNNG behandelten Kulturen wurden auf diesen Wert bezogen.

3.1.4 L5178Y-Zellen

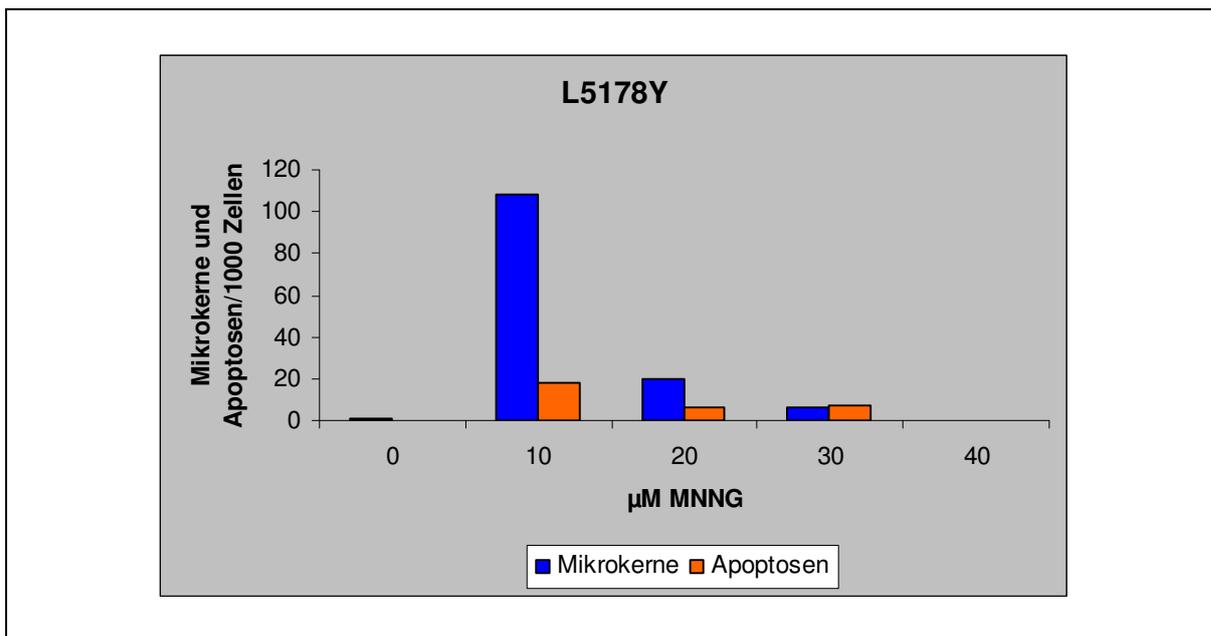


Abb. 17: Zelluläre Antwort der L5178Y Zellen nach Behandlung mit MNNG im Mikrokern-test: L5178Y-Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle), 10µM, 20µM, 30µM und 40µM MNNG inkubiert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht, mit Acridinorange gefärbt und bei 500-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden zwei Objektträger und 1000 Zellen pro Objektträger ausgezählt.

Mikrokerne:

Die Suspensionszellen L5178Y zeigten, ähnlich wie die HCT116, erst einen sehr starken Anstieg der Mikrokerne bei 10µM MNNG (von einem Mikrokern in der Kontrolle auf 108 Mikrokerne bei 10µM MNNG), während bei höheren MNNG-Konzentrationen nur eine sehr geringe Mikrokernzunahme im Vergleich zur Kontrolle (1 MK) beobachtet werden konnte (20 Mikrokerne bei 20µM, 6 bei 30µM) (Abb. 17).

Apoptosen:

Die Apoptosen verhielten sich analog zu den Mikrokernen (keine Apoptose in der Kontrolle, 18 Apoptosen bei 10µM MNNG, 6 Apoptosen bei 20µM MNNG und 7 Apoptosen bei 30µM MNNG). (Abb. 17).

Nekrosen:

Bei der Auswertung dieser Zelllinie, die nur bis zu 30µM MNNG ausgezählt werden konnte, waren kaum nekrotische Zellen zu finden.

Zellzahlen:

Auch in dieser Zelllinie nehmen die Zellzahlen dosisabhängig, verglichen mit der Kontrolle, ab (Tab. 5). Die Zellzahl der Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt und die

Zellzahlen der behandelten Zellen darauf bezogen.

MNNG-Konzentration	Zellzahl
Kontrolle	100%
10µM	44%
20µM	25%
30µM	20%
40µM	14%

Tab. 5: Zellzahlen der Kontrolle und der mit MNNG behandelten L5178Y-Zellen: Die Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin 1h vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle), 10µM, 20µM, 30µM und 40µM MNNG inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellzahlen bestimmt und die Zellzahl der unbehandelten Kontrolle gleich 100% gesetzt. Die Zellzahlen der mit MNNG behandelten Kulturen wurden auf diesen Wert bezogen.

Zusammenfassung Abschnitt 3.1

In den MMR-profizienten, in den MMR-defizienten Zellen und in den L5178Y-Mauslymphomzellen wurde eine starke zelluläre Antwort mit einer Konzentration von 10µM MNNG ausgelöst. Höhere MNNG-Konzentrationen bewirkten einen Rückgang der mit 10µM induzierten Schäden (außer Colo205: Apoptoserate bei 30µM MNNG am höchsten). Auffallend war dabei, dass die verschiedenen Zellen nicht nur abhängig von ihrem MMR-Status mit unterschiedlichen Reaktionen antworteten (Induktion von Mikrokernen oder Apoptosen), sondern auch, dass diese Schäden in ihrer Höhe sehr stark variierten. Während die lymphoblastoiden Suspensionszelllinien TK6 und L5178Y mit einer sehr starken Induktion von Apoptosen (~ 200-fach in TK6) und Mikrokernen (108-fach in L5178Y) reagierten, zeigten die halbadhärenenten Colonzellen Colo205 und die adhärenenten HCT116-Zellen sehr viel geringere Induktionswerte (~26-fache Induktion von Apoptosen Colo205 und ~5-fache Induktion von Mikrokernen in HCT116).

3.2 Nachweis der MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen

3.2.1 Nachweis der MMR-Defizienz mittels Mikrokern-Test

Nachdem eine geeignete MNNG-Konzentration ermittelt worden war, die in allen getesteten Zelllinien eine hohe Schädigung hervorruft, sollte der Vergleich der L5178Y-Zellen mit Zellen bekannten MMR-Status eine Aussage über die MMR dieser Zellen ermöglichen. Dafür wurden die durch 10 μ M MNNG ausgelösten Schäden in L5178Y-Zellen mit denen der MMR-profizienten und –defizienten Zellen im Mikrokern-Test verglichen.

Die MMR-profizienten Zellen (Colo205 und TK6) und die defiziente Zelllinie (HCT116) sowie L5178Y-Mauslymphomzellen wurden mit 25 μ M O⁶-Benzylguanin für 1h vorbehandelt und anschließend mit DMSO (Kontrolle) und 10 μ M MNNG für 24h inkubiert (2.3.7). Es wurde ein Mikrokern-Test durchgeführt (2.3.9.1). Die Mikrokern- und Apoptosefrequenz der Kontrollen wurde gleich eins gesetzt und die Werte in den behandelten Zellen darauf bezogen. Um die Proliferation der Zellen zu überprüfen und damit sicherzustellen, dass die Zellen in der Lage sind, Genomschäden in Form von Mikrokernen und Apoptosen auszubilden, wurden parallel Zellkulturen wie oben beschrieben angelegt und zusätzlich während der MNNG-Behandlung mit 50 μ M BrdU inkubiert. Diese Kulturen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert (2.3.10.1).

3.2.1.1 Colo205-Zellen

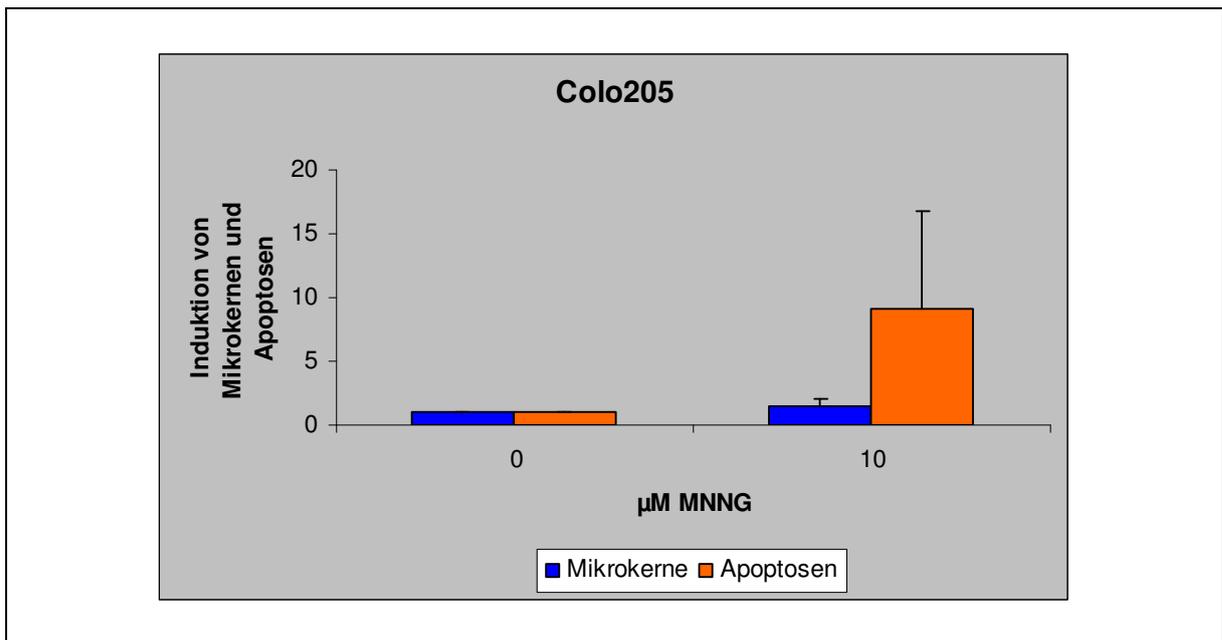


Abb. 18: Zelluläre Antwort der MMR-profizienten Zellen Colo205 nach Behandlung mit MNNG im Mikrokerntest: Colo205-Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle) und 10µM MNNG inkubiert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht, mit Acridinorange gefärbt und bei 500-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden zwei Objektträger und 1000 Zellen je Objektträger ausgezählt. Die Abbildung zeigt den gemittelten Wert aus sechs unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die Kontrollwerte wurden gleich 1 gesetzt und die restlichen Werte darauf bezogen.

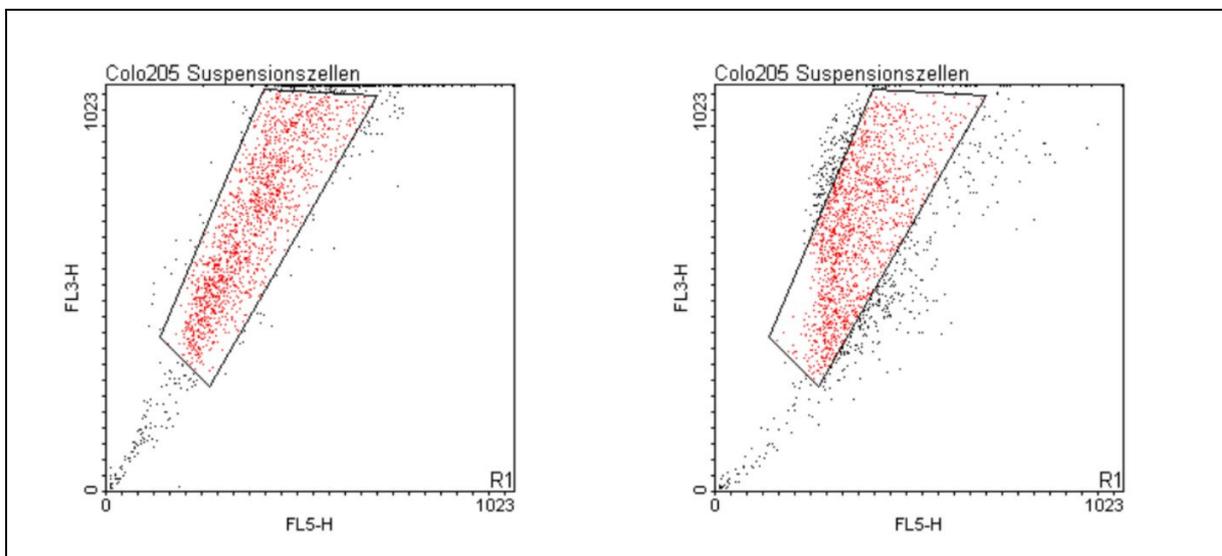


Abb. 19: Proliferationsnachweis der Colo205-Suspensionszellen mittels Durchflusszytometrie: Colo205-Zellen wurden während der 24-stündigen Behandlung mit 25µM O⁶-Benzylguanin und 10µM MNNG zusätzlich mit 50µM BrdU behandelt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Links sind die mit MNNG behandelten Zellen in Abwesenheit von BrdU, rechts in Anwesenheit von BrdU dargestellt. Das „gate“ wurde von den Zellen ohne BrdU auf die Zellen mit BrdU gesetzt und macht deutlich, welche Zellen durch Inkorporation von BrdU aus dem „gate“ nach links verschoben sind.

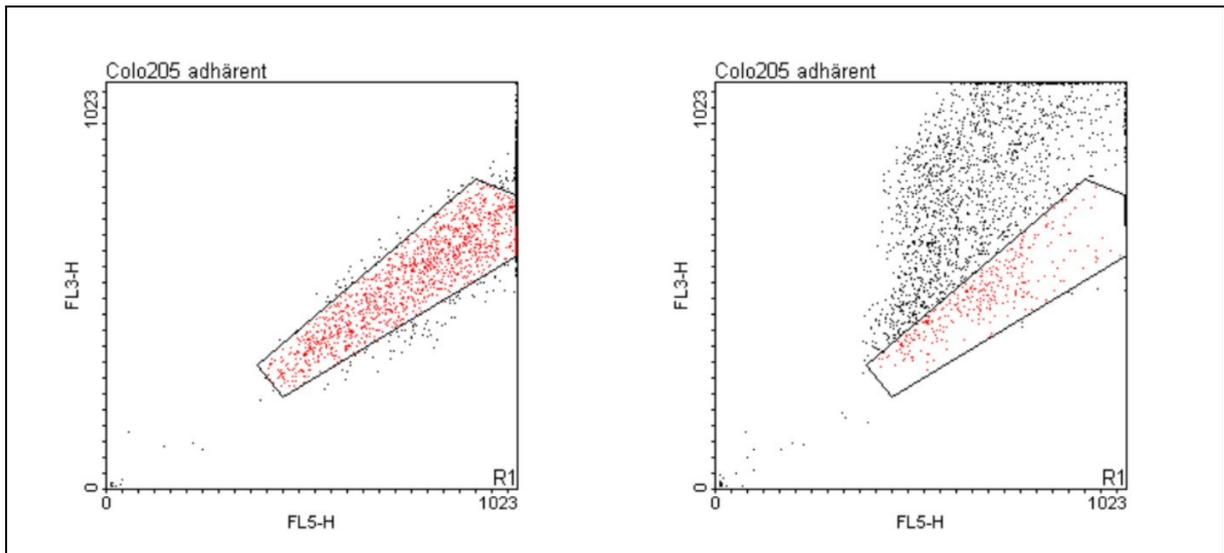


Abb. 20: Proliferationsnachweis der adhärennten Colo205-Zellen mittels Durchflusszytometrie: Colo205-Zellen wurden während der 24-stündigen Behandlung mit $25\mu\text{M}$ O^6 -Benzylguanin und $10\mu\text{M}$ MNNG zusätzlich mit $50\mu\text{M}$ BrdU behandelt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Links sind die mit MNNG behandelten Zellen in Abwesenheit von BrdU, rechts in Anwesenheit von BrdU dargestellt. Das „gate“ wurde von den Zellen ohne BrdU auf die Zellen mit BrdU gesetzt und macht deutlich, welche Zellen durch Inkorporation von BrdU aus dem „gate“ nach links verschoben sind.

Entsprechend der Erwartung konnte in den MMR-profizienten Colo205-Zellen eine Induktion von Apoptosen (bis zu 8-fach) nachgewiesen werden, während die Mikrokernrate nahezu unverändert blieb (1,4-fach) (Abb. 18). Abb. 19 zeigt, dass die Colo205-Suspensionzellen BrdU während der Synthesephase in ihre DNA inserierten (Linksverschiebung, schwarze Punkte), wobei die Synthesephase verzögert war (erkennbar anhand der Kurve, die die Zellen im „Dot-Blot“ beschreiben und der kaum vorhandenen zweiten G1-Phase) (2.3.10.1). Das heißt, die Zellen haben ihre DNA repliziert, aber nur wenige haben sich in der Behandlungszeit von 24h geteilt. Noch deutlicher war diese Verzögerung in den adhärennten Colo205-Zellen zu erkennen, wobei diese zum Teil in die nächste G1-Phase gelangten (Abb. 20).

3.2.1.2 TK6-Zellen

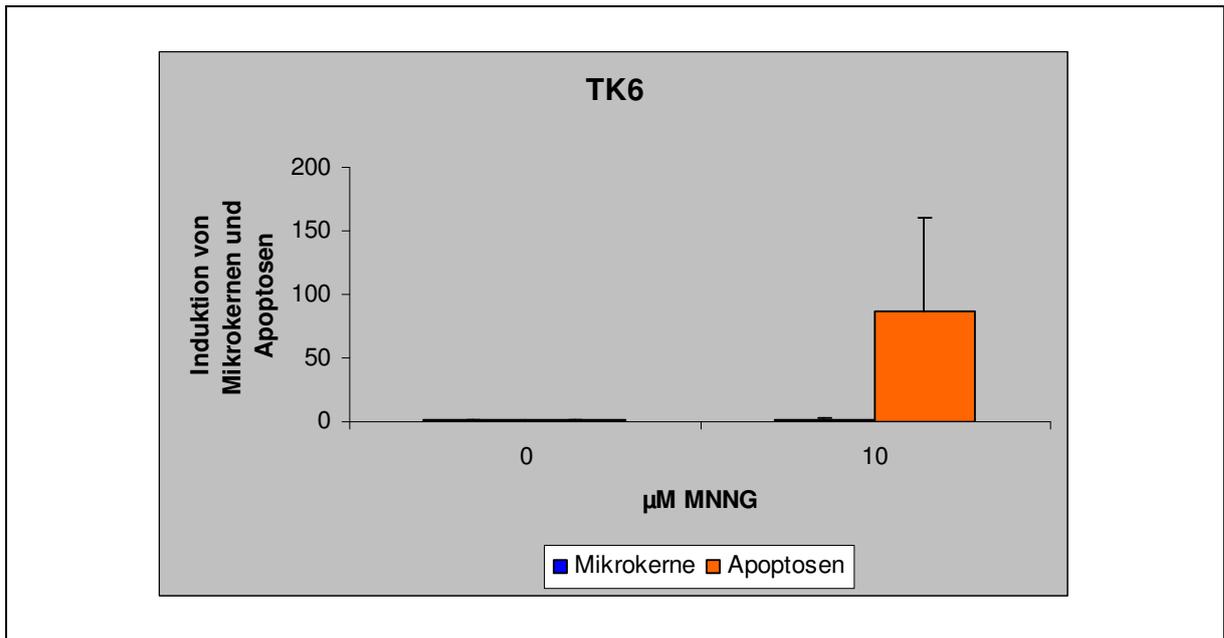


Abb. 21: Zelluläre Antwort der MMR-profizienten Zellen TK6 nach Behandlung mit MNNG im Mikrokerntest: TK6-Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle) und 10µM MNNG inkubiert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht, mit Acridinorange gefärbt und bei 500-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden zwei Objektträger und 1000 Zellen je Objektträger ausgezählt. Die Abbildung zeigt den gemittelten Wert aus vier unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die Kontrollwerte wurden gleich 1 gesetzt und die restlichen Werte darauf bezogen.

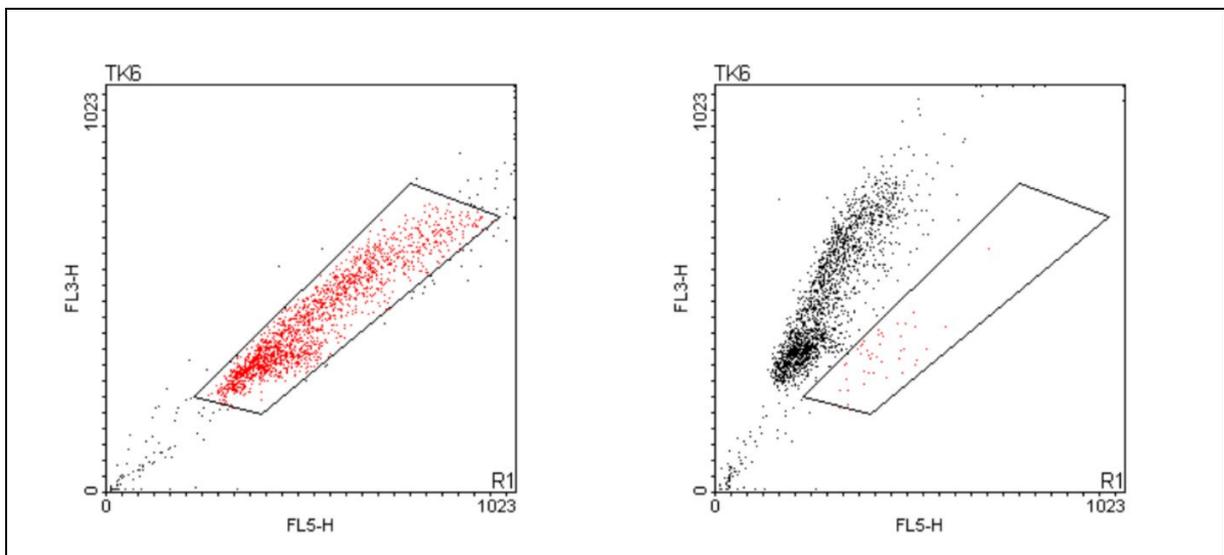


Abb. 22: Proliferationsnachweis der TK6-Suspensionszellen mittels Durchflusszytometrie: TK6-Zellen wurden während der 24-stündigen Behandlung mit 25µM-O⁶-Benzylguanin und 10µM MNNG zusätzlich mit 50µM BrdU behandelt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Links sind die mit MNNG behandelten Zellen in Abwesenheit von BrdU, rechts in Anwesenheit von BrdU dargestellt. Das „gate“ wurde von den Zellen ohne BrdU auf die Zellen mit BrdU gesetzt und macht deutlich, welche Zellen durch Inkorporation von BrdU aus dem „gate“ nach links verschoben sind.

Auch in den MMR-profizienten TK6-Zellen konnte entsprechend der Erwartung eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden (über 80-fache Induktion), während auch hier die Mikrokernrate nahezu unverändert blieb (1,7-fache Induktion) (Abb. 21). Der Proliferationsnachweis dieser Zelllinie während des Versuchsablaufs zeigt eine komplette Linksverschiebung der Zellen in der Dot-Blot-Darstellung (Abb. 22) und somit eine Proliferation für alle Zellen.

3.2.1.3 HCT116-Zellen

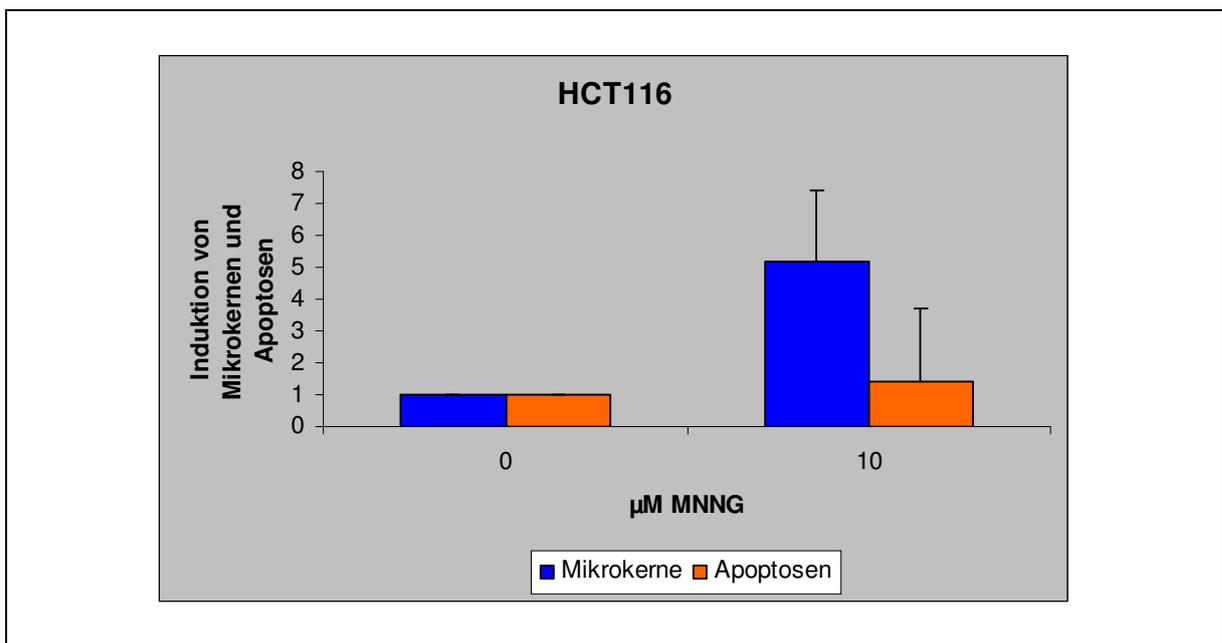


Abb. 23: Zelluläre Antwort der MMR-defizienten Zellen HCT116 nach Behandlung mit MNNG im Mikrokerntest: HCT116-Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle) und 10µM MNNG inkubiert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht, mit Acridinorange gefärbt und bei 500-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden zwei Objektträger und 1000 Zellen je Objektträger ausgezählt. Die Abbildung zeigt den gemittelten Wert aus sechs unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die Kontrollwerte wurden gleich 1 gesetzt und die restlichen Werte darauf bezogen.

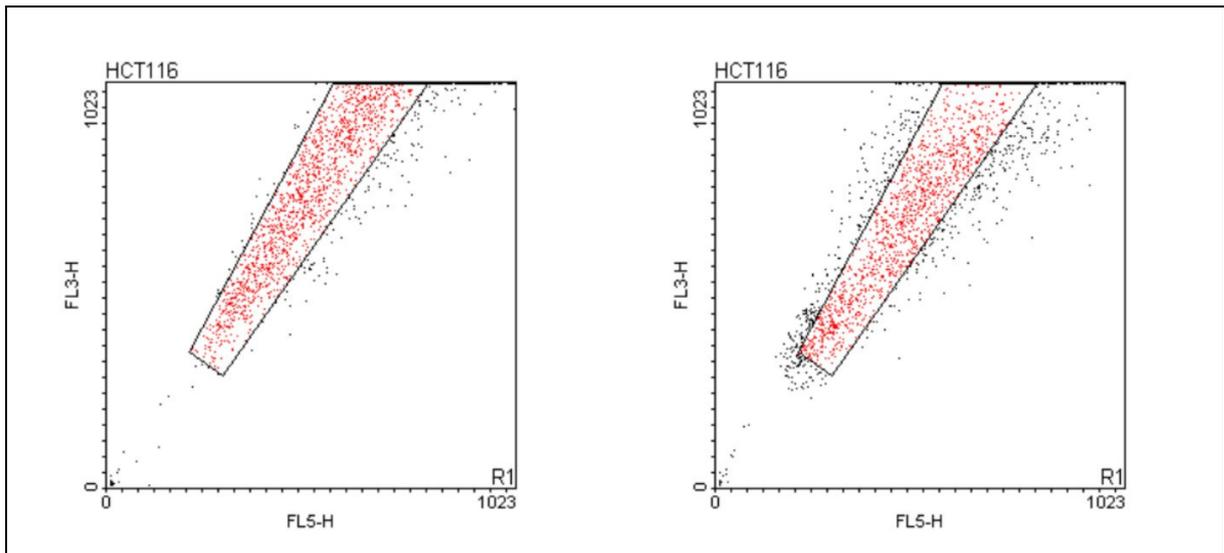


Abb. 24: Proliferationsnachweis der adhärennten HCT116 mittels Durchflusszytometrie: HCT116-Zellen wurden während der 24-stündigen Behandlung mit $25\mu\text{M}$ - O^6 -Benzylguanin und $10\mu\text{M}$ MNNG zusätzlich mit $50\mu\text{M}$ BrdU behandelt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Links sind die mit MNNG behandelten Zellen in Abwesenheit von BrdU, rechts in Anwesenheit von BrdU dargestellt. Das „gate“ wurde von den Zellen ohne BrdU auf die Zellen mit BrdU gesetzt und macht deutlich, welche Zellen durch Inkorporation von BrdU aus dem „gate“ nach links verschoben sind.

In MMR-defizienten HCT116-Zellen (Abb. 23). stieg die Mikrokernfrequenz auf den über 5-fachen Wert im Vergleich zur Kontrolle an, während die Apoptosen lediglich eine 1,4-fache Induktion aufwiesen. Wie die halbadhärennten Colo205-Zellen zeigten auch die HCT116-Zellen nur eine geringe Proliferation (nur sehr wenige Zellen zeigten eine durch den BrdU-Einbau bedingte Linksverschiebung) (Abb. 24).

3.2.1.4 L5178Y-Zellen

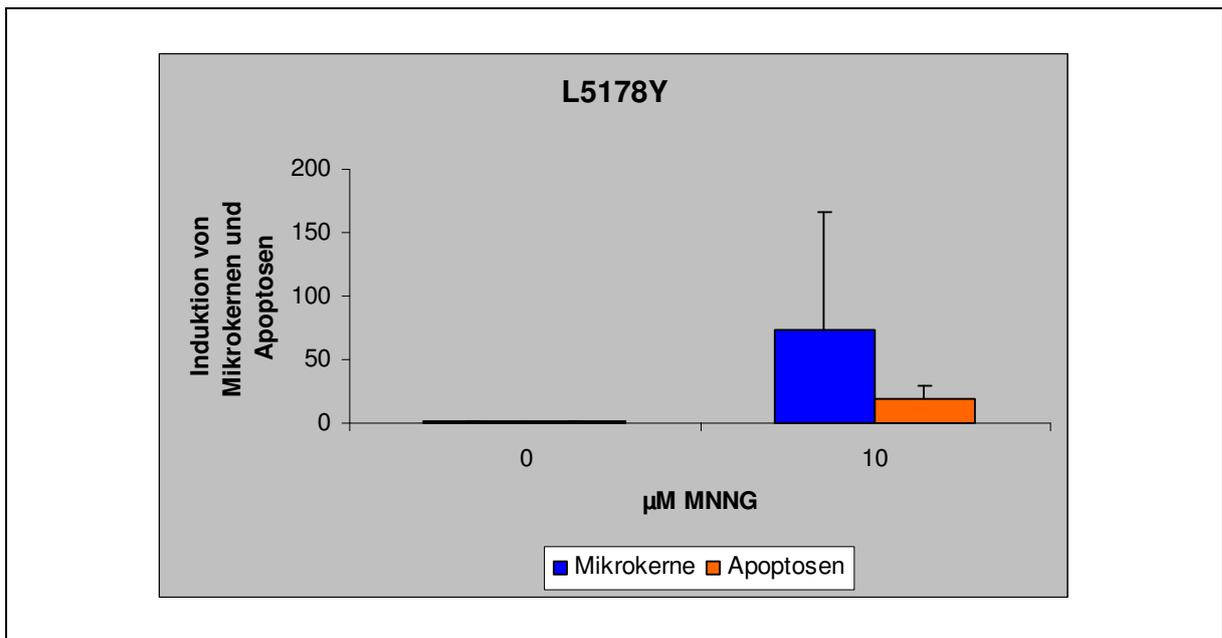


Abb. 25: Zelluläre Antwort der L5178Y Mauslymphomzellen nach Behandlung mit MNNG im Mikrokerntest: L5178Y-Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle) und 10µM MNNG inkubiert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht, mit Acridinorange gefärbt und bei 500-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden zwei Objektträger und 1000 Zellen je Objektträger ausgezählt. Die Abbildung zeigt den gemittelten Wert aus fünf unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die Kontrollwerte wurden gleich 1 gesetzt und die restlichen Werte darauf bezogen.

