# Funktionelle Interaktionen zwischen Wildtyp-p53, Rad51 und Poly-ADP-Phosphoribosyl-Transferase bei der Kontrolle von DNA-Rekombinationsprozessen

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades am Fachbereich Biologie an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Silke Süße

aus Jena

Ulm 2003

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg auf Antrag von Frau Professor Dr. L. WIESMÜLLER Weitere Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH

Tag der Disputation: 04. Juli 2003

Hamburg, den 18. Juni 2003

Wi Hambury Professor Dr. A. Frühwald Dekan

# Inhaltsverzeichnis

1. E	inleit	ung	1
1.1	Die N	Aechanismen der Reparatur von Doppelstrangbrüchen	1
	1.1.1	Die homologie-vermittelte Rekombination, konservative HR und SS/	A 3
		1.1.1.1 Biochemie der konservativen HR	4
		1.1.1.1 Biochemie der nicht-konservativen HR, SSA	6
	1.1.2	Biochemie des Non-Homologous End-Joining	7
	1.1.3	Nachweismethoden der HR	8
		<b>1.1.3.1</b> Das SV40-Rekombinations-Testsystem (Wiesmüller <i>et al.</i> , 1996)	8
		<b>1.1.3.2</b> Das auf <i>EGFP</i> -Rekonstitution basierende Testsystem	
		nach Akyüz <i>et al.</i> (Akyüz <i>et al.</i> , 2002)	9
1.2	Der T	Гumorsuppressor p53 – "Wächter des Genoms"	11
1.3	Die P	oly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1)	16
1.4	Prob	lemstellung	20
	1.4.1	Analyse der Interaktionen zwischen hRad51 und p53	
		bei Teilprozessen der Rekombination	21
	1.1.2	Studien zur potentiellen Kooperation zwischen PARP-1 und p53	
		bei der Kontrolle von DNA-Austauschprozessen	22
2. N	lateria	al und Methoden	23
2.1	Mate	rial	23
	2.1.1	Chemikalien, Biochemikalien und Radiochemikalien	23
	2.1.2	Verbrauchs- und sonstige Materialien	25
	2.1.3	Geräte	26
	2.1.4	Nährmedien	27
	2.1.5	Antikörper	28
		2.1.5.1 Primärantikörper	28
		2.1.5.2 Sekundärantikörper	29
	2.1.6	Oligonukleotide	29

	2.1.7	Vektor	en	30	
	2.1.8	Bakte	rienstämme	32	
	2.1.9	Viren		33	
	2.1.10 Zelllinien				
		2.1.10.1	Mammaliazelllinien	33	
		2.1.10.2	Insektenzelllinien	35	
2.2	Mole	kularbi	iologische und mikrobiologische Methoden	35	
	2.2.1	Herste	ellung transformations-kompetenter Bakterien nach der		
		Mehrio	onen-Technik	35	
	2.2.2	Transt	formation von <i>E. coli</i> (Kaiser und Hognes, 1960)	35	
	2.2.3	Einfrie	ren von Bakterien	36	
	2.2.4	Isolier	ung von Plasmid-DNA aus Bakterien	36	
	2.2.5	Ethan	olpräzipitation von DNA	37	
	2.2.6	Konze	entrationsbestimmung von DNA	37	
		2.2.6.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	37	
		2.2.6.2	Quantifizierung geringer DNA-Mengen	38	
	2.2.7	Hydro	lyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen	38	
	2.2.8	Auftre	nnung von DNA in der Agarosegelelektrophorese		
		(Ausu	bel, 1992)	38	
	2.2.9	Herste	ellung künstlicher DNAs	39	
		2.2.9.1	Herstellung der künstlichen 3-Strang-Rekombinationsintermediate	39	
		2.2.9.2	Radioaktive 5'-Markierung eines Oligonukleotids durch Kinasierung		
			(Weaver und Weissmann, 1979)	39	
		2.2.9.3	Erzeugung der 3-Strang-Substrate durch Hybridisierung	40	
		2.2.9.4	Aufreinigung der 3-Strang-Substrate	41	
		2.2.9.5	Präparation der DNAs für die Strangtransfer-Assays	42	
2.3	Mole	kularbi	iologische und zellbiologische Methoden	42	
	2.3.1	Insekt	enzellkultur	42	
		2.3.1.1	Erhaltungskultur	42	
		2.3.1.2	Einfrieren von Insektenzellen	43	
	2.3.2	Kultur	eukaryontischer Zellen	_43	
		2.3.2.1	Erhaltungskultur	43	
		2.3.2.2	Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen	44	
	2.3.3	Transf	ektion	_44	
		2.3.3.1	Transfektion nach der Kalziumphosphat -Methode		
			(Graham und van der Eb, 1973)	44	

		2.3.3.2	Trai	nsfektion durch Elektroporation (Baum et al., 1994)	44
		2.3.3.3	Trai	nsfektion durch Lipofektion mit FuGENE 6	45
	2.3.4	Bestin	nmur	ng der Transfektionseffizienz	45
	2.3.5	Selekt	ion ι	Ind Klonierung	_46
	2.3.6	Durch	fluss	zytometrie	46
		2.3.6.1	Rek	ombinationsfrequenzbestimmung am Durchflusszytometer	
			(Aky	yüz, 2001)	47
		2.3.6.2	Einp	parametrische Zellzyklusanalyse (Propidiumjodidfärbung)	47
		2.3.6.3	DAF	PI-Färbung zur Analyse der Kernmorphologie	47
	2.3.7	Gener	atior	ıszeitenbestimmung	49
2.4	Prote	einbioc	hen	nische Methoden	49
	2.4.1	Bestin	nmur	ng der Proteinkonzentration	_49
		2.4.1.1	Abs	orption bei 280 nm (Peterson, 1983)	49
		2.4.1.2	Pro	teinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)	49
	2.4.2	SDS-F	Polya	acrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	
		(Laem	mli,	1970)	_50
	2.4.3	Coom	assie	e-Blaufärbung (Blakesley und Boezi, 1977)	<u>51</u>
	2.4.4	Silberf	ärbu	ng	_51
	2.4.5	Weste	rn-B	lot und Antikörperdetektion von transferierten Proteinen	52
	2.4.6	Protei	пехр	ression und –Isolierung	53
		2.4.6.1	Ехр	ression von hRad51 in BLR(DE3)pLysS-Bakterien	
			(Be	nson <i>et al.</i> ,1994)	53
		2.4.6.2	Aufi	reinigung des hRad51-Proteins (Benson <i>et al.</i> ,1994)	54
		2.4.6.3	Erze	eugung von rekombinanten Baculoviren zur Expression von	
			p53	(273H) und Wtp53 jeweils in Fusion mit 6x Histidin-Peptid	56
		2.4.6	3.1	Transformation von Sf9-Insektenzellen (Felgner, 1991)	56
		2.4.6	.3.2	Produktion von Hochtiter-Baculovirusstocks	57
		2.4.6.4	Ехр	ression von rekombinantem Baculovirus zur Proteinexpression in	
			Inse	ektenzellen	57
		2.4.6.5	Her	stellung einer Immunaffinitätsmatrix speziell für p53	58
		2.4.6	.5.1	Reinigung monoklonaler PAb421-Antikörper	
				aus Aszitesflüssigkeit	58
		2.4.6	.5.2	Kopplung des gereinigten Antikorpers an bromcyan-aktivierte	50
			1	Sepharose (Schneider <i>et al.</i> , 1982)	<u></u> 58
		2.4.6.6	imn	nunaminitatsreinigung von numanem p53	59
		2.4.0./	I AL		
				sher et al. 1993)	60
			(rva	סווסו סו מו., וששטן	

	2.4.7	Metho	Methoden für DNA-Protein-Interaktionsstudien62		
		2.4.7.1	2.4.7.1 Gelretardations-Analyse (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMS		
		(Fried und Crothers, 1981; Garner und Revzin, 1981;			
			Sawadogo <i>et al.</i> , 1988)	62	
		2.4.7.2	Exonuklease-Assay (Mummenbrauer <i>et al.</i> , 1996)	63	
		2.4.7.3	Strangtransfer-Assays	64	
2.5	Virol	ogisch	e Methoden		
	2.5.1	Herste	ellung von Virenüberständen	66	
	2.5.2	Infekti	on von eukaryontischen Zellen		
	2.5.3	Bestin	nmung der MOI ( <i>Multiplicity Of Infection</i> )	66	
	2.5.4	Indire	te Immunfluoreszenz	67	
	2.5.5	Rekor	nbinations-Assay (Wiesmüller <i>et al.</i> , 1996)	67	
	2.5.6	Plaque	e-Assay (Wiesmüller <i>et al.</i> , 1996)	68	

3.	Ergebnisse	6	<b>39</b>
----	------------	---	-----------

3.1	Die Rolle von Heteroduplex-Strangkreuzungen in den funktionellen			n	
	Wechselwirkungen von humanem Rad51 und Wildtyp-p53				
	3.1.1	3.1.1 Der Effekt von hRad51-vermitteltem Strangtransfer auf die			
		p53-as	ssoziierte Exonukleaseaktivität	_69	
	3.1.2	Hetero	oduplex-Kreuzungsstrukturen repräsentieren bevorzugte Substra	ate	
		der Nu	ukleaseaktivität von Wildtyp-p53, nicht aber von Mutanten-p53	_73	
	:	3.1.2.1	3-strängige Heteroduplex-Kreuzungsstrukturen mit und ohne		
			A/G-Mismatch als Substrate der Nukleaseaktivität von Wildtyp-p53	73	
		3.1.2.2	P53-Exonukleaseaktivität an Rekombinationsintermediaten mit		
			strangkreuzungsregion-nahem und –fernen A/G-Mismatch	75	
	3.1.3.	Bildun	g von ternären hRad51-p53-DNA-Komplexen an		
		3-strär	ngiger DNA	_78	
	3.1.4	Interal	ktionen von p53(273H) mit 3-strängigen		
		DNA-ł	Kreuzungsstrukturen	.80	
	3.1.5	Interak	tionen der tetramerisierungs-defekten p53(1262)-Mutanten mit		
		Heterc	oduplex-DNA	_82	

3.2	Analyse der Beziehungen zwischen der von Poly-ADP-Ribose-						
	Polymerase abhängigen Signaltransduktion und der Aktivität						
	von	053 nach DNA-Schädigung	86				
	•		••				
	3.2.1	Herstellung der Werkzeuge für die Studien zur potentiellen					
		Wechselwirkung zwischen PARP-1 und p53 bei der Kontrolle von					
		DNA-Austauschprozessen	86				
	3.2.2	Charakterisierung der stabilen Klone LMV2-p53her-Kl8,					
		LMV2-PARP-KI3 und LMV2-PARPp53her-KI1	90				
		3.2.2.1 Morphologie und Wachstumsverhalten in Zellkultur	90				
		<b>3.2.2.2</b> Zellzyklusanalyse nach Östradiolinduktion und nach γ-Bestrahlung	.92				
	:	3.2.2.3 Analyse der Kernmorphologie in der DAPI-Färbung nach					
		γ-Bestrahlung	<u>.</u> 96				
	3.2.3	Beeinflussung von p53-Zielgenen durch PARP-1	101				
	3.2.4	Analyse des Einflusses von PARP-1 und p53 auf die homologe					
		Rekombination im SV40-Testsystem	_103				
	3.2.5	Analyse des Einflusses von stabil exprimierter PARP-1 bei der					
		homologen Rekombination an episomal vorliegenden					
		Rekombinationssubstraten	106				
	3.2.6	Untersuchungen zur Rolle von PARP-1 in der homologen					
		Rekombination an episomal vorliegendem DNA-Substrat	110				
	3.2.7	Rolle von PARP-1 in der homologen Rekombination im Kontext					
		zellulärer Chromosomen	113				
	3.2.8	Einfluß des Caspase-3, -6, -7,-8, -10-Inhibitors Z-DEVD-FMK auf die					
		homologe Rekombination nach stabiler Expression von PARP-1	116				
	3.2.9	Effekt des Caspase-Inhibitors auf die homologe Rekombination nach					
		transienter Expression von PARP-1	119				
4 D	)iskus	sion	122				
	Veel	Pod54 vormittelter Strengevotevoels stimulient die					
4.1	voni		400				
	р53-а	ssoziierte Exonukleaseaktivitat.	122				
4.2	P53 i	nteragiert mit hRad51-Nukleoproteinen.	123				

#### Inhaltsverzeichnis

	4.2	Nukleolytische Prozessierung von Rekombinationsintermediaten	
		durch p53 und ihre mögliche Rolle.	.125
	4.3	Die krebs-relevante Mutante p53(273H) zeigt keine	
		rekombinations-assoziierten biochemischen Aktivitäten.	<u>127</u>
	4.4	Die Rolle der Tetramerisierung von p53: Hinweise aus	
		biochemischen Untersuchungen mit der Mutante p53(1262).	129
	4.6	Postulierung eines Modells für die Aufhebung homeologer	
		Rekombinationsereignisse durch p53.	130
	4.7	Die Inhibition der konservativen homologen Rekombination durch	
		p53 wird durch die Anzahl der Doppelstrangbrüche beeinflusst.	132
	4.8	PARP-1-Überexpression unterdrückt die homologe	
		Rekombination in Abwesenheit von Wtp53.	136
	4.9	Unterdrückung der homologen Rekombination durch	
		Überexpression von PARP-DBD.	<u>136</u>
	4.10	Die rekombinations-inhibierende Wirkung von PARP-1 wird in	
		Gegenwart von Wtp53 im transienten Expressionssystem	420
		Verstarkt.	139
	4.11	Die rekombinations-inhibierende Wirkung von PARP-1	
		Expressionssystem neutralisiert.	<u>141</u>
_	_	_	
5.		usammenfassung	146
6.	Li	teraturverzeichnis	148

#### Inhaltsverzeichnis

7. A	Anhang	
7.1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	170
7.2	Abkürzungsverzeichnis	
7.3	Veröffentlichungen	177
7.4	Danksagung	

1. Einleitung

### 1. Einleitung

Homologe Rekombinationsprozesse sind für eukaryontische Organismen nicht nur wichtig zur Schaffung einer genetischen Vielfalt und zur Sicherung der korrekten Segregation der Chromosomen während der Meiose, sondern auch zur Reparatur von DNA-Schäden Lebenszyklus während des mitotischen (Kucherlapati und Smith. 1988). Rekombinationsreparatur kann bei spontan entstandenen DNA-Schäden erforderlich werden oder bei durch exogene Noxen induzierten, z.B. ionisierende Strahlung. In mitotisch wachsenden Zellen sind Rekombinationsprozesse regelmäßig an die DNA-Replikation geknüpft um einen Bypass unreparierter Läsionen zu erlauben und um Doppelstrangbrüche zu reparieren, die an den Replikationsgabeln entstehen, wenn diese einen Einzelstrangbruch passieren (Cox, 1997; 2000; Haber, 1999). Aufgrund dieser lebensnotwendigen Funktion von Rekombinationsprozessen während des normalen Lebenszyklus der Zellen, verursacht ein Ausfall der zentralen Enzymfunktion hohe Mortalität in E. coli ohne RecA (Roca und Cox, 1990), einen frühen embryonal lethalen Phänotyp von nullizygoten Mäusen für Rad51 (Lim und Hasty, 1996; Tsuzuki et al., 1996), oder resultierten in einer extremen Sensivität gegenüber ionisierender Strahlung und Methyl-Methan-Sulfonat (MMS), wie es in S. cerevisiae-Zellen, die eine Mutation in Rad51 tragen, beobachtet wurde (Game und Mortimer, 1974; Shinohara et al., 1992).

#### 1.1 Die Mechanismen der Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Bei Defekt lediglich eines der beiden DNA-Stränge, kann jeweils der andere noch als Vorlage für die Reparatursynthese dienen, nicht aber, wenn an derselben Stelle beide DNA-Stränge beschädigt sind, z.B. im Falle eines DNA-Doppelstrangbruches. Wenn die doppelsträngige DNA also einen kompletten Bruch erleidet, versagen alle anderen DNA-Reparaturmechanismen, da bei keinem der beiden Stränge mehr von seiner Vollständigkeit ausgegangen werden kann (fehlende Nukleotide aufgrund der Wirkung von Nukleasen in Nachbarschaft des ursprünglichen DNA-Bruches). Die konservative homologe Rekombination ist nun der letztmögliche exakte Reparaturmechanismus.

Innerhalb der letzten Jahre nahm das Verständnis zur Rekombinations-DNA-Reparatur schlagartig zu, sowohl zum molekularen Mechanismus als auch zu den genetischen Determinanten. Mutationen in Genen, welche die Rekombination kontrollieren, führen nicht nur zu einer fehlerhaften DNA-Doppelstrangbruchreparatur und Hypersensitivierung gegenüber ionisierender Strahlung, sondern auch zu genomischer Instabilität, Entwicklungsstörungen und Karzinogenese (Bishop und Schiestl; 2001; Van Gent

*et al.*, 2001). Besonders aufregend war die Beobachtung, dass verschiedene Krebs-Suszeptibilitäts-Syndrome von Mutationen in rekombinations-assoziierten Genen herrührten, einschließlich *Ataxia Telangiectasia* (*ATM*), *Nijmegen Breakage* Syndrom (*NBS1*), *AT-Like Disorder* (*Mre11*), *Fanconi Anemia* (*FANC*-Gene), *Werner's* Syndrom (*WRN*) und bestimmte familiäre Brustkrebs-Syndrome (*BRCA1/2*) (Bishop und Schiestl; 2001; Van Gent *et al.*, 2001). In einer Vielzahl von an der Rekombination beteiligten Genen wurden sporadisch auftauchende Mutationen gefunden, nicht nur in Tumoren, sondern auch in normalem Gewebe, einschließlich *BRCA1*, *Rad54*, *Rad52* und *XRCC3* (Pierce *et al.*, 2001; Thompson und Schild, 2001). Bislang ist weitgehend unbekannt, was die funktionelle Bedeutung dieser Veränderungen ist. Es besteht ein außerordentliches Interesse an der Aufklärung der komplizierten Proteinnetzwerke, in welchen diese und andere Genprodukte kooperieren. Dieses Wissen wird zweifelsfrei letztendlich signifikante Implikationen für die Krebsprävention und -behandlung bringen.

Es gibt zwei Hauptwege zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen, das Non-Homologous End-Joining (NHEJ) und die homologe Rekombination, welche unterschieden werden kann in konservative homologe Rekombination (HR) und Single-Strand-Annealing (SSA) (Karran, 2000) (s. Abb. 2). Die Reparaturwege NHEJ und SSA führen häufig zu fehlerhafter Reparatur, weshalb sie auch als illegitim bzw. nicht-konservativ bezeichnet werden. Demgegenüber stellt die konservative homologe Rekombination den letztmöglichen exakten Mechanismus zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen dar. Diese drei bekannten Reparaturmechanismen sind von der Hefe bis zu den Säugetieren hoch konserviert. Nachdem gezeigt wurde, dass Rad52 Doppelstrangbruchenden bindet, vor nukleolytischen Angriffen schützt und die Ligation unterstützt, wurde gemutmaßt, dass HR und NHEJ um die Doppelstrangbruchenden konkurrieren (Van den Bosch et al., 2002). Bindung der Doppelstrangbruchenden durch Rad52 würde demnach zur Reparatur durch HR führen, wohingegen Bindung von Ku70 die Reparatur durch NHEJ initiieren würde. Studien in Vertebraten indizierten allerdings, dass die relativen Aktivitäten der beiden Reparaturwege zellzyklus-abhängig sind. NHEJ findet an Doppelstrangbrüchen hauptsächlich in der G1- bis frühen S-Phase statt, wohingegen HR vor allem in der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus agiert (Takata et al., 1998). Darüber hinaus findet die HR bevorzugt zwischen Schwesterchromatiden statt, welche nur in der späten S/G2-Phase des Zellzyklus präsent sind (Johnson und Jasin, 2000). In Übereinstimmung zu diesen Beobachtungen steht eine Studie, die kürzlich zeigte, dass spontan induzierte Rad52-Foci in S. cerevisiae meist in S/G2-Phasezellen und nur selten in G1-Zellen beobachtet wurden (Lisby et al., 2001). Welcher der Reparaturwege nun bevorzugt wird, hängt nicht nur von der Zellzyklusphase, sondern auch von dem jeweiligen Organismus, der Art der DNA-Enden, dem

Entwicklungsstadium und möglicherweise noch weiteren unbekannten Faktoren ab. Eine Verbindung innerhalb der Einzelnen zeigt sich an der gleichzeitigen Beteiligung von Rekombinationsproteinen in mehreren der drei Reparaturwege (s. Abb. 1). Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Richardson und Jasin (Richardson und Jasin, 2000) gibt sogar Anlaß zu der Annahme, dass sich die homologe Reparatur und NHEJ nicht komplett separieren lassen. Vielmehr scheinen häufig gemischte Ereignisse aufzutreten, die mit Genkonversion beginnen und durch NHEJ vervollständigt werden.