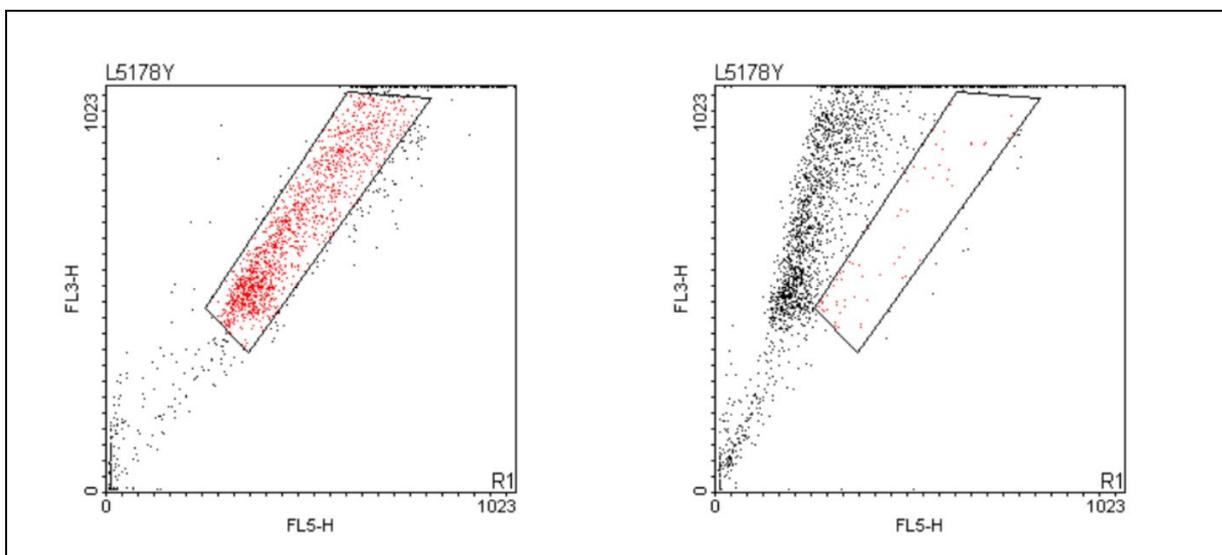


Abb. 26: Proliferationsnachweis der L5178Y-Zellen mittels Durchflusszytometrie: L5178Y-Zellen wurden während der 24-stündigen Behandlung mit 25µM-O⁶-Benzylguanin und 10µM MNNG zusätzlich mit 50µM BrdU behandelt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Links sind die mit MNNG behandelten Zellen in Abwesenheit von BrdU, rechts in Anwesenheit von BrdU dargestellt. Das „gate“ wurde von den Zellen ohne BrdU auf die Zellen mit BrdU gesetzt und macht deutlich, welche Zellen durch Inkorporation von BrdU aus dem „gate“ nach links verschoben sind.

Die Behandlung mit 10 μ M MNNG führte in den L5178Y-Zellen zu einer über siebzigfachen Mikrokerninduktion, während die Apoptoserate im Vergleich zu den Mikrokerneln nur geringfügig anstieg (von 0 Apoptosen in der Kontrolle auf 18 Apoptosen in den behandelten Zellen) (Abb. 25). Wie die TK6-Suspensionszellen zeigten auch die L5178Y-Zellen eine komplette Linksverschiebung im Dot-Blot (Abb. 26) und somit eine unbeeinträchtigte Proliferation.

Der Vergleich der zellulären Antworten der unterschiedlichen Zelllinien zeigte für L5178Y-Zellen ein den HCT116-Zellen ähnliches Verhalten (Anstieg der Mikrokerne bei kaum veränderter Apoptoserate). Ein Unterschied der beiden Zelllinien bestand lediglich in der unterschiedlich hohen Induktionsrate der Mikrokerne (5,2-fach in HCT116; über 70-fach in L5178Y).

Zusammenfassung Abschnitt 3.2.1

Es konnte gezeigt werden, dass MMR-profiziente und –defiziente Zellen eindeutige Unterschiede in ihrer zellulären Antwort auf Behandlung mit MNNG aufzeigen. Während die MMR-profizienten Zellen mit einer Induktion von Apoptosen reagierten, zeigten MMR-defiziente Zellen eine hohe Mikrokernrate nach Behandlung mit MNNG. Der Vergleich der L5178Y-Zellen mit den MMR-profizienten und –defizienten Zellen ergab ein den MMR-defizienten Zellen entsprechendes Verhalten. Auffallend dabei war wieder die unterschiedlich starke Induktion von Mikrokerneln und Apoptosen in den verschiedenen Zelllinien.

Der Proliferationsnachweis mittels BrdU zeigte eine unbeeinträchtigte Proliferation der Suspensionszelllinien TK6 und L5178Y, während die adhärennten HCT116- und die halbadhärennten Colo205-Zellen sich nur zu einem sehr geringen Teil geteilt haben. Die sich teilenden Zellen zeigten aber den erwarteten Effekt.

3.2.2 Nachweis der MMR-Defizienz mittels Mikrokern-Test mit Cytochalasin B

Im Mikrokerntest konnte ein MMR-defizienter Phänotyp der L5178Y-Zellen gezeigt werden, wobei die Induktionsraten in den unterschiedlichen Zelllinien stark unterschiedlich waren (siehe 3.2.1). Fehler oder Verzerrungen der durch den Mikrokern-test gewonnenen Daten sollten deshalb durch den Mikrokern-test mit Cytochalasin B ausgeschlossen werden. Die Zugabe von Cytochalasin B während der Behandlung der Zellen und die anschließende Auswertung doppelkerniger Zellen ermöglicht eine Auszählung von Zellen, die sich genau einmal geteilt haben. Damit wurde nicht nur sichergestellt, dass die ausgewerteten Zellen proliferiert haben und damit in der Lage waren Genomschäden in Form von Mikrokernen und Apoptosen auszubilden, sondern es wurden auch Fehler oder Unterschiede aufgrund unterschiedlicher Generationszeiten ausgeschlossen. Gleichzeitig sollte durch den Mikrokern-Test mit Cytochalasin B sichergestellt werden, dass die zuvor eingesetzte MNNG-Konzentration von 10µM nicht zu hoch war und ebenfalls Verzerrungen der Ergebnisse hervorruft. Da zuvor nur MNNG-Konzentrationen ab 10µM getestet wurden, sollten geringere Konzentrationen eingesetzt werden, um zu gewährleisten, dass diese nicht höhere Schäden in den Zellen auslösen und die Konzentration von 10µM schon einen Rückgang dieser Schäden bewirkt.

Die Zellen TK6 (profizient), HCT116 (defizient) und L5178Y wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin 1h vorbehandelt und anschließend mit unterschiedlichen MNNG-Konzentrationen (0, 0,316, 1, 3,16 und 10µM) für 24h in Anwesenheit von 2µg/ml Cytochalasin B (TK6 und HCT116) und 5µg/ml Cytochalasin B (L5178Y) inkubiert. Anschließend wurde ein Mikrokern-test durchgeführt (2.3.9.2). Die Mikrokern- und Apoptosefrequenz der Kontrollen wurde gleich eins gesetzt und die Werte in den behandelten Zellen darauf bezogen.

3.2.2.1 TK6-Zellen

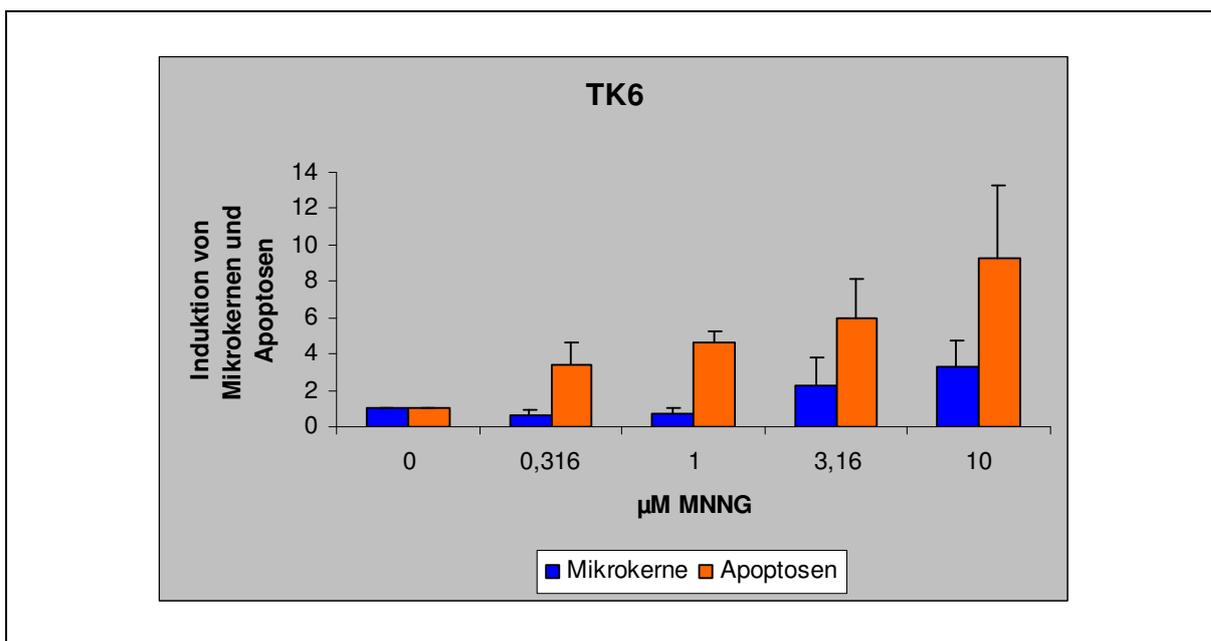


Abb. 27: Zelluläre Antwort der MMR-profizienten Zellen TK6 nach Behandlung mit MNNG im Mikrokerntest mit Cytochalasin B: TK6-Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle), 0,316µM, 1µM, 3,16µM und 10µM MNNG inkubiert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht, mit Acridinorange gefärbt und bei 500-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden zwei Objektträger und 1000 Zellen je Objektträger ausgezählt. Die Abbildung zeigt den gemittelten Wert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die Kontrollwerte wurden gleich 1 gesetzt und die restlichen Werte darauf bezogen.

Die MMR-profizienten TK6-Zellen zeigten dosisabhängig eine starke Induktion von Apoptosen (0,316µM 3,4-fach, 1µM 4,7-fach, 3,16µM 6-fach, 10mM 9,2-fach). Die Mikrokerne stiegen ebenfalls dosisabhängig an, waren aber im Vergleich zu den Apoptosen nur schwach induziert (0,316µM 0,6-fach, 1µM 0,7-fach, 3,16µM 2,3-fach, 10µM 3,2-fach) (Abb. 27).

3.2.2.2 HCT116-Zellen

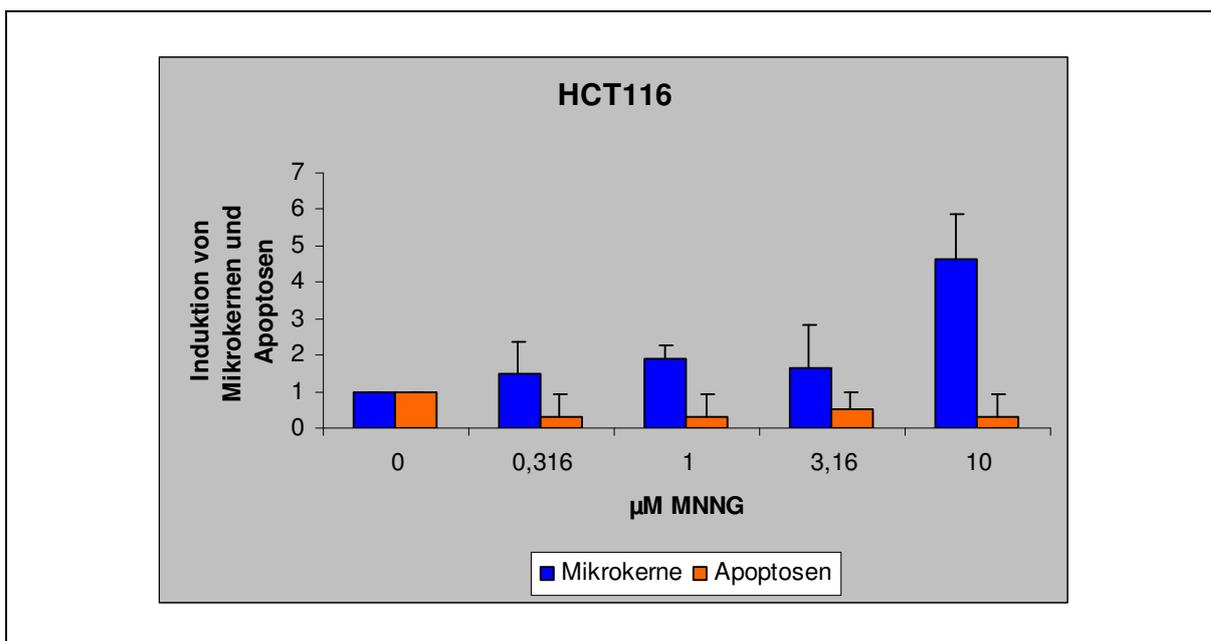


Abb. 28: Zelluläre Antwort der MMR-defizienten Zellen HCT116 nach Behandlung mit MNNG im Mikrokerntest mit Cytochalasin B: HCT116-Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle), 0,316µM, 1µM, 3,16µM und 10µM MNNG inkubiert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht, mit Acridinorange gefärbt und bei 500-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden zwei Objektträger und 1000 Zellen je Objektträger ausgezählt. Die Abbildung zeigt den gemittelten Wert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die Kontrollwerte wurden gleich 1 gesetzt und die restlichen Werte darauf bezogen.

Die MMR-defizienten HCT116-Zellen reagierten dosisabhängig mit einer Induktion der Mikrokern bis zu einem 4,6-fachen Wert nach Behandlung mit 10µM MNNG, wobei der Wert bei 3,16µM MNNG aus der Reihe fiel (0,316µM 1,5-fach, 1µM 1,9-fach, 3,16µM 1,6-fach, 10mM 4,6-fach). Die Apoptoserate nahm in den mit MNNG behandelten Kulturen im Vergleich zur Kontrolle ab (0,316µM 0,3-fach, 1µM 0,3-fach, 3,16µM 0,5-fach, 10µM 0,3-fach) (Abb. 28).

3.2.2.3 L5178Y-Zellen

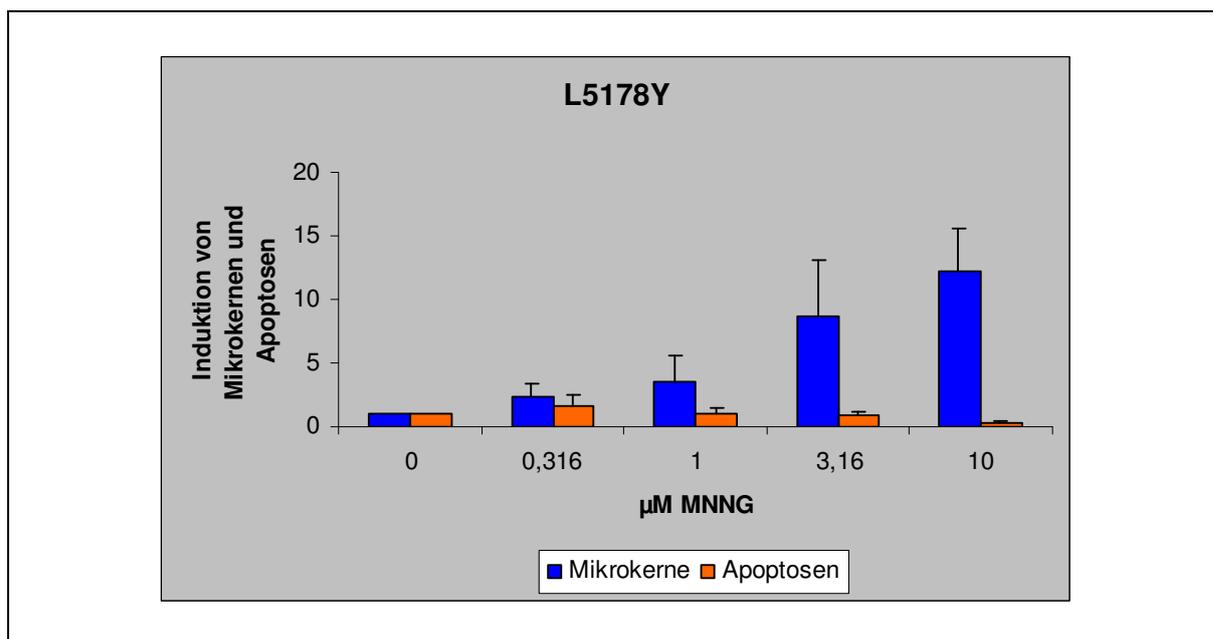


Abb. 29: Zelluläre Antwort der L5178Y Zellen nach Behandlung mit MNNG im Mikrokerntest mit Cytochalasin B: L5178Y-Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle), 0,316µM, 1µM, 3,16µM und 10µM MNNG inkubiert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht, mit Acridinorange gefärbt und bei 500-facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden zwei Objektträger und 1000 Zellen je Objektträger ausgezählt. Die Abbildung zeigt den gemittelten Wert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Die Kontrollwerte wurden gleich 1 gesetzt und die restlichen Werte darauf bezogen.

Auch die L5178Y-Zellen reagierten dosisabhängig mit einer starken Mikrokerninduktion mit bis zu einem 12,2-fachem Wert bei 10µM im Vergleich zur Kontrolle (0,316µM 2,4-fach, 1µM 3,5-fach, 3,16µM 8,6-fach, 10µM 12,2-fach). Die Apoptosen stiegen bei einer Konzentration von 0,316µM MNNG leicht an, gingen aber ab 3,16µM MNNG bis unter den Kontrollwert zurück (0,316µM 1,6-fach, 1µM 1,0-fach, 3,16µM 0,9-fach, 10mM 0,3-fach) (Abb. 29). Die L5178Y-Mauslymphomzelllinie zeigte auch im Mikrokerntest mit Cytochalasin B ein Verhalten wie die MMR-defiziente Zelllinie HCT116 und damit einen MMR-defizienten Phänotyp.

Zusammenfassung Abschnitt 3.2.2

Die Behandlung mit geringeren MNNG-Konzentrationen zeigte in allen Zelllinien einen dosisabhängigen Anstieg der Schäden mit einem Maximum bei 10µM MNNG. Damit konnte gezeigt werden, dass die vorher gewählte Konzentration von 10µM MNNG optimal war. Sowohl die Werte für die Mikrokerninduktion als auch die der

Apoptoseinduktion konnten durch die Anwendung des Mikrokerntests mit Cytochalasin B auf ähnliche Werte angeglichen werden (Induktionen zwischen 4,6 und 12,2). Der im Mikrokerntest beobachtete MMR-defiziente Phänotyp der L5178Y-Zelllinie wurde im Mikrokerntest mit Cytochalasin B bestätigt.

3.2.3 Nachweis der MMR-Defizienz in L5178Y mittels Comet Assay

Sowohl im Mikrokerntest als auch im Mikrokerntest mit Cytochalasin B konnte ein MMR-defizienter Phänotyp der L5178Y-Mauslymphomzelllinie gezeigt werden. Diese MMR-Defizienz sollte durch einen weiteren Endpunkt im Comet Assay bestätigt werden. Zudem sollte gezeigt werden, dass eine in L5178Y-Zellen vorhandene p53-Mutation (Storer et al., 1997; Clark et al., 1998) keinen Einfluss auf das Verhalten der Zellen auf die Behandlung mit MNNG hat. Dafür wurden neben den bekannten MMR-profizienten und –defizienten Zelllinien für den Comet Assay auch WTK1-Zellen eingesetzt, die MMR-profizient sind, aber eine, den L5178Y-Zellen vergleichbare p53-Mutation aufweisen (Little et al., 1995; Phillips et al., 1995; Xia et al., 1995).

Die verschiedenen MMR-profizienten Zellen (TK6 und WTK1) sowie MMR-defiziente Zellen (HCT116) wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend mit DMSO und 10µM MNNG für 24h inkubiert (2.3.7). Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet und ein Comet Assay (2.3.8) durchgeführt. Die einzelnen Zellen wurden bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Anschließend wurden die durch MNNG induzierten Schäden in unterschiedliche Schadensklassen eingeteilt und diese grafisch dargestellt.

3.2.3.1 TK6-Zellen

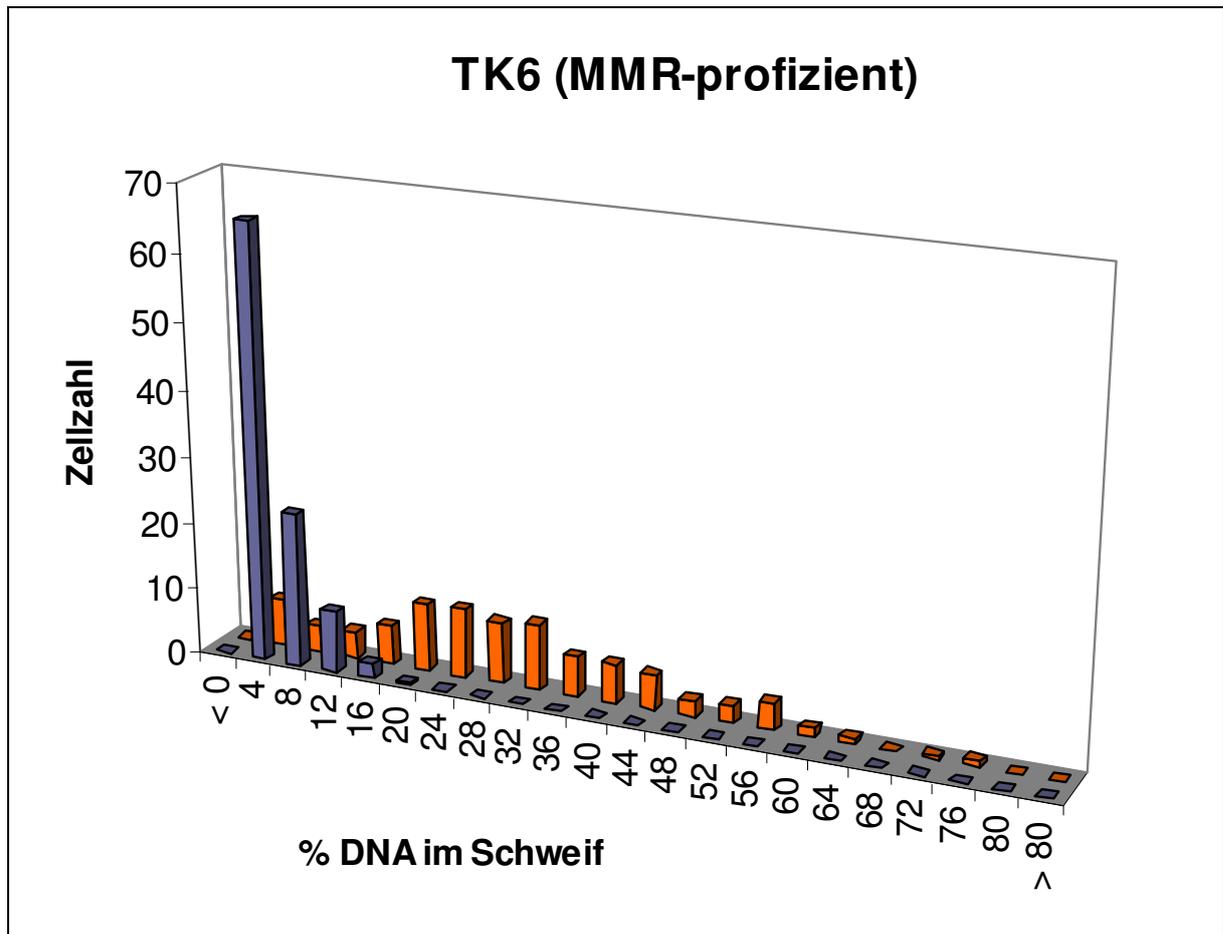


Abb. 30: Zelluläre Antwort der TK6-Zellen nach Behandlung mit MNNG im Comet Assay: TK6-Zellen wurden mit $25\mu\text{M}$ O^6 -Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle) und $10\mu\text{M}$ MNNG inkubiert. Anschließend wurde ein Comet Assay durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Verteilung der Schadensklassen der unbehandelten (blaue Säulen) und der behandelten (orange Säulen) TK6-Zellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten.

Während die MMR-profizienten, unbehandelten TK6-Zellen Schäden bis maximal 20% DNA im Schweif aufwiesen (blaue Säulen), zeigten die behandelten TK6-Zellen eine Verteilung der Zellen über nahezu alle Schadensklassen (orange Säulen in Abb. 30).

3.2.3.2 WTK1-Zellen

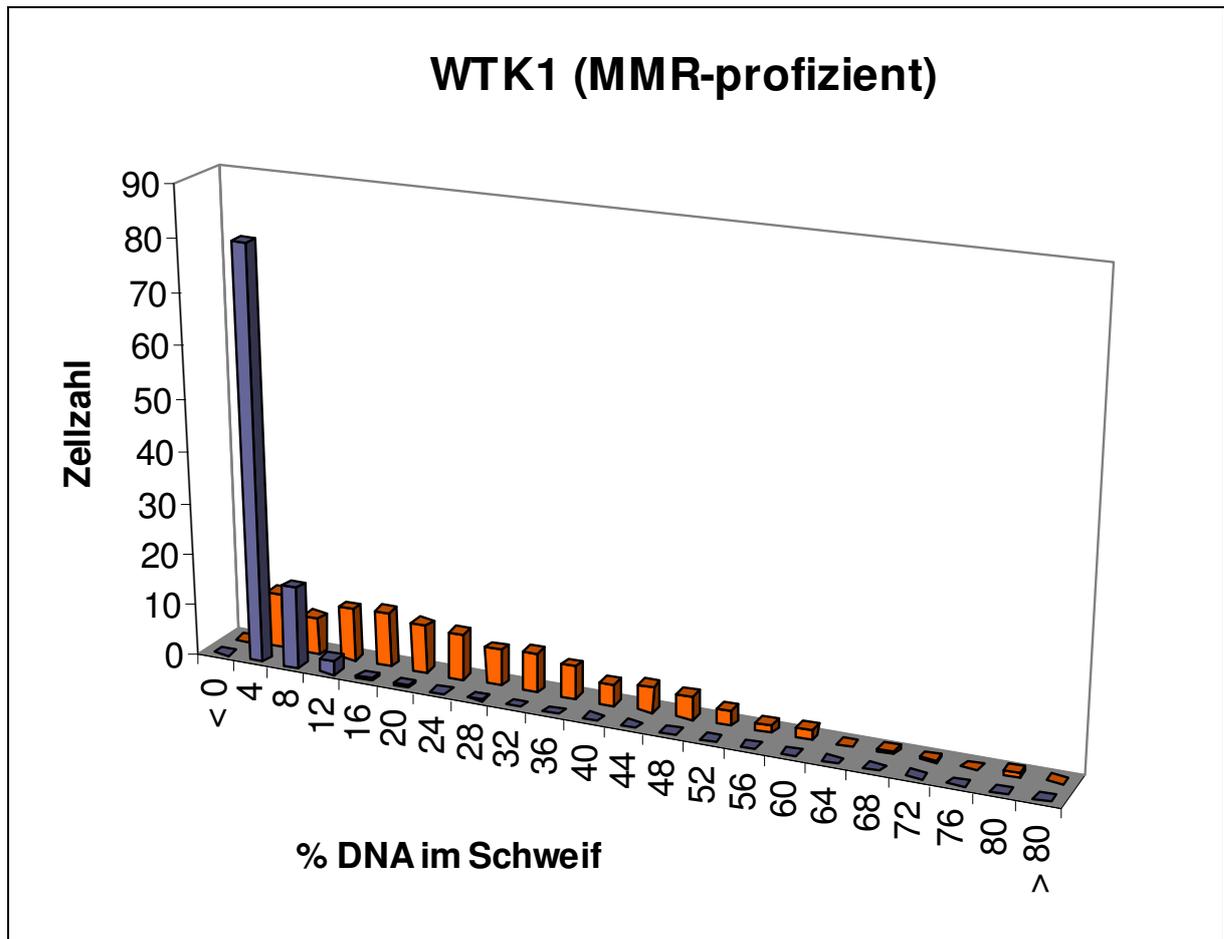


Abb. 31: Zelluläre Antwort der WTK1-Zellen nach Behandlung mit MNNG im Comet Assay: WTK1-Zellen wurden mit 25 μ M O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle) und 10 μ M MNNG inkubiert. Anschließend wurde ein Comet Assay durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Verteilung der Schadensklassen der unbehandelten (blaue Säulen) und der behandelten (orange Säulen) WTK1-Zellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten.

Die unbehandelten MMR-profizienten WTK1-Zellen wiesen Schäden bis maximal 12% DNA im Schweif auf (blaue Säulen), während die behandelten WTK1-Zellen, vergleichbar den TK6-Zellen, ebenfalls eine Verteilung über fast alle Schadensklassen zeigten (orange Säulen in Abb. 31).

3.2.3.3 HCT116-Zellen

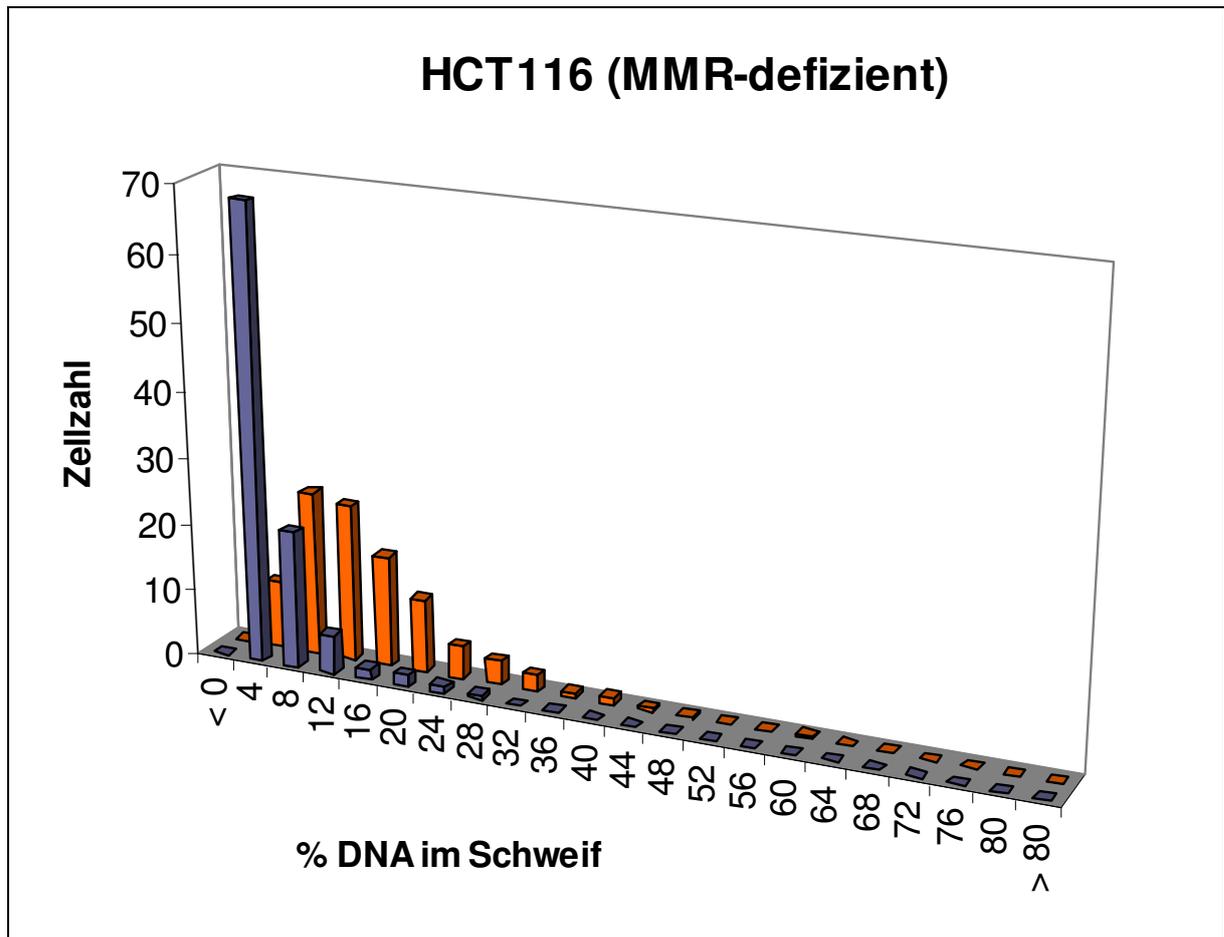


Abb. 32: Zelluläre Antwort der HCT116-Zellen nach Behandlung mit MNNG im Comet Assay: HCT116-Zellen wurden mit 25µM O⁶-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle) und 10µM MNNG inkubiert. Anschließend wurde ein Comet Assay durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Verteilung der Schadensklassen der unbehandelten (blaue Säulen) und der behandelten (orange Säulen) HCT116-Zellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten.

Die MMR-defizienten HCT116-Zellen wiesen in der unbehandelten Kontrolle einen Schaden von bis zu 24% DNA im Schweif auf (blaue Säulen). Die behandelten Zellen (orange Säulen) zeigten nur einen geringfügig größeren Prozentsatz der DNA im Schweif. Der maximale Schaden betrug 40% DNA im Schweif. Die MMR-defizienten und -profizienten Zellen unterscheiden sich damit eindeutig in der Verteilung der Schadenklassen (Abb. 32).

3.2.3.4 L5178Y-Zellen

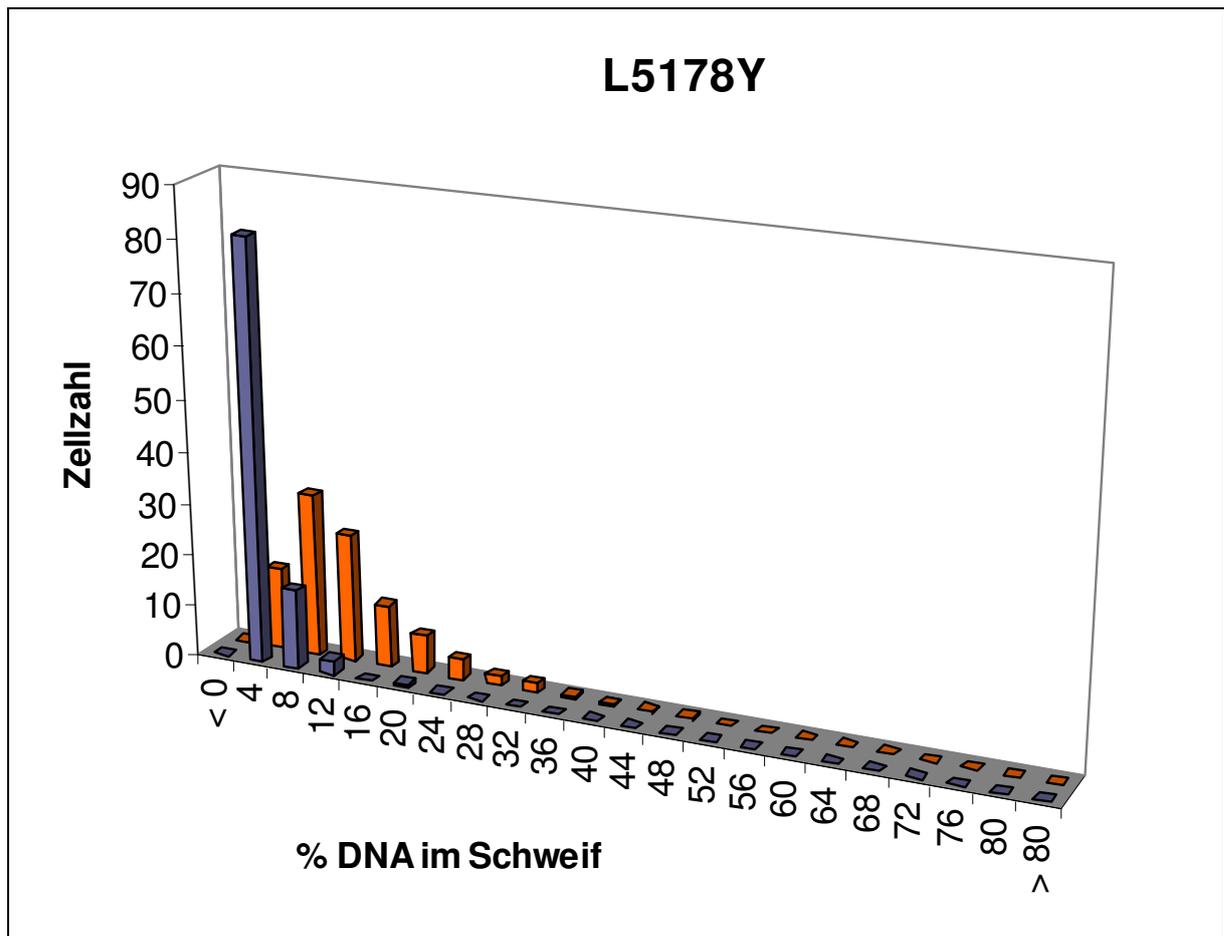


Abb. 33: Zelluläre Antwort der L5178Y-Zellen nach Behandlung mit MNNG im Comet Assay: L5178Y-Zellen wurden mit 25 μ M O6-Benzylguanin vorbehandelt und anschließend für 24h mit DMSO (Kontrolle) und 10 μ M MNNG inkubiert. Anschließend wurde ein Comet Assay durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Verteilung der Schadensklassen der unbehandelten (blaue Säulen) und der behandelten (orange Säulen) L5178Y-Zellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten.

Die L5178Y-Kontrollzellen wiesen Schäden auf, die denen anderer Kontrollzellen (TK6, WTK1 und HCT116) vergleichbar waren (blaue Säulen). Nach Behandlung mit MNNG zeigten sie, wie die MMR-defizienten HCT116-Zellen, eine Schadensverteilung in den unteren Schadensklassen (Maximum bei 32% DNA im Schweif) (orange Säulen). Damit verhielten sie sich auch im Comet Assay wie die MMR-defizienten Kontrollzellen (Abb. 33).

Zusammenfassung Abschnitt 3.2.3

Die durch Behandlung mit MNNG ausgelösten Reaktionen MMR-profizienter und –defizienter Zellen konnten auch im Comet Assay gezeigt werden. Dabei konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die p53-Mutation in der MMR-profizienten Zelllinie

WTK1 nicht nachteilig auf die für MMR-profiziente Zellen typische Reaktion auswirkte. Die WTK1-Zellen zeigten das gleiche Verhalten wie die TK6-Zellen ohne die p53-Mutation. Die L5178Y-Zellen verhielten sich auch im Comet Assay wie die MMR-defizienten HCT116-Zellen. Der MMR-defiziente Phänotyp der L5178Y-Zellen wurde damit nochmals bestätigt.

3.3 Untersuchung der molekularen Ursache für die MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen

Sowohl im Mikrokernstest mit und ohne Cytochalasin B, als auch im Comet Assay konnte gezeigt werden, dass die L5178Y-Zellen einen MMR-defizienten Phänotyp aufweisen. Für diesen Phänotyp sollte die molekulare Grundlage gefunden werden. Mittels Western Blot Analysen sollte ermittelt werden, ob eine mögliche fehlende oder veränderte Expression von MMR-Proteinen Ursache des gezeigten MMR-Phänotyps von L5178Y sein könnte. Dazu wurden unterschiedliche Zelllinien (TK6, WTK1, HCT116, HC, Colo205 und L5178Y) kultiviert (2.3.2), wie unter 2.3.5.1 beschrieben aufgeschlossen und anschließend eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt (2.3.4.1). Aus den Zellextrakten wurden SDS-Proben gleicher Proteinkonzentrationen hergestellt (2.3.5.2) und gleiche Mengen davon in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (2.3.5.3). Die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (2.3.5.5) und die Proteine anschließend mittels Immunodetektion sichtbar gemacht (2.3.6.1). Um die aufgetragenen Proteinmengen zu überprüfen, wurden die vorher verwendeten Antikörper von der Membran gewaschen (2.3.6.2) und diese anschließend zur Detektion mit Tubulin-Antikörper eingesetzt (2.2.7). Aufgetragen wurden immer eine Positiv- und eine Negativkontrolle (sofern Zelllinien dafür vorhanden waren), sowie L5178Y-Zellen. Western Blot Analysen wurden für die drei MMR-Proteine MLH1, MSH2 und MSH6 durchgeführt. Für die restlichen MMR-Proteine konnten keine geeigneten Antikörper gefunden werden.

3.3.1 Untersuchung der molekularen Ursache der MMR-Defizienz auf Proteinebene

3.3.1.1 Expression des MLH1-Proteins in L5178Y-Zellen

Zur Überprüfung der Expression von MLH1 wurden Zellkulturen unterschiedlicher Zelllinien angezogen (2.3.2), die Zellen geerntet und aufgeschlossen (2.3.5.1). Je 20µg Gesamtprotein von TK6-Zellen (Positivkontrolle), von HCT116-Zellen (Negativkontrolle) sowie von L5178Y-Zellen wurden in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (2.3.5.3), auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (2.3.5.5) und diese anschließend zur immunologischen Detektion mit MLH1-Antikörpern (eingesetzte Verdünnung siehe 2.2.7) eingesetzt (2.3.6.1). MLH1 hat ein Molekulargewicht von 83kDa und kann als Bande bei der 85kDa-Markerbande erkannt werden. Abb. 34 zeigt eine solche Bande in der Probe von TK6, während in der Probe von HCT116-Zellen, die kein funktionelles MLH1 besitzen und somit als Negativkontrolle dienten, keine Bande auf dieser Höhe nachgewiesen werden konnte. L5178Y-Zellen zeigten eine der Positivkontrolle vergleichbare Bande.

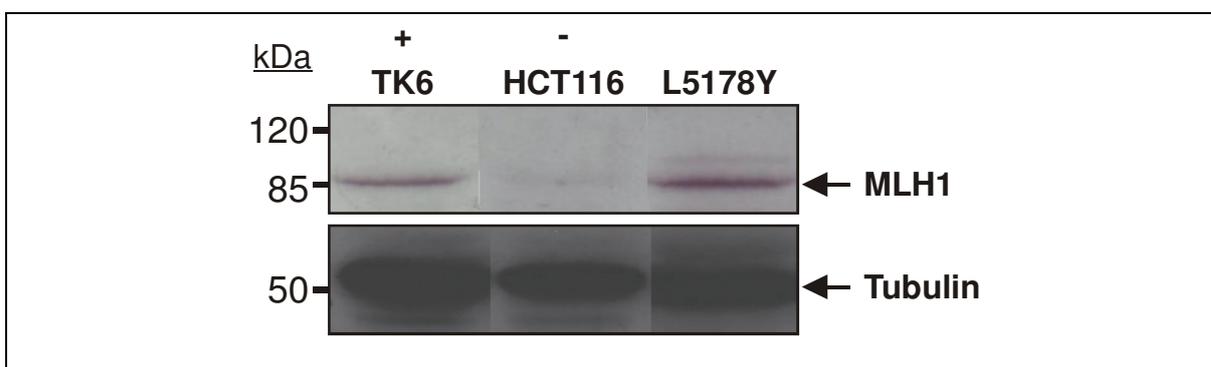


Abb. 34: Überprüfung der Expression von MLH1 in L5178Y-Zellen mittels Western Blot Analyse: Je 20µg Gesamtprotein von TK6 (Positivkontrolle), HCT116 (Negativkontrolle) und L5178Y wurden in einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die anschließende Detektion des MLH1-Proteins mittels MLH1-Antikörper zeigt die unterschiedliche Expression des Proteins in Positivkontrolle (+) und Negativkontrolle (-) sowie die Expression in L5178Y-Zellen. Die Abbildung zeigt Proben, die in demselben Gel aufgetrennt wurden, wobei die Reihenfolge der Proben später mithilfe von Bildbearbeitungsprogrammen verändert wurde.

3.3.1.2 Expression des MSH2-Proteins in L5178Y-Zellen

Zur Überprüfung der Expression von MSH2 wurden Zellkulturen unterschiedlicher Zelllinien (TK6, HC und L5178Y) angezogen (2.3.2), die Zellen geerntet und aufgeschlossen (2.3.5.1). Je 20µg Gesamtprotein von TK6-Zellen (Positivkontrolle), von HC-Zellen (Negativkontrolle) sowie von L5178Y-Zellen wurden in einem Polyacryla-

mid-Gel aufgetrennt (2.3.5.3), auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (2.3.5.5) und diese anschließend zur immunologischen Detektion mit MSH2-Antikörpern eingesetzt (2.3.6.1). MSH2 hat ein Molekulargewicht von 100kDa. Abb. 35 zeigt, dass auch MSH2 in L5178Y-Zellen exprimiert wurde. In der Positivkontrolle ist eindeutig eine starke Bande zwischen der 85kd- und 120kd-Markerbande zu erkennen, die die MMR-defizienten HC-Zellen, die als Negativkontrolle dienten, nicht zeigen. Die Expression in L5178Y ist vergleichbar der Expression in TK6.

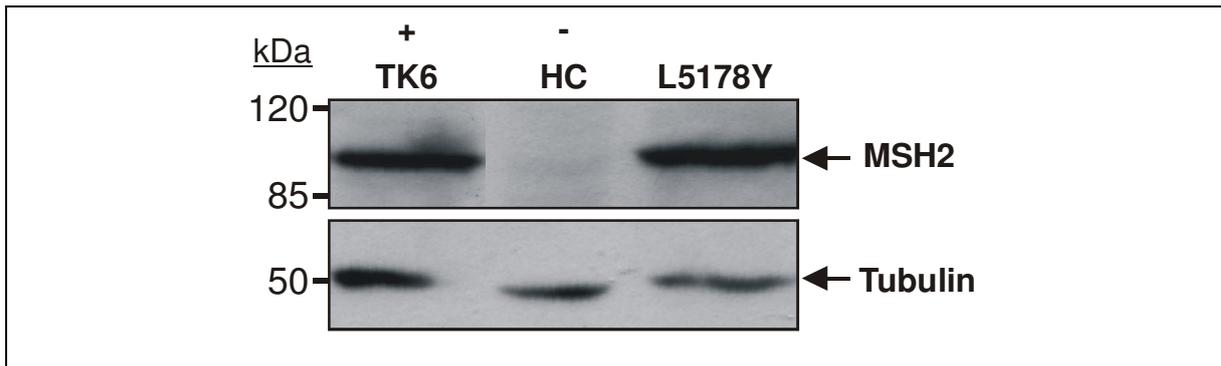


Abb. 35: Überprüfung der Expression von MSH2 in L5178Y-Zellen mittels Western Blot Analyse: Je 20µg Gesamtprotein von TK6 (Positivkontrolle), HC (Negativkontrolle) und L5178Y wurden in einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die anschließende Detektion des MSH2-Proteins mittels MSH2-Antikörper zeigt die unterschiedliche Expression des Proteins in Positivkontrolle (+) und Negativkontrolle (-) sowie die Expression in L5178Y-Zellen. Die Abbildung zeigt Proben, die in demselben Gel aufgetrennt wurden, wobei die Reihenfolge der Proben später mithilfe von Bildbearbeitungsprogrammen verändert wurde.

3.3.1.3 Expression des MSH6-Proteins in L5178Y-Zellen

Zur Überprüfung der Expression von MSH6 wurden Zellkulturen unterschiedlicher Zelllinien (TK6, HCT15 und L5178Y) angezogen (2.3.2)), die Zellen geerntet und aufgeschlossen (2.3.5.2)). Je 20µg Gesamtprotein von TK6-Zellen (Positivkontrolle), von HCT15-Zellen (Negativkontrolle) sowie von L5178Y-Zellen wurden in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (2.3.5.3), auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (2.3.5.5) und diese anschließend zur immunologischen Detektion mit MSH6-Antikörpern eingesetzt (2.3.6.1). MSH6 hat ein Molekulargewicht von 160kDa. MSH6 konnte als eine Bande auf einer Höhe von über 120kDa nachgewiesen werden. Diese Bande war in der Positivkontrolle deutlich erkennbar, während sie in der Negativkontrolle nicht nachweisbar war. Eine Expression von MSH6 in L5178Y-Zellen konnte damit nachgewiesen werden (Abb. 36).

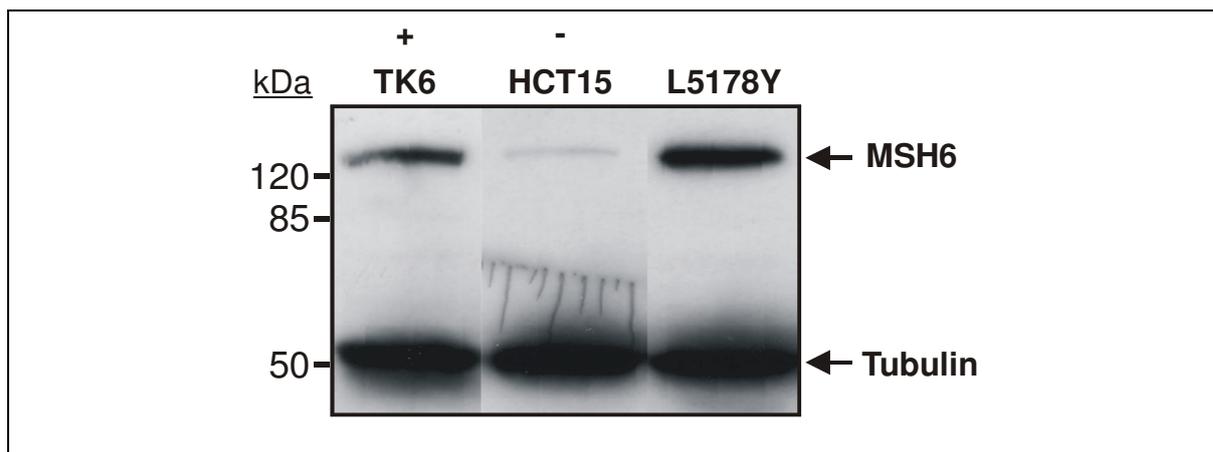


Abb. 36: Überprüfung der Expression von MSH6 in L5178Y-Zellen mittels Western Blot Analyse: Je 20µg Gesamtprotein von TK6 (Positivkontrolle), HCT15 (Negativkontrolle) und L5178Y wurden in einem 12%-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die anschließende Detektion des MSH6-Proteins mittels MSH6-Antikörper zeigt die unterschiedliche Expression des Proteins in Positivkontrolle (+) und Negativkontrolle (-) sowie die Expression in L5178Y Zellen. Die Abbildung zeigt Proben, die in demselben Gel aufgetrennt wurden, wobei die Reihenfolge der Proben später mithilfe von Bildbearbeitungsprogrammen verändert wurde.

Zusammenfassung Abschnitt 3.3.1

Die Expression der drei MMR-Proteine MLH1, MSH2 und MSH6, die eine entscheidende Rolle bei der MMR spielen, konnte nachgewiesen werden. Es zeigten sich im Vergleich zu den Positivkontrollen keine Unterschiede in der Expressionshöhe. Für PMS2, dessen Expression ebenfalls überprüft werden sollte, konnte aufgrund unspezifischer Antikörperbindungen keine Aussage gemacht werden.

3.3.2 Untersuchung der molekularen Ursache der MMR-Defizienz auf DNA-Ebene

Durch Western-Blot-Analysen der drei möglichen MMR-Proteine, für die geeignete Antikörper vorhanden waren, konnte kein Hinweis auf eine molekulare Ursache für den gezeigten MMR-defizienten Phänotyp der L5178Y-Mauslymphomzelllinie gefunden werden. Die Ursache sollte deshalb auf DNA-Ebene durch die Sequenzierung der kodierenden Bereiche aller MMR-Gene (cDNA) ermittelt werden.

Für die Sequenzierung wurden L5178Y-Zellen wie unter 2.3.2 beschrieben kultiviert, Gesamt-RNA isoliert (2.3.3.1) und die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben (2.3.3.2). Die cDNA wurde anschließend zur Amplifikation einzelner Bereiche der MMR-cDNA durch PCR eingesetzt (2.3.3.4). Die PCR-Bedingungen für die jeweiligen Fragmente der unterschiedlichen MMR-Gene sind unter 2.2.9.1 beschrieben und

werden nicht mehr einzeln erwähnt. Einige Primer führten nicht zur Amplifikation der erwünschten Bereiche. Für diese wurden neue Primer synthetisiert und/oder eine Kombination aus vorhandenen Forward- und Reversprimern eingesetzt. Die amplifizierten Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung (2.3.3.6) aus dem Agarosegel eluiert (2.3.3.7) und nach Anhängen eines 3'-terminalen Adenosins (nach PCR mit Vent-Polymerase) (2.3.3.5) mit dem Vektor pGEM-T-Easy ligiert (2.3.3.8.1). Die so entstandenen Plasmide wurden in *E. coli DH5 α* transformiert (2.3.3.9) und anschließend auf LB-Platten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal ausplattiert (2.3.1.2). Die Selektion der Bakterien, die mit einem Insert-tragenden Plasmid transformiert wurden, erfolgte durch Blau-Weiß-Selektion (2.3.3.10). Eine anschließende Kolonie-PCR (2.3.3.11) diente der Überprüfung der Inserts. Nach einer Übernachtskultur der positiven Kolonien (2.3.1.1) wurden die Plasmide isoliert (2.3.3.12) und einer weiteren Überprüfung durch Restriktionsverdau (2.3.3.14.1) unterzogen. Je 10 μ g Plasmid-DNA wurden präzipitiert (2.3.3.13) und zur Sequenzierung zu MWG Biotech nach Ebersberg geschickt. Es wurde ein sogenannter „Comfort-Read“ unter Verwendung der Primer M13 uni (-21) und M13 rev (-29) (Sequenzen auf dem Vektor pGEM-T-Easy vorhanden) durchgeführt.

Unter Verwendung des bei NCBI zur Verfügung stehenden Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) wurden die sequenzierten Bereiche der L5178Y-cDNA mit der entsprechenden Referenzsequenz verglichen. Gefundene Veränderungen, die für die MMR-Defizienz der L5178Y-Zellen verantwortlich gemacht werden können, wurden durch eine zusätzliche Sequenzierung der nicht klonierten PCR-Produkte überprüft (*mlh1* und *pms2*). Dafür wurden amplifizierte cDNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und direkt zur Sequenzierung zu Eurofins Medigenomix nach Martinsried geschickt. Es wurde ein sogenannter „Classic Read“ mit den jeweiligen Primern, die zur Amplifikation eingesetzt wurden, durchgeführt.

Die amplifizierten cDNA-Bereiche, die verwendeten Primer sowie die sequenzierten Bereiche sind in Abbildungen in den jeweiligen Kapiteln grafisch dargestellt. Alle Abweichungen der sequenzierten Bereiche von den Referenzsequenzen wurden in diesen als weiße und schwarze Linien kenntlich gemacht. Viele der gezeigten Veränderungen waren nur in einer Sequenzierung zu finden, obwohl die Plasmide einmal durch den „forward“- und einmal durch den „revers“-Primer sequenziert wurden (wirkliche Mutationen wären bei den Sequenzierungen in beiden Richtungen zu fin-

den). Veränderungen, die nur in einer Sequenzrichtung desselben Fragments auftreten wurden deshalb auf Fehler bei der Sequenzierung zurückgeführt. Insbesondere gilt dies, wenn es sich um die Enden der sequenzierten Bereiche handelt, die erfahrungsgemäß sehr fehlerbehaftet sind. In den Abbildungen sind solche Veränderungen als weiße Linien dargestellt und wurden als wirkliche Abweichungen von der Referenzsequenz ausgeschlossen.

Die meisten MMR-Defizienzen werden durch Mutationen in den MMR-Genen *mlh1* und *msh2* verursacht. Deshalb wurde in dieser Arbeit mit der Suche nach Mutationen in den cDNA-Sequenzen dieser Gene begonnen. Nachdem sich aber die Gewinnung mancher cDNA-Fragmente als sehr schwierig herausstellte (PCR-Bedingungen mussten optimiert werden), wurde die cDNA aller bekannten und in die MMR-involvierten MMR-Proteine parallel amplifiziert und sequenziert. Die aus diesen Sequenzierungen gewonnenen Ergebnisse wurden nicht nach Wichtigkeit der Gene für die MMR geordnet, sondern nach der Bedeutsamkeit der gefundenen Veränderungen.

3.3.2.1 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *msh2*

Für die Sequenzierung der kodierenden Bereiche von *msh2* diente die bei NCBI unter der Accession Nummer NM_008628 (3079bp, mRNA mus musculus) veröffentlichte Referenzsequenz. Die Primer wurden unter Verwendung dieser Referenzsequenz ausgewählt und bei MWG, Ebersberg synthetisiert.

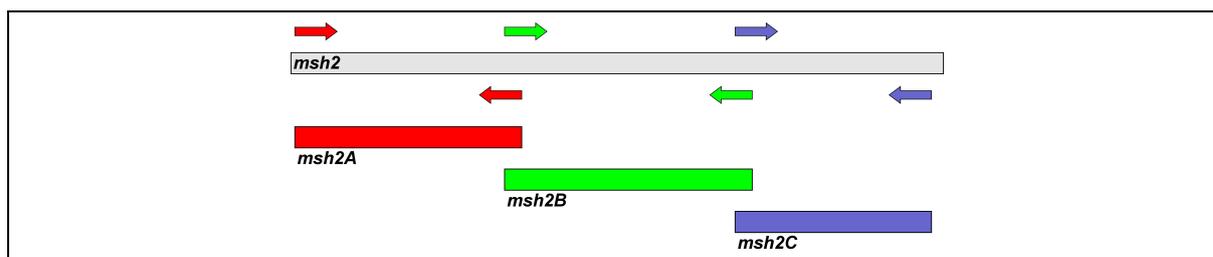


Abb. 37: Maßstabsgetreue Darstellung der *msh2*-cDNA und der amplifizierten Fragmente: Dargestellt ist die komplette *msh2*-cDNA (grau), die zur Amplifizierung einzelner kleinerer Bereiche der cDNA gewählten Primer (Pfeile) und die zugehörigen amplifizierten Fragmente (*msh2A*-*msh2C*) in den Farben der jeweiligen Primer.

Die Sequenzierung wurde wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt, wobei für die Amplifikation von *msh2*-Fragmenten die Primer so gewählt wurden, dass Fragmente einer Größe von etwa 1000 bp entstanden. Diese Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T-Easy kloniert (2.3.3.8.1) und die resultierenden Plasmide mit *ppmsh2A*, *ppmsh2B* und *ppmsh2C* bezeichnet. Abb. 37 zeigt die komplette *msh2*-cDNA und die

gewählten Primer, die zur Amplifikation der Fragmente *msh2A* (1071bp), *msh2B* (1169bp) und *msh2C* (927bp) führten.

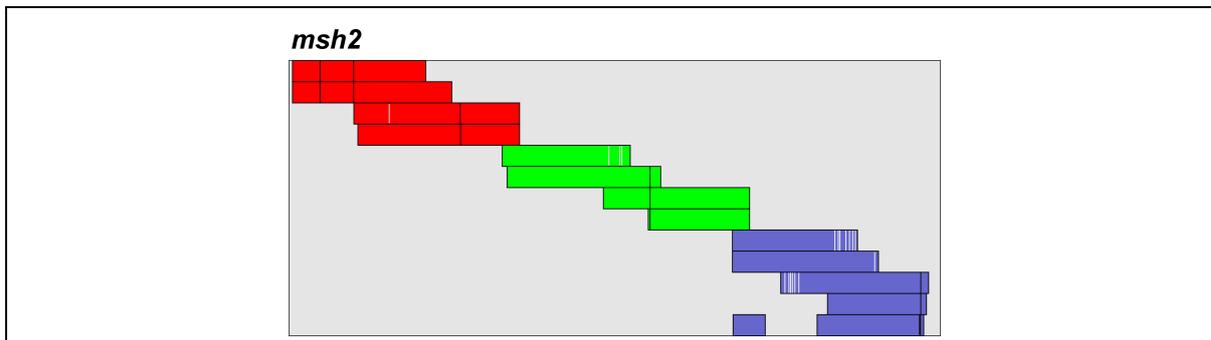


Abb. 38: Maßstabsgetreue Darstellung aller Veränderungen in den kodierenden Bereichen von L5178Y-*msh2*: Die sequenzierten cDNA-*msh2*-Fragmente aus L5178Y-Zellen wurden mit der bei NCBI veröffentlichten Referenzsequenz verglichen und alle zur Referenzsequenz gefundenen Veränderungen an der jeweiligen Position vermerkt (eingezeichnete Linien). Die weißen Linien kennzeichnen die Veränderungen, die auf eine fehlerhafte Sequenzierung zurückzuführen sind, die schwarzen Linien stellen alle anderen Veränderungen dar.

Nach Ausschluss der Sequenzierfehler (weiße Linien in Abb. 38) blieben folgende Veränderungen:

<u>Veränderung</u>	<u>Beschreibung</u>
1 147(C→T)	Austausch von Cytidin zu Thymin an Position 147
2 306(G→A)	Austausch von Guanin zu Adenin an Position 306
3 810/811(CC→TT)	Austausch von 2x Cytidin zu 2x Thymin bei bp 810/811
4 1707(A→G)	Austausch von Adenin zu Guanin an Position 1707
5 nt2980(insC)	Insertion eines Cytidins an Position 2980
6 2985(G→A)	Austausch von Guanin zu Adenin an Position 2985
7 2986(T→C)	Austausch von Thymin zu Cytidin an Position 2986

Diese Veränderungen wurden in die Referenzsequenz übernommen und anschließend unter <http://ca.expasy.org/tools/dna.html> in die Proteinsequenz übersetzt. Diese Proteinsequenz wurde unter <http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html> mit der Proteinreferenzsequenz verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die veränderten Nukleotide in der DNA-Sequenz nicht zum Austausch von Aminosäuren im Protein führen. Die DNA-Sequenz ist zwar an manchen Stellen gegenüber der Referenzsequenz verändert, diese Veränderungen führen aber durch den degenerierten Code für die Aminosäuren bzw. durch die Lokalisation der drei letzten Veränderungen nach dem Stop-Codon nicht zum Aminosäureaustausch und damit nicht zu einer Veränderung des Proteins.

3.3.2.2 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *msh6*

Für die Sequenzierung der kodierenden Bereiche von *msh6* diente die bei NCBI unter der Accession Nummer NM_010830 (4399bp, mRNA mus musculus) veröffentlichte Referenzsequenz. Die Primer wurden unter Verwendung dieser Referenzsequenz ausgewählt (2.2.8.1) und bei MWG, Ebersberg synthetisiert.