**Abb. 1:** Proteine der Doppelstrangbruchreparatur. Der linke Kreis enthält die am NHEJ beteiligten Proteine, während diesen die Teilnehmer der homologie-vermittelten Rekombination (HR) im großen Kreis auf der rechten Seite gegenübergestellt wurden. Die am SSA beteiligten Gen-Produkte wurde als Subpopulation der HR berücksichtigt. Mögliche Überlappungen mit Proteinen der humanen transkriptions-gekoppelten Reparatur (TCR – <u>Transcription-Coupled Repair</u>) und der Mismatch-Reparatur (MMR) wurden durch die gestrichelten Kreise angedeutet, wobei darauf hingewiesen werden muß, dass es zur Zeit keine direkten Beweise für eine Teilnahme von hMSH2 oder hMSH3 am humanen SSA gibt. Diese Abbildung wurde modifiziert nach Karran (Karran, 2000).

# 1.1.1 Die homologie-vermittelte Rekombination, konservative HR und SSA

Es wurden zwei Reparaturwege beschrieben, Rad51-abhängige Stranginvasion oder Rad51-unabhängiges SSA. Beide Prozesse erfordern die Aktivität des *Rad52*-Gen-Produktes. In *Rad52*-Mutanten wurden extreme Rekombinations- und Reparaturdefekte beobachtet, die Einführung eines einzelnen Doppelstrangbruches kann in ihnen den Zelltod verursachen (Paques und Haber, 1999). Die Reparatur eines Doppelstrangbruchs durch homologe Rekombination erfordert ein unbeschädigtes *Template*-Molekül, welches eine homologe DNA-Sequenz trägt. Ein solches *Template* kann bereitgestellt werden vom Schwesterchromatid, dem homologen Chromosom oder einer angrenzenden Wiederholungssequenz auf demselben Chromosom (bei SSA). In Mammaliazellen scheint der relative Beitrag der homologie-vermittelten chromosomalen Doppelstrangbruchreparatur 30-50% zu betragen, wobei diese Aktivität in replizierenden Zellen noch weiter ansteigt, wenn Schwesterchromatide als das bevorzugte homologe *Template* zur Verfügung stehen (Johnson und Jasin, 2000).

Während des Prozesses der homologen Rekombinationsreparatur kommt es zur Rekrutierung dieses homologen Templates. Dieses orientiert sich an den der Bruchstelle benachbarten DNA-Strängen. Zur Durchführung einer effizienten konservativen homologen Rekombinationsreparatur müssen diese mindestens 200 Bp lange Sequenzhomologien aufweisen (Rubnitz und Subramani, 1984; Elliott et al., 1998). Dafür ist dieser Reparaturweg fehlerfreie (konservative HR) der einzig Mechanismus zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Durch Stranginvasion erfolgt die Initiation der homoloaen Rekombination, zu der die Genkonversion, Cross-Over und die strang-induzierte Replikation (BIR - Break-Induced Replication) gehören. Sie verläßt sich auf die Strangtransferase Rad51 und andere Mitglieder der Rad52-Epistase-Gruppe [Mitglieder von S.cerevisiae: Rad50, Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59, Mre11, XRS2 und RDH54/TID1 (Lambert et al., 1999; Pagues und Haber, 1999)]. Möglicherweise ist das RFAI-Gen, welches für die größte Untereinheit des heterotrimeren DNA bindenden Protein-Komplexes RPA kodiert, ein weiteres Mitglied der Gruppe (Firmenich et al., 1995; Smith und Rothstein, 1995).

#### 1.1.1.1 Biochemie der konservativen HR

In E. coli ist RecA alleine ausreichend, um ATP-abhängige homologe Paarung und Strangaustausch über eine Distanz von 6 kB durchzuführen (Roca und Cox, 1990; Kowalczykowski, 1991; Radding, 1991; West, 1992). Das eukaryontische Gegenstück zu RecA, das Rad51-Protein, wurde biochemisch sowohl von Hefe (Sung und Robberson, 1995) als auch vom Menschen charakterisiert (Baumann et al., 1996; Gupta et al., 1997; 1999a,b; Baumann und West, 1999). Genau wie RecA bindet auch humanes Rad51 (hRad51) an einzel- und doppelsträngige DNAs (ssDNA und dsDNA), baut sich kooperativ zu helikalen Nukleoproteinfilamenten zusammen, paart ssDNA mit homologer dsDNA und katalysiert Strangaustausch. Desweiteren hydrolysiert hRad51 ATP und führt Strangaustausch durch, allerdings 10fach weniger effektiv als RecA, so dass die Länge der gebildeten Heteroduplex-DNA auf 1,3 kb limitiert ist (Baumann und West, 1999). In Abwesenheit von ATP ist Rad51 nicht in der Lage, stabile Verbindungsmoleküle zu generieren, während es noch kooperativ und hochaffin an DNA bindet und komplementäre DNA-Stränge zu renaturieren vermag (Baumann et al., 1996; Gupta et al., 1997; Kelly De

Zutter und Knight, 1999). Umgekehrt zur Polarität der bakteriellen Rekombinase, scheint hRad51 den Transfer bevorzugt am 5'-Ende der linearen Duplex zu starten (Sung und Robberson, 1995; Baumann et al., 1996; Baumann und West, 1997; 1999). Seine eingeschränkte Fähigkeit, ausgedehnte Strangaustäusche durchführen zu können, kompensiert Rad51 durch Zusammenarbeit mit dem Einzelstrang-DNA-Binde-Protein, welches in Eukaryonten bekannt ist als Replikations-Protein A (RPA), und mit anderen Mitgliedern der Rad52-Epistase-Gruppe (Kanaar und Hoeijmakers, 1998). RPA scheint Sekundärstrukturen von der ssDNA zu entfernen. Rad52 interagiert mit resektierten Doppelstrangbrüchen (Van Dyck et al., 1999) und mit hRad51 (Shen et al., 1996), um dessen Kooperativität zu erhöhen, an Doppelstrangbrüche zu binden. Rad54 scheint die Konformation von dsDNA zu verändern und mit Rad51 wechselzuwirken, auf eine Art, welche die Separierung von DNA-Strängen und konsequenterweise die Rad51-abhängige Heteroduplex-Bildung erleichtert (Petukhova et al., 1999). Die Produkte der zwei in Hochrisikofamilien am häufigsten veränderten Brustkrebs-Suszeptibilitäts-Gene, BRCA1 und BRCA2, bilden einen biochemischen Komplex mit hRad51 (Scully et al., 1997; Chen et al., 1998a; Marmorstein et al., 1998). BRCA1 scheint in der Zellzykluskontrolle als transkriptioneller Transaktivator Zudem zu fungieren. sorgt es für eine Doppelstrangbruchreparatur über den Weg der homologen Rekombination, wobei mutagene End-Joining-Ereignisse vermieden werden (Moynahan et al., 1999 und darin enthaltene Referenzen). Die Funktion von BRCA2 wurde in der Zwischenzeit ebenfalls aufgegklärt, nachdem dessen dreidimensionale Struktur entschlüsselt wurde, die sich gegenüber anderen DNA-bindenden Proteinen als sehr ähnlich herausstellte (Yang et al., 2002). Schon früher konnte gezeigt werden, dass BRCA2 und Rad51 physikalisch miteinander wechselwirken (Mizuta et al., 1997; Sharan et al., 1997; Wong et al., 1997; Chen et al., 1998a) und nach DNA-Schädigung als nukleäre Foci an Orten der DNA-Reparatur kolokalisieren (Chen et al., 1998b; 1999). Aber erst kürzlich konnte beobachtet werden, dass BRCA2 DNA in Strangbruchnähe bindet und die Rad51-vermittelte Rekombination in vitro stimuliert, d.h. es nimmt direkt an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen über den einzig fehlerfreien Mechanismus, die konservative homologe Rekombination, teil (Yang et al., 2002). Interessanterweise kann der embryonal lethale Phänotyp von Mäusen, die Träger einer homozygoten Mutation in Rad51, in BRCA1 oder in BRCA2 sind, durch eine Mutation im für den Tumorsuppressor p53 kodierenden Gen teilweise unterdrückt werden (Lim und Hasty, 1996; Hakem et al., 1997; Ludwig et al., 1997). Zu diesen genetischen Verbindungen zwischen p53 und der DNA-Rekombination kommen Berichte über die Existenz von physikalischen Wechselwirkungen zwischen p53 und hRad51 (Stürzbecher et al., 1996), zwischen p53 und BRCA1 (Ouchi et al., 1998; Zhang et al., 1998), zwischen p53 und BRCA2 (Marmorstein et al., 1998) und zwischen p53 und RPA (zusammengefaßt in Wold, 1997).

#### 1.1.1.2 Biochemie der nicht-konservativen HR, SSA

Rad52-vermitteltes SSA ist ein Prozess, der eingeleitet wird, wenn ein DNA-Doppelstrangbruch zwischen zwei Wiederholungssequenzen, welche in derselben Richtung orientiert sind, entsteht. Die Homologien, welche mindestens 60-90 Bp betragen sollten (Wilson et al., 1999), werden zur Ausrichtung der DNA-Stränge benötigt, die es zu verbinden gilt. Dem DNA-Bruch direkt benachbarte einzelsträngige Regionen werden durch exonukleolytischen Abbau der 5'-Enden geschaffen. Hierbei gibt es Hinweise darauf, dass die Proteine Rad50, Mre11 und Xrs2/Nbs1 (die an der HR beteiligten Proteine wurden in Hefe charakterisiert: z.B. Xrs2; wobei sich in Säugern die entsprechenden funktionellen Homologe finden: Nbs1, Xrs2-Homolog; zum Teil sind die Namen der Homologe identisch, wie z.B. für Rad50 und Mre11) das Prozessieren der Doppelstrangbruchenden übernehmen (Bressan et al., 1999; Pagues und Haber, 1999). Das Mre11-Protein alleine oder im Komplex. mit Rad50 und Xrs2/Nbs1 besitzt multiple enzymatische Aktivitäten, u.a. eine magnesiumabhängige 3'->5'-dsDNA-Exonuklease und ssDNA-Endo- und Exonukleaseaktivität (Furuse et al., 1998; Usui et al., 1998; Moreau et al., 1999). Die in vitro Beobachtung der 3'->5'-Exonukleaseaktivität von Mre11 steht allerdings einer 5'->3'-Resektion in vivo gegenüber (Usui et al., 1998). Es ist schwierig dies in Einklang zu bekommen, Resektion durch andere, bisher unbekannte Exonukleasen kann nicht ausgeschlossen werden. Die neu geschaffenen einzelsträngigen 3'-Überhänge dienen in jedem Fall der Suche nach kurzen homologen Regionen. Wenn das Schwesterchromatid verfügbar ist, werden die einzelsträngigen Enden in dieses eindringen und eine Reparatur über den HR-Reaktionsweg initiieren. Alternativ hybridisieren die homologen einzelsträngigen DNA-Überhänge, wobei nicht komplementäre Sequenzen zurechtgeschnitten, mögliche Lücken aufgefüllt und die Enden ligiert werden. Dadurch kann SSA zu Deletionen führen.

Kürzlich wurde gezeigt, dass humane und Hefe-Rad52-Proteine spezifisch an Doppelstrangbrüche und teilweise resektierte Doppelstrangbrüche binden, um sie vor nukleolytischem Abbau zu schützen und um Wechselwirkungen zwischen den beiden Enden zu erleichtern (Van Dyck *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Parson *et al.*, 2000). Darüberhinaus wurde gezeigt, dass Rad52 DNA-Hybridisierungs-Reaktionen *in vitro* unterstützt (Mortensen *et al.*, 1996; Reddy *et al.*,1997; Shinohara *et al.*, 1998; Sugiyama *et al.*, 1998). Seine dreidimensionale Struktur wurde bereits als heptamerer Rad52-Ring aufgeklärt (Stasiak *et al.*, 2000). Zudem konnte das Rad52-vermittelte SSA bereits im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden, wobei sowohl Rad52-Ringe gebunden an einzelsträngige DNA-Enden beobachtet werden konnten, als auch zwei DNA-Moleküle, die durch eine Rad52-Brücke zusammengehalten wurden (Van Dyck *et al.*, 2001).

#### 1.1.2 Biochemie des Non-Homologous End-Joining

Non-Homologous End-Joining (NHEJ) von zwei doppelsträngigen DNA-Enden erfordert kein unbeschädigtes *Template* und keine ausgedehnten Homologien zwischen den rekombinierenden Enden. Prinzipiell benötigt dieser Mechanismus zu seiner Durchführung keine Homologien, kann aber manchmal flankierende Mikrohomologien von gerade einmal 2-6 Bp Länge nutzen (Willers *et al.*, 2002). Beim NHEJ erfolgt ein Wiederverbinden der Enden, welche bereits teilweise degradiert sein können. In vielen Fällen beinhaltet das *End-Joining* Sequenzveränderungen durch kurze Deletionen, Insertionen oder Inversionen, d.h. der Reparaturprozeß selbst ist fehlerhaft.

Der Mechanismus des NHEJ wurde ausgiebig in Nagetierzellen studiert und hängt von den aufeinander abgestimmten Aktivitäten der LigaselV, XRCC4, Ku70, Ku80, DNA-PK<sub>CS</sub> und den erst kürzlich identifizierten Faktoren, Artemis und Nej1/Lif2, ab (Featherstone und Jackson, 1999; Lewis und Resnick, 2000; Frank-Vaillant und Marcand, 2001; Moshous *et al.*, 2001; Ooi *et al.*, 2001; Valencia *et al.*, 2001). NHEJ erfolgt wie SSA Rad51unabhängig (Hinds *et al.*, 1990; Lambert *et al.*, 1999).



**Abb. 2:** Mechanismen der Reparatur von Doppelstrangbrüchen, schematisch. Die Enden eines Doppelstrangbruches werden entweder durch den Ku-Heterodimer/DNA-PK<sub>cs</sub>-Komplex oder durch Rad52 gebunden. Beim NHEJ wird die Reparatur durch DNA-Ligase IV und XRCC4 beendet. Demgegenüber wird bei Rad51-vermittelter Stranginvasion des intakten Schwester- oder homologen Chromatids die Reparatur durch homologe Rekombination initiiert. Resektion und Hybridisierung von Mikrohomologien veranlassen eine Reparatur durch SSA, wobei der Ligation ein Abschneiden nichthomologer ssDNA-Enden vorausgeht. Das Schema basiert auf Karran, 2000.

#### 1.1.3 Nachweismethoden der HR

Zur Untersuchung der homologen Rekombination bedient man sich künstlicher Testsysteme, welche darauf aufbauen, dass selbst bei einfachen genetischen Systemen Rekombination immer nur dann stattfinden kann, wenn mindestens zwei homologe DNA-Regionen in einer Zelle vorhanden sind, wie im Falle des SV40-Rekombinations-Testsystems (Wiesmüller *et al.*, 1996) und des auf *EGFP*-Rekonstitution basierenden Systems mit einer ganzen Reihe von episomal und chromosomal integrierten Substraten zum Studium der durch *I-SceI*-Meganuklease induzierten Doppelstrangbruchreparatur (Akyüz *et al.*, 2002).

#### 1.1.3.1 Das SV40-Rekombinations-Testsystem

Das DNA-Doppelstrangvirus SV40 gehört zur Gruppe der Papovaviren und besteht aus einem ikosaedrischen Kapsid, welches sich aus drei Proteinen (VP1, VP2 und VP3) zusammensetzt und ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Molekül aus 5243 Bp umhüllt, welches zellulärem Chromatin ähnelt, da es mit Histonen (der Wirtszelle) die typische Nukleosomenstruktur bildet und deshalb auch als "Minichromosom" bezeichnet wird (Voet, 1995). Das Genom kodiert für verschiedene Proteine, die in verschiedenen Phasen der Infektion exprimiert werden, weshalb man sie in frühe und späte Gene unterteilt, welche in entgegengesetzter Richtung angeordnet sind, ausgehend von der Kontrollregion, die die Transkriptionsstartstellen und den Replikationsursprung (ORI) enthält. Die SV40-Tumorantigene großes Tumorantigen (T-Ag), kleines Tumorantigen (t-Ag) und 17kDa-Tumorantigen (17kT) sind alternative Spleißprodukte der frühen Genregion, während die späten Gene für die Hüllproteine kodieren. Der Rhesusaffe (Macacca mulatta) ist der natürliche Wirt des SV40, dessen Nierenzellen das Virus infiziert und dort persistiert. In der Zellkultur lassen sich auch Zellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze (Ceropithecus aethiops) infizieren (Sweet und Sweet, 1960). Da das Virus zur Replikation der viralen DNA zelluläre Faktoren benötigt, führt die Expression der frühen viralen Gene die Zellen in die S-Phase. Im Gegensatz zur zellulären DNA-Synthese kommt es bei der viralen DNA-Replikation zu mehreren Replikationsrunden. Es schließt sich die Expression der späten Gene an, die zur Synthese der Hüllproteine führt (Wiley et al., 1993; Zuo et al., 1997). Die SV40-Minichromosomen werden in die Kapside verpackt und durch Lyse der Wirtszellen freigesetzt.

SV40 stellt ein geeignetes System zur Untersuchung von Proteinfunktionen in der homologen Rekombination *in vivo* dar. Das mit Wirtszellhistonen assoziierte SV40-Genom kann auf physiologischem Wege, durch Infektion, in die Zellen eingebracht werden und führt so nicht wie nackte DNA (Transfektion), zu einem DNA-schadens-induzierten Anstieg der p53-Menge in der Zelle (Renzing und Lane, 1995; Siegel et al., 1995). Aufgrund seiner geringen Größe bietet das SV40-Genom desweiteren den Vorteil der leichten Manipulierbarkeit und die Möglichkeit der Einführung von Indikatormutationen. So wurde durch Frau Prof. Dr. Wiesmüller ein Testsystem für die guantitative Erfassung homologer Rekombinationsraten zwischen SV40-Chromosomen etabliert, welches auf der Koinfektion von Affennierenzellen mit zwei SV40-Virionen basiert, welche Punktmutationen in einem für die Hüllproteine kodierenden Gen, VP1, an zwei verschiedenen Stellen tragen (Wiesmüller et al., 1996). Diese Punktmutationen führen jeweils zur Expression eines temperatursensitiven VP1-Proteins (Ng et al., 1985) und lassen sich nicht in trans komplementieren. So können Viren lediglich bei der permissiven Temperatur von 32°C produziert werden, nicht jedoch bei der restriktiven Temperatur von 39°C, bei der das VP1-Protein in einer Konformation vorliegt, die keine Bildung von Viruspartikeln erlaubt. Nach Koinfektion von Affennierenzellen können die beiden Mutantenviren durch homologe Rekombination zur Rekonstitution von SV40-Wildtyp führen. Durch die Expression des Wildtyp-VP1 können nun bei der restriktiven Temperatur von 39°C wieder infektöse Wildtypviruspartikel gebildet werden, die im sog. Plaque-Assay bei der restriktiven Temperatur nachgewiesen werden können. Dieser Virusnachweis beruht darauf, dass SV40-Wildtypviren Affennierenzellen der Grünen lysieren. Aufgrund ihrer Mobilitätseinschränkung Meerkatze (CV1) durch eine Softagarbeschichtung können die so freigesetzten Viren lediglich die direkt angrenzenden Zellen infizieren, wodurch nach 14 Tagen ein stecknadelkopfgroßes Loch (Plaque) im Zellrasen entsteht.

# 1.1.3.2 Das auf *EGFP*-Rekonstitution basierende Testsystem nach Akyüz *et al.*, 2002

Der Großteil gegenwärtigen Wissens unseres zu genetischen Rekombinationsereignissen stammt aus Studien in Bäckerhefe, S. cerevisiae, und anderen Pilzen einschließlich S. pombe. Zur Identifizierung von Rekombinationsereignissen in Hefe wurden meist Nahrungsmarker benutzt. Es wurde eine große Vielfalt an Systemen entwickelt, um intra- und intergenetische Rekombination in S. cerevisiae und S. pombe. zu studieren (Fox und Smith, 1998; Osman und Subramani, 1998; Pagues und Haber, 1999). Im Gegensatz zu Hefe ist die homologe Rekombination in somatischen Zellen von Eukaryonten ein sehr seltenes Ereignis. Für die Analyse von Rekombinationsereignissen an definierten chromosomalen Loci in Mammaliazellen und D. melanogaster hat sich der Einsatz von orts-spezifischen Endonukleasen erfolgreich bewährt (Jasin, 1996).