Die Sequenzierung wurde wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt, wobei für die Amplifikation von *msh6*-Fragmenten die Primer so gewählt wurden, dass Fragmente einer Größe von etwa 600bp-1400bp entstanden. Diese Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T-Easy kloniert (2.3.3.8.1) und die resultierenden Plasmide mit *ppmsh6A*, *ppmsh6B* und *ppmsh6C*, *ppmsh6D*, *ppmsh6E*, *ppmsh6F*, *ppmsh6G* und *ppmsh6H* bezeichnet. Abb. 39 zeigt die komplette *msh6*-cDNA und die gewählten Primer, die zur Amplifikation der Fragmente *msh6AB* (1411bp), *msh6B* (908bp), *msh6C* (1009bp), *msh6D* (1021bp), *msh6E* (818bp), *msh6F* (1109bp), *msh6G* (941bp) und *msh6H* (578bp) führten.

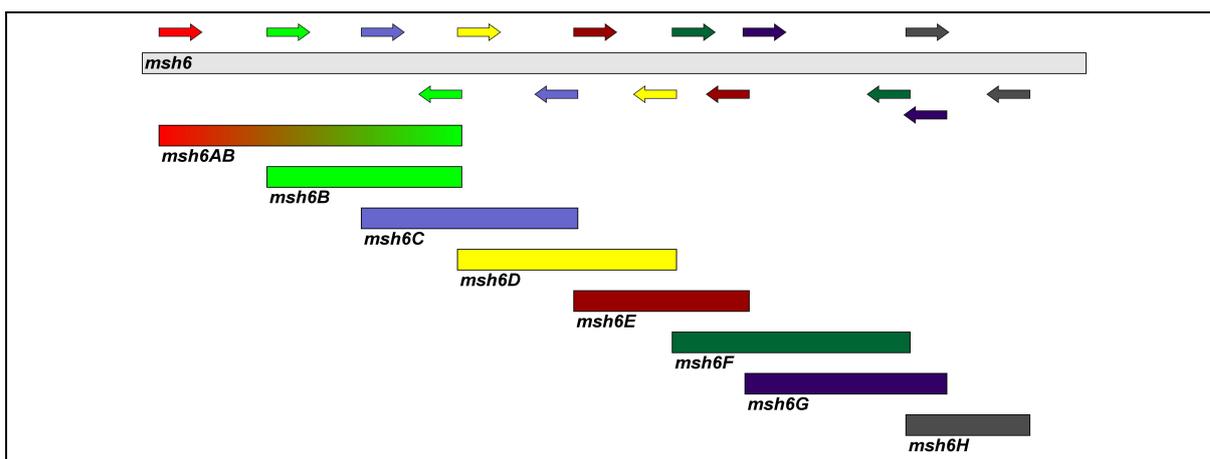


Abb. 39: Maßstabsgetreue Darstellung der *msh6*-cDNA und der amplifizierten Fragmente: Dargestellt ist die komplette *msh6*-cDNA (grau), die zur Amplifizierung einzelner kleinerer Bereiche der cDNA gewählten Primer (Pfeile) und die zugehörigen amplifizierten Fragmente (*msh6AB*-*msh6H*) in den Farben der jeweiligen Primer.

Nach Ausschluss der Veränderungen, die auf Fehler bei der Sequenzierung zurückgeführt wurden, blieben fünf weitere Veränderungen im Vergleich zur Referenzsequenz, die nicht sicher als Fehler bei der Sequenzierung ausgeschlossen werden konnten (Abb. 40). Alle Veränderungen wurden jeweils in nur einem Fragment gefunden, während sie in anderen nicht vorhanden waren.

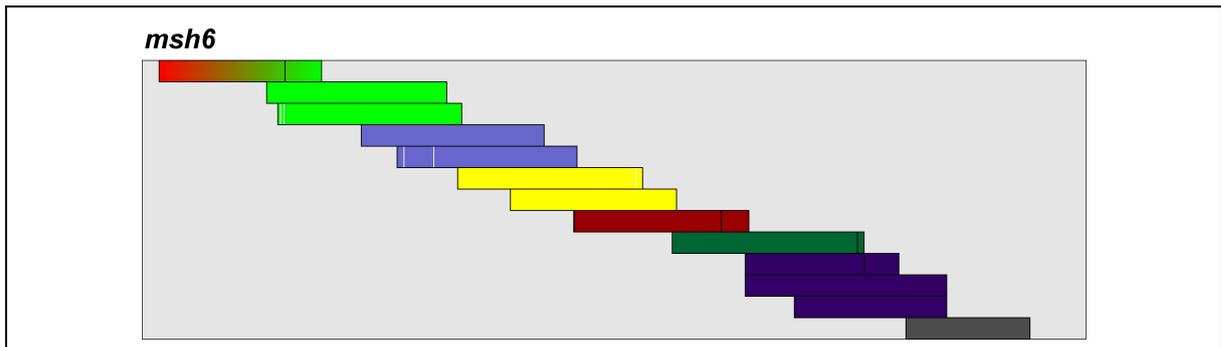


Abb. 40: Maßstabsgetreue Darstellung aller Veränderungen in den kodierenden Bereichen von L5178Y-*msh6*: Die sequenzierten cDNA-*msh6*-Fragmente aus L5178Y-Zellen wurden mit der bei NCBI veröffentlichten Referenzsequenz verglichen und alle zur Referenzsequenz gefundenen Veränderungen an der jeweiligen Position vermerkt (eingezeichnete Linien). Die weißen Linien kennzeichnen die Veränderungen, die auf eine fehlerhafte Sequenzierung zurückzuführen sind, die schwarzen Linien stellen alle anderen Veränderungen dar.

Auf die Übersetzung der L5178Y-*msh6*-Sequenz in die Aminosäuresequenz und den Vergleich dieser Sequenz mit der Proteinreferenzsequenz wurde verzichtet, da die gefundenen Insertions- und Deletionsmutationen zu Leserasterverschiebungen und damit zu keiner Übereinstimmung der Proteine ab bp666 führen würden.

<u>Veränderung</u>	<u>Bemerkung</u>
1 nt666(delG)	Deletion eines Guanosins an Position 666
2 2014C→G	Austausch von Cytidin durch Guanosin an Position 2014
3 nt2699(delT)	Deletion eines Thymidins an Position 2699
4 nt3333(delA)	Deletion eines Adenosins an Position 3333
5 3365 (insT)	Insertion eines Thymidins an Position 3365

3.3.2.3 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *pms1*

Für die Sequenzierung der kodierenden Bereiche von *pms1* diente die bei NCBI unter der Accession Nummer NM_153556 (3045bp, mRNA mus musculus) veröffentlichte Referenzsequenz. Die Primer wurden unter Verwendung dieser Referenzsequenz ausgewählt und bei MWG, Ebersberg synthetisiert.

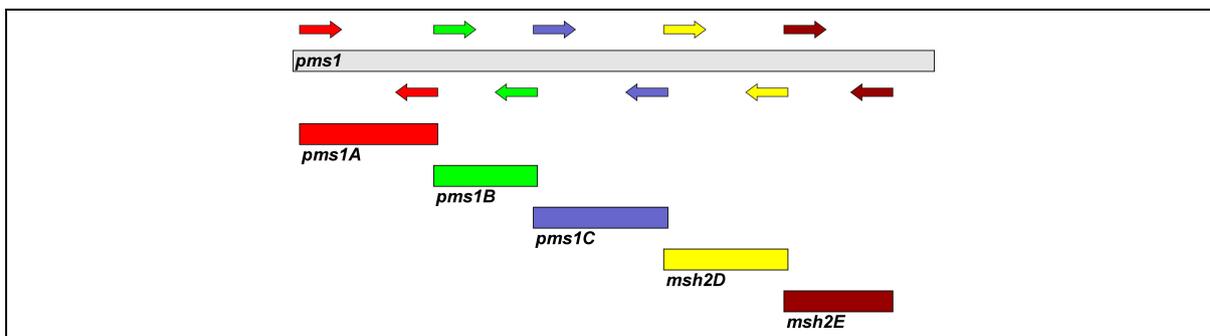


Abb. 41: Maßstabsgetreue Darstellung der *pms1*-cDNA und die amplifizierten Fragmente: Dargestellt ist die komplette *pms1*-cDNA (grau), die zur Amplifizierung einzelner kleinerer Bereiche der cDNA gewählten Primer (Pfeile) und die zugehörigen amplifizierten Fragmente (*pms1A*-*pms1E*) in den Farben der jeweiligen Primer.

Die Sequenzierung wurde wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt, wobei für die Amplifikation von *pms1*-Fragmenten die Primer so gewählt wurden, dass Fragmente einer Größe von etwa 500-700bp entstanden. Diese Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T-Easy kloniert (2.3.3.8.2) und die resultierenden Plasmide mit *ppms1A*, *ppms1B* und *ppms1C*, *ppms1D* und *ppms1E* bezeichnet. Abb. 41 zeigt die komplette *pms1*-cDNA und die gewählten Primer, die zur Amplifikation der Fragmente *pms1A* (656bp), *pms1B* (492bp), *pms1C* (639bp), *pms1D* (590bp) und *pms1E* (517bp) führten. In den codierenden Bereichen von *pms1* aus L5178Y-Zellen wurden drei Abweichungen im Vergleich zur Referenzsequenz gefunden (Abb. 42).

<u>Veränderung</u>	<u>Bemerkung</u>
1 312(A→G)	Austausch von Adenosin durch Guanosin an Position 312

Dieser Austausch in *pms1A* wurde sowohl bei der Sequenzierung durch den „forward“-, als auch durch den „revers“-Primer detektiert. Bei einer zweiten Sequenzierung des gleichen Fragments (gleiches Fragment, andere PCR) konnte diese Veränderung aber nicht mehr gefunden werden.

<u>Veränderung</u>	<u>Bemerkung</u>
2 1894(C→T)	Austausch von Cytosin durch Thymin an Position 1894
3 1917(T→C)	Austausch von Thymin durch Cytosin an Position 1917

Beide Veränderung wurden in dem Fragment *pms1D* gefunden. Während die Veränderung des bp1894 einen Austausch von Cytidin nach Thyminid darstellt, der in allen sequenzierten *pms1D*-Fragmenten gefunden wurde, konnte der Austausch von Thyminid nach Cytidin bei bp1917 nur in einem der zwei sequenzierten *pms1D*-Fragmente gezeigt werden.

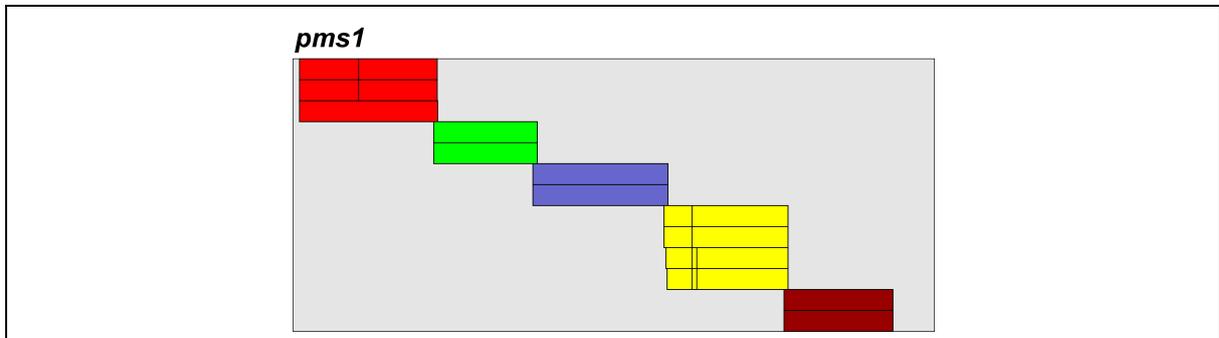


Abb. 42: Darstellung aller Veränderungen in den kodierenden Bereichen von L5178Y-*pms1*: Die sequenzierten cDNA-*pms1*-Fragmente aus L5178Y-Zellen wurden mit der bei NCBI veröffentlichten Referenzsequenz verglichen und alle zur Referenzsequenz gefundenen Veränderungen an der jeweiligen Position vermerkt (eingezeichnete Linien). Die weißen Linien kennzeichnen die Veränderungen, die auf eine fehlerhafte Sequenzierung zurückzuführen sind, die schwarzen Linien stellen alle anderen Veränderungen dar.

Die Veränderungen wurden in die Referenzsequenz übernommen und anschließend unter <http://ca.expasy.org/tools/dna.html> in eine Proteinsequenz übersetzt. Die Proteinsequenz wurde anschließend unter <http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html> mit der Proteinreferenzsequenz verglichen. Der Vergleich ergab, dass alle drei Veränderungen zu einem Austausch von Aminosäuren im Protein führen.

<u>Aminosäureaustausch</u>	<u>Bemerkung</u>
1 I102V	Austausch von Isoleucin gegen Valin an Position 102
2 A629V	Austausch von Alanin gegen Valin an Position 629
3 W637R	Austausch von Tryptophan gegen Arginin an Position 637

3.3.2.4 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *mlh3*

Für die Sequenzierung der kodierenden Bereiche von *mlh3* diente die bei NCBI unter der Accession Nummer XM_484162 (5603bp, mRNA *mus musculus*) veröffentlichte Referenzsequenz. Die Primer wurden unter Verwendung dieser Referenzsequenz ausgewählt und bei MWG, Ebersberg synthetisiert (2.2.8.1).

Die Sequenzierung wurde nach 3.3.2 durchgeführt, wobei für die Amplifikation von *mlh3*-Fragmenten die Primer so gewählt wurden, dass Fragmente einer Größe von etwa 600-1300bp entstanden. Die Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T-Easy

kloniert (2.3.3.8.1) und die resultierenden Plasmide mit *ppmlh3A*, *ppmlh3B* und *ppmlh3C*, *ppmlh3D*, *ppmlh3E*, *ppmlh3F*, *ppmlh3G* und *ppmlh3EF* bezeichnet. Abb. 43 zeigt die komplette *mlh3*-cDNA und die gewählten Primer, die zur Amplifikation der Fragmente *mlh3A* (627bp), *mlh3B* (915bp), *mlh3C* (666bp), *mlh3D* (853bp), *mlh3E* (570bp), *mlh3F* (641bp), *mlh3G* (637bp) und *mlh3EF* (1192bp) führten.

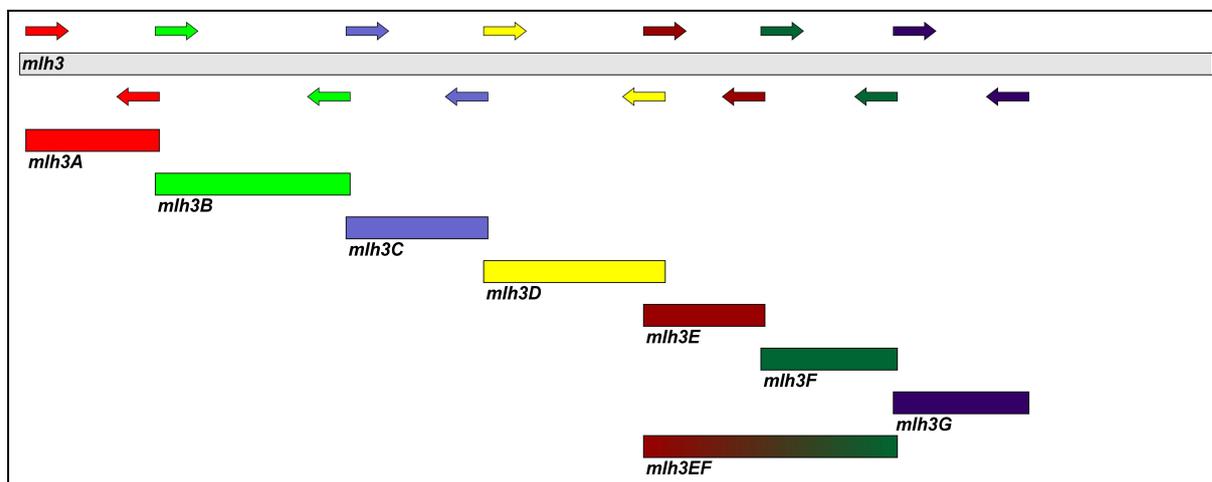


Abb. 43: Maßstabsgetreue Darstellung der *mlh3*-cDNA und der amplifizierten Fragmente: Dargestellt ist die komplette *mlh3*-cDNA (grau), die zur Amplifizierung einzelner kleinerer Bereiche der cDNA gewählten Primer (Pfeile) und die zugehörigen amplifizierten Fragmente (*mlh3A*-*pms1EF*) in den Farben der jeweiligen Primer.

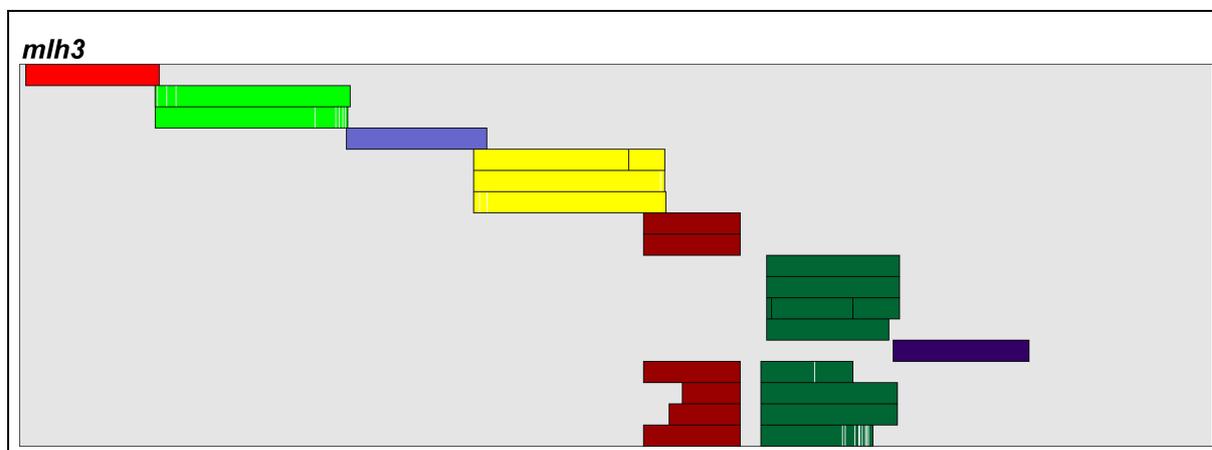


Abb. 44: Maßstabsgetreue Darstellung aller Veränderungen in den kodierenden Bereichen von L5178Y-*mlh3*: Die sequenzierten cDNA-*mlh3*-Fragmente aus L5178Y-Zellen wurden mit der bei NCBI veröffentlichten Referenzsequenz verglichen und alle zur Referenzsequenz gefundenen Veränderungen an der jeweiligen Position vermerkt (eingezeichnete Linien). Die weißen Linien kennzeichnen die Veränderungen, die auf eine fehlerhafte Sequenzierung zurückzuführen sind, die schwarzen Linien stellen alle anderen Veränderungen dar.

Bei der Sequenzierung konnten drei Veränderungen gefunden werden, die nicht sicher als Fehler bei der Amplifikation oder der Sequenzierung ausgeschlossen werden konnten, da das jeweilige Fragment nur einmal in eine Richtung sequenziert

wurde (Abb. 44).

	<u>Veränderung</u>	<u>Bemerkung</u>
1	2860A→G	Austausch von Adenosin zu Guanosin an Position 2860
2	3531(deIT)	Deletion eines Thymidins an Position 3531
3	3913A→T	Austausch von Adenosin zu Thymidin an Position 3913

Auffallend ist, dass ein kleiner Bereich der *mlh3*-cDNA bei keinem der Fragmente sequenziert werden konnte. Die Sequenzierungen der Fragmente *mlh3E* und *mlh3F* konnten nur bis zu bp 3384 von der einen Seite (*mlh3E*) und bis bp3481 von der anderen Seite (*mlh3F*) sequenziert werden. Dieser Bereich von 97bp sollte deshalb von *mlh3EF* erfasst werden.

Auch durch diese Sequenzierung war es aber nicht möglich, diesen Bereich als Sequenz zu gewinnen. Die L5178Y-Zellen zeigen im Vergleich zur Referenzsequenz eine Deletion von 97bp zwischen bp 3384 und bp 3481.

3.3.2.5 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *msh3*

Für die Sequenzierung der kodierenden Bereiche von *msh3* diente die bei NCBI unter der Accession Nummer NM_010829.1 (1185bp, mRNA mus musculus) veröffentlichte Referenzsequenz. Die Primer wurden unter Verwendung dieser Referenzsequenz ausgewählt und bei MWG, Ebersberg synthetisiert (2.2.8.1).

Am Ende der vorliegenden Arbeit wurde bei NCBI eine längere, zweite Version dieser Referenzsequenz unter der Accession Nummer NM_010829.2 (3945bp) gefunden. Die erste Version stellt nur etwa das erste Drittel dieser neuen Sequenz dar, stimmt aber in diesem Bereich mit dieser überein.

Die Sequenzierung wurde wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt, wobei für die Amplifikation von *msh3*-Fragmenten die Primer so gewählt wurden, dass Fragmente einer Größe von etwa 500-1100bp entstanden. Diese Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T-Easy kloniert (2.3.3.8.1) und die resultierenden Plasmide mit *ppmsh3A*, *ppmsh3B* und *ppmsh3C* und *ppmsh3D* bezeichnet. Abb. 45 zeigt die komplette neue Version der *msh3*-cDNA und die gewählten Primer, die zur Amplifikation der Fragmente *msh3A* (1108bp), *msh3B* (912bp), *msh3C* (493bp) und *msh3D* (501bp) führten.

Die sequenzierten Bereiche wurden mit der neuen, zweiten Version der Referenzsequenz von *msh3* verglichen (Abb. 46).

Durch diesen Vergleich konnten viele Veränderungen gefunden werden (Abb. 46), die nicht auf Fehler bei der Amplifikation oder Sequenzierung zurückgeführt werden

können. Eine Deletion von zwei Nukleotiden (515/516(delAT)) konnte in der Sequenzierung des *msh3A*-Fragments gefunden werden. Da diese Mutation zu einer Leserasterverschiebung führen würde, wurde es bei der Auswertung der anderen gefundenen Veränderungen, Nukleotidsubstitutionen, nicht mitberücksichtigt. Alle weiteren gefundenen Veränderungen wurden in die Referenzsequenz übernommen, in die Proteinsequenz übersetzt und anschließend mit der Protein-Referenzsequenz unter <http://ca.expasy.org/tools/dna.html> verglichen.

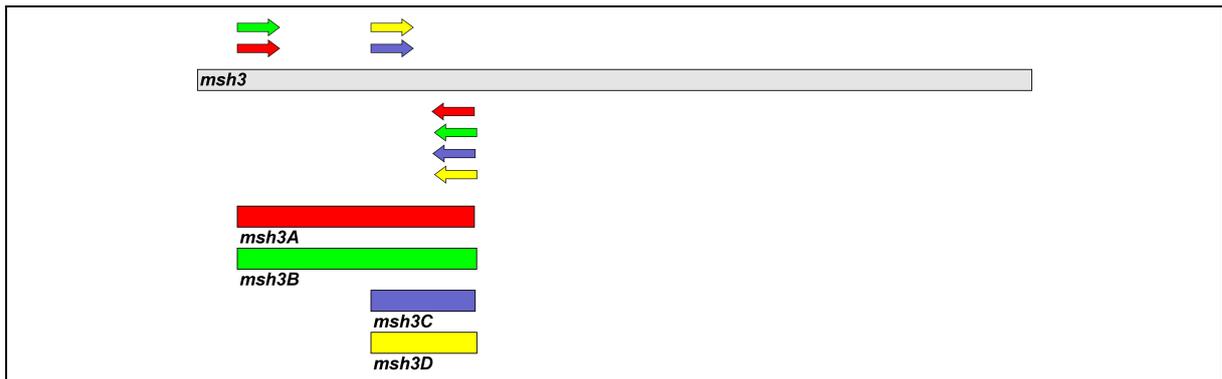


Abb. 45: Maßstabsgetreue Darstellung der *msh3*-cDNA und die amplifizierten Fragmente: Dargestellt ist die komplette zweite und längere Version der Referenzsequenz von *msh3*-cDNA (NM_010829.2) (grau), die zur Amplifizierung einzelner kleinerer Bereiche der cDNA gewählten Primer (Pfeile) und die zugehörigen amplifizierten Fragmente (*msh3A*-*msh3D*) in den Farben der jeweiligen Primer. Da die erste kürzere Version der Referenzsequenz für die Wahl der Primer zu Grunde lag, wurde nur der Anfangsbereich der kompletten cDNA amplifiziert.

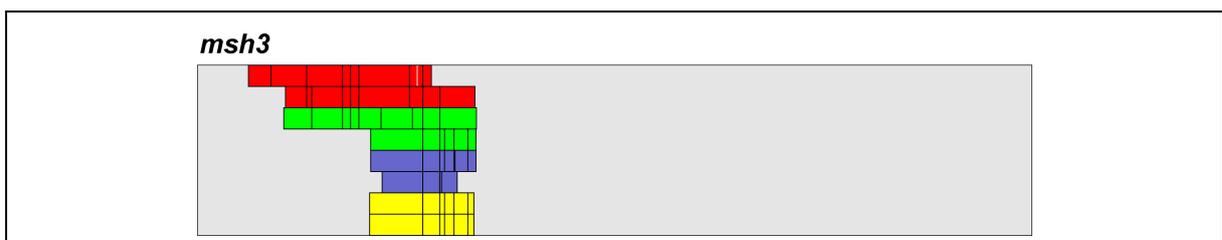


Abb. 46: Maßstabsgetreue Darstellung aller Veränderungen in den kodierenden Bereichen von L5178Y-*msh3*: Die sequenzierten cDNA-*msh3*-Fragmente aus L5178Y-Zellen wurden mit der bei NCBI veröffentlichten zweiten Version der Referenzsequenz verglichen und alle zur Referenzsequenz gefundenen Veränderungen an der jeweiligen Position vermerkt (eingetragene Linien). Die weißen Linien kennzeichnen die Veränderungen, die auf eine fehlerhafte Sequenzierung zurückzuführen sind, die schwarzen Linien stellen alle anderen Veränderungen dar.

Es wurden fünf Veränderungen detektiert, die einen Aminosäureaustausch im Protein bewirken und damit potentiell für den Funktionsverlust in L5178Y-Zellen verantwortlich sein könnten.

	<u>Veränderung der Nukleotidsequenz</u>	<u>Veränderung der Aminosäuresequenz</u>
1	347(G→T)	A82S (Austausch von Alanin zu Serin)
2	540(C→T)	A146V (Austausch von Alanin zu Valin)
3	1002(A→T)	E300S (Austausch von Glutamat zu Serin)
4	1065(C→T)	T321I (Austausch von Threonin zu Isoleucin)
5	1278(T→A)	V392E (Austausch von Valin zu Glutamat)

3.3.2.6 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *mlh1*

Für die Sequenzierung der kodierenden Bereiche von *mlh1* diente die bei NCBI unter der Accession Nummer NM_026810 (2548bp, mRNA mus musculus) veröffentlichte Referenzsequenz. Die Primer wurden unter Verwendung dieser Referenzsequenz ausgewählt und bei MWG, Ebersberg synthetisiert (2.2.8.1).

Die Sequenzierung wurde wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt, wobei für die Amplifikation von *mlh1*-Fragmenten die Primer so gewählt wurden, dass Fragmente einer Größe von etwa 600-1100bp entstanden. Diese Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T-Easy kloniert (2.3.3.8.1) und die resultierenden Plasmide mit *ppmlh1A*, *ppmlh1B*, *ppmlh1C* und *ppmlh1D* bezeichnet. Abb. 47 zeigt die komplette *mlh1*-cDNA und die gewählten Primer, die zur Amplifikation der Fragmente *mlh1A* (1060bp), *mlh1B* (1010bp), *mlh1C* (789bp) und *mlh1D* (588bp) führten.

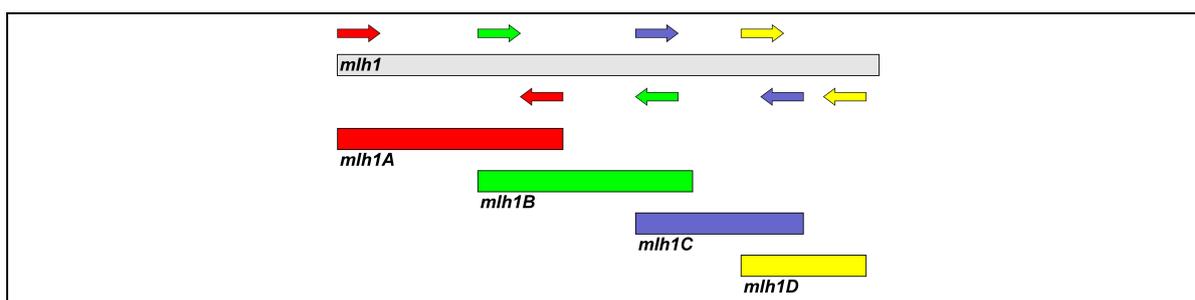


Abb. 47: Maßstabsgetreue Darstellung der *mlh1*-cDNA und die amplifizierten Fragmente: Dargestellt ist die komplette *mlh1*-cDNA (grau), die zur Amplifizierung einzelner kleinerer Bereiche der cDNA gewählten Primer (Pfeile) und die zugehörigen amplifizierten Fragmente (*mlh1A*-*mlh1D*) in den Farben der jeweiligen Primer.

Beim Vergleich der sequenzierten Bereiche der L5178Y-Zellen mit der Referenzsequenz wurden einige Veränderungen gefunden, die nicht auf Fehler bei der Amplifikation oder Sequenzierung zurückgeführt wurden (Abb. 48). Diese Veränderungen wurden in die Referenzsequenz übernommen und in die Proteinsequenz übersetzt.

Der Vergleich dieser L5178Y-Proteinsequenz mit der Proteinreferenzsequenz ergab für fünf Nukleotidsubstitutionen Aminosäureaustausche im Protein (Abb. 49)

	<u>Veränderung der Nukleotidsequenz</u>	<u>Veränderung der Aminosäuresequenz</u>
1	612A→T	I192F (Austausch von Isoleucin zu Phenylalanin)
2	1208T→G	D390E (Austausch von Aspartat zu Glutamat)
3	1249T→G	V404G (Ausstausch von Valin zu Glycin)
4	1416T→G	T460A (Austausch von Threonin zu Alanin)
5	1530T→A	C498S (Austausch von Cystein zu Serin)

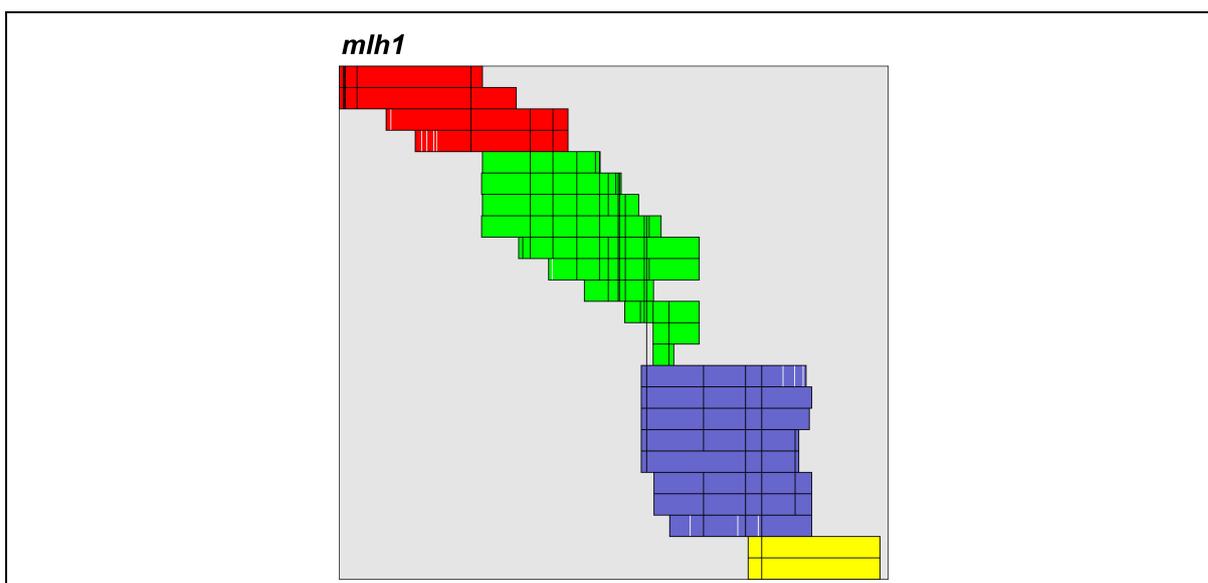


Abb. 48: Maßstabsgetreue Darstellung aller Veränderungen in den kodierenden Bereichen von L5178Y-*mlh1*: Die sequenzierten cDNA-*mlh1*-Fragmente aus L5178Y-Zellen wurden mit der bei NCBI veröffentlichten Referenzsequenz verglichen und alle zur Referenzsequenz gefundenen Veränderungen an der jeweiligen Position vermerkt (eingezeichnete Linien). Die weißen Linien kennzeichnen die Veränderungen, die auf eine fehlerhafte Sequenzierung zurückzuführen sind, die schwarzen Linien stellen alle anderen Veränderungen dar.

Um zu klären, ob die Veränderungen als homozygote Mutationen einen Funktionsverlust von MLH1 bewirken könnten, wurden anschließend erneut PCRs durchgeführt (2.3.3.4) und die PCR-Produkte im Gel zu Eurofins Medigenomix nach Martinsried geschickt, wo ein sogenannter „Classic Read“ durchgeführt wurde.

Die Veränderungen 1-4 wurden durch diese Sequenzierung als homozygote Veränderungen bestätigt, die 5. Veränderung war nicht mehr nachweisbar.

RefSeq	1	MAFVAGVIRRLDET VVNRIAAGEVIQR PANAIKEMIENCLDAKSTNIQVVVKEGGLKLIQ	60
L5178Y	1	MAFVAGVIRRLDET VVNRIAAGEVIQR PANAIKEMIENCLDAKSTNIQVVVKEGGLKLIQ	60
RefSeq	61	IQDNGTGIRKEDLDIVCERFTTSKLQTFEDLASISTYGFRGEALASISHVAHVTTITTKTA	120
L5178Y	61	IQDNGTGIRKEDLDIVCERFTTSKLQTFEDLASISTYGFRGEALASISHVAHVTTITTKTA	120
RefSeq	121	DGKCAYRASYS DGK LQAPPKPCAGNQGLTITVEDLFYNIITRRKALKNPSE EYGKILEVV	180
L5178Y	121	DGKCAYRASYS DGK LQAPPKPCAGNQGLTITVEDLFYNIITRRKALKNPSE EYGKILEVV	180
RefSeq	181	GRYSIHNSGIS I SVKKQGETVSDVRTLPNATTVDNIRSIFGNAVSR ELIEVGCEDKT LAF	240
L5178Y	181	GRYSIHNSGIS I SVKKQGETVSDVRTLPNATTVDNIRSIFGNAVSR ELIEVGCEDKT LAF	240
RefSeq	241	KMNGYISNANYSVKKCIFLLFINHRLVES AALRKA IETVYAAAYLPKNTHPFLYLSLEISP	300
L5178Y	241	KMNGYISNANYSVKKCIFLLFINHRLVES AALRKA IETVYAAAYLPKNTHPFLYLSLEISP	300
RefSeq	301	QNV DVNVHPTKHEVHFLHEESILQRVQQHIESKLLGSNSRMYFTQTLLPGLAGPSGEAA	360
L5178Y	301	QNV DVNVHPTKHEVHFLHEESILQRVQQHIESKLLGSNSRMYFTQTLLPGLAGPSGEAA	360
RefSeq	361	RPTTG VASSSTSGSGDKVYAYQMVRTDSR D QK LDAFLQPVSSL V PSQPQDPAPV RGARTE	420
L5178Y	361	RPTTG VASSSTSGSGDKVYAYQMVRTDSR D QK LDAFLQPVSSL V PSQPQDPAPV RGARTE	420
RefSeq	421	GSPERATREDEEMLALPAPAEAAA ESENLERESLMETSD I AQKAAPTSSPGSSRKRHR ED	480
L5178Y	421	GSPERATREDEEMLALPAPAEAAA ESENLERESLMETSD I AQKAAPTSSPGSSRKRHR ED	480
RefSeq	481	SDVEMVENASGKEMTAA C YPRRRIINLTSVLSLQEEISERCHETLREMLRNHSFVGCVNP	540
L5178Y	481	SDVEMVENASGKEMTAA S YPRRRIINLTSVLSLQEEISERCHETLREMLRNHSFVGCVNP	540
RefSeq	541	QWALAQHQTKLYLLNTTKLSEELFYQIL IYDFANFGVLR LSEPAPLFDLAMLALDSPESG	600
L5178Y	541	QWALAQHQTKLYLLNTTKLSEELFYQIL IYDFANFGVLR LSEPAPLFDLAMLALDSPESG	600
RefSeq	601	WTEDDGPKEGLAEYIVEFLK KKAEM LADYFSVEIDEEGNLIGLPLLIDSYVPPLEGLPIF	660
L5178Y	601	WTEDDGPKEGLAEYIVEFLK KKAEM LADYFSVEIDEEGNLIGLPLLIDSYVPPLEGLPIF	660
RefSeq	661	ILRLATEVNWDEEKECFESLSKECAMFY S IRKQYILEESTLSGQQSDMPGSTSKPWKWTV	720
L5178Y	661	ILRLATEVNWDEEKECFESLSKECAMFY S IRKQYILEESTLSGQQSDMPGSTSKPWKWTV	720
RefSeq	721	EHI IYKAFRSHLLPPKHFTEDGNVLQ LANLPDLYKVFERC 760	
L5178Y	721	EHI IYKAFRSHLLPPKHFTEDGNVLQ LANLPDLYKVFERC 760	

Abb. 49: Vergleich der MLH1- Referenzsequenz und der L5178Y-MLH1-Sequenz: Alle Abweichungen der L5178Y-Sequenz zur Referenzsequenz sind rot markiert.

3.3.2.7 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *pms2*

Für die Sequenzierung der kodierenden Bereiche von *pms2* diente die bei NCBI unter der Accession Nummer NM_008886 (3056bp, mRNA mus musculus) veröffentlichte Referenzsequenz. Die Primer wurden unter Verwendung dieser Referenzsequenz ausgewählt und bei MWG, Ebersberg synthetisiert (2.2.8.1).

Die Sequenzierung wurde wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt, wobei für die Amplifikation von *pms2*-Fragmenten die Primer so gewählt wurden, dass Fragmente einer Größe von etwa 450-1000bp entstanden. Der Bereich zwischen bp1521 und bp1982 konnte mit keinem der gewählten Primer und Alternativprimer amplifiziert werden. Auch eine Kombination der anderen Primer führte nicht zu dem erwünschten Fragment.

Die amplifizierten Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T-Easy kloniert (2.3.3.8.1) und die resultierenden Plasmide mit *ppms2A*, *ppms2B*, *ppms2BA1*, *ppms2BA2*, *ppms2CB* und *ppms2D* bezeichnet. Abb. 50 zeigt die komplette *pms2*-cDNA und die gewählten Primer, die zur Amplifikation der Fragmente *pms2A* (838bp), *pms2B* (1011bp), *pms2BA1* (539bp), *pms2BA2* (450bp), *pms2CB* (780bp) und *pms2D* (1019bp) führten.

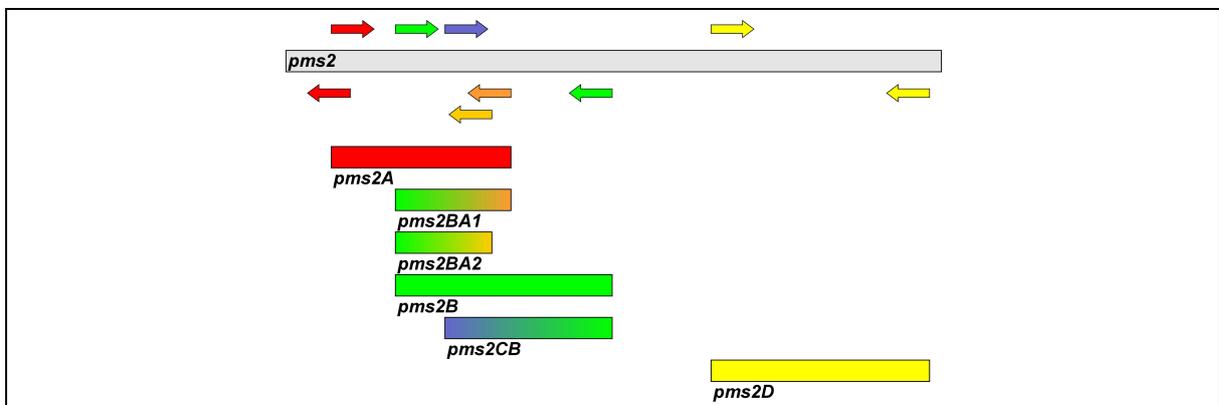


Abb. 50: Maßstabsgetreue Darstellung der *pms2*-cDNA und die amplifizierten Fragmente: Dargestellt ist die komplette *pms2*-cDNA (grau), die zur Amplifizierung einzelner kleinerer Bereiche der cDNA gewählten Primer (Pfeile) und die zugehörigen amplifizierten Fragmente (*pms1A*-*pms1D*) in den Farben der jeweiligen Primer.

Die Sequenzierung der erfolgreich amplifizierten Fragmente und der Vergleich mit der Referenzsequenz zeigte mehrere Veränderungen (Abb. 51).

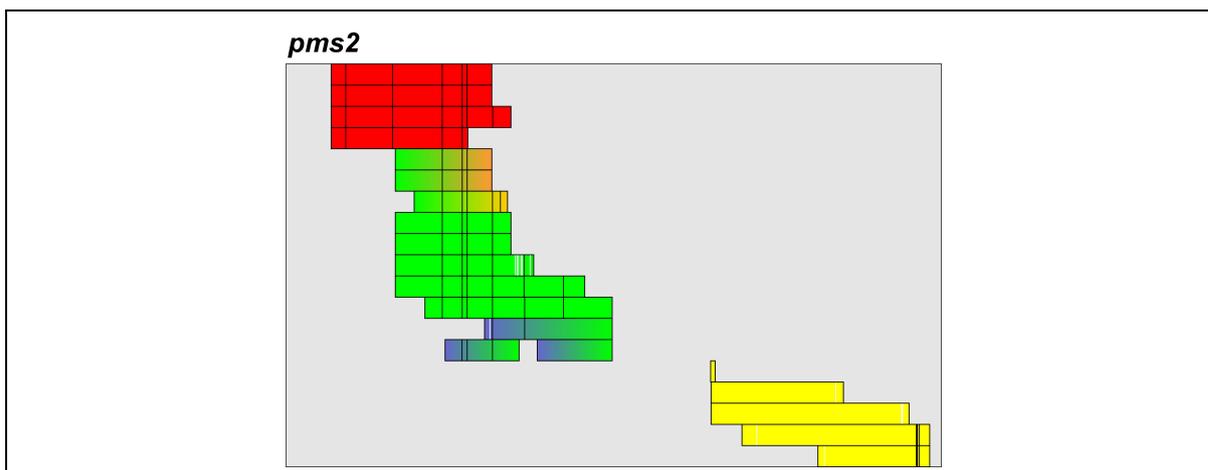


Abb. 51: Maßstabsgetreue Darstellung aller Veränderungen in den kodierenden Bereichen von L5178Y-*pms2*: Die sequenzierten cDNA-*pms2*-Fragmente aus L5178Y-Zellen wurden mit der bei NCBI veröffentlichten Referenzsequenz verglichen und alle zur Referenzsequenz gefundenen Veränderungen an der jeweiligen Position vermerkt (eingezeichnete Linien). Die weißen Linien kennzeichnen die Veränderungen, die auf eine fehlerhafte Sequenzierung zurückzuführen sind, die schwarzen Linien stellen alle anderen Veränderungen dar.

Alle gefundenen Veränderungen, die nicht mit Sicherheit als Fehler bei der Amplifikation oder Sequenzierung ausgeschlossen werden konnten, wurden in die Referenzsequenz übernommen, in die Aminosäuresequenz übersetzt und mit der Protein-Referenzsequenz verglichen (Abb. 52)

Die Veränderungen, die zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz führen sind:

<u>Veränderung</u> <u>der Nukleotidsequenz</u>	<u>Veränderung</u> <u>der Aminosäuresequenz</u>
1 279A→G	I32V (Austausch von Isoleucin zu Valin)
2 729T→G	S182A (Austausch von Serin zu Alanin)
3 821/822CG→GC	H212Q und A213P (Austausch von Histidin-Alanin nach Glutamin-Prolin)
4 844/845 CG→GC	T220S (Austausch von Threonin zu Serin)
5 964(insC)	G260R; 313Stop
6 1113(delT)	nach Stop-Codon
7 1294T→C	nach Stop-Codon

Die gefundene Insertions-Mutation 964(insC) führt nach 260 Aminosäuren zu einer Leserasterverschiebung und damit zu einer veränderten Aminosäuresequenz. Diese wird nach 313 Aminosäuren durch den Einbau eines Stop-Codons abgebrochen (Abb. 52). Nachdem diese Mutation eindeutig für einen MMR-Funktionsverlust in L5178Y-Zellen verantwortlich gemacht werden könnte, sollte dieser Bereich nochmals durch Sequenzierung der nicht klonierten PCR-Produkte bestätigt werden (Abb. 53).

```

1                                                    50
PMS2RefSeq ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
PMS2L5178Y IPVKVLKNFQ IPEYHWRRQI TCRQVTMVYM QQKWVFLETR LFPRAAPQLS

51                                                    100
PMS2RefSeq ~~~~~ ~MEQTEGVST ECAKAIKPID GKSVHQICSG QV LSLSTAV
PMS2L5178Y RGDCDWRSPA SMEQTEGVST ECAKAIKPID GKSVHQICSG QV LSLSTAV

101                                                   150
PMS2RefSeq KELIENSVDA GATTIDLRK DYGVDLIEVS DNGCGVEEEN FEGLALKHHT
PMS2L5178Y KELIENSVDA GATTIDLRK DYGVDLIEVS DNGCGVEEEN FEGLALKHHT

151                                                   200
PMS2RefSeq SKIQEFADLT QVETFGFRGE ALSSLCALSD VTISTCHGSA SVGTRLVFDH
PMS2L5178Y SKIQEFADLT QVETFGFRGE ALSSLCALSD VTISTCHGSA SVGTRLVFDH

201                                                   250
PMS2RefSeq NGKITQKTPY PRPKGTTVSV QHLFYTLPVR YKEFQRNIKK EY SKMVQVLQ
PMS2L5178Y NGKITQKTPY PRPKGTTVSV QHLFYTLPVR YKEFQRNIKK EY SKMVQVLQ

251                                                   300
PMS2RefSeq AYCIISAGVR VSCTNQLGQG KR HA VVCTSG T SGMKENIGS VFGQKQLQSL
PMS2L5178Y AYCIISAGVR VSCTNQLGQG KR DE VVCTSG S SGMKENIGS VFGQKQLQSL

301                                                   350
PMS2RefSeq IPFVQLPPSD AVCEEYGLST S.GRHKTFST FRASFHSART APGGVQQTG.
PMS2L5178Y IPFVQLPPSD AVCEEYGLST SRTPQNLF.. YVSGFISQCT HGAGRSATDR

351                                                   400
PMS2RefSeq SFSSSIRGPV TQQRSLSLSM RFYHMYNRHQ YPFVVLNVSV DSECVDINVT
PMS2L5178Y QFFFINQRPC DPAKVSKLVN EVL...SHV *PASV.PICR P*RFER*LRMC

```

Abb. 52: Vergleich der PMS2- Referenzsequenz und der L5178Y-PMS2-Sequenz: Alle Aminosäureaustausche sind rot markiert, während eine veränderte Aminosäuresequenz, die durch die Insertion eines zusätzlichen Nukleotids in die L5178Y-Sequenz entstanden ist, gelb dargestellt ist.

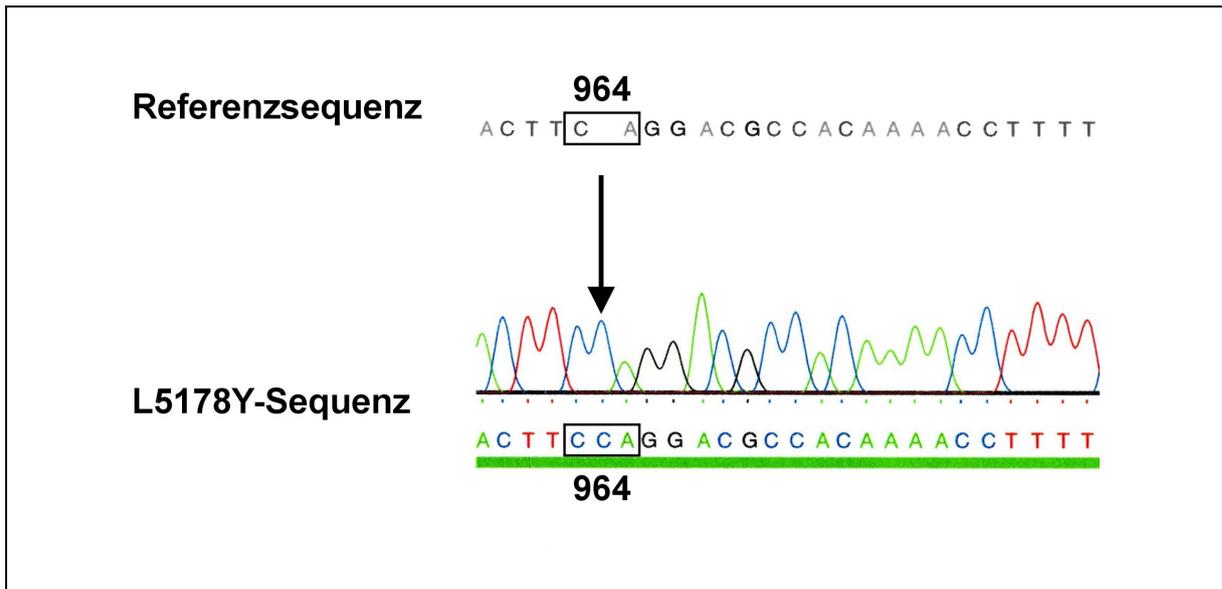


Abb. 53: Darstellung der *pms2*-Referenzsequenz und des Sequenzierchromatogramms der L5178Y-*pms2*-Sequenz nach Sequenzierung der PCR-Produkte. Das zusätzliche Cytosin in der L5178Y-Sequenz ist durch einen zweiten Peak bei 964 Basenpaaren gekennzeichnet (Pfeil).

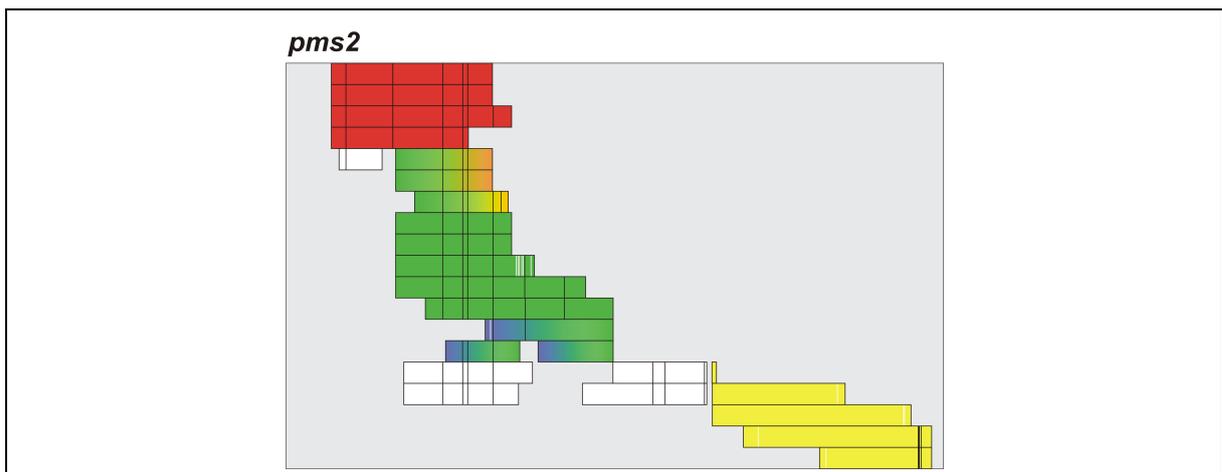


Abb. 54: Maßstabsgetreue Darstellung aller Veränderungen in den kodierenden Bereichen von L5178Y-*pms2*: Gezeigt sind außerdem die durch die Sequenzierung von PCR-Produkten bestätigten sowie neu gefundene Veränderungen. Die sequenzierten cDNA-*pms2*-Fragmente aus L5178Y-Zellen wurden mit der bei NCBI veröffentlichten Referenzsequenz verglichen und alle zur Referenzsequenz gefundenen Veränderungen an der jeweiligen Position vermerkt (eingzeichnete Linien). Die weißen Linien kennzeichnen die Veränderungen, die auf eine fehlerhafte Sequenzierung zurückzuführen sind, die schwarzen Linien stellen alle anderen Veränderungen dar.

Abb. 54 zeigt zum einen die Bereiche der PCR-Produkte, die sequenziert wurden (weiße Balken) und zum anderen die Veränderungen, die durch diese Sequenzierungen gefunden wurden (schwarze Linien). Alle Veränderungen, die zuvor durch die Sequenzierung der klonierten *pms2*-Fragmente gefunden wurden und die zu Aminosäureaustauschen im Protein führen, konnten durch die Sequenzierung der PCR-

Produkte bestätigt werden. Durch den Einsatz neuer Primer war es außerdem möglich, den zuvor fehlenden 461bp-Bereich fast vollständig zu sequenzieren, wobei noch drei weitere Veränderungen nach der Insertions-Mutation gefunden wurden.

	<u>Veränderung</u>	<u>Bemerkung</u>
1	279A→G	Bestätigung der Veränderung
2	729T→G	Bestätigung der Veränderung
3	821/822CG→GC	Bestätigung der Veränderung
4	844/845 CG→GC	Bestätigung der Veränderung
5	964(insC)	Bestätigung der Veränderung;
6	1113(delT)	nach Stop-Codon
7	1294T→C	nach Stop-Codon
8	1705A→G	nach Stop-Codon
9	1762T→C	nach Stop-Codon
10	1945delT	nach Stop-Codon

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuchsbedingungen optimiert, die Voraussetzung für den Nachweis einer MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen waren. Diese Versuchsbedingungen, die sich auf die Konzentration der eingesetzten Substanz bezog, wurde in Zellen unterschiedlichen MMR-Status sowie in L5178Y-Mauslymphomzellen eingesetzt, um eine MMR-Defizienz der L5178Y-Zellen nachzuweisen. Ein MMR-defizienter Phänotyp dieser Zelllinie konnte mittels Mikrokern-Test sowohl ohne als auch mit Cytochalasin B und im Comet Assay nachgewiesen werden. Eine molekulare Ursache für diese MMR-Defizienz auf Proteinebene konnte nicht gezeigt werden. Durch die Sequenzierung der kodierenden Bereiche der MMR-Gene, wurde als wichtigste Mutation eine Insertions-Mutation in *pms2* nachgewiesen, die für die MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen verantwortlich gemacht wird.

4.1 Optimierung der Versuchsbedingungen für den Nachweis einer MMR-Defizienz

Für den Nachweis der vermuteten MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen sollten MMR-profiziente (TK6 und Colo205) und –defiziente (HCT116) Zellen herangezogen und die Reaktion der L5178Y-Mauslymphomzelllinie mit den Reaktionen dieser Zellen verglichen werden. Um durch einen solchen Vergleich eine Aussage über den MMR-Status einer Zelllinie treffen zu können, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- 1) Es muss eine Substanz gewählt werden, die abhängig vom MMR-Status der Zellen unterschiedliche Antworten hervorruft.
- 2) Sind diese Antworten abhängig von der Konzentration dieser gewählten Substanz, so müssen geeignete Substanzkonzentrationen ermittelt werden, die diese Antworten MMR-abhängig auslösen. Konzentrationen, die MMR-unabhängige Reaktionen bewirken, müssen ausgeschlossen werden.
- 3) Unerwünschte Nebenwirkungen der Substanz, die zu potentiellen Fehlern der Ergebnisse führen, müssen ebenfalls ausgeschlossen werden

Zu 1): Alkylierende Agenzien sind generell die am häufigsten eingesetzten Substanzen um unterschiedliche Reaktionen in Zellen unterschiedlichen MMR-Status hervorzurufen. Speziell die Fähigkeit des S_N1 alkylierenden Agenz MNNG, in MMR-

profizienten und –defizienten Zellen unterschiedliche Reaktionen, wie Induktion von Apoptosen oder Genomschäden hervorzurufen, wurde in der Literatur hinreichend beschrieben (Sansom et al., 2001). Deshalb wurde in dieser Arbeit MNNG zur Auslösung der unterschiedlichen Reaktionen eingesetzt.

Zu 2): Dabei musste berücksichtigt werden, dass MNNG nicht nur abhängig vom MMR-Status der Zellen wirkt, sondern zusätzlich die eingesetzte MNNG-Konzentration auf die Reaktion der Zellen Einfluss hat. Geringe MNNG-Konzentrationen führen zu MMR-abhängigen Antworten (Apoptosen oder Genomschäden), während hohe MNNG-Dosen ein MMR-unabhängiges Absterben der Zellen bewirken (Nekrosen) (Roos et al., 2004). Zu Beginn der Arbeit mussten deshalb MNNG-Konzentrationen ermittelt werden, die hoch genug sind, MMR-abhängige Antworten in den unterschiedlichen Zellen auszulösen, aber gering genug, um die Zellen nicht durch einen MMR-unabhängigen Mechanismus zu töten.

Zu 3): Es musste außerdem berücksichtigt werden, dass jede Substanz neben der erwünschten Wirkung auf die Zellen auch Nebenwirkungen aufweist, die die Ergebnisse beeinflussen können. Sowohl für die Bildung von Mikrokernen als auch für die Induktion von Apoptosen spielt die Proliferation/Replikation der Zellen eine entscheidende Rolle. Ein Fehlen von Genomschäden in Form von Mikrokernen und/oder Apoptosen aufgrund fehlender Proliferation musste deshalb ausgeschlossen werden. Das heißt, es musste sichergestellt werden, dass die eingesetzten MNNG-Konzentrationen eine Proliferation der behandelten Zellen gewährleisten.

Die Behandlung mit MNNG führte in Zellen unterschiedlichen MMR-Status zu unterschiedlichen zellulären Reaktionen, wobei die Auswertung der unterschiedlichen Endpunkte (Mikrokerne, Apoptosen, Nekrosen, Zellzahlen) auch Aufschluss über das Verhalten der Zellen auf unterschiedliche MNNG-Konzentrationen lieferte. Es wurden folgende Konzentrationen ermittelt:

- (a) Konzentrationen, die MMR-abhängige Antworten in den Zellen auslösen (Mikrokerne/Apoptosen)
- (b) Konzentrationen, die einen MMR-unabhängigen Zelltod bewirken (Nekrose)
- (c) Konzentrationen, die eine Störung der Proliferation der Zellen zur Folge haben (Zellzahlen in Kombination mit Mikrokernrate, Apoptosen und Nekrosen)

4.1.1 Geeignete MNNG-Konzentration für Colo205-Zellen

Die MMR-profizienten und halbadhärenenten Colo205-Zellen reagierten auf alle eingesetzten MNNG-Konzentrationen mit einer Induktion von Apoptosen. Das heißt, mit Konzentrationen zwischen 10 μ M und 40 μ M konnte in den Colo205-Zellen ein MMR-abhängiger Effekt ausgelöst werden (a), ohne dass die Zellen MMR-unabhängig abstarben (kaum nekrotische Zellen in allen Konzentrationen) (b). Der Rückgang der bei 30 μ M induzierten Apoptosen bei einer Konzentration von 40 μ M zeigte aber, dass die Zellen ab dieser Konzentration nicht mehr so gut proliferierten. Hätten sie sich weiter geteilt, so müsste ein weiterer Anstieg der Apoptosen zu sehen sein. Die abnehmenden Zellzahlen der behandelten Zellen wurde überwiegend auf die große Induktion von Apoptosen zurückgeführt, ab einer Konzentration von 40 μ M aber auf Apoptosen in Kombination mit verminderter Proliferation der Zellen (c).

Generell hätten alle getesteten MNNG-Konzentrationen eingesetzt werden können, um MMR-abhängige Antworten in den Colo205-Zellen auszulösen, ohne MMR-unabhängigen Zelltod zu bewirken. Lediglich die gestörte Proliferation bei 40 μ M MNNG zeigte, dass Konzentrationen bis 30 μ M für den anschließenden Vergleich besser geeignet sind.

4.1.2 Geeignete MNNG-Konzentration für TK6-Zellen

In TK6-Zellen bewirkte eine Konzentration von 10 μ M MNNG eine sehr starke Induktion von Apoptosen und damit eine MMR-abhängige Reaktion (a). Im Gegensatz zu den ebenfalls MMR-profizienten Colo-205-Zellen, zeigten die TK6 aber sehr viele nekrotische Zellen nach Behandlung mit höheren MNNG-Konzentration (20-40 μ M). Eine Auswertung dieser Konzentrationen war aufgrund dieser starken MMR-unabhängigen Reaktion nicht mehr möglich (b). Über die Proliferation der Zellen konnte keine Aussage gemacht werden, da nur eine Konzentration ausgewertet werden konnte und die abnehmende Zellzahl sowohl auf einer verminderten Proliferation, auf Apoptosen, auf Nekrosen oder die Kombination dieser Parameter beruhen kann (c).

Für TK6-Zellen wurden 10 μ M MNNG als geeignete Konzentration angesehen, um MMR-abhängige Apoptosen auszulösen und MMR-unabhängige Reaktionen zu vermeiden.

4.1.3 Geeignete MNNG-Konzentration für HCT116-Zellen

Die MMR-defizienten HCT116-Zellen reagierten auf 10 und 20µM MNNG mit einer Induktion von Mikrokernen und zeigten damit die MMR-abhängige Reaktion (a), wobei ab 20µM MNNG auch ein MMR-unabhängiger Effekt in Form von Nekrosen beobachtet wurde (b). Ebenfalls ab 20µM MNNG zeigte sich, dass die Zellen in ihrer Proliferation gestört werden. Die durch 10µM MNNG induzierten Mikrokerne gingen bis auf den Kontrollwert zurück. Die abnehmenden Zellzahlen wurden damit bei geringeren MNNG-Konzentrationen überwiegend auf Nekrosen zurückgeführt, während bei höheren eine Kombination aus nekrotischen Zellen und gestörter Proliferation verantwortlich gemacht wurde (c).

Auch für HCT116-Zellen wurde für den Vergleich 10µM MNNG als geeignete Konzentration eingesetzt, um MMR-abhängige Reaktionen zu erwirken, MMR-unabhängigen Zelltod und gestörte Proliferation zu verhindern.

4.1.4 Geeignete MNNG-Konzentration für L5178Y-Zellen

Die L5178Y-Zellen reagierten auf 10µM MNNG mit einem sehr starken Anstieg der Mikrokerne (MMR-abhängige Reaktion) (a). Nekrosen wurden in diesen Zellen nur vereinzelt gefunden, so dass ein MMR-unabhängiger Effekt aller eingesetzten MNNG-Konzentrationen ausgeschlossen wird (b). Allerdings zeigte sich, dass schon geringe MNNG-Konzentrationen (20µM) einen starken Einfluss auf die Proliferation der L5178Y-Zellen hatten. Die durch 10µM MNNG induzierten Mikrokerne nahmen bei 20µM und 30µM sehr stark ab, so dass die abnehmenden Zellzahlen mit der geringeren Proliferation ab 20µM MNNG zu erklären sind (c).