Es ist gut etabliert, dass Doppelstrangbrüche rekombinogen sind. Die Bildung von Doppelstrangbrüchen in vegetativ wachsenden Zellen durch orts-spezifische Endonukleasen führt zu drastisch ansteigenden Rekombinationsraten. Darüberhinaus verhindert eine Deletion der meiose-spezifischen Endonuklease SPO11 in S. cerevisiae oder sein Homolog in S. pombe (Rec12+) die Entstehung meiotischer Doppelstrangbrüche und verhindert dadurch die meiotische Rekombination (Cao et al., 1990; Cervantes et al., 2000). Doppelstrangbrüche sind extrem rekombinogen, wie an embryonalen Stammzellen von Mäusen und Hefe durch Manipulation festgestellt wurde. Ein weitverbreitetes System zur orts-spezifischen Doppelstrangbruchinduktion in S. cerevisiae basiert auf der HO-Endonuklease, welche eine Zielsequenz von 22 Bp erkennt und normalerweise nur an einer Stelle im Gesamtgenom von S. cerevisiae schneidet (dem sog. Mating-Type-Lokus) (Paques und Haber, 1999). Konstrukte, in welchen das HO-Gen mit einem induzierbaren Promotor fusioniert wurde, erlauben die HO-Expression einfach aufgrund des geeigneten Mediums. Eine andere, in Mammaliarekombinations-Assays häufig benutzte, Endonuklease ist I-Scel. Dieses Enzym wurde erstmals in Mitochondrien der Hefe identifiziert und erkennt eine Sequenz von 18 Nukleotiden (Plessis et al., 1992), welche im Mammaliagenom nicht vorkommt. Zum Nachweis der Reparatur spezifischer Doppelstrangbrüche wird die IScel-Erkennungssequenz innerhalb eines Selektionsgens (z.B. Neomycin), gen-randständig oder an einer definierter Stelle im Genom plaziert. Die Möglichkeit der Einführung von Doppelstrangbrüchen an definierten Stellen kann sehr nützlich sein bei der Erforschung der Mechanismen der Doppelstrangbruchreparatur. In Kombination mit Doppelstrangbruchdefizientem Hintergrund, kann Einführung orts-spezifischen reparatur die von Erforschung Doppelstrangbrüchen zur der Rolle bestimmter Gene der Doppelstrangbruchreparatur ausgenutzt werden.



**Abb. 3:** Prinzip des auf EGFP-Rekonstitution entwickelten Testsystems. Die Rekombinationssubstrate wurden in gleicher Orientierung auf dem retroviralen Vektor p5N-M kloniert. Nach Initierung der Rekombination durch die Expression von I-Scel und Restriktion an der I-Scel-Erkennungssequenz im Rekombinationsakzeptor(*Δ*-EGFP) kommt es zur Rekonstitution des WtEGFP-Gens durch homologe Rekombination und im Ergebnis fluoreszieren Zellen grün. Die Rekombinationsraten werden errechnet, indem die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen mit Hilfe des FACScan bestimmt werden.

#### 1.2 Der Tumorsuppressor p53 – "Wächter des Genoms"

Die Notwendigkeit der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität für die Vermeidung von Krebs wird besonders deutlich am Beispiel des Tumorsuppressorproteins p53, welches in 50-60% aller Krebsarten durch Mutation bzw. Deletetion der beiden Allele ausgeschaltet ist (Lane, 1992). P53 wurde bereits früh als Element der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität erkannt, da in Zellen, in denen der Tumorsuppressor p53 ausgeschaltet wurde, chromosomale Aberrationen gehäuft auftreten (Vogelstein *et al.*, 1993).

DNA-Schäden und hierbei insbesondere DNA-Doppelstrangbrüche führen zur Akkumulation und zur Aktivierung von p53 als transkriptioneller Transaktivator (Siegel *et al.,* 1995; Lutzker und Levine, 1996). Je nach Ausmaß des DNA-Schadens wird dadurch

entweder ein Wachstumsstop in der Zellzyklusphase G1, also vor der Verdopplung des Genoms durch DNA-Replikation, eingeleitet oder das zelleigene Selbstmordprogramm, die Apoptose, wird induziert (Jacks und Weinberg, 1996). Hierbei führt die Aktivierung von p53 zur transkriptionellen Aktivierung von p53-Zielgenen, wie z.B. von *p21<sup>Waf1/Cip1</sup> (El-Deiry et al., 1993)*, dessen Genprodukt als Inhibitor von zellzyklusstadien-spezifischen zyklin-abhängigen Kinasen G1-Arrest auslöst. So wird der Zelle genügend Zeit gegeben, die entstandenen Schäden zu beheben, bevor diese durch DNA-Replikation manifestiert würden. Bei irreparabler DNA-Schädigung löst p53 in bestimmten Zelltypen über die Vermittlung von proapoptotischen p53-Zielgenen wie z.B. *Bax*, den aktiven Zelltod, die Apoptose, aus (Gottlieb und Oren, 1996; Levine, 1997).

Einige Berichte zeigten jedoch, dass die Transaktivatorfunktion von p53 seine Tumorsuppressorfunktion nicht vollständig erklären kann. Darauf deutete die Beobachtung, dass der Ausfall des p53-Gens in p53-Null-Mäusen zu einer massiven Tumorinzidenz führte, so dass die meisten p53-Null-Mäuse nach wenigen Monaten an multiplen Tumoren starben (Levine, 1997). Demgegenüber zeigen Knockout -Mäuse, denen das zentrale p53-Zielgen p21<sup>Waf1/Cip1</sup> fehlt, im Vergleich zu normalen Mäusen keine erhöhte Anfälligkeit für Tumoren (Deng et al., 1995). Auch die Reprimierung der p53-abhängigen Apoptose durch den Inhibitor PFT $\alpha$  (Pifithrin  $\alpha$ ) führte zu keiner Steigerung der Tumorinzidenz (Komarov *et al.*, 1999). In der Tat wurde während der letzten Jahre aus mehreren Laboratorien berichtet, dass p53 über seine wachstums-regulatorische Funktion hinaus, biochemische Aktivitäten ausübt, welche auf eine aktive Teilnahme bei Replikations- oder/und Reparaturprozessen hindeuten (zusammengefaßt in Janus et al., 1999a). So kann p53 kurze DNA-Einzelstränge rehybridisieren (Oberosler et al., 1993; Bakalkin et al., 1994, Brain und Jenkins, 1994) und DNA-Schaden artige Übergänge zwischen einzel- und doppelsträngiger DNA erkennen (Lee et al., 1995; Reed et al., 1995; Levine, 1997). Es besitzt eine Exonukleaseaktivität, durch die es DNA-Einzelstränge vom 3' zum 5'-Ende hin abbauen kann (Mummenbrauer et al., 1996). Zudem bindet p53 zahlreiche Faktoren der DNA-Replikation und Reparatur, so das Einzelstrangbindeprotein RPA, die Helikasen XPB und XPD, welche Funktionen bei der Nukleotid-Exzisionsreparatur ausüben, die zentrale Strangtransferase hRad51 (Stürzbecher et al., 1996), welche ein Homolog des bakteriellen RecA-Proteins darstellt, und die Rad51-Bindeproteine BRCA1 (Ouchi et al., 1998, Zhang et al., 1998) und BLM (Wang et al., 2001). Verschiedene Studien deuten auf eine Rolle von p53 bei der Nukleotid-Exzisionreparatur (NER) möglicherweise über Wechselwirkungen mit der Helikaseuntereinheit des dualen Transkriptions-/ NER-Faktors TFIIH (Smith et al., 1995; Wang et al., 1995; Leveillard et al., 1996; Mirzayans et al., 1996; Ford und Hanawalt, 1997). Doch seitdem beobachtet wurde, dass p53 das Gen des NER-Faktors p48 anschaltet, scheint eine direkte, molekulare

Wechselwirkung als NER-stimulierender Mechanismus eher unwahrscheinlich (McKay *et al.*, 1999).

Der gegenwärtige Wissensstand zum Tumorsuppressor p53 bezüglich der funktionellen Domänen, der posttranslationalen Modifikationen und Wechselwirkungen mit anderen Proteinen ist in Abb. 4 zusammengefaßt.



**Abb. 4:** Charakterisierung des Tumorsuppressors p53. Die römischen Ziffern kennzeichnen phylogenetisch konservierte Sequenzen. Phosphorylierungsstellen sind mit *P*, Acetylierungsstellen mit *Ac* und die Sumoylierungsstelle mit *Su* angegeben. Kurzbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis bzw. der Beschreibung im nachfolgenden Text zu entnehmen.

Die drei funktionellen Hauptdomänen des Proteins – eine saure N-terminale Domäne, eine zentrale Kern (*Core*)-Domäne und eine basische C-terminale Domäne - zeigen eine Vielzahl biochemischer Aktivitäten. In der zentralen, hydrophoben Domäne, welche die sequenzspezifische DNA-Bindungsregion (El-Deiry *et al.*, 1992; Bargonetti *et al.*, 1993) und die 3'->5'-Exonukleaseaktivität (Mummenbrauer *et al.*, 1996) beherbergt, wurden die meisten Mutationen in menschlichen Tumoren nachgewiesen (Hollstein *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 1991) (s. Abb. 5). Besonders häufig wurden Mutationen an den Aminosäuren 175, 248 und 273, den sog. *Hotspots*, beobachtet (Deppert *et al.*, 1994; Donehower & Bradley, 1993). Über die *Core*-Domäne kann p53 mit dem großen SV40 T-Antigen (T-Ag) interagieren, was einst zu seiner Entdeckung führte (Lane und Crawford, 1979). Neuere Beobachtungen führten zu der Erkenntnis, dass diese Region mit dem PML (promyelozytäre Leukämie)- Protein wechselwirkt, was offensichtlich für die Stabilisierung des p53-Proteins von Bedeutung ist (Ryan *et al.*, 2001). PML, ein Ringfingerprotein, kommt ubiqutär in Säugerzellen vor und bildet mit anderen Proteinen Komplexe, die sog. *Nuclear Bodies*, zu denen es auch p53 rekrutiert (Ferbeyre *et al.*, 2000; Fogal *et al.*, 2000). Es wirkt als negativer Wachstumsregulator, der in der Lage ist, einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus, Seneszenz und Apoptose auszulösen (Strudwick und Borden, 2002). Der Verlust des PML führt in der Zelle zur Beeinträchtigung der p53-Stabilisierung und stellt somit einen p53 regulatorisch vorgeschalteten Faktor dar (Ryan *et al.*, 2001).

Die saure, Nterminale Domäne wird auch als Transaktivatordomäne beschrieben. Sie rekrutiert Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie, wie TFIIH und TBPassoziierte Faktoren, wodurch die Expression bestimmter Zielgene aktiviert wird (Prives und Hall, 1999). Der N-Terminus ist desweiteren an der Regulierung der Aktivität und Stabilität des p53-Proteins beteiligt. Das Protein MDM2, welches selbst durch p53-vermittelte Transaktivierung exprimiert wird, blockiert durch Bindung des N-Terminus von p53 dessen Transaktivatorfunktion (Brown *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1993), ein Mechanismus, der auch als negativer *Feedback-Loop* bezeichnet wird. MDM2 verhindert nicht nur den Kontakt von p53 zur Transkriptionsmaschinerie, sondern initiiert auch dessen Degradation über das Ubiquitin-Proteasomen-System (Wu *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 2000). Bindet dagegen p19 ARF (das Produkt des Tumorsuppressorgens ARF) an MDM2, führt dies zur Stabilisierung von p53 (Ryan *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung von Ser15, Thr18 und Ser20 führt ebenfalls zu einer Stabilisierung und einer Erhöhung der p53-Konzentration, weil diese die Wechselwirkung von p53 mit MDM2 unterbinden (Shieh *et al.*, 1999; 2000; Chehab *et al.*, 2000; Hirao *et al.*, 2000; Sakaguchi *et al.*, 2000).

Der basische C-Terminus übt vorwiegend regulatorische Funktionen aus (Prives und Hall, 1999). Besonders bedeutsam für die p53-Funktion ist die hier gelegene Oligomerisierungsdomäne, welche die Tetramerisierung des Proteins erlaubt und neben der sequenzspezifischen Bindung für die Ausübung der Transaktivatorfunktion essentiell ist (Stürzbecher *et al.*, 1992; Prive und Hall, 1999). Die Tetramerisierung wird stabilisiert über Phosphorylierung an Ser392 durch CK2 und destabilisiert durch Cdk2/ZyklinB und Cdk2/ZyklinA (Liang und Clarke, 2001). Zur Stabilisierung trägt auch die Acetylierung von C-terminalen Lysinresten durch Histon-Acetyltransferasen wie p300/CBP und pCAF bei (Ryan *et al.*, 2001). Desweiteren liegen in der C-terminalen Domäne drei Kernlokalisationssignale (NLS) und ein Kernexportsignal (NES) (Shaulsky *et al.*, 1990; Liang und Clarke, 2001). Der äußersten C-Terminus kann unspezifisch DNA (auch einzelsträngige) und RNA binden (Steinmeyer und Deppert, 1988; Bakalkin *et al.*, 1995) und regulatorisch auf die

sequenzspezifische DNA-Bindung und Exonukleaseaktivität von p53 Einfluß nehmen (Hupp *et al.*, 1993; Janus *et al.*, 1999b).



**Abb. 5:** Mutationshäufigkeiten von p53 in humanen Tumoren. Der graphischen Darstellung sind die Mutationshäufigkeiten einzelner Aminosäuren von p53 bei Krebspatienten zu entnehmen. Auffällig ist die Lokalisierung der Akkumulation der Mutationen einschließlich der sog. *Hotspots*, welche sich auf die zentrale Domäne und insbesondere die darin enthaltenen phylogenetisch stark konservierten Regionen konzentriert. Die Darstellung wurde der aktuellen Datenbank von T. Soussi, Mai 2003 entnommen.

Die homologe Rekombination kann zu gefährlichen Genom-Rearrangements führen, wenn nicht perfekt homologe Regionen beteiligt sind. Fehlerhafte Austauschereignisse verursachen Deletionen, Duplikationen, Verkürzungen und Ausweitungen von Wiederholungssequenzen (zusammengefaßt in Belmaaza und Chartrand, 1994), welche zur Entwicklung von Tumoren führen können. Es wurde gezeigt, dass die Aktivität des Mismatch-Reparatursystems Rekombination zwischen divergierenden Sequenzen inhibiert (zusammengefaßt in Modrich und Lahue, 1996). In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Wiesmüller zeigte sich, dass p53 ein Schlüsselfaktor eines ähnlichen Kontrollprozesses ist, welcher die Genauigkeit der Rekombination gewährleistet (Dudenhöffer et al., 1998). Danach kann p53 die homologe Rekombination in Primatenzellen besonders stark inhibieren, wenn A/G- und C/T-Fehlpaarungen an den nach Strangaustausch generierten Heteroduplicies entstehen. Zudem zeigt p53 in vitro hohe Bindungsaffinitäten für 3-strängige Rekombinationsintermediate, besonders wenn diese die beschriebenen Fehlpaarungen enthalten. Für die Funktion von p53 bei der Kontrolle der Rekombination ist sowohl die zentrale DNA-Bindungsdomäne (Vogelstein und Kinzler, 1993;

Cho *et al.*, 1994; Mummenbrauer *et al.*, 1996; Dudenhöffer *et al.*, 1999; Janus *et al.*, 1999b) als auch die eterminale Oligomerisierungsdomäne essentiell (Stürzbecher *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993, 1994; Watermann *et al.*, 1995). Der extreme C-Terminus, welcher unspezifische DNA-Bindung, Rehybridisierung und Strangtransferaktivitäten ausführt, ist für die Rekombinationssuppression und die Bindung an 3-strängige Verbindungs-DNA durch p53 entbehrlich, vermittelt aber die Stimulierung der Basalaktivität durch Basenfehlpaarungen.

Spontane Doppelstrangbrüche können durch Metabolisierung der DNA entstehen und treten daher mit einer hohen Häufigkeit auf. Darüber hinaus verursachen auch kosmische Strahlung und freie Radikale Doppelstrangbrüche. 1000 bis 10.000 p53-Tumorsuppressormoleküle sind in menschlichen Zellen ständig verfügbar (Oren et al., 1981; Patschinsky und Deppert, 1990), um bei der Reparatur spontan auftretender DNA-Brüche durch Rekombinationsprozesse mitzuwirken. Hierbei scheint p53 keinen enzymatischen Bestandteil der Reparaturmaschinerie selbst darzustellen, sondern für die Qualitätskontrolle des Ausbesserungsarbeiten verantwortlich zu sein. Diese Qualitätskontrolle der letztmöglichen korrekten Reparaturmechanismus, den die Zelle für Doppelstrangbrüche zur Verfügung hat, ist enorm wichtig, da ohne diesen Mechanismus nicht oder fehlerhaft reparierte DNA bei der nächsten Zellteilung weitergegeben würde.

#### 1.3 Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1)

Vor über 2 Milliarden Jahren, brachten anaerobe Einzeller Eukaryonten hervor, u.a. durch Inkorporierung eines Vorgängers des Mitochondriums in ihr Zytoplasma. Trotz des Triumphes über diesen symbiontischen Schritt beherbergen Mitochondrien ein Repertoire an Molekülen, welche Zellsuizid, die sog. Apoptose, auslösen. Diese Moleküle mögen für das Überleben des mitochondrialen Vorfahren, des Protomitochondrions essentiell gewesen sein (James und Green, 2002). Die Identität und Aktivierungsmechanismen dieser, den Zelltod induzierenden Mitspieler, kennenzulernen, ist eine dringende Herausforderung für die Biologen und sollte die Entdeckung neuer therapeutischer Möglichkeiten für die Behandlung verschiedener humaner Erkrankungen hervor bringen (Nicholson, 2000; Reed, 2001). In diesem Zusammenhang steht eine der jüngsten Entdeckungen: Die Freisetzung des wirkungsvollen mitochondrialen Zytotoxins AIF, welches zum apoptotischen Zelltod führt, ausgelöst durch die Aktivierung des nukleären Enzyms Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) (Yu *et al.*, 2002).

Die Entdeckung, dass es möglich ist, den Zelltod durch Inhibitoren der PARP-1 oder durch Deletion des *Parp-1*-Gens zu unterdrücken, löste ein explosionsartiges Interesse am

Prozess der Poly(ADP-Ribosy)lierung aus. Insbesondere der Befund, dass die Unterdrückung von PARP-1 vor Ischemia, Entzündung, Diabetes und septischem Schock in Tiermodellen dieser Krankheiten schützen kann, erregte großes Aufsehen (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1998; Scovassi und Poirier, 1999; Chiarugi, 2002).

Das humane PARP-1-Protein (Abb. 6) erstreckt sich über 1014 AS und besitzt drei funktionelle Hauptdomänen: eine Nterminale DNA-Bindungsdomäne (DBD) mit zwei Zink-Fingern (FI und FII), welche als molekularer Strangbruchsensor agieren und auch mit Proteinpartnern interagieren; eine zentrale Automodifikationsdomäne, welche die Auto-Poly(ADP-Ribosylierungs)-Stellen enthält (Uchida et al., 1993), über welche die PARP-DNA-Interaktionen reguliert werden, diese enthält auch ein BRCT-Motiv für Protein-Protein-Wechselwirkungen, und eine C-terminale katalytische Domäne, welche die Strangbruch abhängige Poly(ADP-Ribose)-Synthese einleitet (zusammengefaßt in de Murcia und Menissier-de Murcia, 1994). Die katalytische Domäne enthält eine Donor-Stelle (Bindung von NAD<sup>+</sup>) und eine Akzeptor-Stelle (Polymerbindung). Die Enzymstruktur ist der von bakteriellen ADP-ribosylierenden (z.B. Diphterietoxin, Toxinen welche den eukaryontischen Elongationsfaktor eEF2 inaktiviert) verwandt, unterscheidet sich aber von diesen durch eine zusätzliche  $\alpha$ -Helix, welche die Bindung an geschädigte DNA ermöglicht (Ruf *et al.*, 1996; 1998). Desweiteren enthält die PARP-1 ein bipartielles nukleäres Lokalisationssignal (NLS), welches durch eine Caspase 3-Schnittstelle unterbrochen ist.



**Abb. 6:** PARP-1, Struktur und Poly(ADP-Ribosylierungs)-Partner. Die schematische Darstellung gibt einen Überblick zu den funktionellen Domänen der PARP-1, sowie den Proteinen, mit denen das PARP-1-Protein interagiert. Detailierte Beschreibung siehe Text.