Auch in den L5178Y-Zellen konnte eine MNNG-Konzentration von 10µM für den Vergleich der unterschiedlichen Zellen herangezogen werden.

Generell konnte gezeigt werden, dass die Zellen unterschiedlich sensitiv auf Behandlung mit MNNG reagierten. Während in TK6, HCT116 und L5178Y durch 20µM MNNG MMR-unabhängiger Zelltod ausgelöst wurde, zeigten Colo205-Zellen diesen erst ab einer Konzentration von 40µM. Mit einer Konzentration von 10µM MNNG konnte aber in allen Zelllinien eine MMR-abhängige Reaktion hervorgerufen werden, ohne die Proliferation der Zellen so stark zu beeinträchtigen, dass eine Ausbildung von Schäden nicht mehr möglich war. In den anschließenden Versuchen wurde deshalb eine MNNG-Konzentration von 10µM eingesetzt.

4.2 Nachweis der MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen

4.2.1 Nachweis der MMR-Defizienz mittels Mikrokern-Test

Durch den Einsatz von Zelllinien mit unterschiedlichem MMR-Status konnte mittels Mikrokern-Test gezeigt werden, dass sich die L5178Y-Zellen auf Behandlung mit 10 μ M MNNG wie die MMR-defizienten HCT116-Zellen verhalten. Sie reagierten mit einer Induktion von Mikrokernen, während die MMR-profizienten Zellen eine Induktion von Apoptosen zeigten. Auffallend war dabei, dass die verschiedenen Zellen nicht nur abhängig von ihrem MMR-Status mit unterschiedlichen Reaktionen antworteten (Induktion von Mikrokernen oder Apoptosen), sondern auch, dass diese Schäden in ihrer Höhe sehr stark variierten. Während die lymphoblastoiden Suspensionszelllinien TK6 und L5178Y mit einer sehr starken Induktion von Apoptosen (über 80-fach in TK6) und Mikrokernen (über 70-fach in L5178Y) reagierten, zeigten die halbadhärenten Colonzellen Colo205 und die adhären-ten HCT116 sehr viel geringere Induktionswerte (8-fache Induktion von Apoptosen in Colo205 und 5-fache Induktion von Mikrokernen in HCT116).

Eine Ursache für diese stark unterschiedlichen Induktionswerte könnte zum einen die unterschiedliche Sensitivität der Zellen unterschiedlichen Ursprungs sein (lymphoide Zellen TK6 und L5178Y gegenüber Colonzellen Colo205 und HCT116). Zum anderen könnte auch ein unterschiedlich starker Einfluss von 10 μ M MNNG auf die Proliferation der Zellen die unterschiedlichen Werte verursachen. Werden die Colonzellen möglicherweise stärker durch 10 μ M MNNG in ihrer Proliferation beeinträchtigt, so können sie im Vergleich zu besser proliferierenden Zellen weniger Schäden ausbilden. Die stärkere Beeinträchtigung der Proliferation der Zellen durch MNNG wurde hier ausgeschlossen, da die Coloadenomcarcinomzellen zwar geringere Induktionswerte als die lymphoiden Zellen aufwiesen, diese Werte aber in den höheren MNNG-Konzentrationen nur geringfügig abfielen. Daraus wurde geschlossen, dass die Proliferation kaum beeinträchtigt war (3.1). Im Vergleich dazu fielen die hohen Induktionswerte bei 10 μ M MNNG in den Suspensionszellen bei der nächsthöheren Konzentration so stark ab (3.1), dass von einer starken Abnahme der Proliferation ausgegangen wurde.

Die durchflusszytometrische Messung der Proliferation der Zellen zeigte, dass Colo205 und HCT116 tatsächlich nur eine geringe Proliferationsrate aufwiesen. Nachdem die Konzentrationen als mögliche Ursache für diese geringe Proliferation aber ausgeschlossen wurden (siehe oben), wurde die längere Generationszeit der Colon-

Zellen für die geringeren Induktionswerte verantwortlich gemacht. Während der Behandlungsdauer von 24h ist in diesen Zellen maximal ein kompletter Zellzyklus möglich, während sich die Suspensionszellen aufgrund einer kürzeren Generationszeit öfter teilen und damit mehr Schäden aufweisen können.

Unabhängig von der Höhe der induzierten Antworten konnte mit 10µM MNNG in allen eingesetzten Zellen, gemäß ihres MMR-Status, eine Induktion von Apoptosen oder Mikrokernen ausgelöst werden. Der Vergleich der L5178Y-Zellen mit den MMR-profizienten und –defizienten Vergleichszellen zeigte einen MMR-defizienten Phänotyp dieser Zellen.

4.2.2 Nachweis der MMR-Defizienz mittels Mikrokern-Test mit Cytochalasin B

Mit der Cytochalasin B-Methode sollte zum einen ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Generationszeiten der Zellen Einfluss auf die Testergebnisse ausüben, zum anderen sollte das Verhalten der Zellen auf geringere MNNG-Konzentrationen getestet sowie die zuvor eingesetzte Konzentration von 10µM bestätigt werden.

4.2.2.1 Angleichung der Induktionsraten

Durch die Zugabe von Cytochalasin B wird die Zellteilung nach abgeschlossener Kernteilung verhindert, so dass bei Auszählung doppelkerniger Zellen gewährleistet ist, dass alle Zellen nach genau einer Teilung ausgewertet werden, egal wie lange sie dafür gebraucht haben. Dadurch wird eine Verzerrung der Ergebnisse durch unterschiedlich lange Generationszeiten der Zelllinien verhindert. Tab. 6 zeigt alle Mikrokern- und Induktionswerte nach Behandlung mit 10µM MNNG im Mikrokern- und im Mikrokern-Test mit Cytochalasin B:

	Mikrokern-Test Induktionswerte bei 10µM MNNG		Mikrokern-Test mit Cytochalasin B Induktionswerte bei 10µM MNNG	
	Apoptosen	Mikrokerne	Apoptosen	Mikrokerne
TK6	87,0	1,7	9,2	3,2
HCT116	1,4	5,2	0,3	4,6
L5178Y	18,5	74,0	0,3	12,2

Tab. 6: Mikrokern- und Induktionswerte nach Behandlung mit 10µM MNNG

Durch Zugabe von Cytochalasin B zu den L5178Y-Zellen zeigte sich ein starker

Rückgang des Induktionswertes der Mikrokerne von über 70 auf 12,2 bei 10 μ M MNNG. Da Mikrokerne definitiv in sich teilenden Zellen nach genau einer Teilung ausgezählt wurden, ist ein Rückgang dieser im Vergleich zum Mikrokerntest ohne Cytochalasin B darauf zurückzuführen, dass die Zellen, die sich zwei- und mehrmals geteilt haben und ebenfalls Mikrokerne tragen, nicht mehr, wie im Mikrokerntest ohne Cytochalasin B, mitgezählt wurden. Die Zugabe von Cytochalasin B zu den HCT116-Zellen zeigte, wie erwartet, keinen großen Einfluss auf den Mikrokern-Induktionswert. Da sich diese Zellen langsamer teilen ist davon auszugehen, dass die beobachteten Mikrokerne im Mikrokerntest nach 24h den Mikrokernen im Mikrokerntest mit Cytochalasin B entsprechen, da HCT116 eine Generationszeit von 18-22h haben und sie sich in dieser Zeit nicht öfter hätten teilen können.

Auf den ersten Blick war nicht plausibel, warum sich auch der Wert für die Apoptosen in TK6-Zellen angeglichen hat. Da Apoptose einen Zerfall des Zellkerns bewirkt, können Apoptosen nicht in doppelkernigen Zellen ausgezählt werden. Zu erwarten wäre, dass die Apoptosewerte keinen Unterschied zu den Werten im Mikrokerntest ohne Cytochalasin B zeigen. Der Rückgang der Zahl konnte deshalb nur auf eine gestörte Proliferation der Zellen durch Cytochalasin B zusätzlich zu MNNG zurückgeführt werden. Dieses belegten auch die abnehmenden Zahlen für die doppelkernigen Zellen bei steigender MNNG-Konzentration (Daten nicht gezeigt).

Auch für die Apoptosen in HCT116- und L5178Y-Zellen wäre eigentlich zu erwarten, dass die Werte im Vergleich zum Mikrokerntest ohne Cytochalasin B unverändert bleiben, da weiterhin alle Zellen zur Auswertung von Apoptosen ausgezählt werden. Der Rückgang der Apoptosen in HCT116- und L5178Y-Zellen bei höheren MNNG-Konzentrationen konnte auch hier mit einer gestörten Proliferation durch Cytochalasin B erklärt werden

Die weiter bestehenden kleinen Unterschiede der Induktionswerte sind vermutlich auf den Ursprung der Zellen und/oder auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund dieser zurückzuführen.

4.2.2.2 Testen geringerer MNNG-Konzentrationen

Nachdem 10 μ M MNNG bisher die niedrigste eingesetzte Konzentration war, sollte zudem ausgeschlossen werden, dass geringere Konzentrationen größere Schäden auslösen, die durch eine beginnende Beeinträchtigung der Proliferation durch 10 μ M MNNG rückläufig sind.

Auch hier zeigte sich, dass MNNG-Konzentrationen von bis zu 10 μ M die für die Zellen typischen Reaktionen hervorriefen. Mikrokerninduktion bei den MMR-defizienten HCT116-Zellen und Apoptoseinduktion bei den MMR-profizienten TK6-Zellen. Die ausgelösten Schäden stiegen dosisabhängig bis zu einer Konzentration von 10 μ M MNNG an. Die Wahl der MNNG-Konzentration von 10 μ M wurde damit nochmals bestätigt. Auf Behandlung aller eingesetzten MNNG-Konzentrationen verhielten sich die L5178Y-Zellen wie die MMR-defizienten HCT116-Zellen. Der MMR-defiziente Phänotyp konnte damit nochmals bestätigt werden. Verzerrungen der Ergebnisse durch unterschiedliche Generationszeiten der Zellen konnten durch die Cytochalasin-B-Methode ausgeschlossen werden. Die gewählte MNNG-Konzentration von 10 μ M zeigt ein Maximum induzierter Schäden und wird damit als Konzentration zur Behandlung der Zellen bestätigt. Die L5178Y-Mauslymphomzelllinie zeigt auch im Mikrokerntest mit Cytochalasin B einen MMR-defizienten Phänotyp.

4.2.3 Nachweis der MMR-Defizienz mittels Comet Assay

Ein MMR-defizienter Phänotyp der L5178Y-Mauslymphomzellen konnte sowohl im Mikrokerntest ohne als auch mit Cytochalasin B gezeigt werden. Dieser sollte durch einen weiteren Endpunkt im Comet Assay nochmals bestätigt werden. Außerdem sollte ausgeschlossen werden, dass eine in den L5178Y-Zellen beschriebene p53-Mutation für den gefundenen Phänotyp verantwortlich sein könnte. Diese Mutation, die in der DNA-bindenden Domäne von p53 lokalisiert ist (Storer et al., 1997; Clark et al., 1998), könnte ebenfalls zur der beobachteten Reaktion führen. P53 ist als „Hüter des Genoms“ in die Zellzykluskontrolle involviert, trägt zur Reparatur von Schäden bei und sorgt außerdem für die Eliminierung stark geschädigter Zellen durch Apoptose. Eine Funktionsstörung dieses Proteins könnte damit ebenfalls einen Anstieg der Genomschäden bei fehlender Apoptoserate bewirken. Um zu prüfen, ob die bei L5178Y-Zellen vorhandene Mutation Auswirkungen auf die durch MNNG verursachten Reaktionen hat, wurden im Comet Assay zusätzlich Zellen eingesetzt, die eine den L5178Y-Zellen vergleichbare p53-Mutation aufweisen, aber MMR-profizient sind. Diese Zellen (WTK1-Zellen) haben die gleichen Vorläuferzellen wie TK6 und unterscheiden sich von diesen nur durch die p53-Mutation.

Auch im Comet Assay konnten durch MNNG unterschiedliche Reaktionen der Zellen detektiert werden. Während die MMR-profizienten Zellen (Colo205, TK6 und WTK1)

eine Verteilung der behandelten Zellen über nahezu alle Schadensklassen zeigten, wiesen die MMR-defizienten und die L5178Y-Zellen nur Schäden bis maximal 40% DNA im Schweif auf. Über die Ursache der Verteilung MMR-profizienter Zellen kann keine definitive Aussage gemacht werden. Zwar liegt die Vermutung nahe, die Verteilung über die Schadensklassen resultiert aus der fortschreitenden Fragmentierung der DNA apoptotischer Zellen (frühe und späte Apoptosen), doch wird diese Vermutung kontrovers diskutiert. Es ist bislang nicht geklärt, ob apoptotische Zellen im Comet Assay durch die Verteilung auf die hohen Schadensklassen identifiziert werden können oder ob die Fragmentierung der DNA dazu führt, dass die, durch apoptotische Prozesse gebildeten kleinen Bruchstücke während der Elektrophorese verlorengehen und damit im Comet Assay nicht mehr nachweisbar sind. In dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass die beobachtete Verteilung über alle Schadensklassen auf Apoptosen zurückzuführen ist, da diese in frühe und späte Apoptosen eingeteilt werden können, die unter anderem auch durch den unterschiedlichen Grad der DNA-Fragmentierung erkennbar sind. Je weiter die Apoptose fortgeschritten ist, desto mehr ist die DNA fragmentiert und desto mehr Zellen müssen in den höheren Schadensklassen zu finden sein. Dabei wird nicht ausgeschlossen, dass sehr späte Apoptosen durch das Verschwinden sehr kleiner Fragmente während der Elektrophorese nicht nachgewiesen werden können. Damit wäre zu erklären, warum in den höchsten Schadensklassen keine/kaum Zellen mehr gefunden werden.

In den MMR-defizienten Zellen werden die DNA-Schäden in Form von Bruchstücken für die Schadensverteilung bis maximal 40% DNA im Schweif verantwortlich gemacht. Chromosomenbruchstücke führen dazu, dass die Zelle im Comet Assay einen „Schweif“ zeigt, dieser aber einen bestimmten Wert nicht überschreitet, weil es sich nur um einzelne kleine Bruchstücke handelt, die vom „Kopfteil“ während der Elektrophorese getrennt werden. Die Haupt-DNA bleibt dabei erhalten.

Sicher ist jedoch, dass auch im Comet Assay Zellen unterschiedlichen MMR-Status unterschiedliche Reaktionen zeigten, wobei die Reaktion der L5178Y-Zellen mit der der MMR-defizienten HCT116-Zellen vergleichbar war. Damit verhielten sich die L5178Y-Zellen auch im Comet Assay wie die MMR-defizienten Vergleichszellen.

Die WTK1-Zellen verhielten sich wie die MMR-profizienten TK6-Zellen. Die p53-Mutation, die der Mutation in L5178Y-Zellen vergleichbar ist, scheint keinen Einfluss auf das Verhalten der Zellen bei Behandlung mit MNNG auszuüben und wurde damit als mögliche Ursache des gezeigten Phänotyps ausgeschlossen.

4.3 Untersuchung der molekularen Ursache für die MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen

4.3.1 Untersuchung der molekularen Ursache der MMR-Defizienz auf Proteinebene

MLH1 und MSH2 sind aufgrund ihrer Komplexbildung mit je zwei weiteren MMR-Proteinen entscheidende Proteine in der MMR. Das führt dazu, dass in 80-90% aller MMR-defizienten Zellen Mutationen in diesen Proteinen gefunden werden. Ebenfalls häufig sind Mutationen in den MMR-Proteinen PMS2 und MSH6, denen nach MLH1 und MSH2 ebenfalls eine bedeutende Rolle zukommt. Western Blot Analysen mit geeigneten Antikörpern sollten mögliche Unterschiede in der Expression dieser Proteine in L5178Y-Zellen zeigen, die für den MMR-defizienten Phänotyp dieser Zelllinie verantwortlich sein könnten. Die Western Blot Analysen der MMR-Proteine zeigten, dass L5178Y-Zellen MLH1, MSH2 sowie MSH6 exprimieren. Diese Expression war vergleichbar mit der Expression in den MMR-profizienten Kontrollzelllinien. Fehlende oder verminderte Expression der Proteine konnte damit nicht für die gefundene MMR-Defizienz der L5178Y-Zellen verantwortlich gemacht werden. Auch Mutationen, die zu Größenveränderungen der Proteine führen oder die Stabilität der Proteine ändern, konnten als Ursache ausgeschlossen werden.

Während eine fehlende Expression eines MMR-Proteins eindeutig gezeigt hätte, dass dieses Protein nicht vorhanden ist und damit seine Funktion nicht ausüben kann, kann umgekehrt von einem exprimierten Protein nicht geschlossen werden, dass es funktionell ist. Mutationen, die zu einem Funktionsverlust führen, müssen nicht unbedingt die Expression, Struktur oder Stabilität des Proteins beeinflussen. Über die nachgewiesenen Proteine konnte damit keine Aussage bezüglich ihrer Funktionalität getroffen werden. Für die restlichen MMR-Proteine waren keine käuflichen bzw. keine spezifischen Antikörper vorhanden. Eine Untersuchung der Expression dieser Proteine war daher nicht möglich.

4.3.2 Untersuchung der molekularen Ursache der MMR-Defizienz auf cDNA-Ebene

Nachdem ein MMR-defizientes Verhalten der L5178Y-Zellen gezeigt werden konnte, die Western Blot Analysen aber keinen Anhaltspunkt für eine molekulare Ursache lieferten, sollte diese durch die Sequenzierung der kodierenden Bereiche aller be-

kannten MMR-Gene gefunden werden. Dafür wurden Teilbereiche der MMR-cDNA amplifiziert, in einen Vektor ligiert und anschließend sequenziert. Bei der Sequenzierung dieser Plasmidkonstrukte wird aber nur die mRNA eines Chromosoms erfasst, je nachdem ob die mRNA des einen oder des anderen Chromosoms in cDNA umgeschrieben, amplifiziert und in den Vektor kloniert zur Klonbildung des transformierten Bakteriums führt. Bei gefundenen Veränderungen kann damit keine Aussage bezüglich der Homo- oder Heterozygotie getroffen werden. Es muss immer damit gerechnet werden, dass diese Veränderungen nicht auf beiden Chromosomen vorhanden sind, sondern nur heterozygot auf einem Chromosom vorliegen. Eine heterozygote Veränderung ist aber für den Funktionsverlust der MMR nicht ausreichend (Ausnahme PMS2). Außerdem muss damit gerechnet werden, dass manche Mutationen nicht erfasst werden, da durch die Unterteilung der cDNA in Teilbereiche möglicherweise immer gerade die Chromosomenabschnitte des Chromosoms sequenziert werden, die an diesen Stellen nicht verändert sind. Allerdings können solche „verpassten“ Veränderungen nur heterozygot vorliegen und sind damit für einen Funktionsverlust ohne Relevanz.

Um sicherzustellen, dass gefundene Veränderungen, die für einen Funktionsverlust als relevant erachtet wurden, homozygot vorliegen, wurden die nicht klonierten PCR-Produkte der jeweiligen Fragmente, die eine Mischung der amplifizierten cDNAs beider Chromosomen darstellen, direkt sequenziert. Heterozygote Mutationen sind als Doppelpeaks, in den Sequenzierchromatogrammen erkennbar, während homozygote Veränderungen nur einen Peak zeigen.

Durch die Sequenzierung der PCR-Produkte kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass gefundene Veränderungen als sogenannte „compound heterozygote“ Veränderungen einen Funktionsverlust bewirken. Das heißt, liegen zwei gefundene Veränderungen gemeinsam auf einem Chromosom, während das homologe Chromosom unverändert ist, so übernimmt das nicht veränderte Protein die Funktion. Sind die Mutationen aber auf beide homologe Chromosomen verteilt, führen sie als „compound heterozygote“ Veränderungen zum Funktionsverlust.

Gefundene Veränderungen, sofern es sich nicht um Insertions-Deletions-Mutationen handelt, die eine Leserasterverschiebung und damit ein nicht funktionelles Protein zur Folge haben, sind außerdem nur schwer zu interpretieren. Es ist nicht vorhersehbar, wie sich eine Aminosäuresubstitution, die zu einer „Missense-Mutation“ führt, auf das Protein oder vielmehr dessen Funktion auswirkt.

Gefundene Veränderungen, die zu einem Aminosäureaustausch im Protein führen, führen nicht zwangsläufig zu einer veränderten Funktion des Proteins. Es muss immer überlegt werden, ob die ausgetauschten Aminosäuren ähnliche Eigenschaften aufweisen und damit die gleichen Funktionen übernehmen können und ob sie in einer für die Funktion des Proteins notwendigen Domäne liegen. Bereiche, die oft über mehrere Spezies hinweg konserviert sind, sind für die Funktion meist von essentieller Bedeutung und führen bei Veränderung zum Funktionsverlust, während Veränderungen in nicht konservierten Bereichen oft ohne Bedeutung sind.

4.3.2.1 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *msh2*-cDNA

Die in der *msh2*-Sequenz in L5178Y-Zellen gefundenen Veränderungen führen entweder nicht zu Aminosäuresubstitutionen und damit auch nicht zu einem Funktionsverlust oder sind nach dem Stop-Codon lokalisiert. Damit haben sie keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz und können als Ursache für einen Funktionsverlust ausgeschlossen werden.

4.3.2.2 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *msh6*-cDNA

In *msh6* konnten fünf Veränderungen gefunden werden, die nicht sicher als Fehler bei der Amplifikation oder bei der Sequenzierung ausgeschlossen werden können. Es kann aber ausgeschlossen werden, dass diese Veränderungen als homozygote Mutationen den MMR-Funktionsverlust bewirken, da diese immer nur in einer Sequenzierung gefunden wurden, während sie in anderen nicht vorhanden waren. Allerdings wäre es möglich, dass es sich um heterozygot auftretende Veränderungen handelt, die als sogenannte „compound heterozygote“ Veränderungen zu einem Funktionsverlust von MSH6 und damit zu einer MMR-Defizienz führen könnten.

Alle gefundenen Veränderungen (außer 2014C→G)) sind Insertions-Deletionsmutationen, die zu einer Leserasterverschiebung führen würden. Leserasterverschiebungen führen aber entweder dazu, dass das entsprechende Protein durch ein vorzeitiges Stop-Codon nur teilweise exprimiert wird oder das exprimierte Protein instabil ist und nach der Translation abgebaut wird. Es wäre durch Western Blot Analysen nicht mehr oder nur in deutlich geringerer Expressionshöhe nachweisbar. MSH6 konnte aber mittels Western Blot Analysen eindeutig und vergleichbar zu der in MMR-profizienten Kontrollzellen detektierten Proteinmenge nachgewiesen werden. Damit können die Deletions-Insertions-Veränderungen als echte Mutationen ausgeschlossen werden. Bei diesen Veränderungen handelt es sich vermutlich um

Fehler der Polymerase bei der Amplifizierung oder um Fehler bei der Sequenzierung. Es bleibt eine Nukleotidsubstitution von Cytidin nach Guanosin an Position bp2014. Diese Veränderung wurde aber nur in einem Fragment gefunden, während es in einem anderen nicht nachweisbar war. Damit kann ausgeschlossen werden, dass es sich um eine homozygote Veränderung handelt, die für den Funktionsverlust in L5178Y-Zellen verantwortlich gemacht werden kann. Auch MSH6 wird als Ursache für den MMR-Funktionsverlust ausgeschlossen.

4.3.2.3 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *pms1*-cDNA

In der *pms1*-Sequenz der L5178Y-Zellen konnten drei Veränderungen im Vergleich zur Referenzsequenz gefunden werden, die zum Austausch von Aminosäuren im Protein führen.

	<u>Veränderung</u>	<u>Bemerkung</u>
1	I102V	ähnliche Aminosäuren
2	A629V	ähnliche Aminosäuren
3	W637R	nicht ähnliche Aminosäuren

Eine Aussage darüber, ob die Veränderungen I102V und W637R wirkliche Veränderungen sind oder durch Fehler bei der Sequenzierung oder Amplifikation hervorgingen, kann nicht gemacht werden, da beide Fehler nicht in allen sequenzierten Fragmenten gefunden wurden. Es kann lediglich ausgeschlossen werden, dass sie als homozygote Veränderungen den Funktionsverlust bewirken. Eine potentielle Compound Heterozygotie kann nicht ausgeschlossen werden.

Die zweite Veränderung hingegen (A629V) wurde in beiden unabhängig voneinander amplifizierten und sequenzierten Fragmenten gefunden. Sie stellt vermutlich eine wirkliche Veränderung dar. Es kann aber keine Aussage darüber getroffen werden, ob sie homo- oder heterozygot vorliegt. Auf eine Sequenzierung der PCR-Produkte wurde verzichtet, da es sich hier um den Austausch zweier sehr ähnlicher Aminosäuren handelt, und damit nicht von einer Änderung der Funktion ausgegangen wird.

4.3.2.4 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *mlh3*-cDNA

Bei Abschluss der Arbeit war die Referenzsequenz XM_484162 (5603bp, mRNA mus musculus) durch eine andere Referenzsequenz unter der Accession Nummer NM_145446 (2077bp, mRNA mus musculus) ersetzt. Diese neu veröffentlichte Sequenz zeigt nur eine Übereinstimmung mit den letzten 2041bp der ursprünglichen

XM_484162-Sequenz. Die zugehörige Proteinsequenz dagegen zeigt nicht ein Protein, das für die cDNA-Länge von 2041bp zu erwarten wäre. Die cDNA scheint nach 183bp zum Abbruch der Aminosäuresequenz zu führen. Generell scheint es mit dieser Sequenz Unstimmigkeiten zu geben, da sie von NCBI zwischenzeitlich zur weiteren Überprüfung zurückgenommen wurde.

Die Sequenzierung der L5178Y-*mlh3*-Sequenz und der Vergleich mit der Sequenz XM_484162 ergab drei Veränderungen, die nicht sicher als Fehler bei der Amplifikation und/oder Sequenzierung ausgeschlossen werden konnten. Allerdings kann ausgeschlossen werden, dass diese Veränderungen homozygot vorliegen und damit einen Funktionsverlust bewirken könnten, da sie in mehreren anderen Fragmenten nicht auftraten. Die Möglichkeit eines Funktionsverlustes durch Compound Heterozygotie bleibt bestehen.

Durch Vergleich der L5178Y-Sequenz mit der Sequenz NM_145446 kann keine der drei Veränderungen bestätigt werden. Genausowenig die Deletion von 97bp, die durch den Vergleich der L5178Y-Sequenzen mit der Sequenz XM_484162 detektiert wurde.

Es ist nicht ersichtlich, welche der beiden Sequenzen die korrekte Sequenz in *Mus musculus* darstellt und mit welcher die Sequenzierungen letztendlich verglichen werden sollten. Wahrscheinlich ist, dass eine geeignete Referenzsequenz noch nicht existiert und damit Aussagen bezüglich einer MMR-Defizienz aufgrund von Veränderungen in *mlh3* bisher nicht sicher möglich sind.

4.3.2.5 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *msh3*-cDNA

Die Referenzsequenz (NM_010829.1), für die die Primer erstellt wurden, stellte eine Sequenz von 1185bp dar. Diese Sequenz wurde durch eine zweite Version (NM_010829.2, 3945bp) bei NCBI ersetzt. Nach Abschluss des experimentellen Teils der Arbeit war es somit nicht mehr möglich, die nötigen Amplifikationen und Sequenzierungen für diese neue Sequenz durchzuführen. Die Sequenzen die aufgrund der 1. Version der Referenzsequenz gewonnen wurden, wurden aber mit der 2. Version der Referenzsequenz verglichen, die mit den 1185bp der Version1 überwiegend übereinstimmt.

Die gefundene Deletion von zwei Nukleotiden (515/516(delAT)) in *msh3A* wurde nur in einem Fragment gefunden, da dieser Bereich nur einmal sequenziert wurde. Es kann also nicht gesagt werden, ob diese Deletion auf eine fehlerhafte Amplifikation

oder Sequenzierung beruht oder ob sie als wahre Veränderung homozygot oder heterozygot vorliegt.

Alle weiteren Veränderungen sind Nukleotidsubstitutionen, von denen fünf einen Aminosäureaustausch im Protein bewirken.

	<u>Veränderung</u>	<u>Bemerkung</u>
1	A82S	nicht ähnliche Aminosäuren
2	A146V	ähnliche Aminosäuren
3	E300S	nicht ähnliche Aminosäuren
4	T321I	nicht ähnliche Aminosäuren
5	V392E	nicht ähnliche Aminosäuren

Die Aminosäureaustausche von Alanin nach Serin (A82S), von Glutamat nach Serin (E300S) oder von Valin nach Glutamat (V392E) können jeweils nicht in allen sequenzierten Fragmenten gefunden werden und müssen als homozygote Veränderungen ausgeschlossen werden. Die Möglichkeit einer Compound Heterozygotie bleibt bestehen. Es bleiben die zwei Aminosäureaustausche von Alanin nach Valin (A146V) und von Threonin nach Isoleucin (T321I), von denen davon auszugehen ist, dass sie homozygot vorhanden sind und damit die MMR-Defizienz bewirken könnten. Allerdings stellen Alanin und Valin sehr ähnliche Aminosäuren dar, so dass auch hier nicht von einer Funktionsänderung durch diese Veränderung ausgegangen wird. Anders verhält es sich mit dem Austausch von Threonin nach Isoleucin. Sie stellen Aminosäuren unterschiedlicher Gruppen dar und könnten damit durchaus für die gefundene MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen verantwortlich sein. Eine eindeutige Aussage über Veränderungen in *msh3* ist aber aufgrund der später veröffentlichten zweiten Version der Referenzsequenz nicht möglich.

4.3.2.6 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *mlh1*-cDNA

Durch die Sequenzierung von *mlh1* konnten fünf Veränderungen gefunden werden, die zu einem Austausch von Aminosäuren im Protein führen.

	<u>Veränderung</u>	<u>Bemerkung</u>
1	I192F	nicht ähnliche Aminosäuren
2	D390E	ähnliche Aminosäuren
3	V404G	ähnliche Aminosäuren
4	T460A	nicht ähnliche Aminosäuren
5	C498S	nicht ähnliche Aminosäuren

Vier der fünf Veränderungen konnten anschließend durch Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt werden, während die fünfte Veränderung (C298S) als Mutation ausgeschlossen wurde. Diese zuvor in den klonierten und sequenzierten cDNA-Fragmenten gefundene Veränderung wird auf eine fehlerhafte Amplifikation des cDNA-Fragments zurückgeführt, da die sequenzierten Fragmente aus derselben PCR stammten.

Die Aminosäuresubstitution Isoleucin zu Phenylalanin (I192F) wird auf eine fehlerhafte Referenzsequenz zurückgeführt. Vergleicht man andere *mlh1*-Sequenzen (Mensch, Maus, Ratte oder Hund), so findet sich an dieser Stelle immer ein Phenylalanin statt des Isoleucins, das in der Referenzsequenz von *Mus musculus* vorhanden ist (Abb. 55). Deshalb wird dieser Austausch in L5178Y-Zellen im Vergleich zur Referenzsequenz als Mutation ausgeschlossen.

Die beiden Austausche Aspartat zu Glutamat (D390E) und Valin zu Glycin (V404G) stellen Austausche ähnlicher Aminosäuren dar und sind vermutlich nicht für den MMR-defizienten Phänotyp verantwortlich.

Der Bereich, in dem der Austausch D390E gefunden wurde, stellt einen Bereich mit sehr starker Übereinstimmung in den beiden Sequenzen hMLH1 und mMLH1 dar. Während das gefundene Glutamat in L5178Y-Zellen eine Veränderung gegenüber der mMLH1-Sequenz darstellt, ist in der humanen Sequenz das Glutamat regulär an dieser Stelle zu finden (Abb. 55). Nachdem beide Aminosäuren, Aspartat und Glutamat, sehr ähnliche Aminosäuren darstellen, der Austausch in einem Bereich großer Übereinstimmung der beiden Referenzsequenzen liegt und die humane Sequenz an dieser Stelle Glutamat aufweist, wird davon ausgegangen, dass beide Aminosäuren an dieser Stelle möglich sind. Ein Funktionsverlust durch diese Veränderung wird daher ausgeschlossen.

hMLH1	1	MSFVAGVIRRLDETVDVNRRIAAGEVIQRPANAIAKEMIENCLDAKSTSIQVIVKEGGGLKLIQ	60
mMLH1	1	M+FVAGVIRRLDETVDVNRRIAAGEVIQRPANAIAKEMIENCLDAKST+IQV+VKEGGGLKLIQ	60
hMLH1	61	IQDNGTGIRKEDLDIVCERFTTSKLSQSFEDLASISTYGFRGEALASISHVAHVTTITTKTA	120
mMLH1	61	IQDNGTGIRKEDLDIVCERFTTSKLSQ+FEEDLASISTYGFRGEALASISHVAHVTTITTKTA	120
hMLH1	121	DGKCAYRASYSYGKLGKAPPKPCAGNQGTQITVEDLFYNIATRKRKALKNPSEEEYGKILEVV	180
mMLH1	121	DGKCAYRASYSYGKLGK+APPKPCAGNQGT ITVEDLFYNI TRKRKALKNPSEEEYGKILEVV	180
L5178Y			
hMLH1	181	GRYSVHNAGISF SVKKQGETVADVRTLPNASTVDNIRSI FGNAVSRRELIEIGCEDKTLLAF	240
mMLH1	181	GRYS+HN+GIS SVKKQGETV+DVRTLPNASTVDNIRSI FGNAVSRRELIE+GCEDKTLLAF	240
hMLH1	241	KMNGYISNANYSVKKCIFLLFINHRLVESTSLRKAIAETVYAAAYLPKNTHPFLYLSLEISF	300
mMLH1	241	KMNGYISNANYSVKKCIFLLFINHRLVES +LRKAIAETVYAAAYLPKNTHPFLYLSLEISF	300
hMLH1	301	QNVDVNVHPTKHEVHFLHEESILERVQQHIESKLLGNSSSRMFTQTLPLGLAGPSGEMV	360
mMLH1	301	QNVDVNVHPTKHEVHFLHEESIL+RVQQHIESKLLGNSSSRMFTQTLPLGLAGPSGEAA	360
L5178Y			
hMLH1	361	KSTTSLTSSSTSGSSDKVYAHQMVRTDSRE QKLDAFLQPLSKPLSSQPQ--AIVTEDKTD	418
mMLH1	361	+ TT + SSSTSGS DKVYA+QMVRTDSR+QKLDAFLQP+S + SQPQ A V +T+ RPTTGVAASSSTSGSGDKVYAYQMVRTDSR QKLDAFLQPVSSLP SQPQPDPAPVRGARTE	420
L5178Y			
hMLH1	419	ISSGRARQQDEEMLELPAPAEVAAKNQSLGDDTTKGTSEVSEKRGPTSS--NPRKRHRED	476
mMLH1	421	S RA ++DEEMLELPAPAE AA++++LE ++ TS+ ++K PTSS + RKRHRED	480
hMLH1	477	SDVEMVEDDSRKEMTAACPRRRIINLTSVLSLQEEINEQGHEVLRREMLHNHSFVGCVNP	536
mMLH1	481	SDVEMVE+ S KEMTAAC PRRRIINLTSVLSLQEEI+E+ HE LREML NHSFVGCVNP	540
hMLH1	537	QWALAQHQTKLYLLNNTTKLSEELFYQILYDFANFGVLRLEPAPLFDLAMLALDSPESG	596
mMLH1	541	QWALAQHQTKLYLLNNTTKLSEELFYQILYDFANFGVLRLEPAPLFDLAMLALDSPESG	600
hMLH1	597	WTEEDGPKEGLAEYIVEFLKKAEMLADYFSLEIDEENLIGLPLLIDNYVPPLEGLPIF	656
mMLH1	601	WTE+DGPKEGLAEYIVEFLKKAEMLADYFS+EIDEENLIGLPLLID+YVPPLEGLPIF	660
hMLH1	657	ILRLATEVNWDEEKECFESLSKECAMFYSIKQYI SEESTLSGQQSEVPGSIPNSWKWTV	716
mMLH1	661	ILRLATEVNWDEEKECFESLSKECAMFYSIKQYI EESTLSGQQS++PGS WKWTV	720
hMLH1	717	EHIVYKALRSHILPPKHFTEDGNILQLANLPDLYKVFERC	756
mMLH1	721	EHI+YKA RSH+LPPKHFTEDGN+LQLANLPDLYKVFERC	760

Abb. 55: Darstellung der Aminosäuresequenzen von mMLH1 und hMLH1 sowie der Veränderungen, die sich aus dem Vergleich der mMLH1-Referenzsequenz und L5178Y-MLH1-Sequenz ergeben. Die einzelnen Veränderung der L5178Y-Sequenz im Vergleich zur mMLH1-Referenzsequenz sind gelb dargestellt, während die Aminosäuren der anderen beiden Sequenzen an diesen Stellen rot markiert sind.

Der Austausch Valin nach Glycin (V404G) stellt ebenfalls einen Austausch ähnlicher Aminosäuren dar und ist damit für einen Funktionsverlust dieses Proteins vermutlich

nicht von Bedeutung. Zudem wird in der humanen MLH1-Sequenz an dieser Stelle eine weitere, andere Aminosäure ähnlicher Eigenschaften gefunden (Abb. 55), so dass auch diese Veränderung als Grund für den MMR-defizienten Phänotyp in L5178Y-Zellen ausgeschlossen wird.

Der bestehende Aminosäureaustausch von Threonin nach Alanin (T460A) könnte allerdings durchaus einen Funktionsverlust bewirken. Es handelt sich dabei um nicht ähnliche Aminosäuren. Allerdings befindet sich diese Veränderung weder in der für die Dimerisierung mit anderen MutL-Homologen oder weiteren MMR-Proteinen notwendigen C-terminalen Region, noch in der für die MMR-Funktion wichtigen ATPase-Domäne im N-Terminus. Der Vergleich mit hMLH1 zeigt, dass diese Veränderung in einem Bereich geringer Übereinstimmung der beiden MLH1-Proteine liegt (Abb. 55). Naheliegender ist, dass es sich um die sogenannte Linker-Region handelt, die lediglich die funktionellen Domänen dieses MMR-Proteins verbindet. Damit wird auch diese Veränderung als Ursache für die gefundene MMR-Defizienz in L5178Y-Zellen ausgeschlossen.

4.3.2.7 Mutationssuche in den codierenden Bereichen von *pms2*-cDNA

Durch die Sequenzierung der kodierenden Bereiche des *pms2*-Gens aus L5178Y-Zellen konnte neben einer Insertions-Mutation (964(insC)) eine Reihe von Veränderungen nachgewiesen werden, die zu einer veränderten Proteinsequenz führen. Diese Veränderungen sind:

	<u>Veränderung der Nukleotidsequenz</u>	<u>Veränderung der Aminosäuresequenz</u>
1	279A→G	I32V
2	729T→G	S182A
3	821/822CG→GC	H212Q und A213P
4	844/845 CG→GC	T220S
5	964(insC)	G260R; 313Stop

Vergleicht man die murine mit der humanen Protein-Referenzsequenz, so zeigt sich eine sehr starke Sequenzhomologie der beiden PMS2-Protein-Sequenzen. Deshalb wird diese humane Referenzsequenz zur Abschätzung der gefundenen Veränderungen mitberücksichtigt. (Abb. 56) zeigt die beiden Referenzsequenzen hPMS2 und mPMS2 sowie die PMS2-Sequenz aus L5178Y-Zellen.

```

1
mPMS2 ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
hPMS2 ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
PMS2L5178Y IPVKVLKNFQ IPEYHWRRQI TCRQVTMVYM QQKWVLETR LFPRAAPQLS

51
mPMS2 ~~~~~~ ~MEQTEGVST ECAKAIKPID GKSVMHQICSG QVILSLSTAV
hPMS2 ~~~~~~ ~MERAESSST EPAKAIKPID RKSVMHQICSG QVILSLSTAV
PMS2L5178Y RGDCDWRSPA SMEQTEGVST ECAKAIKPID GKSVMHQICSG QVILSLSTAV

101
mPMS2 KELIENSVDA GATTIDLRLK DYGVDLIEVS DNGCGVEEEN FEGLALKHHT
hPMS2 KELVENS LDA GATNIDLK LK DYGVDLIEVS DNGCGVEEEN FEGLTLKHHT
PMS2L5178Y KELIENSVDA GATTIDLRLK DYGVDLIEVS DNGCGVEEEN FEGLALKHHT

151
mPMS2 SKIQEFADLT QVETFGFRGE ALSSLCALSD VTISTCHGSA SVGTRLVFDH
hPMS2 SKIQEFADLT QVETFGFRGE ALSSLCALSD VTISTCHASA KVGTRLMFDH
PMS2L5178Y SKIQEFADLT QVETFGFRGE ALSSLCALSD VTISTCHGSA SVGTRLVFDH

201
mPMS2 NGKITQKTPY PRPKGTTVSV QHLFYTL PVR YKEFQRNIKK EYAKMVQVLQ
hPMS2 NGKIIQKTPY PRPRGTTVSV QQLFSTLPVR HKEFQRNIKK EYAKMVQVLH
PMS2L5178Y NGKITQKTPY PRPKGTTVSV QHLFYTL PVR YKEFQRNIKK EYAKMVQVLQ

251
mPMS2 AYCIIISAGVR VSCTNQLGQG KRHA VVCTSG ISGMKENIGS VFGQKQLQSL
hPMS2 AYCIIISAGIR VSCTNQLGQG KROP VVCTGG SPSIKENIGS VFGQKQLQSL
PMS2L5178Y AYCIIISAGVR VSCTNQLGQG KROP VVCTSG ISGMKENIGS VFGQKQLQSL

301
mPMS2 IPFVQLPPSD AVCEEYGLST S.GRHKTFST FRASFHSART APGGVQQTG.
hPMS2 IPFVQLPPSD SVCEEYGLSC SDALHNLF.. YISGFISQCT HGVGRSSTDR
PMS2L5178Y IPFVQLPPSD AVCEEYGLST SRTPQNLF.. YVSGFISQCT HGAGRSATDR

351
mPMS2 SFSSSIRGPV TQQRSLSLSM RFYHMYNRHQ YPFVVLNVS V DSECVDINVT
hPMS2 QFFFINRRPC DPAKVCR LVN EVYHMYNRHQ YPFVVLNIS V DSECVDINVT
PMS2L5178Y QFFFINQRPC DPAKVS KL VN EVL...SHV *PASV.PICR P*RFR*LRMC

401
mPMS2 PDKRQILLQE EKLLLAVLKT SLIGMFSDSA NKLNVNQ... ..QPLLDV
hPMS2 PDKRQILLQE EKLLLAVLKT SLIGMFSDSV NKLNVSQ... ..QPLLDV
PMS2L5178Y ...GY*CNSR *KANSTTRE AIAGRF.KDL LDRNV*Q*CK QA*CQPAATA

451
mPMS2 E..GNLVKLH TAELEKPVPG K.QDNPSL K STADEKRVAS ISRLREAFSL
hPMS2 E..GNLIKMH AADLEKPMVE K.QDQSPSLR .TGEEKDVS ISRLREAFSL
PMS2L5178Y RC*R*LSKAA YCRTRKACAR KAR*LSFTEE HSRREKGSIH LQAERGLFSS

501
mPMS2 HPTKEIKSRG PETAELTRSF PSEK.RGVLS SYPSDVISYR GLRGSQDKLV
hPMS2 RHTTENKPHS PKTPEPRRSP LGQK.RGMLS SSTSGAISDK GVLRPQKEAV
PMS2L5178Y SY*RDQV*GS RDC*TDTEFS K*EKGRVILL SFRRHLLQRP PWL AQ...I

551
mPMS2 SPTDS.PGDC MDREKIEKDS GLSSTSAGSE EEFSTPEVAS SFSSDYNVSS
hPMS2 SSSHG.PSDP TDRAEVEKDS GHGSTSVDS. EGFSIPDTGS HCSSEYAASS
PMS2L5178Y GESHGQPW*L YGQRENKRL RAQQHLSWL* GRVQHPRSGQ *L*Q*L....

601
mPMS2 LEDRPSQETI NCGDLDCRPP GTGQSL.... ...KPEDHGY QCKALPL..A
hPMS2 PGDRGSQEHV ...DSQEKAP ETDDSFSDVD CHSNQEDTGC KFRVLPQP.T
PMS2L5178Y *RELPRRQTF S.GNHKLW*P GLPSSRYRTV LEARRPWISM QSSTSSSSVT

```

	651				700
mPMS2	RLSPTNAKRF	KTEERPSNVN	ISQRLPGPQS	TSAAEVDVAI	KMNKRIVLLE
hPMS2	NLATPNTKRF	KKEEILSSSD	ICQKLVNTQD	MSASQVDVAV	KINKKVVPLD
PMS2L5178Y	HKCQALQDRG	KTLKCQHFSK	IAWSSEHLSS	*GRCSHKNE*	ENRAPRVLSE
	701				750
mPMS2	FSLSSLAKRM	KQLQHLKAQN	KHELSEYRKF	AKICPGENQA	AEDELKREIS
hPMS2	FSMSSLAKRI	KQLHHEAQQS	EGEQNYRKF	AKICPGENQA	AEDELKREIS
PMS2L5178Y	F..SS*ANE	VTAPKGAEQT	*TEL..QKI*	GQDLPWRKPS	SRR*TQKRD*
	751				800
mPMS2	KSMFAEMEIL	GQFNLGFIIVT	KLKEDLFLVD	QHAADKEYNF	.EMLQQHTVL
hPMS2	KTMFAEMEII	GQFNLGFIIT	KLNEDIFIVD	QHATDEKYNF	.EMLQQHTVL
PMS2L5178Y	*IDVCRDGD	GSV*PGIYSN	QTERGPLPGG	PACCG*EVQL	*DAAAAGAP
	801				850
mPMS2	QAQRLITPQT	LNLTAVNEAV	LIENLEIFRK	NGDFDFVIDE	APVTERAKLI
hPMS2	QGQRLIAPQT	LNLTAVNEAV	LIENLEIFRK	NGDFDFVIDE	APVTERAKLI
PMS2L5178Y	GAEAHHTPDS	.ELNCCQ*SC	TDRKSGNIQK	EWL*LCH**G	CSSH*KG*ID
	851				900
mPMS2	SLPT...SKN	WTFGPQDIDE	LIFMLSDSPG	VMCPRSRVRQ	MFASRACRKS
hPMS2	SLPT...SKN	WTFGPQDVDE	LIFMLSDSPG	VMCPRSRVKQ	MFASRACRKS
PMS2L5178Y	FLTN**KLDL	WTPRYR*TD.	.LYVK*QPWG	HV..PALTSQ	...TDVCFQS
	901				950
mPMS2	VM.IGTALNA	SEMKKLITHM	GEMDHPWNCP	HG..RPTMR.	..HVANLDVI
hPMS2	VM.IGTALNT	SEMKKLITHM	GEMDHPWNCP	HG..RPTMR.	..HIANLGVI
PMS2L5178Y	LSEVSDDWNG	AQC.....	.ERDEEAHHP	HG*DGPPLEL	PPRQANHEAR
	951				1000
mPMS2	SQN~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
hPMS2	SQN~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
PMS2L5178Y	CQSGCHLSEL	THPL*HRVYY	RLFGLQREGF	K*SDYRCTKI	SMLL*CTGSI
	1001				1050
mPMS2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
hPMS2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
PMS2L5178Y	*KQC*GRHDG	VFL*LSYLG	PVGAHVSPGL	*DHSEPHS*D	SIQGQKKKI
	1051				
mPMS2	~~~~~				
hPMS2	~~~~~				
PMS2L5178Y	FFAF*KK				

Abb. 56: Darstellung der Aminosäure-Referenzsequenzen mPMS2 und hPMS2 sowie der L5178Y-PMS2-Sequenz: Alle Veränderungen der L5178Y-Sequenz im Vergleich zur mPMS2-Referenzsequenz, sowie die Aminosäuren von hPMS2, die an den Stellen der Veränderungen stehen, sind rot gekennzeichnet.

Alle vier Veränderungen vor der Insertions-Mutation führen zu Austausch von Aminosäuren, die in der humanen Sequenz regulär zu finden sind und die damit nicht als Ursache eines MMR-Funktionsverlustes in Betracht gezogen werden (Abb. 56). Dagegen führt die Insertions-Mutation nach 260 Aminosäuren zu einer Leserasterverschiebung und anschließend zu einem Aminosäureabbruch nach 313 Aminosäuren. (Abb. 56, Abb. 57). Die Veränderungen sind immer in Bezug auf das erste Start-Codon angegeben. Die Nummerierung in der Abbildung bezieht sich nicht auf das erste Start-Codon und stimmt damit nicht mit den Angaben im Text überein.

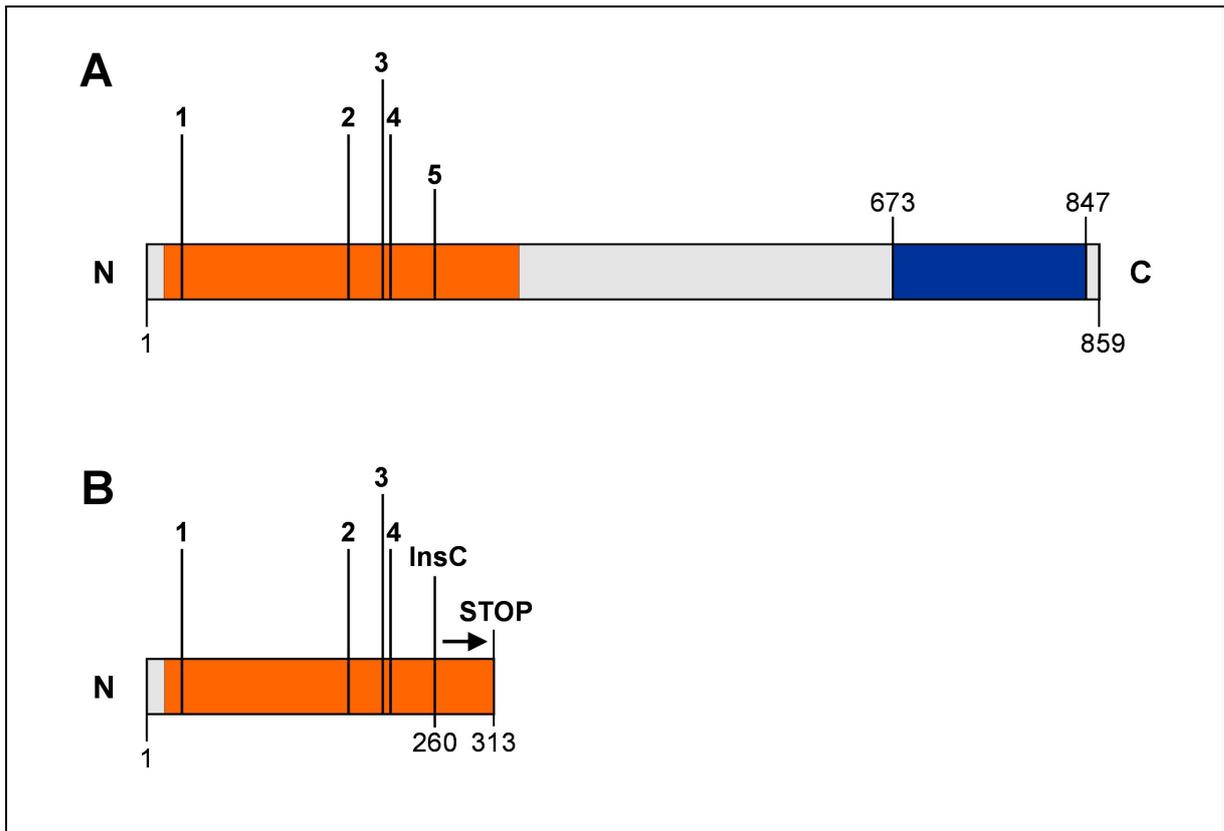


Abb. 57: Schematische Darstellung des mPMS2-Proteins (A) und des verkürzten PMS2-Proteins aus L5178Y-Zellen (B). Abbildung A zeigt die PMS2-Proteinsequenz mit den funktionellen Domänen in orange (ATPase-Domäne) und blau (Dimerisierungsdomäne) sowie die Veränderungen, die in der PMS2-Sequenz von L5178Y-Zellen im Vergleich zur Referenzsequenz gefunden wurden (1-5). Die Abbildung B zeigt das mögliche PMS2-Transkript aus L5178Y-Zellen, das lediglich aus der ATPase-Domäne (orange) besteht. Gezeigt ist außerdem die Insertionsmutation (InsC), die zu einer Leserasterverschiebung nach 260 Aminosäuren und anschließend zu einem Stop-Codon nach 313 Aminosäuren führt.

Dieser Aminosäureabbruch führt dazu, dass nur die Information für den N-terminalen Bereich, der die ATP-bindende Domäne des MMR-Proteins darstellt, vorhanden ist. Die Information für die C-terminale Region, die für die Komplexbildung mit MLH1 notwendig und damit für die MMR-Funktion essentiell ist, fehlt. Damit kann lediglich der N-terminale Bereich mit der ATP-bindenden Domäne exprimiert werden. Ein verkürzt translatiertes Protein wird aber als nicht funktionsfähiges Protein erkannt und abgebaut oder übernimmt nur die Funktion, die durch die bestehende funktionelle Domäne möglich ist. Das heißt, PMS2 besitzt zwar möglicherweise die N-terminale Domäne und damit seine ATPase-Funktion, kann aber aufgrund der fehlenden Dimerisierungsdomäne trotzdem nicht mit MLH1 interagieren und somit seine Funktion als MMR-Protein nicht wahrnehmen.

Während für andere MMR-Proteine beide Allele Mutationen aufweisen müssen, um eine MMR-Defizienz zu verursachen, konnte für PMS2 gezeigt werden, dass der

Funktionsverlust eines Allels zur Ausprägung der Defizienz ausreichend ist (Nicolaidis et al., 1998). Bei der Insertionsmutation 964(InsC) in L5178Y-Zellen handelt es sich aber mit großer Wahrscheinlichkeit um eine homozygote Insertionsmutation, da durch die Sequenzierung der *pms2*-PCR-Produkte keine Heterozygotie gezeigt werden konnte.

Die Kenntnis des genetischen Hintergrunds von Zelllinien, die in der Routine-Gentoxizitätstestung Anwendung finden, ist von großer Bedeutung für die Auswahl einer geeigneten Test-Zelllinie und die anschließende Bewertung der durch sie gewonnenen Testergebnisse. Je mehr über den genetischen Hintergrund solcher Zellen bekannt ist, desto besser können Testergebnisse interpretiert werden.

Zudem ist es möglich für Substanzgruppen, die getestet werden sollen auf Testzellen zurückzugreifen, von denen zu erwarten ist, dass sie aufgrund ihres genetischen Hintergrunds auf diese Substanzgruppe besonders sensitiv reagieren.

Andererseits können aber auch solche besonders sensitiven Test-Zelllinien aus der Testung ausgeschlossen werden, wenn davon auszugehen ist, dass sie einen DNA-Schaden anzeigen, der in unveränderten Zellen des Organismus nicht auftritt. Damit könnte verhindert werden, dass zum Beispiel im Rahmen der Zulassung von Pharmazeutika Substanzen ausgeschlossen werden, die eigentlich potente Arzneimittel darstellen.

In der L5178Y-Mauslymphomzelllinie war bisher eine p53-Mutation bekannt. Mit der Kenntnis der zusätzlichen MMR-Defizienz ist es möglich, diese Zelllinie noch gezielter für Substanztestungen einzusetzen und Ergebnisse unter Berücksichtigung der MMR-Defizienz zusätzlich zu der p53-Mutation noch besser zu interpretieren.

5 Zusammenfassung

Die Entwicklung und Zulassung von Arzneimitteln sowie die Bewertung von Xenobiotika erfordern eine Reihe von Testsystemen zur Toxizitätsermittlung. Für die Überprüfung der Gentoxizität stehen eine Vielzahl etablierter Testsysteme zur Verfügung, die oft auf Krebszelllinien basieren. Krebszelllinien haben jedoch die Eigenschaft, neben den für die Testung notwendigen Veränderungen weitere Veränderungen zu tragen, die zu Reaktionen führen können, wie sie in den Primärzellen des Organismus nicht auftreten. Daher ist die Kenntnis des genetischen Hintergrunds der verwendeten Krebszelllinien wertvoll, um Testergebnisse bewerten und gentoxische Risikopotentiale abschätzen zu können.

Die Mauslymphomzelllinie L5178Y nimmt unter den auf Krebszellen basierenden Testsystemen eine besondere Stellung ein, da sie die weltweit in der Gentoxizitätsprüfung am häufigsten eingesetzte Zelllinie ist. In der vorliegenden Arbeit wurde in dieser Zelllinie eine Veränderung nachgewiesen, die das Mismatch-Reparatur-System (MMR-System) betrifft.

Bei der MMR handelt es sich um einen Mechanismus, der daran beteiligt ist, die Integrität des Genoms zu gewährleisten. In MMR-profizienten Zellen werden Fehler in der DNA, die bei der Replikation, der homologen Rekombination oder durch äußere gentoxische Einwirkungen entstehen, entweder erkannt und repariert, oder die geschädigten Zellen werden durch die Induktion von Apoptosen eliminiert. Im Gegensatz dazu überleben MMR-defiziente Zellen trotz gravierender DNA-Schäden und akkumulieren diese.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Akkumulierung von Genomschäden bei L5178Y-Zellen als Reaktion auf Behandlung mit alkylierenden Agenzien beobachtet, während andere Vergleichszelllinien Apoptosen induzierten. Dieses Verhalten der L5178Y-Zellen, das in der Literatur bei MMR-defizienten Zellen für alkylierende Agenzien beschrieben ist, führte zu der Vermutung, dass die L5178Y-Zellen einen MMR-defizienten Phänotyp aufweisen.

Dieser MMR-defiziente Phänotyp wurde durch gezielte Behandlung von L5178Y-Zellen und Zellen mit bekanntem MMR-Status mit dem alkylierenden Agens MNNG und dem anschließenden Vergleich der Reaktionen geprüft und bestätigt. Der Vergleich erfolgte durch den Nachweis gentoxischer Effekte im Mikrokern-Test und im Comet Assay.

Auf Proteinebene konnte für den gezeigten MMR-defizienten Phänotyp bei den drei wichtigsten, in die MMR involvierten Proteine, MLH1, MSH2 und MSH6 keine Ursache gefunden werden: Alle untersuchten Proteine zeigten eine Expression, die mit denen der MMR-profizienten Kontrollzelllinien vergleichbar war.

Auf DNA-Ebene wurde durch die Analyse aller bekannter, in die MMR involvierter Gene durch die Sequenzierung der kodierenden Bereiche als wichtigste Veränderung eine Insertions-Mutation (964(insC)) in *pms2* gefunden. Diese führt nach 260 Aminosäuren zu einer Leserasterverschiebung und nach 313 Aminosäuren zu einem Abbruch der Aminosäuresequenz aufgrund eines Stop-Codons. Zwar ist somit die Information für den N-terminalen Bereich von PMS2, der die DNA-Bindedomäne und die ATP-ase aktiven Stellen beinhaltet, vorhanden, die für den C-Terminus hingegen, der für die Dimerisierung mit dem MMR-Protein MLH1 und damit für die Funktion essentiell ist, fehlt.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die L5178Y-Zelllinie MMR-defizient ist. Mit der Insertions-Mutation (964(insC)) in *pms2* wurde eine molekulare Ursache gefunden, die diese Defizienz erklären kann. Daraus folgt für den Einsatz der L5178Y-Zelllinie in Gentoxizitätstests, dass die Berücksichtigung ihrer MMR-Defizienz die Möglichkeit der Bewertung von Testergebnissen erheblich erweitern kann.

6 Summary

The development and approval of pharmaceuticals as well as the evaluation of xenobiotics require several test systems for the detection of genotoxicity. There is a number of established genotoxicity test systems, which are often based on cancer cell lines. In addition to mutations that are essential for genotoxicity testing, cancer cell lines may also carry mutations that might cause reactions not occurring in the primary cells of the organism. Therefore the knowledge of the genetic background of the cell line used is important for the evaluation of test results and the subsequent genotoxicity risk assessment.

Among test systems that are based on cancer cells the mouse lymphoma cell line L5178Y adopts a very prominent position due to its worldwide application for genotoxicity testing. The dissertation on hand provides evidence that there are mutations in the L5178Y cell line that are related to the mismatch-repair system (MMR system). MMR participates in safeguarding the genomic integrity.

In MMR-proficient cells, DNA defects that arise during replication, homologous recombination or as a result of genotoxic effects are either recognized and repaired or the genetically altered cells are eliminated by induction of apoptosis. MMR-deficient cells, however, survive despite serious DNA defects and accumulate them.

The accumulation of DNA damage as result of treatment with alkylating agents had been observed in L5178Y cells while other cell lines had reacted with an induction of apoptosis. The induction of apoptosis after treatment with alkylating agents is described in the literature as a typical behaviour for MMR-deficient cells. From this the hypothesis was established, that L5178Y-cells might exhibit a MMR-deficient phenotype.

This MMR-deficient phenotype was proven by selective treatment of L5178Y cells and cells with known MMR status with the alkylating agent MNNG followed by the subsequent comparison of the different reactions. The comparison was carried out by the detection of genotoxic effects using the micronucleus test and the comet assay.

On the protein level there was not an indication that the observed MMR-deficiency was related to the the three most important MMR-proteins MSH2, MLH1 and MSH6: All proteins demonstrated expression levels that were comparable to the levels of the MMR-proficient control cells.

On the DNA level, however, several mutations were detected by sequence analysis

of the coding regions of all genes known to be involved in MMR. The most important among these mutations was an insertion mutation (964(insC)) in *pms2*, that caused a frameshift after 260 amino acids. By this frameshift, a stop-codon was introduced, leading to an interruption of the sequence after 313 amino acids. While the information of the N-terminal region of *pms2* containing the DNA-binding domain as well as the ATPase active sites is still present, the information of the C-terminus is lost. This region is responsible for the dimerisation with the MMR-protein MLH1. Therefore, the MMR-function that is due to this complex, is missing.

In conclusion, a MMR-deficiency of L5178Y cells was demonstrated. This MMR-deficiency is explained by an insertion-mutation in *pms2* (964(insC)). Consideration of this MMR-deficiency enhances the meaningfulness of the evaluation of test results with L5178Y mouse lymphoma cells in risk assessment.

7 Anhang

7.1 Erstellen isogenetischer Zellen mit unterschiedlichem MMR-Status

Parallel zur Untersuchung des MMR-Status der L5178Y-Mauslymphomzellen, sollten isogenetische Zelllinien mit unterschiedlichem MMR-Status hergestellt werden. Diese sollten zum einen beweisen, dass unterschiedliche Reaktionen von Zellen unterschiedlichen MMR-Status auf den jeweiligen MMR-Status zurückzuführen sind und zum anderen sollte so gezielt das MMR-abhängige Verhalten der Zellen auf verschiedene Substanzen aufgezeigt werden. Mittels RNA-Interferenz ist es möglich isogenetische Zellen zu erhalten, die sich nur in einer Eigenschaft (hier MMR-Status) unterscheiden.

7.2 Konstruktion des Vektors

Für die Herstellung isogenetischer Zellen, die sich nur in der Expression von MLH1 unterscheiden, wurde der induzierbare Vektor pRNATin-H1.2/Neo der Firma Genescript gewählt (2.2.6) und mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und HindIII geschnitten (2.3.3.14.2).