PARP-1 wird im Nukleus stark exprimiert mit ungefähr einem Molekül pro 1000 Bp. PARP-1 katalysiert die Transformation von  $\beta$ -Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) in Nikotinamid und Poly(ADP-Ribose). Unter homeostatischen Bedingungen nimmt PARP-1 an der Genomreparatur, DNA-Replikation und der Regulierung der Transkription teil (D'Amours et al., 1999). Als Antwort auf Stress, der toxisch für das Genom ist, steigt die PARP-1-Aktivität stark an, was offenbar wichtig für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität ist (Shall und Murcia, 2000). Massive PARP-1-Aktivierung kann zur Erschöpfung des Pools an NAD<sup>+</sup> und ATP in der Zelle führen, was letzlich eine Energieentleerung und den Tod der Zelle durch Nekrose nach sich zieht (Ha und Snyder, 2000). PARP-1 bindet schnell und unspezifisch an ssDNA- und dsDNA-Brüche [aber auch andere DNA-Arten, wie Kreuz-Strukturen (Sastry und Kun, 1990), Matrix-Attachment-Sequenzen (Galande und Kohwi-Shigematsu, 1999), zentromere Alpha-Satellitten-DNA (Earle et al., 2000), Enhancer wie TEF-1 (Butler und Ordahl, 1999), sowie Promotoren z.B. von der induzierbaren NO-Synthase], wobei durch diese DNA-Schadensbindung die katalytische Aktivität der PARP-1 um mehr als zwei Größenordnungen ansteigen kann (Althaus und Richter, 1987; Oei et al., 1997; de Murcia et al., 1998; D'Amours et al., 1999; Shall und de Murcia, 2000; Herceg und Wang, 2001). Daraufhin katalysiert das Enzym die kovalente Bindung von Poly(ADP-Ribose)-Ketten an Zielproteine. Mehr als 30 nukleäre Proteine wurden bisher als Poly(ADP-Ribose)-Akzeptoren identifiziert, u.a. Histone, Topoisomerase I und II, DNA-PK<sub>cs</sub>, p53 und PARP-1 via seine Automodifikationsdomäne selber (Le Rhun et al., 1998). Erst kürzlich wurden Poly(ADP-Ribose)-Bindungsdomänen in den folgenden Proteinen nachgewiesen: p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, MSH6, DNA-Ligase III, XRCC1, DNA-Polymerase  $\epsilon$ , Ku70, NF- $\kappa$ B, iNOS, caspase-aktivierte DNase und Telomerase (Pleschke et al., 2000). Zudem wurde innerhalb dieser Proteine eine Überlappung des Poly(ADP-Ribose)-Bindungsmotiv mit fünf wichtigen funktionellen Domänen festgestellt, die verantwortlich sind für (i) Protein-Protein-Wechselwirkungen, (ii) DNA-Bindung, (iii) nukleäre Lokalisation, (iv) nukleärer Export und (v) Proteindegradation. Somit scheint die PARP-1 und ihre zunehmend wachsende Familie die Domänenfunktionen speziell von Signalnetzwerkproteinen via Poly(ADP-Ribosylierung) zu regulieren. Noch vor Kurzem wurden Poly(ADP-Ribosylierungs)-Prozesse generell der PARP-1 (früher PARP) zugeschrieben bis sich herausstellte, dass Pflanzen mehr als ein PARP-Protein haben. Zwei Pflanzen-PARPs wurden 1998 kloniert und identifiziert, als PARP-1 und PARP-2 identifiziert (Babiychuk et al., 1998). Diese Entdeckungen führten im folgenden zur Identifizierung mehrerer neuer PARP-Gene in Säugern (PARP-3; Vparp/PARP-4, Tankyrase/PARP-5, Tankyrase2, PARP-6, PARP-7).

Da Poly(ADP-Ribosylierugs)-Reaktionen im Kern eine derart bedeutende Rolle zukommt, soll abschließend der Metabolismus der Poly(ADP-Ribose) *in vivo* näher beleuchtet werden. Die Synthese von Poly(ADP-Ribose) erfordert drei verschiedene Enzymaktivitäten [Initiation oder Mono(ADP-Ribosylierung) des Substrates, Elongation des Polymers und Verzweigung], welche alle durch die PARP-1 ausgeführt werden können und welche durch ihre anabole Aktivität für die Poly(ADP-Ribosylierung) in lebenden Zellen hauptverantwortlich ist (Althaus und Richter, 1987; Shieh *et al.*, 1998).

Das konstitutive Vorkommen von (ADP-Ribose)-Polymeren ist in unstimulierten Zellen sehr gering (Ferro und Oppenheimer, 1978; Benjamin und Gill, 1980; Wielckens et al., 1983; Kreimeyer et al., 1984). In Abwesenheit eines DNA-Schadens wurde die Mehrheit der ADP-Ribose-Einheiten an Akzeptorproteinen als Mono- oder Oligo(ADP-Ribose) gefunden (Ferro und Oppenheimer, 1978; Benjamin und Gill, 1980). Diese unterscheiden sich qualitativ von nach DNA-Schäden synthetisierten polymeren ADP-Ribosen (Alvarez-Gonzales und Jacobson, 1987), welche zudem deutlich langsamer degradiert werden (Halbwertzeit von 7,7 h verglichen mit <1min) (Wielckens et al., 1983; Kreimeyer et al., 1984; Alvarez-Gonzales und Althaus, 1989). In Gegenwart von DNA-Strangbrüchen wird die PARP-1-Aktivität (durch Bindung an Strangbrüche) 10-500fach stimuliert (Wielckens et al., 1983; Alvarez-Gonzales und Althaus, 1989; Simonin et al., 1993), während das zelluläre NAD<sup>+</sup>-Niveau korrespondierend sinkt (Singh et al., 1985). In lebenden Zellen ist die Poly(ADP-Ribose)-Synthese direkt proportional zur Anzahl der Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche, die in der genomischen DNA auftauchen (Althaus und Richter, 1987). Sowohl konstitutive als auch aktivierte Raten der (ADP-Ribose)-Polymere sind Funktionen der NAD<sup>+</sup>-Konzentration der Zelle (Ferro und Olivera, 1982; Coppola et al., 1995).

Die Degradation der (ADP-Ribose)-Polymere erfolgt *in vivo* schnell durch die Poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolase (PARG) mit ihrer Exo- (Miwa *et al.*, 1974) und Endoglycosidase-Aktivität (Ikejima und Gill, 1988). Der Katabolismus der Poly(ADP-Ribose) ist eine Funktion seiner eigenen zellulären Konzentration (Alvarez-Gonzales und Althaus, 1989), wobei beobachtet wurde, dass eine effiziente Aktivierung der PARG *in vivo* eine Mindestkonzentration von (ADP-Ribose)-Polymeren von >5µM erfordert (Alvarez-Gonzales und Althaus, 1989). Dieser Aktionsmodus der PARG mag die *in vivo* sehr kurze Halbwertszeit der Polymere während des Vorliegens eines DNA-Schadens (<1min) gegenüber der wesentlich längeren der (konstitutiven) Polymere in unstimulierten Zellen erklären (Wielckens *et al.*, 1982; Alvarez-Gonzales und Althaus, 1989; Malanga und Althaus, 1994). Zudem werden verzweigte und kurze Polymere langsamer degradiert als lange und lineare (Hatakeyama *et al.*, 1996; Malanga und Althaus, 1994). Diese Bevorzugung

bestimmter Typen von (ADP-Ribose)-Ketten könnte auch die biphasische Degradation der Polymere *in vivo* und die Existenz zweier unterschiedlicher Polymer-Populationen (mit verschiedenen Halbwertszeiten) nach DNA-Schädigung erklären. Wielckens *et al.* (Wielckens *et al.*, 1982) bestimmte die Halbwertszeit der langlebigen Polymer-Population mit ungefähr 6 min in Zellen, die durch Dimethyl-Sulfat geschädigt wurden.

Zur Ablösung der letzten (ADP-Ribose)-Einheit vom Akzeptor-Protein bedarf es eines weiteren Enzyms, der (ADP-Ribosyl)-Protein-Lyase (Okayama *et al.*, 1978; Oka *et al.*, 1984). Dies scheint der wichtigste regulatorische Schritt im Polymer-Katabolismus zu sein (Wielckens *et al.*, 1982). Es wurde beobachtet, dass nach DNA-Schädigung (Chemikalien) die Menge an Mono(ADP-Ribose)-Addukten im Nukleus um das 9fache stiegt, während sie im Zytoplasma unverändert blieb (Hilz *et al.*, 1982). Die Halbwertszeit dieser Mono(ADP-Ribose)-Addukte ist mit 8-10 min sogar länger als die der (ADP-Ribose)-Ketten (<1-6 min) und ihre Existenz ist offensichtlich abhängig vom Vorhandensein von DNA-Strangbrüchen. Freie Mono(ADP-Ribose)-Einheiten werden katabolisiert zu AMP und Ribose-5-Phosphat durch (ADP-Ribose)-Pyrophosphatasen (Miro *et al.*, 1989; Fernandez *et al.*, 1996) oder können auch Mono(ADP-Ribose)-Proteinaddukte durch nicht-enzymatische Mechanismen (Glycosylierung oder Glycoxidation) bilden (Cervantes-Laurean *et al.*, 1993; 1996).

#### 1.4 Problemstellung

Instabilitäten im genetischen Material der Körperzellen können zur Entwicklung hyperproliferativer Zellpopulationen bis hin zum Tumor und zur Metastasierung führen, wenn im Verlauf dieses Mehrstufenprozesses Onkogene aktiviert oder Tumorsuppressoren inaktiviert werden. Da die zelluläre DNA permanent den Angriffen von ionisierender und UV-Strahlung, Sauerstoffradikalen, chemischen Mutagenen und Viren ausgesetzt ist, müssen komplexe Überwachungsund Reparatursysteme die Integrität des Genoms aufrechterhalten. Nach dem Auftauchen von Schäden im Genom übt das Protein p53 multiple Funktionen als Regulator von Wachstum, Apoptose und DNA-Reparatur aus, welche in der Summe seine universelle Rolle als Tumorsuppressor erklären. 1000 bis 10.000 p53-Moleküle sind in menschlichen Zellen ständig verfügbar, um bei der Reparatur spontan auftretender DNA-Brüche durch Rekombinationsprozesse mitzuwirken. Hierbei scheint p53 keinen enzymatischen Bestandteil der Reparaturmaschinerie selbst darzustellen, sondern für die Qualitätskontrolle der Ausbesserungsarbeiten verantwortlich zu sein. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass p53 homologe Rekombinationsprozesse unabhängig von seiner Transaktivierungs- und Wachstumskontrollfunktion reguliert.

# 1.4.1 Analyse der Interaktionen zwischen hRad51 und p53 bei Teilprozessen der Rekombination

Der Prozeß der homologen Rekombination an DNA-Substraten mit Einzel- oder Doppelstrangbrüchen verläuft über mehrere Stufen (Erzeugung von ungepaarten Bereichen, homologe Paarung und Strangaustausch, Branch-Migration, Auflösung des Rekombinationsintermediates) unter Beteiligung zahlreicher Enzymaktivitäten (DNA-Helikasen oder Exonukleasen, DNA-Paarungs- und Strangtransferfaktoren, Einzelstrang-Bindeproteine, Holliday-Junction spezifische Helikasen und Endonukleasen, Ligasen und Polymerasen). Zu Beginn dieser Arbeit existierten Hinweise dafür. dass der Tumorsuppressor p53 auf der Stufe des DNA-Strangtransfers Genauigkeitskontrolle an neu aebildeten Heteroduplices in Abhängigkeit bestimmter Basen-Fehlpaarungs-Typen ausübt. Auf dieser Stufe führt hRad51 die zentrale Funktion der DNA-Strangtransferase aus. So war es naheliegend, eine funktionelle Wechselwirkung zwischen p53 und hRad51 beim eigentlichen Strangaustauschprozeß zu vermuten.

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, unter Anwendung biochemischer Analyseverfahren zu zeigen, dass p53 und die Rekombinase Rad51 an rekombinativen DNA-Strukturen physikalisch und funktionell miteinander wechselwirken. In diese Untersuchungen sollte die bei Krebspatienten am zweithäufigsten beobachtete p53-Mutante p53(273H) einbezogen werden, wodurch zur Klärung der Ursachen des DNA-Reparaturdefektes dieser Mutante und demzufolge auch seiner kanzerogenen Wirkung beigetragen werden sollte.

Es wurde angestrebt, die Hypothese zu überprüfen, ob p53 gerade entstehende Heteroduplices auf Anwesenheit von Basen-Fehlpaarungen durchsucht, in engem Kontakt zur initialen Strangtransferase hRad51. Dafür mußte durch Anwendung geeigneter Testsysteme geklärt werden, ob p53 den Strangtransfer durch Rad51 beeinflußt. Desweiteren war geplant, eine mögliche Verbindung zwischen p53-abhängiger Regulation von Rekombinationsprozessen und exonukleolytischem Angriff der DNA zu analysieren. Mit Hilfe von Wtp53- oder mutantem p53(273H)-Protein sollte in Anwesenheit von hRad51 die Nukleaseaktivität während Strangtransferreaktionen und die Komplexbildung an DNA-Rekombinationsintermediaten untersucht werden.

Um den Mechanismus der regulierenden Wirkung von p53 bei der homologen Rekombination weiter aufzuklären, sollten nicht nur die rekombinations-relevanten biochemischen Aktivitäten der Mutante p53(273H), sondern auch die einer

Oligomerisierungsmutante im Vergleich zu denen von Wtp53 untersucht werden. Hierzu war vorgesehen, die Proteine in Insektenzellen nach Infektion mit rekombinanten Baculoviren überzuexprimieren und sie anschließend chromatographisch aufzureinigen und für die enzymologischen Tests einzusetzen.

# 1.4.2 Studien zur Potentiellen Kooperation zwischen PARP-1 und p53 bei der Kontrolle von DNA-Austauschprozessen

Der durch DNA-Schäden initiierte Signaltransduktionsweg beinhaltet schadensinduzierbare Kinasen, Acetylasen und möglicherweise auch die Poly(ADP-Phosphoribosyl)-Transferase-1 (PARP-1). Bislang ist nichts darüber bekannt, ob p53-vermittelte Rekombinationskontrolle von diesem Signalweg gesteuert wird. Deswegen wurde geplant, den Einfluß des DNA-Strangbruchsensors PARP-1 auf die rekombinations-regulatorischen Funktionen von p53 zu analysieren.

Um mögliche Steuerprozesse der p53-abhängigen Rekombinationskontrolle durch PARP aufzudecken, sollte PARP-1 funktionell in Zellen mit unterschiedlichem p53-Status aktiviert und inaktiviert werden. PARP-1 ist in Säugerzellen an der Aufrechterhaltung der Genomstabilität beteiligt, weshalb PARP-1 konditional an- und ausgeschaltet werden sollte, um unvorhergesehene Änderungen des genetischen Hintergrundes durch konstitutive Expression zu vermeiden. Für die Inaktivierung wurde eine dominant negative Variante des PARP-Proteins angewandt, nämlich die DNA-Binde-Domäne, welche nicht mehr zur Poly-ADP-Ribosylierung befähigt ist und der Wildtyp Form von PARP-1 den Zugang zu DNA-Brüchen versperrt.

Zur Aufklärung der Bedeutung der Detektion von DNA-Strangbrüchen und der Weiterleitung über das Enzym PARP-1 für die Kontrolle von DNA-Austauschprozessen durch p53 in gezielt veränderten zellulären Systemen stehen Rekombinations-Testsysteme zur Verfügung, welche Rekombinationsmessungen basierend auf SV40-Viren bzw. Fluoreszenzsignalen ermöglichen.

# 2. Material und Methoden

# 2.1 Material

## 2.1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Radiochemikalien

Es wurden handelsübliche Chemikalien in Analysenqualität der Firmen Biorad (München), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (München) und Sigma (München) bezogen. Spezielle (Bio-) Chemikalien wurden von folgenden Firmen verwendet:

β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg			
γ- <sup>32</sup> Ρ-ΑΤΡ	Hartmann, Braunschweig			
<sup>32</sup> P-ortho-Phosphat	Hartmann, Braunschweig			
Acrylamid/Bis Solution (19:1) 40% (w/v)	Gibco BRL Life Technologies,			
	Eggenstein			
Agarose	Sigma, München			
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt			
Ampicillin	Amersham, Braunschweig			
Aprotinin (Produktname: Trasylol)	Bayer, Leverkusen			
ATP	Boehringer, Mannheim			
Bacto Agar	Difco Laboratories, USA			
Bacto Trypton	Difco Laboratories, USA			
Bacto Yeast-Extract	Difco Laboratories, USA			
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt			
BSA	New England Biolabs, USA			
Coomassie Brillant Blue R-250	Serva, Heidelberg			
Coomassie Brillant Blue G-250	Serva, Heidelberg			
DAPI	Serva, Heidelberg			
DEAE-Bio-Gel <sup>®</sup> A-Gel	BioRad, München			
DMEM (Isoleucinfrei)	Biochrom, Berlin			
DMEM	Gibco BRL Life Technologies,			
	Eggenstein			
DMEM (Isoleucinfrei)	Biochrom, Berlin			
DNA-Längenmarker 1kb+	Gibco BRL Life Technologies,			
	Eggenstein			
DNA-Marker λ/HindIII	MBI-Fermentas, St.Leon-Rot			

dNTPs	NEB, Frankfurt/M.
DTE	Merck, Darmstadt
DTT	Serva, Heidelberg
ECL-Lösungen	Amersham, Braunschweig
FCS	Boehringer, Mannheim
FuGENE 6	Roche, Mannheim
G418 (Geneticin)	Gibco BRL Life Technologies,
	Eggenstein
Glutamin	Biochrom, Berlin
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HCI (6N)	Pierce, USA
HEPES	Serva, Heidelberg
Hydroxyapatite Bio-Gel <sup>®</sup> HT-Gel:	BioRad, München
Hygromycin B	Roche, Mannheim
IPTG	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Leupeptin	Boehringer, Mannheim
Magermilchpulver	Neuform, Herrenberg
Nonidet P40	Fluka, Neu-Ulm
Norit A	Merck, Darmstadt
Opti-Freeze <sup>®</sup>	ICN Biomedicals, USA
Pefabloc	Biomol, Hamburg
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL Life Technologies,
	Eggenstein
Pepstatin A	Biomol, Hamburg
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protogel (30% Acrylamid/ 0,8%Bisacrylamid)	National Diagnostics, England
Protein G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protogel (30% Acrylamid/0,8%Bisacrylamid)	National Diagnostics, England
	(Biozym)
Puromycin	Serva, Heidelberg
Refobacin (Gentamicin)	Ratiopharm, Ulm
RPMI 1640	Gibco BRL Life Technologies,
	Eggenstein
SDS-PAGE Proteinstandard	BioRad, München
SOC-Medium	Novagen, England
Super-Signal ULTRA chemiluminescent substrate	Pierce, Illinois, USA

Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold XR TALON<sup>®</sup> Metal Affinity Resin TEMED Tetracyclin Trasylol (Aprotinin) Tris-HCl Triton X 100 Trypsin-EDTA-Lösung:

Tween-20: Vectashield<sup>®</sup> Viapur Spüllösung Steriles Wasser: Packard, Groningen, Holland Clontech, USA Serva, Heidelberg Serva, Heidelberg Bayer, Leverkusen Serva, Heidelberg Fluka, Neu-Ulm Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein Fluka, Neu-Ulm Vector Laboratories, USA Baxter, Unterschleisheim

## 2.1.2 Verbrauchs- und sonstige Materialien

DE 81-Membran Dialyseschläuche Visking 8/32 Einfrierröhrchen Elektroporationsküvetten (0,4 cm) FACS-Röhrchen PS 12-75 Filterpapier Whatman 3MM Gewebekulturschalen Glasfaserfilter Hybond-C Super (Nitrozellulose) Hybond-N (Nitrocellulose) Immobilon-P Membran Klonierungsringe Mikrofilter Ultrafree MC 10.000 NMWL Nucleobond AX500-Säulen **Oxford-Pipetten** Phosphoimager-Screen Protein Assay-Kit (Bradford) Röntgenfilm Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm Kodak X-OMAT BMR Spinnerflaschen Sterivex (Sterilfilter) Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold XR

Whatman, Maidstone, England Serva, Heidelberg Nunc GmbH, Wiesbaden Biebrich Biorad. München Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg Schleicher und Schüll, Dassel Nunc GmbH, Wiesbaden Biebrich Schleicher und Schüll, Dassel Amersham, Braunschweig Amersham, Braunschweig Millipore, Eschborn Sigma-Aldrich, Taufkirchen Millipore, USA Machery-Nagel, Düren Oxford-Sampler Micropipetting System Fuji, Japan Biorad, München Kodak, USA/ Amersham, Braunschweig Kodak, USA/ Amersham, Braunschweig Bellco Glass Inc., Vineland, USA Millipore, Eschborn Packard, Groningen, NL

Zentrifugenröhrchen Falcon (15 bzw. 50 ml) Zentrifugenröhrchen (15 bzw. 30 ml) Becton Dickinson, USA Corex, USA

#### 2.1.3 Geräte

Analysenwaage PM460 Bakterienschüttler AJ 115 Blotkammer Mini-Trans Blot Durchflusszytometer Coulter Epics XL-MCL Durchflusszytometer FACScalibur Gene Pulser mit Pulse Controller Geldokumentationsanlage Epifluoreszenzmikroskop DM-RA Immersionsölobjektiv 63x/1,4 oder 40x/1,0 Digitalkamera (Spot Modell 1.3.0) Gelkammer Modell AE-6450 Gelkammer für Agarosegele Gelkammer Protean 2XI Cell Geltrockner Model 583 Heizblock Techne Dry-block DB2A Mini-Gel-Apparatur Nassblotapparatur pH-Meter PHM 82 Phospholmager Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem Power-Supply PAC 300 Power-Supply EPS 2A 200 Rotor Sorvall SLA-3000 Rotor Sorvall SS-34 Spektralphotometer BioSpec-1601E Szintillationszähler Thermocycler Thoma-Zählkammer Ultraschall Sonifier B12 Vortex Zentrifuge 5415 C Zentrifuge Sorvall RC-5B

Mettler, Gießen Ifors, Schweiz Biorad. München Beckmann, München Becton Dickinson, Heidelberg Biorad. München Intas, Göttingen Leica, Heidelberg Leica, Heidelberg **Diagnostic Instruments, USA** Atto, Japan Renner, Dannstadt Biorad. München Biorad. München Thermo-Dux, Wertheim Hoefer, Pharmacia Biotech, Freiburg Hoefer Pharmacia Biotech, Freiburg Radiometer, Dänemark Fuji, Japan Hoefer Pharmacia Biotech, Freiburg Biorad, München Hoefer, USA Sorvall, Bad Homburg Sorvall, Bad Homburg Shimadzu, Japan Beckman, München MWG-Biotech, Ebersberg NeoLab, Heidelberg Branson, Danbury, USA Merck, Darmstadt Eppendorf, Hamburg Sorvall, Bad Homburg

# 2.1.4 Nährmedien

DMEM	133,8 g/l	DMEM-Pulver,
	3,7 g/l	NaHCO₃,
		in Viapurex-H₂O, pH 7,0.
Erhaltungsmedium DMEMØ5(10)/1	5-10%	FCS,
	1%	Penicillin/Streptomycin,
		in DMEM-Flüssigmedium.
Erhaltungsmedium DMEMØ10/1	10%	FCS (östradiolarm),
	1%	Refobacin,
		in phenolrotfreiem DMEM-
		Flüssigmedium.
Erhaltungsmedium RPMIØ12/1	12%	FCS (östradiolarm),
	1%	Penicillin/Streptomycin,
	1%	Glutamin,
		in phenolrotfreiem RPMI1640-
		Flüssigmedium.
FCS (östradiolarm)	10 g	Norit A (Aktivkohle),
	1,2 g	Dextran 35,
	11	FCS,
		30 min rühren lassen,
		anschließend bei 14000 rpm
		abzentrifugieren und Überstand
		sterilfiltrieren.
Einfriermedium	20 ml	DMEM (2x),
	25 ml	FCS,
	4 ml	7,5% (w/v) NaHCO <sub>3,</sub>
	6 ml	DMSO.
## 2.1.5 Antikörper

### 2.1.5.1 Primärantikörper

- Anti-Aktin Monoklonaler Ziege-Antikörper, erkennt ein Epitop am C-Terminus von Aktin (Santa Cruz, Heidelberg; Arbeitskonzentration im "Western": 1:2500).
- Anti-Bax Ab-1 Muriner monoklonaler Antikörper gegen das humane Bax-Protein, erkennt ein Epitop zwischen den Aminosäuren 3 und 16 (BIOCARTA; Arbeitskonzentration im "Western": 1.1000).
- Anti-hp21 (WAF-1) Muriner monoklonaler Antikörper, der das humane p21<sup>WAF</sup>-Protein erkennt (Calbiochem, Bad Soden; Arbeitskonzentration im "Western": 1:200-1:1000).
- DO1 Muriner monoklonaler Antikörper gegen das humane p53-Protein, erkennt ein N-terminales Epitop zwischen den Aminosäuren 20 und 25 (Calbiochem, Bad Soden; Vojtesek *et al.*, 1992; Arbeitskonzentration im "Western": 1:1000 - 1: 5000).
- F-I-23 Muriner monoklonaler Antikörper gegen das humane PARP-1Protein und die PARP-DBD, erkennt ein N-terminales Epitop,
  Hybridomaüberstand, der freundlicherweise von Prof. Dr. A. Bürkle,
  Uni Konstanz, zur Verfügung gestellt wurde (Guy G. Poirier,
  Quebec, Kanada; Arbeitskonzentration im Western 1:100.
- PAb108 Muriner Antikörper, erkennt SV40 T-Ag-Epitop, SV40 t-Ag und SV40 17kT (Gurney *et al.*, 1986; Arbeitskonzentration in der Immunfluoreszenz: 1:2-1:5).
- PAb421 Muriner monoklonaler Antikörper gegen das humane p53-Protein, erkennt ein C-terminales Epitop zwischen den Aminosäuren 372 und 382 (Harlow *et al.* 1981; Arbeitskonzentration im "Western": 1: 200 - 1: 500).

## 2.1.5.2 Sekundärantikörper

Huhn-Anti-Ziege-Peroxidase	Biomol, Hamburg
	Arbeitskonzentration im "Western": 1:5000
Streptavidin-Cy3-Konjugat	Dianova, Hamburg
	Arbeitskonzentration in der Immunfluoreszenz: 1:400
Ziege-Anti-Maus-Biotin	Dianova, Hamburg
	Arbeitskonzentration in der Immunfluoreszenz: 1:100
Ziege-Anti-Maus-Peroxidase	Biomol, Hamburg
	Arbeitskonzentration im "Western": 1:2500 - 1: 10000

## 2.1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
"Top"-Oligo	5'-GACGCTGCCGAATGGATCCGGTTAAAGGGTAAT
	TTTAAAATATCTGGGAAGTCCCTTCCACTGCTG-3'
"Central"-Oligo	5'-GCAGTGGAAGGGACTTCCCAGATATTTTAAAATT
(Match)	ACCCTTAGAAAGCGGTCTGTGAAAAACCCCCTA-3′
A/G-"Central"-Oligo	5'-GCAGTGGAAGGGACTT <u>A</u> CCAGATATTTTAAAATT
(Mismatch)	ACCCTTAGAAAGCGGTCTGTGAAAAACCCCCTA-3′
"Bottom"-Oligo	5'-GGGGTTTTTCACAGACCGCTTTCTAAGGGTAA
	TTTTAAAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCGA-3'
"Top"-Oligo (long)	5′-
93mer	GACGCTGCCGAATGGATCCGGTTAAAGGGTAATTTTAAA
	ATATCTCGAGAGTCCCTTCCACTGCTGTGTTCTAGAAGT
	<u>G</u> TTGGTTAACAGCCC-3′
A-G "Central" (long)	5'-
110mer	GGGCTGTTAACCAA <u>A</u> ACTTCTAGAACACAGCAGTGGAA
	GGGACTCTCGAGATATTTTAAAATTACCCTTAGAAATCG
	ATCTGTGAAAAACCCCTACCCGGGTTCCTTTT-3'
"Bottom" (long)	5′-
81mer	AAAAAGGAACCCGGGTAGGGGTTTTTCACAGATCGATTT
	CTAAGGGTAATTTTAAAGGTGTCTAGAGGATCCGACTAT
	CGA-3′

Oligo 1 für	5′-
Strangtransfer	ACCGCTTTCTAAGGGTAATTTTAAAATATCTGGGAAGTC
	CCTTCCACTGCTGTGTTCAGAAGTGTT-3'
Oligo 2 für	5'-
Strangtranfer	AACACTTCTGGAACACAGCAGTGGAAGGGACTTCCCAG
	ATATTTTAAAATTACCCTAGAAAGCGGT-3'

Alle synthetischen Oligonukleotide wurden von MWG Biotech bezogen.

## 2.1.7 Vektoren

- pBlueScriptII KS<sup>(+/-)</sup> Ein Plasmidderivat des pBR322 mit einer multiplen Klonierungsstelle (Stratagene, Heidelberg). Das Plasmid wird im Text als pBS abgekürzt.
- pCMV-hWtp53 Vektor zur Expression des humanen Wtp53 unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Der Vektor wurde von Dr. K. Roemer, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar, zur Verfügung gestellt (Roemer & Mueller-Lantzsch, 1996).
- pCMV-I-Scel Vektor zur Expression von I-Scel unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Der Vektor wurde von Frau Dr. Maria Jasin, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA, zur Verfügung gestellt (Rouet *et al.*, 1994).
- pCMVp6 Vektor zur Expression der PARP-DBD (Küpper *et al.*, 1995) mit vorgeschaltetem CMV-Promotor. Der Vektor wurde von Frau E. Bendrat, HPI, Hamburg generiert und zur Verfügung gestellt.
- pCMVp31 Vektor zur Expression der humanen PARP-1 mit vorgeschaltetem CMV-Promotor. Der Vektor wurde von Frau E. Bendrat, HPI, Hamburg generiert und zur Verfügung gestellt.
- pEGFP-N1 Vektor zur Expression des *EGFP*-Gens unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Eine multiple Klonierungsstelle erlaubt die C-terminale Markierung von Proteinen mit EGFP (Clontech, Californien, USA).

- pFB530 cDNA, kodierend für hRAD51 in einen pET11d Expressionsvektor kloniert, unter der Kontrolle eines T7Φ10 Promotors (Benson *et al.*, 1994).
- pGC Kontrollplasmid mit vorgeschaltetem GC-Promotor. Der GC-Promotor enthält Gal4 responsive Elemente (sog. GREs), welche von Gal4-her in Zellen erkannt werden (Braselmann *et al.*, 1993).
- pGCp6 Vektor zur Expression der PARP-DBD (Küpper *et al.*, 1995) mit vorgeschaltetem GC-Promotor. Der Vektor wurde von Frau E. Bendrat, HPI, Hamburg generiert und zur Verfügung gestellt.
- pGCp31 Vektor zur Expression der humanen PARP-1 mit vorgeschaltetem GC-Promotor. Der Vektor wurde von Frau E. Bendrat, HPI, Hamburg generiert und zur Verfügung gestellt.
- pHyg Vektor zur Expression des Hygromycin-Resistenzgens in eukaryontischen Zellen (Dudenhöffer *et al.*, 1998).
- pM5Neo Vektor zur Expression des Neomycin-Resistenzgens in eukaryontischen Zellen (Laker *et al.*, 1987).
- pMV-GalER-VP Retroviraler Vektor zur Expression des östradiolabhängigen chimären Transkriptionsfaktors GalERVP unter der Kontrolle der 5<sup>c</sup>LTR des murinen Moloney-Leukämie-Virus (Braselmann *et al.*, 1993).
- pSV53her Vektor zur Expression des humanen wtp53 unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Das produzierte p53-Protein ist mit der Östradiolbindedomäne des humanen Östradiolrezeptors fusioniert und erlaubt die funktionelle Aktivierung durch Östradiol (Roemer and Friedmann, 1993).

Die folgenden Vektoren wurden von Dipl.-Biol. N. Akyüz generiert, beschrieben (Akyüz *et al.*, 2002) und zur Verfügung gestellt:

p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-EJ, -HR oder - $\Delta$  Rekombinationssubstrate, die in Kapitel 3.2.5 detailiert beschrieben sind.

p5bPuroCMV-WtEGFP Positivkontrolle und Wt*EGFP*-Substrat zur Ermittlung der Transfektionseffizienz (s. Kapitel 3.2.5). p5bPuroCMV-HR Negativkontrollplasmid mit Akzeptor

p5xtrshSV40-Hyg Negativkontrollplasmid mit Donor 3'EGFP, ohne Akzeptor.

HR-EGFP, ohne Donor.

Für Baculoviren, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden (siehe 2.4.6.3), standen zwei Konstrukte, generiert von Frau E. Bendrat, zur Verfügung. Diese Vektorkonstrukte wurden zur Proteinexpression von Wtp53 unf p53(273H), jeweils fusioniert mit 6x Polyhistidinschwanz, designiert.

## 2.1.8 Bakterienstämme (E. coli)

- *BLR (DE3) pLysS*  $F^-$  ompT hsdS<sub>B</sub> ( $r_R^-m_R^-$ ) gal dcm  $\Delta$  (srl-recA) 306::Tn10 (tet<sup>R</sup>) (DE3) pLysS (cam<sup>R</sup>), (Novagen, USA)
- *E. coli DH*  $5\alpha$  F'/endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub>+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Naľ) relA1  $\Delta$  (laclZYA-argF)U169 deoR( $\phi$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15), (NEB, Frankfurt/M.) (Hanahan, 1983)
- *E. coli XL 10 Gold* Tet<sup>r</sup>∆(mcrA)183 ∆(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacl<sup>q</sup>Z∆M15Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]<sup>a</sup> (Stratagene, Californien, USA)
- *E. coli SCS 110* rpsL (Str<sup>r</sup>) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44∆ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacl<sup>q</sup>Z∆M15] (Stratagene, Californien, USA)

### 2.1.9 Viren

Die hier aufgeführten Viren standen für die vorgestellte Arbeit zur Verfügung:

- WtSV40 Stamm 776; erstes kloniertes SV40-Virus, mit kleiner *Plaque*-Bildung (*"Small Plaque Strain"*). GenBank-Accession-Nummer JO2400, ATTC-Nummer 45019, 4501 (Fiers *et al.*, 1978).
- SV40-tsVP1(290T) Virus, der durch *in vitro*-Einführung der Punkt-mutation A2367C im SV40-Genom entstanden ist (Wiesmüller *et al.*, 1996).
- SV40-tsVP1(196Y) Virus, der durch in vitro-Einführung der Punkt-mutation C2084T im SV40-Genom entstanden ist (Wiesmüller *et al.*, 1996).
- Baculoviren wtp53-, p53(273P)- und p53(248P)-exprimierend (Dudenhöffer *et al.*, 1999).

### 2.1.10 Zelllinien

### 2.1.10.1 Mammaliazellinien

CV1 SV40-permissive Affennierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) mit fibroblastenähnlicher Morphologie und pseudodiploidem Chromosomensatz. ATTC#CCL70 (Manteuil *et al.*, 1973). Zur Erhaltung wurde DMEM5/1 verwendet.

COS-1 CV1-Zelllinie, die mit einer Mutante von SV40 transformiert wurde, deren SV40-Replikationsursprung eine 6 bp-Deletion besitzt. ATTC#CRL1650 (Gluzman, 1981). Zur Erhaltung wurde DMEM10/1 verwendet.

LLC-MK<sub>2</sub> Affennierenzellen des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) (Hull *et al.*, 1956). Zur Erhaltung wurde DMEMØ10/1 verwendet.

- LLC-MK<sub>2</sub>(neo) LLC-MK<sub>2</sub>-Zelllinie, die stabil mit pM5Neo transfiziert wurde (Dudenhöffer *et al.*, 1998). Zur Erhaltung wurde DMEMØ10/1 verwendet.
- LLC-MK<sub>2</sub>(p53her)21 LLC-MK<sub>2</sub>-Zelllinie, die stabil mit pM5Neo und pSV53her transfiziert wurde (Boehden, 2003). Zur Erhaltung wurde DMEM⊘10/1 verwendet.
- LMV2 LLC-MK<sub>2</sub>-Zelllinie, die stabil mit Vektor pMV-GalER-VP (Braselmann *et al.*, 1993) transfiziert (Dudenhöffer *et al.*, 1999). Zur Erhaltung wurde DMEMØ10/1 verwendet.
- MHHR-4 KMV5-Derivat, das mit dem Rekombinations-vektor p5trsSV40HygbPuroCMV-HR stabil transfiziert wurde (Akyüz *et al.*, 2002). Zur Erhaltung wurde RPMIØ12/1 verwendet.
- MH∆-6 KMV5-Derivat, das mit dem Rekombinations-vektor p5trsSV40HygbPuroCMV-∆ stabil trans-fiziert wurde (Akyüz et al, 2002). Zur Er-haltung wurde RPMIØ12/1 verwendet.
- LMV2-p53her-Kl8 LMV2-Zelllinie, die stabil mit pSV53her transfiziert sind. Die Zelllinie wurde von Fr. E. Bendrat etabliert. Zur Erhaltung wurde DMEMØ10/1 verwendet.
- LMV2-PARP-KI3 LMV2-Zelllinie, die stabil mit pGC-PARP transfiziert sind. Der pGC-Vektor ist ein eukaryontischer Expressionsvektor (Braselmann *et al.*, 1993) und erlaubt hier die Expression des PARP-Gens unter der Kontrolle des Gal4-Promotors. Die Zelllinie wurde von Fr. E. Bendrat etabliert. Zur Erhaltung wurde DMEMØ10/1 verwendet.
- LMV2-p53herPARP-KI1 LMV2-Zelllinie, die stabil mit pSV53her und pGC-PARP (s. p31herCl3) transfiziert sind. Die Zelllinie wurden von Fr. E. Bendrat etabliert. Zur Erhaltung wurde DMEMØ10/1 verwendet.

### 2.1.10.2 Insektenzellinien

Sf9	Insektenzelllinie aus S	Spodoptera frug	giperda (\	/aughn <i>et al</i> ., 1	977)
High Five	Insektenzelllinie aus Baculoviren (Wickhan	<i>Trichoplusia</i> ∩ et al., 1992)	<i>ni</i> zur	Amplifikation	von

## 2.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

## 2.2.1 Herstellung transformations-kompetenter Bakterien nach der Mehrionen-Technik

100 ml Ψ-Broth- Medium wurden mit 0,5 ml einer Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C und 180 rpm geschüttelt, bis eine optische Dichte von etwa 0,5 bei einer Wellenlänge von 595 nm erreicht war. Die Bakterien wurden dann in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 2 min auf Eis abgekühlt. Nach dem Abzentrifugieren (Sorvall RC-5B-Zentrifuge, Rotor SLA-3000, 5000 rpm, 10 min, 4°C) wurde das Bakteriensediment in 30 ml eiskaltem TfBI resuspendiert, 30 - 60 min auf Eis inkubiert, wieder abzentrifugiert, in 5 ml TfBII aufgenommen und weitere 15 min auf Eis belassen. Die kompetenten Bakterien wurden anschließend aliquotiert (á 100 μl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Ψ-Broth-Medium:	10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 10 mM MgCl <sub>2</sub> in LB-Medium; pH mit KOH auf 7,6
	bringen.
TfBI:	100 mM RbCl; 50 mM MnCl_2; 10 mM CaCl_2; 30 mM Kaliumacetat, 15%
	(v/v) Glycerol; pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen.
TfBII:	10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl_2; 15% (v/v) Glycerol; pH 7,0
	einstellen.

## 2.2.2 Transformation von *E. coli* (Kaiser und Hognes, 1960)

Kompetente *E. coli*-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und jeweils 100 µl mit 100-500 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 s bei 42°C wurden die Bakterien für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) wurde die Bakteriensuspension für 1 h bei 37°C geschüttelt und anschließend in verschiedenen Volumina auf Agar mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

- **LB-Medium:** 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in 1l ddH<sub>2</sub>O, pH 7,4.
- LB-Agar: 15 g Bacto Agar in 1I LB-Medium (autoklavieren und nach dem Abkühlen auf 50°C mit oder ohne Antibiotika ausplattieren).

Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

- 50-100 µg/ml Ampicillin
- 30 µg/ml Kanamycin
- 30 µg/ml Streptomycin
- 12 µg/ml Tetrazyklin.

## 2.2.3 Einfrieren von Bakterien

Die Bakterienkultur (in LB-Medium) wurde entweder mit Glycerol [Endkonzentration 30-50% (v/v)] oder mit DMSO [Endkonzentration 7% (v/v)] versetzt und bei –80°C eingefroren und gelagert.

**LB-Medium:** 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in 1l ddH<sub>2</sub>O, pH 7,4.

## 2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für *Mini-Plasmidpräparationen* wurden je 5 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit je einer transformierten Bakterienkolonie angeimpft und auf einem Schüttler bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert. 1,5 ml dieser Übernachtkultur wurden in einem Reaktionsgefäß bei 14.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zur Isolierung der Plasmid-DNA mit dem *QIAmp-Mini-DNA-Kit* nach Anleitung des Herstellers (QIAGEN) bearbeitet. Die in 10 mM Tris, pH 8,5 oder TE-Puffer aufgenommene Plasmid-DNA wurde durch Restriktion (s. 2.2.7) und analytische Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.8) untersucht.

Für *Maxi-Plasmidpräparation* wurde eine 250-500 ml Übernachtkultur in einem 2 l Kolben bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden bei 5.000 rpm (Sorvall-Zentrifuge, SLA 3000-Rotor) für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus dieser Kultur wurde mit Hilfe des *QIAGEN-Plasmid-Maxi-Kit* oder *GIBCO concert High Purity* nach Angaben des Herstellers (QIAGEN bzw. GIBCO) durchgeführt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde durch Restriktion mit verschiedenen

Endonukleasen (s. 2.2.7) und anschließender Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.8) charakterisiert.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA.
LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in 1l ddH<sub>2</sub>O, pH 7,4.
Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

50-100 μg/ml Ampicillin,
30 μg/ml Kanamycin,
30 μg/ml Streptomycin,
12 μg/ml Tetrazyklin.

## 2.2.5 Ethanolpräzipitation von DNA

Zur DNA-Fällung wurde ein 2,5 faches Volumen Ethanol (absolut) und <sup>1</sup>/<sub>10</sub> Volumen 3 M Natriumacetat, pH 4,6 zum Reaktionsansatz gegeben. Der Ansatz wurde gut durchmischt und für mindestens 30 min bei –20 °C inkubiert. Anschließend wurde er für 15 - 30 min bei 4.000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das DNA-Pellet wurde mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, für 30 min bei 37 °C getrocknet und in TE aufgenommen.