Um den Abbau der *mlh1*-mRNA und damit die Hemmung der MLH1-Protein-Expression in MMR-profizienten zu gewährleisten, wurde auf eine von Luo und Lin veröffentlichte Sequenz zurückgegriffen (Luo et al., 2004). Mit dieser Sequenz folgte wie unter 2.3.12.1 beschrieben die Konstruktion der Oligonukleotide *shhmlh1*(1) und *shhmlh1*(2), die anschließend bei GeneScript synthetisiert wurden (Abb. 58)

```

5´-GATCC-GGTCACTACTAGTAACT-TTCAAGAGA-AGTTACTAGTAGTGAACC-TTTTTT-GGAAA-3´
3´-G-CCAAGTCATGATCATTTGA-AAGTCTCT-TCAAATGATCATCACTTGG-AAAAAA-CCTTT-TCGA-5´

```

Abb. 58: Insert zur Erstellung des *shhmlh1*-Konstrukts: Sense- und Antisense-Sequenz sind rot, die Linker-Sequenz ist schwarz dargestellt. Die Terminationssequenz ist blau, die Überhänge für die Schnittstellen sind grün.

Die von Luo et al., übernommene MLH1- und komplementäre Sequenz ist rot dargestellt. Die konstruierten Überhänge für die BamHI und HindIII-Schnittstelle sind grün. Die Linker-Sequenz ist schwarz gezeigt. Termination und Rest sind grau.

Beide Oligonukleotide wurden einer Annealingreaktion unterzogen, das doppelsträn-

gige Insert anschließend mit dem Vektor ligiert und in *E. coli* transformiert (2.3.12.1). Das Konstrukt wurde mit *shhmlh1* bezeichnet. Zur Überprüfung der erfolgreichen Insertion des Fragments in den Vektor wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (2.3.3.11, Abb. 59). Positive Klone wurden in einer Übernachtskultur angezogen (2.3.1.1), die Plasmide aus dieser Kultur isoliert (2.3.3.12) und diese durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und HindIII nochmals überprüft (2.3.3.14.2) (Abb. 60). Die Konstrukte wurden anschließend bei der Firma MWG Biotech mit den Primern pRNA_for und pRNA_rev sequenziert und auf die korrekte Sequenz und Insertion des *shhmlh1*-Inserts überprüft.

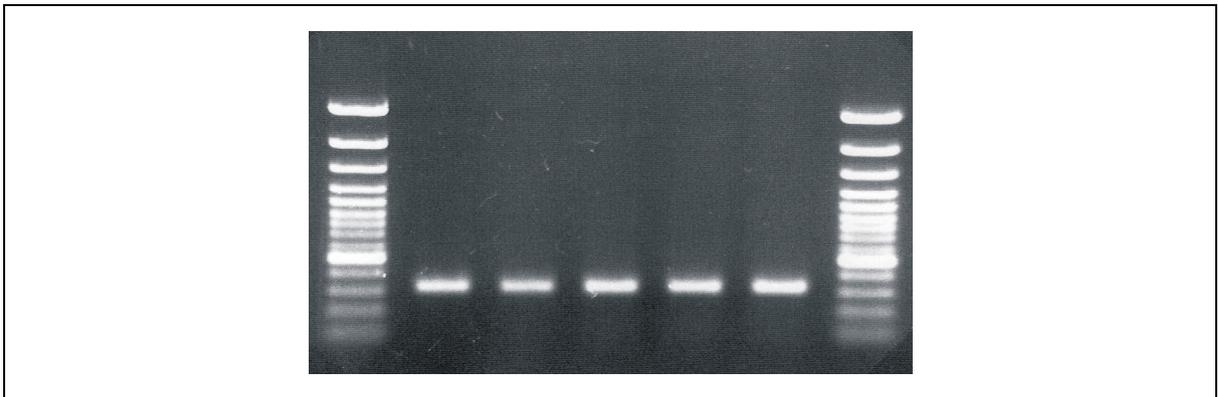


Abb. 59: Überprüfung der Insertion des Fragments *shhmlh1* in den Vektor pRNATin-H1.2/Neo durch Kolonie-PCR: Die Abbildung zeigt Banden auf einer Höhe von ~300bp in allen Kolonien. Diese Banden entsprechen der erwarteten Größe von 311bp.

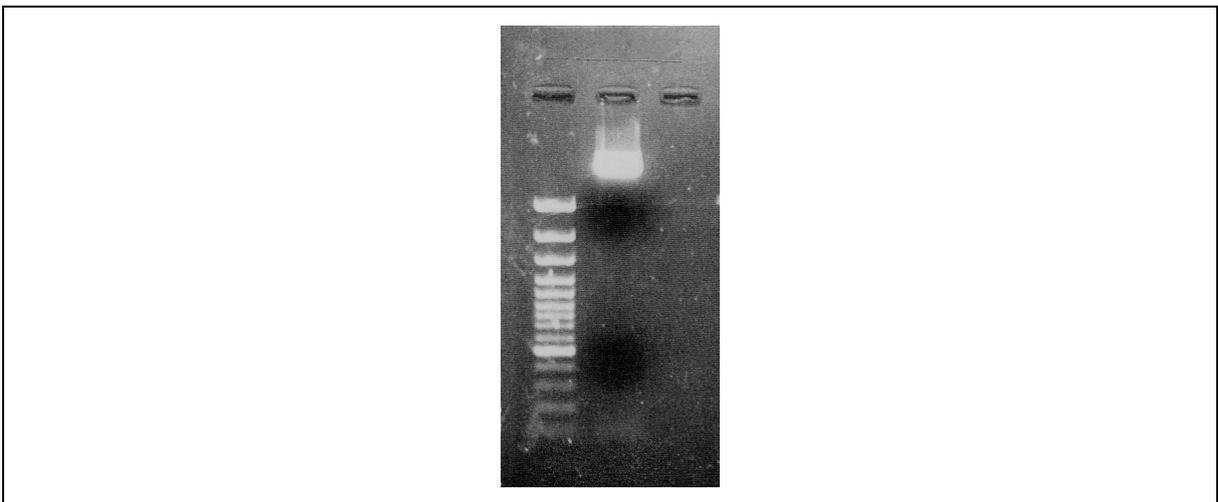


Abb. 60: Überprüfung der Insertion des Fragments *shhmlh1* in den Vektor pRNATin-H1.2/Neo durch Restriktionsverdau: Die Abbildung zeigt eine Bande auf einer Höhe von ~100bp. Diese Bande entspricht der erwarteten Größe (Fragment 67bp).

Es konnte zum einen gezeigt werden, dass die isolierten Plasmide ein Insert mit der Größe des „hairpin“-Konstrukts tragen. Es zeigt sich eine Bande auf Höhe der

100bp-Markerbande. Das konstruierte Fragment mit einer Größe von 67bp konnte erfolgreich in den Vektor kloniert werden. Eine zusätzliche Bande über der Höhe der 3000bp-Markerbande zeigt den geschnittenen Vektor.

1	NNNNNTNGAN	TNGGGCAGAT	ATACGCGTTT	ATACGACTCA	CTATAGGGAG
51	AGAGAGAGAA	TTACCCTCAC	TAAAGATATT	TGCATGTCGC	TATGTGTTCT
101	GGGAAATCAC	CATAAACGTG	AAACTCTATC	ATTGATAGAG	TTCTTATAAG
151	TTCTGTATGA	GACCACTCG	G ATCCGGTTCA	CTACTAGTAA	ACTTCAAGA
201	GAAGTTTACT	AGTAGTGAAC	CTTTTTTGA	AAAGCT	TAAG TTTAAACCGC
251	TGATCAGCCT	CGACTGTGCC	TTCTAAATAG	TAATCAATTA	CGGGGTCATT
301	AGTTCATAGC	CCATATATGG	AGTTCGCGT	TACATAACTT	ACGGTAAATG
351	GCCCGCCTGG	CTGACCGCCC	AACGACCCCC	GCCCATGAC	GTCAATAATG
401	ACGTATGTTC	CCATAGTAAC	GCCAATAGGG	ACTTTCCATT	GACGTCAATG
451	GGTGGAGTAT	TTACGGTAAA	CTGCCCACTT	GGCAGTACAT	CAAGTGTATC
501	ATATGCCAAG	TACGCCCCCT	ATTGACGTCA	ATGACGGTAA	ATGGCCCCGC
551	TGGCATTATG	CCCAGTACAT	GACCTTATGG	GACTTTCCTA	CTTGGCAGTA
601	CATCTACGTA	TTAGTCATCG	CTATTACCAT	GGTGATGCGG	TTTTGGCAGT
651	ACATCAATGG	GCGTGGATAG	CGGTTTGACT	CACGGGGATT	TCCAAGTCTC
701	CACCCCATTG	ACGTCAATGG	GAGTTTGTTT	TGGCACCAA	ATCAACGGGA
751	CTTTCCAAA	TGTCGTAACA	ACTCCGCCCC	ATTGACGCAA	ATGGGCGGTA
801	GGCGTGTACG	GTGGGAGGTC	TATATAAGCA	GAGCTGGTTT	AGTGAACCGT
851	CAGATCCGCT	AGCGTACCG	GTCGCCACCA	TGGCCAGCAA	GGGCGAGGAG
901	CTGTTACCG	GCGTGGTGCC	CATCCTGGTG	GAGCTGGACG	GCGATGTGAA
951	TGGGCACAAG	TTCAGCGTGA	GCGGCGAGGG	CGAGGGCGAT	GCCACCTACG
1001	GNAGCTGACC	CTGAGTCATC	TGCACACNGC	AAGCTGCTGT	GCCTNNNACN
1051					

Abb. 61: Nukleotidsequenz des konstruierten Plasmids: Gezeigt ist die Vektorsequenz mit der eingefügten Sequenz des ligierten Inserts *shhmlh1* (gelb markiert).

Der Vergleich der DNA-Sequenz des Vektors mit dem sequenzierten Bereich der eingeschickten Plasmide zeigt eine Übereinstimmung mit der Vektorsequenz bis zu der BamH-I und HindIII-Schnittstelle. Zusätzlich weisen die Plasmide die Sequenz des inserierten Konstrukts auf. Der Vergleich der Sequenzierung mit dem konstruierten Konstrukt zeigt eine 100%ige Übereinstimmung. Das Insert ist an korrekter Stelle inseriert worden und weist die richtige Sequenz auf. Das Plasmid sollte in der Lage sein die Expression des MMR-Proteins MLH1 in MMR-profizienten Zellen zu hemmen, so dass diese einen MMR-defizienten Phänotyp aufweisen.

Die Transfektion dieses Plasmids und die anschließende Überprüfung der MLH1-Expression wurde in der Masterthesis von Kathrin Fischer (Fischer, 2006) weitergeführt. Nach Transfektion in MCF-7-Zellen konnte weder eine Abnahme der *mlh1*-mRNA noch des MLH1-Proteins beobachtet werden. Die anschließende Untersuchung zeigte, dass der *shhmlh1*-Vektor nach Einbringen in die Zellen stark mutiert

war. Möglich ist, dass die induzierte Verringerung des MLH1-MMR-Proteins zu einem Mutator-Phänotyp geführt hat. Da RNA-Interferenz eine hohe Sequenz-Spezifität erfordert, führte der mutierte *shhmlh1*-Vektor zum Ende des RNAi-vermittelten Abbaus der MLH1-mRNA. Folglich verhinderte ein selbstzerstörerisches System die Herstellung isogenetischer Zelllinien, die sich nur in ihrem MMR-Status unterscheiden.

8 Referenzen

- Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., Juhn, G., Kasweck, K.L., Lin, P.F., Wadhams, A., and Hozier, J.C.** (1990). Molecular dissection of mutations at the heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 51-55.
- Aquilina, G., and Bignami, M.** (2001). Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage. *J Cell Physiol* **187**, 145-154.
- Aquilina, G., Crescenzi, M., and Bignami, M.** (1999). Mismatch repair, G(2)/M cell cycle arrest and lethality after DNA damage. *Carcinogenesis* **20**, 2317-2326.
- Benjamin, M.B., Potter, H., Yandell, D.W., and Little, J.B.** (1991). A system for assaying homologous recombination at the endogenous human thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6652-6656.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J.** (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- Bignami, M., O'Driscoll, M., Aquilina, G., and Karran, P.** (2000). Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. *Mutat Res* **462**, 71-82.
- Borden, E.C.** (1978). Synergistic cytotoxicity for L929 cells of polyribonucleoside-polyribocytidylic acid and amphotericin B methyl ester. *J Natl Cancer Inst* **60**, 1309-1311.
- Boyer, J.C., Umar, A., Risinger, J.I., Lipford, J.R., Kane, M., Yin, S., Barrett, J.C., Kolodner, R.D., and Kunkel, T.A.** (1995). Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. *Cancer Res* **55**, 6063-6070.
- Buermeyer, A.B., Deschenes, S.M., Baker, S.M., and Liskay, R.M.** (1999). Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* **33**, 533-564.
- Burdett, V., Baitinger, C., Viswanathan, M., Lovett, S.T., and Modrich, P.** (2001). In vivo requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6765-6770.
- Cannavo, E., Marra, G., Sabates-Bellver, J., Menigatti, M., Lipkin, S.M., Fischer, F., Cejka, P., and Jiricny, J.** (2005). Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. *Cancer Res* **65**, 10759-10766.
- Ceccotti, S., Aquilina, G., Macpherson, P., Yamada, M., Karran, P., and Bignami, M.** (1996). Processing of O6-methylguanine by mismatch correction in human cell extracts. *Curr Biol* **6**, 1528-1531.

- Cejka, P., Stojic, L., Mojas, N., Russell, A.M., Heinimann, K., Cannavo, E., di Pietro, M., Marra, G., and Jiricny, J.** (2003). Methylation-induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *Embo J* **22**, 2245-2254.
- Clark, A.B., Valle, F., Drotschmann, K., Gary, R.K., and Kunkel, T.A.** (2000). Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes. *J Biol Chem* **275**, 36498-36501.
- Clark, L.S., Hart, D.W., Vojta, P.J., Harrington-Brock, K., Barrett, J.C., Moore, M.M., and Tindall, K.R.** (1998). Identification and chromosomal assignment of two heterozygous mutations in the Trp53 gene in L5178Y/Tk(+/-)-3.7.2C mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* **13**, 427-434.
- Clive, D.** (1973). Recent developments with the L5178Y TK heterozygote mutagen assay system. *Environ Health Perspect* **6**, 119-125.
- Clive, D., Flamm, W.G., Machesko, M.R., and Bernheim, N.J.** (1972). A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Mutat Res* **16**, 77-87.
- Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F., Batson, A.G., and Brown, M.M.** (1979). Validation and characterization of the L5178Y/TK+/- mouse lymphoma mutagen assay system. *Mutat Res* **59**, 61-108.
- Combes, R.D., Stopper, H., and Caspary, W.J.** (1995). The use of L5178Y mouse lymphoma cells to assess the mutagenic, clastogenic and aneugenic properties of chemicals. *Mutagenesis* **10**, 403-408.
- Cooper, D.L., Lahue, R.S., and Modrich, P.** (1993). Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. *J Biol Chem* **268**, 11823-11829.
- Dao, V., and Modrich, P.** (1998). Mismatch-, MutS-, MutL-, and helicase II-dependent unwinding from the single-strand break of an incised heteroduplex. *J Biol Chem* **273**, 9202-9207.
- Drummond, J.T., Li, G.M., Longley, M.J., and Modrich, P.** (1995). Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science* **268**, 1909-1912.
- Edelmann, W., Umar, A., Yang, K., Heyer, J., Kucherlapati, M., Lia, M., Kneitz, B., Avdievich, E., Fan, K., Wong, E., Crouse, G., Kunkel, T., Lipkin, M., Kolodner, R.D., and Kucherlapati, R.** (2000). The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression. *Cancer Res* **60**, 803-807.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T.** (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Fedier, A., and Fink, D.** (2004). Mutations in DNA mismatch repair genes: implications for DNA damage signaling and drug sensitivity (review). *Int J Oncol* **24**, 1039-1047.

-
- Fenech, M.** (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* **455**, 81-95.
- Fischer, K.** (2006). Role of the mismatch repair status and the cytosin methylation in the sensitivity of cells towards genotoxic agents.
- Flores-Rozas, H., Clark, D., and Kolodner, R.D.** (2000). Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mispair recognition complex. *Nat Genet* **26**, 375-378.
- Genschel, J., Littman, S.J., Drummond, J.T., and Modrich, P.** (1998). Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *J Biol Chem* **273**, 19895-19901.
- Gu, L., Hong, Y., McCulloch, S., Watanabe, H., and Li, G.M.** (1998). ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res* **26**, 1173-1178.
- Guarne, A., Junop, M.S., and Yang, W.** (2001). Structure and function of the N-terminal 40 kDa fragment of human PMS2: a monomeric GHL ATPase. *Embo J* **20**, 5521-5531.
- Guerrette, S., Wilson, T., Gradia, S., and Fishel, R.** (1998). Interactions of human hMSH2 with hMSH3 and hMSH2 with hMSH6: examination of mutations found in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Mol Cell Biol* **18**, 6616-6623.
- Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L., and Prakash, S.** (1998). ATP-dependent assembly of a ternary complex consisting of a DNA mismatch and the yeast MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 protein complexes. *J Biol Chem* **273**, 9837-9841.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hawn, M.T., Umar, A., Carethers, J.M., Marra, G., Kunkel, T.A., Boland, C.R., and Koi, M.** (1995). Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res* **55**, 3721-3725.
- Hickman, M.J., and Samson, L.D.** (1999). Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10764-10769.
- Hickman, M.J., and Samson, L.D.** (2004). Apoptotic signaling in response to a single type of DNA lesion, O(6)-methylguanine. *Mol Cell* **14**, 105-116.
- Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T., and Hayashi, M.** (2001). Spindle poisons induce allelic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction. *Mutat Res* **493**, 101-114.
- Ibelgaufts, H.** (1993). *Gentechnologie von A bis Z*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Kaina, B., and Christmann, M.** (2002). DNA repair in resistance to alkylating anti-cancer drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther* **40**, 354-367.
-

- Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K., and Coquerelle, T.** (1997). Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat Res* **381**, 227-241.
- Kaina, B., Ochs, K., Grosch, S., Fritz, G., Lips, J., Tomicic, M., Dunkern, T., and Christmann, M.** (2001). BER, MGMT, and MMR in defense against alkylation-induced genotoxicity and apoptosis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **68**, 41-54.
- Kariola, R., Rævaara, T.E., Lonnqvist, K.E., and Nystrom-Lahti, M.** (2002). Functional analysis of MSH6 mutations linked to kindreds with putative hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Hum Mol Genet* **11**, 1303-1310.
- Karran, P.** (2001). Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* **22**, 1931-1937.
- Kat, A., Thilly, W.G., Fang, W.H., Longley, M.J., Li, G.M., and Modrich, P.** (1993). An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6424-6428.
- Kolas, N.K., Svetlanov, A., Lenzi, M.L., Macaluso, F.P., Lipkin, S.M., Liskay, R.M., Grealley, J., Edelman, W., and Cohen, P.E.** (2005). Localization of MMR proteins on meiotic chromosomes in mice indicates distinct functions during prophase I. *J Cell Biol* **171**, 447-458.
- Kolodner, R.D., and Marsischky, G.T.** (1999). Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 89-96.
- Kondo, E., Horii, A., and Fukushige, S.** (2001). The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. *Nucleic Acids Res* **29**, 1695-1702.
- Kunkel, T.A., and Erie, D.A.** (2005). DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* **74**, 681-710.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Li, G.M., and Modrich, P.** (1995). Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1950-1954.
- Liechty, M.C., Scalzi, J.M., Sims, K.R., Crosby, H., Jr., Spencer, D.L., Davis, L.M., Caspary, W.J., and Hozier, J.C.** (1998). Analysis of large and small colony L5178Y tk^{-/-} mouse lymphoma mutants by loss of heterozygosity (LOH) and by whole chromosome 11 painting: detection of recombination. *Mutagenesis* **13**, 461-474.

-
- Lipkin, S.M., Wang, V., Jacoby, R., Banerjee-Basu, S., Baxevanis, A.D., Lynch, H.T., Elliott, R.M., and Collins, F.S.** (2000). MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet* **24**, 27-35.
- Little, J.B., Nagasawa, H., Keng, P.C., Yu, Y., and Li, C.Y.** (1995). Absence of radiation-induced G1 arrest in two closely related human lymphoblast cell lines that differ in p53 status. *J Biol Chem* **270**, 11033-11036.
- Liu, L., Markowitz, S., and Gerson, S.L.** (1996). Mismatch repair mutations override alkyltransferase in conferring resistance to temozolomide but not to 1,3-bis(2-chloroethyl)nitrosourea. *Cancer Res* **56**, 5375-5379.
- Luo, Y., Lin, F.T., and Lin, W.C.** (2004). ATM-mediated stabilization of hMutL DNA mismatch repair proteins augments p53 activation during DNA damage. *Mol Cell Biol* **24**, 6430-6444.
- Marsischky, G.T., Filosi, N., Kane, M.F., and Kolodner, R.** (1996). Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev* **10**, 407-420.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T.** (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**, 563-574.
- Mechanic, L.E., Frankel, B.A., and Matson, S.W.** (2000). *Escherichia coli* MutL loads DNA helicase II onto DNA. *J Biol Chem* **275**, 38337-38346.
- Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y., and Tuschl, T.** (2004). Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *Rna* **10**, 544-550.
- Meyers, M., Hwang, A., Wagner, M.W., and Boothman, D.A.** (2004). Role of DNA mismatch repair in apoptotic responses to therapeutic agents. *Environ Mol Mutagen* **44**, 249-264.
- Mitchell, A.D., Auletta, A.E., Clive, D., Kirby, P.E., Moore, M.M., and Myhr, B.C.** (1997). The L5178Y/tk+/- mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay a phase III report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* **394**, 177-303.
- Modrich, P.** (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* **25**, 229-253.
- Modrich, P., and Lahue, R.** (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* **65**, 101-133.
- Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T., and Sawyer, J.** (1985). Analysis of trifluorothymidine-resistant (TFT^r) mutants of L5178Y/TK+/- mouse lymphoma cells. *Mutat Res* **151**, 161-174.

- Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G., and Johnson, K.O.** (1981). The utilization of trifluorothymidine (TFT) to select for thymidine kinase-deficient (TK^{-/-}) mutants from L5178Y/TK^{+/-} mouse lymphoma cells. *Mutat Res* **85**, 363-378.
- Nicolaides, N.C., Littman, S.J., Modrich, P., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B.** (1998). A naturally occurring hPMS2 mutation can confer a dominant negative mutator phenotype. *Mol Cell Biol* **18**, 1635-1641.
- Obmolova, G., Ban, C., Hsieh, P., and Yang, W.** (2000). Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature* **407**, 703-710.
- Ochs, K., and Kaina, B.** (2000). Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res* **60**, 5815-5824.
- Ormerod, M.G.** (1997). Analysis of cell proliferation using the bromodeoxyuridine/Hoechst-ethidium bromide method. *Methods Mol Biol* **75**, 357-365.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J.** (2004). Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells. *Methods Mol Biol* **265**, 85-100.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J., and Conklin, D.S.** (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16**, 948-958.
- Phillips, E.N., Xia, F., Kelsey, K.T., and Liber, H.L.** (1995). Spectra of spontaneous and X-ray-induced mutations at the hprt locus in related human lymphoblast cell lines that express wild-type or mutant p53. *Radiat Res* **143**, 255-262.
- Raschle, M., Dufner, P., Marra, G., and Jiricny, J.** (2002). Mutations within the hMLH1 and hPMS2 subunits of the human MutLalpha mismatch repair factor affect its ATPase activity, but not its ability to interact with hMutSalpha. *J Biol Chem* **277**, 21810-21820.
- Raschle, M., Marra, G., Nystrom-Lahti, M., Schar, P., and Jiricny, J.** (1999). Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J Biol Chem* **274**, 32368-32375.
- Roos, W., Baumgartner, M., and Kaina, B.** (2004). Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* **23**, 359-367.
- Sansom, O.J., Toft, N.J., Winton, D.J., and Clarke, A.R.** (2001). Msh-2 suppresses in vivo mutation in a gene dose and lesion dependent manner. *Oncogene* **20**, 3580-3584.
- Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D., and Hozier, J.** (1985). Cytogenetic characterization of the L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C mouse lymphoma cell line. *Mutat Res* **147**, 243-253.

- Sawyer, J.R., Moore, M.M., and Hozier, J.C.** (1989). High-resolution cytogenetic characterization of the L5178Y TK[±] mouse lymphoma cell line. *Mutat Res* **214**, 181-193.
- Schmutte, C., Sadoff, M.M., Shim, K.S., Acharya, S., and Fishel, R.** (2001). The interaction of DNA mismatch repair proteins with human exonuclease I. *J Biol Chem* **276**, 33011-33018.
- Schofield, M.J., and Hsieh, P.** (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol* **57**, 579-608.
- Semple, T.U., Quinn, L.A., Woods, L.K., and Moore, G.E.** (1978). Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of the colon for a cytotoxicity model. *Cancer Res* **38**, 1345-1355.
- Skopek, T.R., Liber, H.L., Penman, B.W., and Thilly, W.G.** (1978). Isolation of a human lymphoblastoid line heterozygous at the thymidine kinase locus: possibility for a rapid human cell mutation assay. *Biochem Biophys Res Commun* **84**, 411-416.
- Stojic, L., Brun, R., and Jiricny, J.** (2004). Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1091-1101.
- Stojic, L., Cejka, P., and Jiricny, J.** (2005). High doses of SN1 type methylating agents activate DNA damage signaling cascades that are largely independent of mismatch repair. *Cell Cycle* **4**, 473-477.
- Storer, R.D., Kraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L., and DeLuca, J.G.** (1997). The mouse lymphoma L5178Y Tk[±] cell line is heterozygous for a codon 170 mutation in the p53 tumor suppressor gene. *Mutat Res* **373**, 157-165.
- T.Strachan, A.P.R.** (1996). *Molekulare Humangenetik*.
- Tishkoff, D.X., Boerger, A.L., Bertrand, P., Filosi, N., Gaida, G.M., Kane, M.F., and Kolodner, R.D.** (1997). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7487-7492.
- Tomer, G., Buermeyer, A.B., Nguyen, M.M., and Liskay, R.M.** (2002). Contribution of human mlh1 and pms2 ATPase activities to DNA mismatch repair. *J Biol Chem* **277**, 21801-21809.
- Umar, A., and Kunkel, T.A.** (1996). DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur J Biochem* **238**, 297-307.
- Umar, A., Boyer, J.C., and Kunkel, T.A.** (1994). DNA loop repair by human cell extracts. *Science* **266**, 814-816.
- Umar, A., Risinger, J.I., Glaab, W.E., Tindall, K.R., Barrett, J.C., and Kunkel, T.A.** (1998). Functional overlap in mismatch repair by human MSH3 and MSH6. *Genetics* **148**, 1637-1646.

- Umar, A., Buermeyer, A.B., Simon, J.A., Thomas, D.C., Clark, A.B., Liskay, R.M., and Kunkel, T.A.** (1996). Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* **87**, 65-73.
- van de Wetering, M., Oving, I., Muncan, V., Pon Fong, M.T., Brantjes, H., van Leenen, D., Holstege, F.C., Brummelkamp, T.R., Agami, R., and Clevers, H.** (2003). Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* **4**, 609-615.
- Warburg, O., and Christian, W.** (1942). Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochemische Zeitschrift* **310**, 384-421.
- Wu, X., Platt, J.L., and Cascalho, M.** (2003). Dimerization of MLH1 and PMS2 limits nuclear localization of MutLalpha. *Mol Cell Biol* **23**, 3320-3328.
- Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T., and Liber, H.L.** (1995). Altered p53 status correlates with differences in sensitivity to radiation-induced mutation and apoptosis in two closely related human lymphoblast lines. *Cancer Res* **55**, 12-15.
- Zhou, M.Y., Clark, S.E., and Gomez-Sanchez, C.E.** (1995). Universal cloning method by TA strategy. *Biotechniques* **19**, 34-35.

Lebenslauf

Name	Katja Kampfinger
Geburtsdatum/-ort	17. Oktober 1973 / Ulm
seit 05/2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
10/2002 - 09/2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
11/2001	Erlangung des Diplomgrades
11/2000 - 11/2001	Diplomarbeit, Institut für physiologische Chemie, Ruhr-Universität Bochum
04/1998 - 09/2000	Hauptstudium im Studiengang Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
11/1997 - 04/1998	Auslandsaufenthalt in Südafrika
10/1993 - 10/1997	Grundstudium im Studiengang Biologie, Universität Ulm / LMU München
07/1993	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
08/1992	Geburt meines Sohnes Moritz
1984 - 1993	Albertus-Gymnasium, Lauingen
1980 - 1984	Grundschule, Lauingen

Ich danke

**Fr. Prof. Dr. Helga Stopper,
meiner Doktormutter**

Vielen Dank zum einen natürlich für das Thema, ohne das diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, zum anderen aber auch für die immer offene Tür, die es mir leicht gemacht hat, jederzeit mit Fragen, Ideen oder für Diskussionen bei Ihnen vorbeizukommen. Danke aber auch für die Einblicke in die Labororganisation, die ich bei Ihnen gewinnen konnte und die mir vor allem im letzten Jahr große Dienste erwiesen haben. Vielen Dank für die sehr schöne und auch sehr lehrreiche Zeit bei Ihnen im Labor.

Dr. Robert Hock

Vielen Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens.

**Dr. Nicole Schupp,
meiner guten Freundin**

Vielen Dank für Deine Unterstützung bei allen Fragen bezüglich meiner Arbeit, aber auch für die vielen Unterhaltungen, die nichts mit der Arbeit zu tun hatten. Vielen Dank dafür, dass Du dir immer Zeit genommen hast, wenn ich irgendetwas wissen wollte. Und vor allem, danke dafür, dass Du mir gezeigt hast, was bei der Betreuung von Laboranten, Praktikanten und Diplomanden wichtig ist (wie zum Beispiel einfach mal aufzustehen und mitzukommen, um Fragen zu klären).

Theresa Ehrlich

Vielen Dank für Deinen unglaublichen Einsatz bei der Gewinnung von RNA und der anschließenden Prozedur bis zur Sequenzierung. Vielen Dank für Deine vielen und ausführlichen Ergebnisprotokolle und nicht zuletzt für die supertollen Kuchen, die Du angeschleppt hast.

**Berta, Judith, Katja, Kathrin,
Kristin, Maria, Michael,
Thomas, Ursula, Uschi
und allen im Labor, die
ich jetzt vergessen habe**

Vielen Dank dafür, dass Ihr meine dummen Sprüche niemals ernst genommen habt und dass ich mit Euch so herzlich und ausgelassen lachen konnte. Es war eine verdammt schöne Zeit mit Euch im Labor. Und, Kristin, danke für den Werwolf.

**Moritz,
meinem Sohn**

der schon aussieht wie ein Döner. Ab jetzt wird wieder richtig gekocht (ich versuch's zumindest). Danke dafür, dass Du immer bemerkt hast, wenn es besser war, sich aus meinem Zimmer zu schleichen und mich meiner Arbeit zu überlassen.

**Kay,
meinem Liebsten**

Vielen Dank dafür, dass Du immer da bist, wenn ich dich brauche. Danke auch dafür, dass Du mich während meiner Arbeit immer im richtigen Moment von dieser abgehalten und dafür gesorgt hast, dass ich mal wieder an was anderes denke.

**Angelika und Schorsch,
meinen Eltern**

Vielen Dank dafür, dass Ihr mir immer zu verstehen gebt, dass Ihr nie daran zweifelt, dass ich alles irgendwie hinkriege. Vielen Dank für die aufmunternden und oft gehörten Worte: „Du machst das schon.“

Ich erkläre

hiermit, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ferner bestätige ich, dass ich weder an der Universität Würzburg noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung abzulegen.

Würzburg, den 07.05. 2007

Katja Kampfinger