**TE-Puffer:** 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA.

## 2.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

## 2.2.6.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch bestimmt und das Ergebnis durch Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.8) überprüft. Die DNA-Lösung wurde 1:200 mit 10 mM Tris, pH 8,5 oder TE-Puffer verdünnt und die Extinktion dieser Verdünnung bei 260 nm und 280 nm (OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub>) gegen 10 mM Tris, pH 8,5 bzw. TE-Puffer als Referenz bestimmt. Es gilt dabei folgender Richtwert für dsDNA: OD<sub>260</sub> x 0,05 x Verdünnung entspricht der DNA-Konzentration in  $\mu$ g/ $\mu$ l. Ein Quotient von OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> von über 1,8 zeigt an, dass die DNA frei von Proteinen ist.

**TE-Puffer:** 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA.

### 2.2.6.2 Quantifizierung geringer DNA-Mengen

Mit Hilfe des *DNA DipStick Kits* (Invitrogen) war es möglich, DNA-Konzentrationen zu bestimmen, die zwischen 0,1-10 ng/µl lagen. Diese Methode wurde vor allem zur Quantifizierung von (radioaktiven) Oligonukleotiden aus den Kapiteln 2.2.9.1 und 2.2.9.3 verwendet und nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

## 2.2.7 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur Klonierung, Charakterisierung oder Orientierungsbestimmung eines DNA-Fragmentes wurde dieses mit ausgewählten Restriktionsendonukleasen behandelt. Die Reaktionen wurden in einem Mindestvolumen von 20 µl angesetzt und, soweit vom Hersteller nicht anders empfohlen, bei 37 °C für 1 - 2 h inkubiert. Es wurde ein Verhältnis von 1 U Enzym pro 1 µg DNA eingesetzt. Für die Reaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer benutzt und zu jedem Ansatz BSA (Endkonzentration 1x) zugegeben. Die Enzyme wurden durch Hitze (10 min bei 75 °C oder 20 min bei 65 °C) oder durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 1x) inaktiviert.

100x BSA-Stocklösung:10mg/ml BSA.10x EDTA:50 mM EDTA.

# 2.2.8 Auftrennung von DNA in der Agarosegelelektrophorese (Ausubel, 1992)

Plasmide und Restriktionsansätze wurden auf Agarosegelen aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Vor dem Auftragen der DNA-Proben auf das Gel wurden sie mit DNA-Probenpuffer (Endkonzentration 1x) versetzt. Parallel zu den Proben wurde ein DNA-Marker aufgetrennt. Die Separation erfolgte bei konstant 80 V und die Detektion der DNA unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm.

TAE-Puffer:	1 mM EDTA, 40 mM Tris/Acetat; pH 8,0.
10x DNA-Probenpuffer:	100 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerol, 1% (w/v) SDS, 0,25% (w/v)
	Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol; pH 8.0.
Agarosegele:	0,8-2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer, 1 µg/ml Ethidiumbromid.

#### 2.2.9 Herstellung künstlicher DNAs

#### 2.2.9.1 Herstellung der künstlichen 3-Strang-Rekombinationsintermediate

Die Oligonukleotide, die zur Erzeugung der 3-Strang-Substrate eingesetzt wurden, bilden eine DNA-Struktur, die ein bei der Rekombination auftretendes Intermediat [des SV40-tsVP1(286S)-Lokus (Dudenhöffer *et al.*, 1998)] imitiert. Die *Match*-Substrate wurden aus den drei Oligonukleotiden "Top", "Central" (*Match*) und "Bottom" gebildet. Bei Einsatz des A/G-"Central"(*Mismatch*)-Oligonukleotids entstand eine A/G-Fehlpaarung innerhalb des Rekombinationsintermediates (s. Abb. 7 und 20a).



**Abb. 7:** Künstlich erzeugtes 3-Strang-DNA-Substrat zur Nachahmung eines Rekombinationsintermediates.

Für die Exonuklease-Assays (Kapitel 2.4.7.2) wurden zum Teil künstliche 3-Strang-Substrate mit längeren Oligonukleotiden (aber prinzipiell gleichen Aufbaus wie die soeben beschriebenen "kurzen" 3-Strang-Substrate, vgl. a und b in Abb. 20) eingesetzt, "Top" (lang), A/G-"Central" (lang) und "Bottom" (lang), welche zudem Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen enthielten (s. Abb. 20b).

# 2.2.9.2 Radioaktive 5'-Markierung eines Oligonukleotids durch Kinasierung (Weaver und Weissmann, 1979)

Das freie 5'-Ende von synthetischen DNA-Oligonukleotiden kann mit T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert werden. Diese Kinasierung wurde durchgeführt, um definiert einen spezifischen Einzelstrang des Rekombinationsintermediates radioaktiv zu markieren.

Pro Ansatz wurden 80 pmol des Oligonukleotids "Top" bzw. "Top" (lang) in 1x Kinase-Puffer mit 40 U T4-Polynukleotidkinase (NEB) und 240  $\mu$ Ci  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP 45 min bei 37°C inkubiert. Durch anschließendes 10-minütiges Erhitzen auf 68°C wurde das Enzym inaktiviert. Das kinasierte Oligonukleotid wurde von freien Nukleotiden durch Ethanolfällung befreit. Dazu wurden 0,1 Volumenanteile 3 M Na-Acetat, pH 4,8 und 3 Volumenanteile absoluten Ethanols hinzugefügt, 30 min oder über Nacht bei -20°C inkubiert und die DNA

durch Zentrifugation bei 20.000 x g pelletiert. Nach einmaligem Waschen mit 80%igem Ethanol wurde das DNA-Pellet mindestens 20 min getrocknet und anschließend in 28 µl Hybridisierungspuffer gelöst.

Hybridisierungspuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM DTT (frisch zusetzen).

#### 2.2.9.3 Erzeugung der 3-Strang-Substrate durch Hybridisierung

Die in Abb. 20 dargestellten künstlich erzeugten 3-Strang-DNA-Substrate (3sDNAs) ahmen sehr frühe *in vivo*-Rekombinationsintermediate nach. Das radioaktiv markierte DNA-Oligonukleotid ("Top") wurde an ein teilweise komplementäres 2. Oligonukleotid ("Central") hybridisiert und letzteres im noch einzelsträngigen Abschnitt an ein komplementäres 3. Oligonukleotid ("Bottom") anhybridisiert. Das "Central"-Oligonukleotid fungiert als Verbindungsstück zwischen den beiden DNA-Einzelsträngen und simuliert somit die zu rekombinierende DNA.

Die Hybridisierungsansätze für die "kurzen" Substrate, 3sDNA (*Match*) und 3sDNA A/G (*Mismatch*), sowie "lange" 3sDNA A/G (*Mismatch*) setzten sich folgendermaßen zusammen:

Oligonukleotid	3sDNA ( <i>Match</i> )	3sDNA A/G ( <i>Mismatch</i> )	"lange" 3sDNA A/G ( <i>Mismatch</i> )
"Top"-Oligo kinasiert (siehe 2.2.9.2)	12 µl	14 µl	7 µl
"Central"-Oligo ( <i>Match</i> ) (20pmol/µl) "kurz"	0,7 µl		
A/G-"Central"-Oligo ( <i>Mismatch</i> ) (20pmol/µl) "kurz" "lang"		0,8 µl	0,4 µl
"Bottom"-Oligo (20 pmol/µl) "kurz" "lang"	0,7 µl	0,8 µl	0,4 µl

Die Oligonukleotidmischungen wurden jeweils 10 min auf 60°C erhitzt, um mögliche bestehende Sekundärstrukturen innerhalb der einzelsträngigen DNAs aufzulösen und anschließend rasch zum Abkühlen gebracht, indem der Metalleinsatz des Heizblocks auf Eis gekühlt wurde.

#### 2.2.9.4 Aufreinigung der 3-Strang-Substrate

Die Trennung des 3-Strang-Substrates von restlicher einzel- und doppelsträngiger DNA erfolgte durch native, kontinuierliche PAGE. Zu den Match und A-G mismatch Substraten wurden jeweils 5 µl, zu dem kinasierten "Top"-Oligo-Substrat 7 µl DNA-Probenpuffer gegeben. Die Proben wurden dann auf ein 6% iges natives kontinuierliches PAA-Gel (20 x 16 x 0,075 cm; 1:19 Bisacrylamid/Acrylamid in 1x TBE, 30 µl TEMED, 150 µI 10% APS) aufgetragen und bei einer Spannung von 160 V in 1x TBE-Puffer aufgetrennt. Anschließend wurde die Positionen der Einzelund 3-Strangbanden durch Autoradiographie identifiziert (1 bis 20-minütige Exposition, X-Omat Röntgenfilm). Die Match- und Mismatch-3sDNAs sowie die Einzelstrangbande ("Top"-Oligo) wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Plastikreaktionsgefäß überführt, mit einer Plastikpipettenspitze zermörsert und mit 500 µl Elutionspuffer bedeckt. Die Elution erfolgte über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C. Anschließend wurden die Gelstückchen durch 5minütige Zentrifugation bei 20.000 x g abzentrifugiert, der Überstand über Glaswolle filtriert und die DNA mit 0,1 Volumenteilen 3 M Na-Acetat, pH 4,8 und 3 Volumenteilen absolutem Ethanol gefällt. Die DNA-Pellets wurden zweimal mit kaltem, 80% igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Elutionspuffer gelöst (match: 27 µl, mismatch: 30 µl und Einzelstrang "Top"-Oligo: 15 µl). Zur Quantifizierung der Substratausbeute wurden die Zerfallsereignisse pro Minute (cpm) mit dem Szintillationszähler gemessen, wobei je 1 µl Substrat-DNA in 2 ml Szintillationslösung gegeben wurden. Die Konzentrationen der aufgereinigten DNAs wurden mit Hilfe des DNA DipStick Kits (Invitrogen) (s. Kapitel 2.2.6.2) bestimmt.

Elutionspuffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA;
	2 mM DTT (frisch zusetzen).
5x DNA-Ladepuffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 % (v/v) Glycerol; 0,1 M
	EDTA; 1 % (w/v) Bromphenolblau (oder
	Xylencyanol).
10x TBE:	0,89 M Tris/HCI, pH 8,0; 0,89 M Borsäure; 25 mM
	EDTA.
6%iges Polyacrylamidgel (40 ml):	6 ml 10x RegG-Laufpuffer; 4 ml 40% (w/v)
	Polyacrylamid (1:19 Bisacrylamid); 30 ml ddH2O;
	entgasen und 150 $\mu l$ 10% (w/v) APS; 30 $\mu l$ TEMED
	zugeben und Gel gießen.

#### 2.2.9.5 Präparation der DNAs für die Strangtransfer-Assays

Für die Strangtransfer-Assays (Kapitel 2.4.7.3) wurden Oligonukleotid 1 und Oligonukleotid 2 (siehe Kapitel 2.1.6.2) verwendet, welche SV40-Sequenzen des SV40-tsVP1(286S)-Lokus (Dudenhöffer *et al.*, 1998) beinhalten. Das Oligo 1 (67-mer) wurde mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP am 5'-Ende markiert (s. Kapitel 2.2.9.9). <sup>32</sup>P-markierte und nicht-markierte Duplex DNAs wurden durch Hybridisierung, wie in Kapitel 2.2.9.3 beschrieben, des markierten oder nicht-markierten Oligo 1 mit dem komplementären Oligo 2 (67-mer) generiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der Substrate wie unter 2.2.9.4 beschrieben, wobei hierfür allerdings ein 12%iges natives kontinuierliches PAA-Gel verwendet wurde. Die Konzentrationen der aufgereinigten DNAs wurden mit Hilfe des *DNA DipStick Kits* (Invitrogen) (s. Kapitel 2.2.6.2) bestimmt.

12%iges Polyacrylamidgel (40 ml): 4 ml 10x TBE-Laufpuffer; 12 ml 40% (w/v) Polyacrylamid (1:19 Bisacrylamid); 24 ml ddH2O; entgasen und 150 μl 10% (w/v) APS; 30 μl TEMED zugeben und Gel gießen.

## 2.3 Molekularbiologische und zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Insektenzellkultur

### 2.3.1.1 Erhaltungskultur

Die zur Virusamplifikation verwendeten SF9-Zellen, sowie die zur Proteinexpression verwendeten High-Five-Zellen wurden als adhärente Zellkulturen in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bei 27°C bis zur Konfluenz expandiert und ca. alle 2 Tage nach der Teilung im Verhältnis 1:3 passagiert. Die Ablösung der Zellen erfolgte hierbei durch vorsichtiges Abklopfen. Zur Gewinnung großer Proteinmengen wurden Insektenzellen als adaptierte Suspensionskultur bei einer Dichte von ca. 1 x 10<sup>6</sup>/ml in Spinnerflaschen (Bellco) kultiviert. Alle 2 Tage wurden die Suspensionszellen bei einer Dichte von ca. 1,5 x 10<sup>6</sup>/ml durch Mediumzugabe verdünnt. Zur Gewährleistung der optimalen Infizierbarkeit und Proteinexpression wurden ausschließlich logarithmisch wachsende Zellen mit >95% Viabilität (nach Trypan-Blau-Färbung) verwendet. Alle Insektenzelllinien wurden in TC-100-Insektenmedium (Biochrom, Berlin) mit 10% (v/v) FCS und 2% (v/v) 200 mM L-Glutamin gehalten.

 Trypan-Blau Stocklösung:
 10 mM Tris/HCl, pH 7,2; 0,5% (w/v) Trypan-Blau; 0,85%

 (w/v) NaCl.

#### 2.3.1.2 Einfrieren von Insektenzellen

High-Five- und Sf9-Insektenzellen wurden als adhärente Zellkulturen in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bei 27°C bis zu einer 90-100% igen Konfluenz expandiert. Logarithmisch wachsende Zellen mit >95% Viabilität wurden durch leichtes Abschlagen der Zellen geerntet und mit einer Dichte von 2 x  $10^7$ /ml Einfriermedium in Kryoröhrchen (Nunc) aliquotiert. Die Zellen wurden zunächst für 1h bei –20°C und danach für 24 h bei –80°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff dauerkonserviert.

**Einfriermedium:** 90% (v/v) FCS; 10% (v/v) DMSO.

#### 2.3.2 Kultur eukaryontischer Zellen

#### 2.3.2.1 Erhaltungskultur

Alle Zelllinien wurden auf Gewebekulturschalen der Fa. Nunc bei 5% CO<sub>2</sub>, 85% Humidität und 37°C kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen durch eine drei- bis fünfminütige Behandlung mit Trypsin-Lösung bei 37°C von der Kulturschale gelöst, durch Zugabe von Kulturmedium verdünnt und auf neue Gewebekulturschalen gegeben. CV1 Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), KMV5 in phenolrotfreiem RPMI mit 12% östradiolarmen FCS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin gehalten. Die LL-CMK<sub>2</sub>-wtp53her-bzw. –neo Klone wurden aufgrund des konstant exprimierten, durch Östradiol funktionell induzierbaren p53 in phenolrotfreiem DMEM mit Zusatz von 10 % östradiolarmen FCS wird der Östradiolgehalt des Serums auf unter 10% des Ausgangsgehaltes reduziert. Da auch Phenolrot aufgrund der Strukturähnlichkeit schwach an den Östradiolrezeptor bindet wurde phenolrotfreies Medium verwendet.

östradiolarmes FCS: 10 g Norit A (Aktivkohle); 1 g Dextran 40 oder 1,2 g Dextran 35;
1 I FCS; 30 min rühren lassen, anschließend bei 19.000 x g abzentrifugieren und Überstand sterilfiltrieren.

#### 2.3.2.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen von einer Gewebekulturschale mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert (400 x g, 3 min, RT) und in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Einfrierröhrchen (Nunc) sofort auf Eis gestellt, über Nacht bei –80°C belassen und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurde der Inhalt eines Einfrierröhrchens in 10 ml Medium aufgenommen und abzentrifugiert (400 x g, 3 min, RT). Die sedimentierten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und auf Gewebekulturschalen gegeben. Nach ca. 24 h wurde das Medium erneuert.

**Einfriermedium:** 20 ml 2x DMEM; 25 ml FCS; 4 ml 7,5% (w/v) NaHCO<sub>3</sub>; 6 ml DMSO oder Optifreeze® der Firma ICN.

#### 2.3.3 Transfektion

# 2.3.3.1 Transfektion nach der Kalziumphosphat-Methode (Graham und van der Eb, 1973)

Bei der Kalziumphosphat-Methode wird die DNA in Form von feinkörnigen Kalziumphosphat-Präzipitaten auf die Zellen aufgebracht und von ihnen durch Endozytose aufgenommen. Das Präzipitat wird durch langsame Mischung eines Ansatzes aus DNA, Kalziumchlorid und Phosphationen erhalten. Dafür wurden in ein Polypropylenröhrchen 500 µl 2x HeBS und 20 µg DNA vorgelegt und tropfenweise 500 µl 0,25 M CaCl<sub>2</sub> unter gleichzeitiger Durchmischung mit Hilfe einer Pasteurpipette hinzugegeben. Das so erhaltene DNA-Kalziumphosphat-Präzipitat wurde für 30 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Nach 16-20 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium mit DNA-Kalziumphosphat-Präzipitat abgesaugt und frisches Medium auf die Zellen gegeben.

**2x HeBS:** 247 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 42 mM Hepes.

# 2.3.3.2 Transfektion durch Elektroporation (Baum *et al.*,1994)

Bei diesem Verfahren werden die Zellen kurz einem elektrischen Feld ausgesetzt. Diese Behandlung erzeugt für einige Millisekunden kleine depolarisierte (elektrisch

neutrale) Poren in der Zellmembran, wodurch die Passage von Molekülen, auch von DNA und RNA, in die Zelle möglich wird. Die Elektroporation wurde wie bei Baum *et al.* (1994) beschrieben durchgeführt. Dafür wurden pro Ansatz 0,1-1 x 10<sup>7</sup> Zellen für 5 min bei 250 x g zentrifugiert und in 400 µl Kulturmedium resuspendiert. In einer Elektroporationsküvette wurden 10-20 µg DNA in einem Höchstvolumen von 40 µl vorgelegt und Zellsuspension dazupipettiert. Der Ansatz wurde durch auf- und abpipettieren gut durchmischt.

Die Elektroporation erfolgte bei 240 Volt und 1050  $\mu$ F. Die Zellen wurden nach der Elektroporation sofort in eine 6 cm-Platte mit Erhaltungsmedium aufgenommen und 24 - 96 h im Brutschrank inkubiert.

#### 2.3.3.3 Transfektion durch Lipofektion mit FuGENE 6

Das FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche) ist ein Multi-Komponenten-Reagenz, welches auf liposomen-vermittelter Transfektion basiert. Es wurde zur effizienten Transfektion adhärenter eukaryontischer Zellen verwendet. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in Six-Well-Platten ausgesät. Pro Loch (Ø3,5 cm) wurden 2 µg DNA und 4 µl FuGENE 6 eingesetzt. Das raum-temperierte FuGENE 6 wurde in ein konisches 15 ml-Falcon-Röhrchen in 100 µl vorgelegtes Medium ohne FCS (oder andere Zusätze) direkt hinein pipettiert, gevortext und anschließend, die in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöste DNA zugegeben, gemischt (durch auf- und abpipettieren) und 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der Zellen gewechselt, wobei pro Loch (Ø3,5 cm) 4 ml frisches Vollmedium zugegeben wurden. Der Transfektionsansatz (150 µl) wurde vorsichtig in das Medium der Zellen geträufelt und die Schale kurz vorsichtig geschwenkt und anschließend bis Versuchsende 72 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Konfluenz der Zellen lag zum Zeitpunkt der Transfektion zwischen 50 und 80%. Für mehrere mit dem gleichen Transfektionsgemisch zu behandelnde Zellen, wurde jeweils ein Mastermix angefertigt. Während der 72stündigen Inkubationsdauer der Zellen mit den FuGENE 6-DNA-Komplexen konnten keine Zytotoxizitätserscheinungen beobachtet werden.

#### 2.3.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienzen wurden eukaryontische Zellen jeweils mit dem Plasmid pEGFP-N1 oder p5bPuroCMV-WtEGFP transfiziert (s. 2.3.3.2 bzw. 2.3.3.3). 4 - 96 h nach Transfektion wurde der prozentuale Anteil der grünfluoreszierenden Zellen entweder am Immunfluoreszenz-Mikroskop oder am Durchflusszytometer bestimmt.

#### 2.3.5 Selektion und Klonierung

Zur Isolierung von Klonen, die ein gewünschtes DNA-Fragment in ihr zelluläres Genom integriert haben, wurden die Zellen 48 h nach Transfektion (2.3.3.1) aus einer 9 cm-Platte auf fünf 9 cm-Platten verteilt. Nach Absetzen der Zellen (ca. 6 h) wurde das Erhaltungsmedium abgesaugt und Selektionsmedium (Erhaltungsmedium mit Selektionsagens) auf die Zellen gegeben. Nach 14-16 Tagen Selektion wurde das Medium abgesaugt und Klonierungsringe (0,5-1 cm Durchmesser), an deren Unterseite Silikonfett aufgebracht wurde, um die makroskopisch sichtbaren Klone gelegt. Nach Trypsinierung der Zellen innerhalb eines jeden Klonierungsringes wurden die Klone einzeln in je ein Loch einer 96-Loch-Platte überführt. Nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz wurden die Klone auf größere Platten transferiert.

## 2.3.6 Durchflußzytometrie (Akyüz, 2001)

Die Durchflusszytometrie erlaubt die optische Analyse mehrerer Tausend bis Millionen Zellen innerhalb kürzester Zeit. In einem geschlossenen System werden die Zellen durch eine Messküvette gesogen, wo sie mit einem gebündelten Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge (hier ein Argon-Laser mit 488 nm) angeregt werden. Das von der Zelle emittierte Licht wird von verschiedenen Spiegeln mit unterschiedlichen Filtern erfasst und die Daten an einem Computer ausgewertet.

Vor der Untersuchung wurden  $0,1 - 1 \ge 10^7$  Zellen zentrifugiert (250 x g, 5 min), das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und erneut sedimentiert. Die Zellen wurden in 1 ml PBS (mit 0,2% EDTA versetzt) resuspendiert und auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml gebracht. 1-2 ml dieser Suspension wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und die Fluoreszenzen der Zellen automatisch am Zytometer analysiert.

Zu Beginn der Messung wurden die Zellen zuerst im FSC- und SSC-Kanal als Dot-Plot-Diagramm in Form einer Wolke in die Mitte des Diagramms gezogen, so dass alle Zellen analysiert werden konnten. Anschließend wurden die grünfluoreszierenden Zellen im FL1-Kanal (Skala linear, FITC-Filter) bzw. die mit PI gefärbten im FL2- (Skala logarithmisch, Rhodamin-Filter) und FL3-Kanal (Skala linear, Cy5-Filter) gemessen.

Zur Quantifizierung grünfluoreszierender Zellen wurden die Werte im Histogramm (Zellzahl versus Fluoreszenzintensität) entweder durch Setzen von Markern im

Grünfluoreszenz-Bereich des FL1-Kanals (1-2 Größenordnungen über der Autofluoreszenz) oder durch das Abziehen des FL1-Diagramms einer nicht fluoreszierenden Zellpopulation errechnet.

Zur Analyse und Auswertung von Zellzyklusdaten nach PI-Färbung wurden zunächst in einem Dot-Plot [FL2-A (Fläche) gegen FL2-W (Weite)] aufgetragen und ein Marker (*Gate*) gesetzt, so dass Dubletten von der Analyse ausgeschlossen wurden. An diesen so selektionierten Zellpopulationen wurden anschließend Fluoreszenzintensitäten linear im FL3-H-Kanal (Höhe) gemessen und daraus mit Hilfe der *Wincycle-Software* die Verteilung auf unterschiedliche Zellzyklusphasen errechnet. Durch logarithmische Darstellungsweise der FL2-H-Werte (Höhe) wurde eine Darstellung über mehrere Größenordnungen erreicht und in einigen Fällen erst so der Anteil an apoptotischen Zellen mit sehr geringem DNA-Gehalt sichtbar gemacht.

## 2.3.6.1 Rekombinationsfrequenzbestimmung am Durchflußzytometer (Akyüz, 2001)

24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Elektroporation (und für MHEJ-12, MHHR-4 bzw. MH∆-6-Zellen Inkubation in Erhaltungsmedium mit 0,2 µM Östradiol) wurden 1-2 ml-Aliquots aus den Ansätzen genommen und die Zellen zentrifugiert (250 x g, 5 min). Das Zellpellet wurde in 1-5 ml PBS (mit 0,2% EDTA versetzt) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in PBS (mit 0.2% EDTA versetzt) resuspendiert und am Durchflusszytometer grün- und orangefluoreszierende Zellen über die FL1- und FL2-Kanäle quantifiziert. Pro Ansatz wurden 30.000 Zellen analysiert und die Rekombinationsfrequenzen in transfizierten Zellen als grünfluoreszierende Zellen in der Gesamtzellpopulation errechnet. Unter Korrektur der Werte bezüglich Transfektionseffizienzen der jeweiligen wurden dann Rekombinationsfrequenzen bezogen auf transfizierte Zellen ermittelt (s. 2.3.4).

#### 2.3.6.2 Einparametrische Zellzyklusanalyse (Propidiumjodidfärbung)

Für die Zellzyklusanalyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen mit dem DNA Farbstoff Propidiumjodid angefärbt. Das Zellpellet von 10<sup>6</sup> Zellen wurde nach einmaligem Waschen mit PBS, in 1 ml PBS resuspendiert und auf einem mechanischen Rührgerät bei 400 U/min vorsichtig 9 ml eiskalte Fixierlösung dazugetropft. Die fixierten Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert und mindestens 1 h bei –20°C gelagert (die so fixierten Zellen können mehrere Wochen bei –20°C gelagert werden). Für die Färbung wurden die fixierten Zellen in zwei Schritten mit zunächst 1:1 Fixierlösung/PBS und dann PBS gewaschen. Die

rehydrierten Zellen wurden pelletiert und in 0,5 bis 1,5 ml PI-Färbelösung vorsichtig durch 5maliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Zellen wurden dann für 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert und bis zur Messung mit einem Durchflusszytometer der Fa. Becton Dickinson (Facscalibur) im Dunkeln bei RT aufbewahrt. Zur Analyse und Auswertung der Zellzyklusdaten (PI-Färbung) wurden zunächst in einem Dot-Plot (FL2-A (Fläche) gegen FL2-W (Weite)) aufgetragen und ein Marker (Gate) gesetzt, so dass Dubletten von der Analyse ausgeschlossen wurden. An diesen so selektionierten Zellpopulation wurden anschließend Fluoreszenzintensitäten linear im FL3-H-Kanal (Höhe) gemessen. Durch logarithmische Darstellungsweise der FL2-H-Werte (Höhe) wurde eine kompensierte Messung erreicht und in einigen Fällen erst so der Anteil an apoptotischen Zellen mit sehr geringen DNA-Gehalt sichtbar gemacht. Die Auswertung der DNA-Histogramme erfolgte mit einer Analysesoftware zur Zellzyklusanalyse (MODFIT).

Fixierlösung:80% (v/v) Ethanol und Aceton im Verhältnis 1:1.PI-Färbelösung/Stocklösung:500 μg/ml Propidiumjodid in 38 mM Na-Citrat, pH 7,0.PI-Färbelösung-Arbeitslösung:PI-Stocklösung 1/10 mit PBS verdünnen und 50 μg/mlRNaseA (frisch ansetzen).

## 2.3.7 DAPI-Färbung zur Analyse der Kern-Morphologie

Für Studien der Morphologie der Kerne wurden Zellen der LMV2-Linie und der von ihr abgeleiteten stabilen Klone für 24 h auf Deckgläschen kultiviert, mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend mit 3,7% Formaldehyd in PBS für 10 min fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,3% Triton X 100 für 3 min. Die zelluläre DNA der fixierten und permeabilisierten Zellen wurden dann mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff 4´,6-Diamidin-2-phenyl-indol (DAPI) (0,1  $\mu$ g/ml) innerhalb von 10 min (RT, im Dunkeln) blau gefärbt Danach wurden die Präparate mit PBS und abschließend einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, bevor sie auf einem Objektträger in Mounting-Medium eingebettet wurden. Nach Aushärtung (ü.N., im Dunkeln) konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden (Anregungswellenlänge  $\lambda$ =350 -370 nm).Hierbei wurde das Immersionsölobjektiv 40x/ 0,75 der Fa. Olympus verwendet.

Mounting-Medium: 5 g Polyvinylalkohol 25/140; 90 ml PBS; 10 ml Glycerol.

### 2.3.8 Generationszeitenbestimmung

Zur Bestimmung der Generationszeit von Zelllinien wurden 5 x 10<sup>5</sup> Zellen in 9 cm-Schalen (Doppelbestimmung) ausgesät (mit und ohne 1 µM Östradiol) und nach 24- und 48-stündiger Inkubation ausgezählt.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

## 2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

### 2.4.1.1 Absorption bei 280 nm (Peterson, 1983)

Zur schnellen Ermittlung des Proteingehalts wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Näherungsweise entspricht eine OD<sub>280</sub> von 1 einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml.

### 2.4.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurde der *Protein-Assay-Kit* der Fa. Biorad oder selbst hergestellte Bradford-Lösung verwendet. Diese Methode basiert auf der Reaktion von Coomassie brillant blue G-250 mit Proteinen zu einem blauen, anionischen Farbstoff und der daraus resultierenden Veränderung im Absorptionsmaximum. Dabei bleibt der Extinktionskoeffizient über einen großen Konzentrationsbereich konstant. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurde eine Eichkurve erstellt. 5-10 µl der zu quantifizierenden Proteinlösung wurden in 1 ml 1:5 verdünntes Bradford-Reagenz aufgenommen. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm im Spektralphotometer bestimmt und die Proteinkonzentration an der erstellten BSA-Eichkurve abgelesen.

**Bradford-Lösung:** 100 mg Coomassie-Blau R-250; 50 ml Ethanol; 100 ml 85%ige Phosphorsäure; mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 I auffüllen.

# 2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1979)

Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamidgelelektorphorese (SDS-PAGE): 1 x  $10^{6}$ -1 x  $10^{7}$  Zellen wurden für 5 min bei 250 x g zentrifugiert und in einer Konzentration von 1-4 x  $10^{4}$  Zellen/µl mit 3x SDS-Probenpuffer bzw. 1,5x SDS-PARP-Puffer versetzt. Letzterer Puffer wurde speziell dafür verwandt, die PARP quantitativ in Lösung zu bringen. Die Proben wurden für 8 min bei 100°C aufgekocht. Dadurch kommt es zu einer vollständigen Denaturierung der Proteine und durch die Bindung von SDS an die Proteine zu einer gleichmäßigen Ladungsverteilung. Die Proteine bewegen sich deshalb im elektrischen Feld weitgehend unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz.

Für die SDS-PAGE wurde ein Gelsystem von Pharmacia mit Gelen der Größe 88 x 100 x 0,75 mm benutzt. Es besteht aus einem Trenngel, welches mit einem Sammelgel überschichtet ist. Die Acrylamidkonzentration der Trenngele (375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS) betrug je nach Größe der aufzutrennenden Proteine 10-15%. Das Sammelgel hatte eine Acrylamidkonzentration von 2% (125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS). Im großporigen Sammelgel, dessen pH-Wert zwei Einheiten niedriger ist als der des Trenngels, kommt es zur Fokussierung der Proteine, die im höher prozentigen Trenngel nach ihrem Molekulargewicht in verschiedene Banden aufgetrennt werden.

Zur Polymerisierung wurden die Gele mit je 150 µl 10% (w/v) APS und 30 µl TEMED pro 45 ml Endvolumen versetzt. Das Acrylamid/Bisacrylamidverhältnis betrug 37,5:1. Die Proteine wurden für 60 - 90 min bei 25 mA pro Minigel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese erfolgte die Visualisierung der Proteine durch Coomassie-Blaubfärbung (2.4.3), Silberfärbung (2.4.4) oder Western-Blot-Analyse (2.4.5).

3x SDS-Probenpuffer:	65 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% (v/v) Glycerol; 2,3% (w/v) SDS;
	5% (v/v); 0,05% (w/v) Bromphenolblau; 7% (v/v) $\beta\text{-Mercapto-}$
	Ethanol (frisch zusetzen).
1,5x SDS-PARP-Puffer:	93,75 mM Tris/HCl, pH 6,8; 9 M Harnstoff; 15% (v/v) Glycerol;
	3% (w/v) SDS; 0,0045% (w/v) Bromphenolblau; 7,5% (v/v) $\beta\text{-}$
	Mercapto-Ethanol (frisch zusetzen).
SDS-PAGE-Laufpuffer:	25 mM Tris/HCl; 190 mM Glyzin; 1% (w/v) SDS.
4x SDS-Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,4% (w/v) SDS.
4x SDS-Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS.

#### 2.4.3 Coomassie-Blaufärbung (Blakesley und Boezi, 1977)

Nach Auftrennung im Gel (2.4.2) wurden die Proteine durch Coomassie-Blau angefärbt. Dazu wurden die Gele 10 min in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Nach Dekantieren der Färbelösung und kurzer Spülung in H<sub>2</sub>0 zur Entfernung von Coomassie-Resten, wurde nicht gebundener Farbstoff anschließend durch wiederholtes Schwenken in Coomassie-Entfärber (über Nacht) oder in Schnellentfärber (30-60 min) ausgewaschen. Alle Arbeitsschritte konnten durch Erhitzen der Lösungen in der Mikrowelle beschleunigt werden.

Die gefärbten SDS-Gele wurden über Nacht in H<sub>2</sub>O mit 5% (v/v) Glycerol und 5% (v/v) Ethanol gelegt und durch Trocknung in Azetatfolie oder auf Whatmannpapier konserviert.

Färbelösung:	0,5% (w/v) Coomassie-Blau R; 50% (v/v) Methanol; 10% (v/v)
	Essigsäure.
Entfärber:	5% (v/v) Methanol bzw. 10% (v/v) Ethanol; 7% (v/v) Essigsäure.
Schnellentfärber:	10% (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) Essigsäure.

### 2.4.4 Silberfärbung

Minigele wurden folgendermaßen gefärbt (Oakley *et al.*, 1980): Das Gel wurde zweimal je 30 min in 5% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure fixiert und anschließend für 30 min in einer 10% igen (v/v) Glutaraldehyd-Lösung inkubiert. Nach mehreren Waschschritten in H<sub>2</sub>O (20-30 min) wurde das Gel für 30 min in Lösung 1 inkubiert, danach kurz (2 x 30 s) mit H<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich mit Lösung 2 gefärbt. Die Reaktion wurde mit 5% Methanol, 7% Essigsäure gestoppt. Zur Silberfärbung können auch Gele verwendet werden, die bereits mit Coomassie-Blau gefärbt wurden.

- **Lösung 1:** 2,0 ml 1 N NaOH; 1,4 ml NH<sub>3</sub> (25%, w/v); 92,6 ml  $H_2O$ ; 4,0 ml AgNO<sub>3</sub>-Lösung (0,2 mg/ml), tropfenweise zugeben (frisch ansetzen).
- **Lösung 2:** 0,1 ml Formaldehyd; 50,0 mg Zitronensäure; 10,0 ml Methanol; 90,0 ml  $H_2O$  (frisch ansetzen).

## 2.4.5 Western-Blot und Antikörperdetektion von transferierten Proteinen

Nach der SDS-Gelelektrophorese (siehe 4.3.2.4.) erfolgte der Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Imobilon-P, Millipore) in einer Hoefer-Naßblotapparatur. Gegen Ende des Gellaufs wurden jeweils 4 auf Gelgröße zurechtgeschnittene Whatmann-Papiere in Transferpuffer äquilibriert. Die ebenfalls zurechgeschnittene PVDF-Membran wurde kurz (2 min) in Methanol aktiviert und nach zweimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Nach dem Gellauf wurde das Gel auf einen vorbereiteten Stapel aus 1 Pufferkissen, 2 Whatmann und der Membran gelegt. Darauf wurden wiederum 2 Whatmann und 1 Pufferkissen gelegt. Dieses "Sandwich" wurde mit der Membranseite zur Kathode in der Blotapparatur fixiert und der Transfer 60 min bei konstant 100 V unter Eis-Kühlung durchgeführt.

Mit der anschließenden Immundetektion wurden Proteine auf der PVDF-Membran mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht. Unspezifische Bindungsstellen wurden zunächst mit Blockierungslösung 30 min bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:10.000 (je nach verwendetem Antikörper) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockierungslösüng. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges, 10-minütiges Waschen in TBS-Tween-Puffer entfernt. Anschließend erfolgte für 30-45 min bei RT eine Inkubation mit einem peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper. Der Sekundär-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2.500 bis 1:10.000 in Blockierungslösung eingesetzt. Dieser Antikörper bindet an den Fc-Teil des ersten Antikörpers. Die gekoppelte Peroxidase ist in der Lage den Farbstoff Luminol zu spalten, so dass über eine Chemilumineszenz-Reaktion Photonen frei werden, die zur Schwärzung eines auf die Membran aufgelegten Röntgenfilms führen, und damit die Proteinbanden sichtbar werden lassen. Nachdem der Sekundär-Antikörper mit der Membran inkubiert und die Membran erneut gewaschen wurde (dreimal für je 10 min in TBS-Tween-Puffer), löste die Zugabe von jeweils 4 ml luminolhaltigem ECL-Entwicklungsreagenz A und B die Chemilumineszenz-Reaktion aus. Nach einer Minute wurden die Proteinbanden mit Hilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Die Expositionszeiten der Membranen auf Biomax-MR Röntgenfilmen lagen zwischen 5 s und 30 min. Konnte mit dieser Methode kein Signal erzielt werden, wurde der Blot nochmals mit der sensitivität-steigernden Super-Signal<sup>®</sup> ULTRA Chemilumineszenz-Lösung von Pierce mit einer Einwirkzeit von 5 min entwickelt. Die Antikörperverdünnungen richteten sich nach der jeweiligen Affinität des Antikörpers für das Antigen und wurden individuell bestimmt.

Transferpuffer:	192 mM Glyzin, 50 mM Tris-HCl.
10x TBS:	0,2 M Tris/HCl, pH 7,6; 1,37 M NaCl.
TBS-Tween:	10% (v/v) 10x TBS; 0,2% (v/v) Tween 20.
Blockierungslösung:	TBS-Tween, 5% (w/v) Magermilchpulver.
ECL-Lösung A:	2,5 mM Luminol; 0,4 mM p-Coumarinsäure; 100 mM Tris/HCl,
	рН 8,5.
ECL-Lösung B:	13 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 100 mM Tris/HCl, pH 8,5.

## 2.4.6. Proteinexpression und -Isolierung

# 2.4.6.1 Expression von hRad51 in BLR (DE3) pLysS-Bakterien (Benson *et al.*, 1994)

Zur Expression von hRad51 wurden kompetente Zellen des *E. coli* Stammes BLR (DE3) pLysS (Novagen) mit dem Plasmid pFB530 transformiert. Das Genom dieses Bakterienstammes kodiert nicht für ein eigenes RecA-Protein, der Bakterienstamm besitzt eine ins Genom integrierte  $\lambda$ -DNA (DE3) mit einer Sequenz für eine IPTG-induzierbare T7-RNA-Polymerase, das Transposon Tn10 mit einer Tetracyclin-Resistenz und das Plasmid pLysS, welches für Lysozym kodiert und eine Chloramphenicol-Resistenz trägt.

Zur Transformation wurde zu 20 µl einer Suspension kompetenter Bakterien (Novagen) 1 µl des Plasmides gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte 40 s bei 42°C im Wasserbad und anschließender Abkühlung für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 80 µl SOC-Medium (Novagen) wurde der Ansatz 1 h bei 37°C geschüttelt. Dieser Transformationsansatz wurde in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (25-34 µg/ml) und Tetracyclin (12,5 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Diese Übernachtkultur wurde auf 4 I LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (25-34 µg/ml) und Tetracyclin (12,5 µg/ml) überimpft (je 1/20 der Kultur) und bis zu einer OD<sub>650 nm</sub> von 0,45 wachsen gelassen. Bei dieser OD wurde die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert und weitere 4 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Zur Kontrolle der Expression wurde vor IPTG-Induktion und 4 h nach der Induktion jeweils 1 ml der Bakteriensuspension abgenommen, die Bakterien abzentrifugiert (2700 x g, 10 min) und in je 100 µl 3x SDS-Probenpuffer aufgekocht. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (2700 x g, 10 min, 4°C) geerntet und in 100 ml Lysispuffer resuspendiert. Die Bakterien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3x SDS-Probenpuffer:	65 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% (v/v) Glycerol; 2,3% (w/v) SDS; 5%
	(v/v) $\beta$ -Mercapto-Ethanol (frisch zusetzen); 0,05% (w/v)
	Bromphenolblau.
Lysispuffer:	0,1 M Tris/HCl pH 8,0; 2 mM EDTA; 5% (v/v) Glycerol.

# 2.4.6.2 Aufreinigung des hRad51-Proteins (Benson *et al.*, 1994)

Die Bakterienzellen wurden durch dreimaliges Einfrieren und Wieder-Auftauen lysiert. Nach erstmaligem Auftauen wurden 0,1% (v/v) Triton, 1 mM DTT und Proteaseinhibitoren (5 µg/ml Pepstatin A, 125 µg/ml Pefabloc, 5 µg/ml Trasylol, 5 µg/ml Leupeptin) hinzugegeben. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Zur vollständigen Lyse wurde die Suspension fünfmal für 30 s mit 50 Watt Ultraschall behandelt. Unlösliches Material wurde durch Ultrazentrifugation entfernt (Beckman Rotor 50Ti, 45000 rpm, 1 h, 4°C). Der Überstand mit dem löslichen hRad51 wurde anschließend zweimal für je 2 h gegen 2 I R-Puffer mit Proteaseinhibitoren dialysiert. Um eventuell ausgefallenes Material zu entfernen, wurde das Dialysat abzentrifugiert (10 min, 12000 x g, 4°C). Das Dialysat wurde auf eine 60 ml DEAE-Biogel A-Säule (Biorad), die zuvor in R-Puffer äguilibriert worden war, geladen. Die Flußrate betrug 43 ml/h. Nach Waschen der Säule mit 600 ml R-Puffer, einschließlich Proteaseinhibitoren, wurde das hRad51-Protein mit Hilfe eines linearen Salzgradienten, der von 0,05 M bis 0,6 M KCI reichte, in 6 ml Fraktionen eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden über SDS-PAGE analysiert und die 37 kDa-hRAD51-Banden enthaltenden Fraktionen vereinigt. Das hRad51-Protein eluierte bei einer Salzkonzentration von 0,2-0,3 M KCI. Die vereinigten Fraktionen der DEAE-Säule (DEAE-*Pool*) wurden gegen je 1.5 l P-Puffer zweimal für je 2 h dialysiert, eventuell ausgefallenes Material durch Zentrifugation entfernt und auf eine 15 ml Hydroxyapatit (HA)-Säule (Biorad), die zuvor mit P-Puffer äquilibriert worden war, geladen. Die Flußrate betrug 7 ml/h. Nach Waschen der Säule mit ca. 100 ml P-Puffer erfolgte die Elution mit einem linearen 150 ml-Gradienten von 0,1 M bis 0,8 M Kalium-Phosphat wobei Fraktionen mit einem Volumen von 2 ml aufgefangen wurden. Die Fraktionen, die hRAD51 enthielten, wurden per SDS-PAGE identifiziert (Elution maximal bei 0,4 M K-Phosphat). War die hRad51-Präparation noch mit Nukleasen kontaminiert (siehe Exonuklease-Assay in Kapitel 2.4.7.2), wurde sie einer dritten Säulenchromatographie unterzogen. Hierzu wurden die vereinigten HA-Fraktionen auf eine 3,75 ml Blue-Agarose-Säule (Sigma), die zuvor mit R-Puffer plus 0,1 M KCl äquilibriert worden war, geladen. Die Säule wurde mit 30 ml R-Puffer (+ 0,1 M KCl) gewaschen und mit einem linearen 37,5 ml Gradienten von 0,1 M bis 1 M KCI in R-Puffer eluiert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert und die

entsprechenden Fraktionen, die bei einer Salzkonzentration zwischen 0,5 M bis 0,8 M KCl eluierten, vereinigt. Das aufgereinigte Protein wurde zur Lagerung zweimal gegen je 250 ml Lagerungspuffer für 2 h dialysiert und bei -70°C eingefroren.

In Abb. 8 ist der über die Reinigungsschritte zunehmende Reinheitsgrad von hRad51 im SDS-PAGE nach Coomassie- bzw. Silberfärbung veranschaulicht: die bakterielle Expression des hRad51, die vereinigten Fraktionen der DEAE-Säule (DEAE-*Pool*), welche auf die HA-Säule geladen wurden und die HA-Fraktionen mit dem aufgereinigten hRad51. Die anschließende Durchführung einer dritten Säulenchromatographie war meist überflüssig.



**Abb. 8:** Reinigung von hRad51, analysiert in der SDS-PAGE nach anschließender Coomassie- (a) bzw. Silberfärbung (b). "IPTG" und "+IPTG" steht für Totalhomogenat der Bakterien vor (Spur 2) und nach (Spur 3) hRad51-Expression durch Induktion mittels IPTG; es wurden jeweils gleiche Mengen geladen (je 6 μl). "DEAE-*Pool*" steht für die vereinigten eluierten Fraktionen nach DEAE-Säulenchromatographie (Spur 4, 20 μl), wohingegen die verschiedenen Ziffern für die Einzelfraktionen nach HA- Säulenchromatographie stehen und das aufgereinigte hRad51 (37 kDa) enthalten (Spuren 5-9, je 20 μl). Das aufgereinigte hRad51-Protein war hier erst deutlich im Silbergel erkennbar (b), wohingegen die Sensitivität der Coomassie-Färbung in diesem Fall nicht ausreichend war (a). In den Fraktionen des aufgereinigten hRad51 tauchte nach Silberfärbung in jeder Präparation eine ca. 70 kDa große kontaminierende Proteinbande auf, bei der es sich höchstwahrscheinlich um Keratin (67 kDa) der Haut handelt, welches aber keinen Störfaktor bei den Versuchen darstellt.

#### Proteaseinhibitoren/ Stocklösungen:

Aprotinin 1000x: 5 mg/ml in PBS bzw. käufliches Trasylol (Bayer) 100x.Leupeptin 1000x: 5 mg/ml in 50% Glyzerol.

Pefabloc 200x: 25 mg/ml in 50% Glyzerol.

**Pepstatin A 200x:** 1 mg/ml in Ethanol.

(Proteaseinhibitoren wurden vor Gebrauch dem Puffer frisch zugesetzt.)

- **R-Puffer:** 20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 10% (v/v) Glycerol; 0,5 mM DTT (frisch zusetzen); 0,05 M KCl.
- P-Puffer: 0,1 M Kalium-Phosphat, pH 6,8; 10% (v/v) Glycerol; 0,5 mM DTT (frisch zusetzen).
- Lagerungspuffer: 20 mM Tris-Acetat pH 8,0; 100 mM KOAc; 10% (v/v) Glycerol; 0,5 mM DTT (frisch zusetzen).

# 2.4.6.3 Erzeugung von rekombinanten Baculoviren zur Expression von p53(273H) und Wtp53 jeweis in Fusion mit 6x Histidin-Peptid

### 2.4.6.3.1 Transformation von Sf9-Insektenzellen (Felgner, 1991)

Zur Herstellung der rekombinanten Wtp53- und p53(273H)-Baculoviren, jeweils in Fusion mit 6x Histidin-Peptid, wurden 3 x 10<sup>6</sup> log-Phase Sf9-Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen in 2 ml serumfreies TC-100-Insektenzellmedium ausgesät. Während der ca. 15 min dauernden Anhaftungsphase wurden 5 – 10 µg des entsprechenden Baculotransfer-Vektors, 1 µg Baculo-Gold-Virus-DNA (Pharmingen), 20 µl DOTAP-Liposomentransfektionslösung (Boehringer) und 1 ml serumfreies TC-100-Insektenmedium in einem konischen 15 ml-Falcon-Reaktionsgefäß durch vortexen gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsmix tropfenweise gleichmäßig über die Zellschicht verteilt. Die Kulturflaschen wurden langsam für 4 h bei RT auf einem Horizontalschüttler und unter Lichtausschluß (Alufolie) bewegt. Nach anschließender Zugabe von 5 ml TC-100-Komplettmedium wurden die Flaschen bei 27°C inkubiert und täglich auf Infektionszeichen untersucht. Nach ca. 5 Tagen wurde der Kulturüberstand bei 4.000 x g zentrifugiert und zur weiteren Amplifikation verwendet. Für die erste Amplifikation wurden wiederum 3 x 10<sup>6</sup> Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesät. Nach dem Anhaften der Zellen wurde das Medium abgenommen und 250 µl des Transfektionsüberstandes in 2 ml TC-100-Komplettmedium hinzugegeben. Nach 1 h Inkubation bei 27°C wurde das Mediumvolumen pro Ansatz ad 10 ml aufgefüllt und anschließend für ca. 5 Tage unter visueller Transfektionskontrolle gehalten. Der Virusüberstand wurde dann wie oben beschrieben geerntet.

Die beiden verwendeten Baculotransfer-Vektoren wurden von Frau E. Bendrat hergestellt.

#### 2.4.6.3.2 Produktion von Hochtiter-Baculovirusstocks

Zur Amplifikation von Hochtiter-Virusstocks wurden log-Phase Sf9-Zellen mit einer Dichte von 2 x 10<sup>6</sup>/ml in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach Anhaftung der Zellen (ca. 15 min) wurden die Zellen mit 250 µl bis 2 ml des entsprechenden Baculo-Hochtiter-Virusstocks bzw. des 1. Amplifikats (2.4.6.3.1) infiziert und 1 h bei 27°C inkubiert. Nach anschließendem Mediumwechsel wurden die Zellen bei 27°C inkubiert, bis die massive Virusfreisetzung durch Lyse von 80-90% der Zellen beobachtet werden konnte (3 - 5 Tage). Der Virusüberstand wurde anschließend durch Zentrifugation bei 4.000 x g geklärt und unter Lichtausschluß bei 4°C gelagert.

## 2.4.6.4 Expression von rekombinantem Baculovirus zur Proteinexpression in Insektenzellen

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden log-Phase High-Five-Zellen in dreistöckigen Zellkulturflaschen (Nunc) ausgesät und expandiert. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen mit 2-3 ml des entsprechenden Baculovirusstocks infiziert und 40-70 h inkubiert. Die Ernte erfolgte durch leichtes Abschlagen der Zellen und anschließender Zentrifugation bei 150 x g. Das Zellpellet wurde 2x mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und direkt verarbeitet oder bei –80°C gelagert.



**Abb. 9:** Testexpression von humanen p53-Varianten im Baculosystem. Es wurden jeweils die geernteten High-Five-Gesamtzellhomogenate nach Expression von Wtp53, p53(273H) (mit Histidin-Schwanz) bzw. der Mutante p53(1262) in SDS-Probenpuffer aufgekocht und in der SDS-PAGE aufgetrennt (s. Kapitel 2.4.2). Nach Proteintransfer erfolgte die Immunodetektion (s. Kapitel 2.4.5) mit dem p53-spezifischen Antikörper PAb421. Die Bande von p53(237H) (Spur 2, 60 kDa apparent) liegt im Vergleich zu Wtp53 (Spur 1, 53 kDa) und p53(1262) (Spur 3, 53 kDa) etwas höher (oberer Pfeil), da hier ein Histidin-Schwanz anfusioniert wurde und zusätzlich eine besonders starke Proteinexpression vorlag.

#### 2.4.6.5. Herstellung einer Immunaffinitätsmatrix speziell für p53

#### 2.4.6.5.1 Reinigung monoklonaler PAb421-Antikörper aus Aszitesflüssigkeit

Um reinen PAb421-Antikörper zu erhalten, wurde zu 1 ml Aszitesflüssigkeit (ca. 4 mg PAb421) 0,1 ml Antikörper-Bindungspuffer zugesetzt und Präzipitate anschließend entfernt, indem 5 min bei 20.000 x g in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit Antikörper-Bindungspuffer auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt und anschließend zusammen mit 1 ml vorbereiteter Protein-G-Sepharose-Suspension (Amersham Bioscience) (2 mg Trockengewicht, Bindungskapazität von 18 mg humanem IgG), welche bereits mit Antikörper-Bindungspuffer äguilibriert wurde, für 2 h bei 4°C über Kopf gerollt. Anschließend wurde die Suspension in eine Einmalsäule (Biorad) gefüllt und nach Absetzen der Gelmatrix mit 20 ml Antikörper-Bindungspuffer gewaschen. Die Elution des Antikörpers mit Elutionspuffer erfolgte in Fraktionen mit einem Volumen von 500 µl, wobei die Fraktionen sofort mit 2 M Tris-Base neutralisiert wurden. Die Fraktionen wurden durch Gelelektrophorese in einem 12% igem SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert, diejenigen mit den höchsten Proteinmengen vereinigt und über Nacht gegen Kopplungspuffer dialysiert. Die Proteinkonzentrationen nach der Dialyse wurden am Photometer bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Eine OD<sub>280</sub> von 1,44 entspricht ungefähr einer IgG Menge von 1 mg/ml.

Antikörper-Bindungspuffer:	100 mM Na-Glyzinat pH 9,0; 3 M NaCl
Elutionspuffer:	0,1 M Kalium-Citrat pH 3,0.
Kopplungspuffer:	0,1 M NaHCO₃ pH 8,3; 0,5 M NaCl.

## 2.4.6.5.2 Kopplung des gereinigten Antikörpers an bromcyan-aktivierte Sepharose (Schneider *et al.*, 1982)

Zur Kopplung des gereinigten Antikörpers PAb421 wurden 0,7 g BrCN-aktivierte Sepharose 4B-CL (Pharmacia) in 10 ml 1 mM HCl pH 3,0 aufgelöst und 15 min bei Raumtemperatur gequollen. Die Matrix wurde in eine Säulenfritte gefüllt und zuerst mit 250 ml 1 mM HCl und 100 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit Kopplungspuffer äquilibriert. Die Gelmatrix wurde dann über Nacht bei 4°C mit ca. 1 mg PAb421 inkubiert. Nach Absetzen der Gelmatrix wurde die vollständige Bindung des Antikörpers an die Gelmatrix überprüft, indem die Proteinmenge im Überstand photometrisch bestimmt wurde. Die Bindung kann als vollständig angesehen werden, wenn die OD<sub>280</sub> gegen Luft nicht mehr als 0,05 beträgt.

Nach Abschluß der Bindungsreaktion wurde die mit dem Antikörper verbundene Matrix auf einer Fritte mit 50 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 gewaschen und mit Lagerungspuffer äquilibriert. Die Antikörpermatrix wurde zum Schutz vor Kontaminationen bei längerer Lagerung mit 0,05% (w/v) NaN<sub>3</sub> versetzt und bei 4°C gelagert.

Kopplungspuffer:0,1 M NaHCO3 pH 8,3; 0,5 M NaCl.Lagerungspuffer:30 mM KPi pH 7,8; 1 mM EDTA.

#### 2.4.6.6 Immunaffinitätsreinigung von humanem p53

Zur Aufreinigung von baculoviral in High-Five-Insektenzellen überexprimiertem humanem p53, wurde eine Antikörpersäule mit dem Antikörper PAb421 hergestellt, welcher die Aminosäuren 372-382 im C-terminalem Bereich von p53 bindet.

Das Zellpellet von 3x10<sup>8</sup> High-Five-Zellen (nach entsprechender Baculovirusinfektion) wurde in 10 ml Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren lysiert (1 h über Kopf bei 4°C gerollt), die Zelltrümmer in der Ultrazentrifuge (Rotor SW-41, 35.000 rpm, 35 min, 4°C) abzentrifugiert und das geklärte Lysat auf eine PAb421-Antikörper-Säule (1 ml) geladen. Anschließend wurde die Säule mit Puffer A gewaschen (10x Säulenvolumen) und im 2. Waschschritt mit Puffer B schon etwa 20% des gebundenen p53 eluiert. Im eigentlich Elutionsschritt mit dem Elutionspuffer (pH 9,0-Wechsel) erhält man dann zu >90% sauberes p53-Protein (Mummenbrauer *et al.*, 1996) (Abb. 10a). Allen Puffern wurden frisch Proteaseinhibitoren zugesetzt.

Zur besseren Haltbarkeit des aufgereinigten p53 Proteins wurde es sofort nach der Aufreinigung gegen Lagerungspuffer dialysiert, bei 4°C gelagert und ca. 1 Woche für biochemische Experimente verwendet. Die Proteinmengen wurden mittels Bradford-Bestimmung oder Abschätzung in Coomassie-gefärbten Gelen ermittelt.



**Abb.10:** Elutionsprofil von immunaffinitätsgereinigtem Wtp53. Die Elution erfolgte zunächst mit Hochsalzpuffer (1 M KCI) bei pH 7,8 (a) und anschließend durch Wechsel auf pH 9,0 (b). Die verschiedenen Ziffern stehen für die Einzelfraktionen nach Elution der PAb421-Antikörper-Säule mit den beiden Puffern vor (a) und nach (b) pH-Wechsel. Der schwarze Pfeil verweist auf die Laufhöhe der p53-Bande (50 kDa apparent).

Proteaseinhibitoren/ Stocklösungen:

**Aprotinin 1000x:** 5 mg/ml in PBS bzw. käufliches Trasylol (Bayer) 100x.

Leupeptin 1000x: 5 mg/ml in 50% (v/v) Glycerol.

Pefabloc 200x: 25 mg/ml in 50% (v/v) Glycerol.

**Pepstatin A 200x:** 1 mg/ml in Ethanol.

(Proteaseinhibitoren wurden vor Gebrauch dem Puffer frisch zugesetzt.)

- Lysispuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,5% (w/v) Lubrol oder 0,1 % (v/v) Triton; 5 mM EDTA; 1 mM DTT (frisch zugeben).
- Puffer A:30 mM K-Phosphat pH 7,8; 0,1 M KCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT<br/>(frisch zugeben).
- Puffer B: 30 mM K-Phosphat pH 7,8, 1 M KCl 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT (frisch zugeben).
- Elutionspuffer: 30 mM K-Phosphat pH 9,0; 1 M KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1% (w/v) Lubrol; 10% (v/v) Glycerol; 1 mM DTT (frisch zugeben).
- Lagerungspuffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM KCl; 10% (v/v) Glycerol; 1 mM DTT (frisch zugeben).

## 2.4.6.7 TALON<sup>®</sup>-Metallaffinitätschromatographie zur Aufreinigung von humanen p53-Fragmenten in Fusion mit 6x-Histidin-Peptid (Kasher *et al.*, 1993)

Die humanen p53-Fragmente mit Polyhistidin-Schwanz wurden in mit Baculoviren infizierten Insektenzellen exprimiert.

Durch die hohe Affinität der Imidazol-Ringsysteme von Histidin-Resten zu Metallionen können solche Proteine über eine TALON-Metallaffinitätssäule aufgereinigt werden. Hierzu wurden vorbereitend 2 ml des aufgeschwemmten TALON-Metallaffinitätschromatographie-Materials (Clontech) mit zweimal 10 ml Waschpuffer I gewaschen.

Allen nachfolgend verwendeten Puffern wurden Proteaseinhibitoren frisch zugegeben. Das Pellet von 4 x 10<sup>8</sup> Insektenzellen wurde mit 30 ml Lysispuffer versetzt und 1 h über Kopf bei 4°C gerollt. Die Zellen wurden dreimal für 10 s mit Ultraschall lysiert und die Zelltrümmer in der Ultrazentrifuge (Rotor SW-41, 35.000 rpm, 35 min, 4°C) abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit dem TALON-Säulenmaterial gemischt und 1 h rollend bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Material zweimal mit je 25 ml Waschpuffer I gewaschen und mit Waschpuffer II in eine Glassäulenfritte gefüllt. Nach Waschen mit ca. 50 ml Waschpuffer II erfolgte die Elution mit Elutionspuffer, wobei acht 1 ml Fraktionen aufgefangen wurden. Die aufgefangenen Fraktionen wurden auf eine

Endkonzentration von 5 mM DTT eingestellt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach Bradford und über die Analyse der Bandenintensität im Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 10). Das resultierende p53-Protein war zu >90% rein und exonukleaseaktiv (Mummenbrauer *et al.*, 1996).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 Fraktionen 130 − 64 − 53 − 37 − 33 − 33 −

**Abb.11:** Elutionsprofil von TALON-säulen-aufgereinigtem Wtp53 mit 6x-Histidin-Schwanz in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Proteine der Fraktionen 1-8 wurden in den Spuren 2-9 geladen. Der schwarze Pfeil verweist auf die Laufhöhe der p53-Bande mit 6x-Histidin-Schwanz (60 kDa apparent).

#### Proteaseinhibitoren/ Stocklösungen:

**Aprotinin 1000x:** 5 mg/ml in PBS bzw. käufliches Trasylol (Bayer) 100x.

Leupeptin 1000x: 5 mg/ml in 50% (v/v) Glycerol.

Pefabloc 200x: 25 mg/ml in 50% (v/v) Glycerol.

Pepstatin A 200x: 1 mg/ml in Ethanol.

(Proteaseinhibitoren wurden vor Gebrauch dem Puffer frisch zugesetzt.)

Lysispuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,5% (w/v) Lubrol oder 0,1 %	
	(v/v) Triton; 1 mM $\beta$ -Mercapto-Ethanol (frisch zusetzen); 2 mM	
	$Na_2S_2O_5$ (frisch zusetzen).	
Waschpuffer I:	20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM KCl; 1 mM $\beta\text{-Mercapto-Ethanol}$	
	(frisch zusetzen).	
Waschpuffer II:	20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM KCl; 1 mM $\beta\text{-Mercapto-Ethanol}$	
	(frisch zusetzen); 10 mM Imidazol (frisch zusetzen).	
Elutionspuffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM KCl; 1 mM $\beta$ -Mercapto-Ethanol (frisch	

zusetzen); 300 mM Imidazol (frisch zusetzen).

#### 2.4.7 Methoden für DNA-Protein-Interaktionsstudien

## 2.4.7.1 Gelretardations-Analyse (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA) (Fried und Crothers, 1981; Garner und Revzin, 1981; Sawadogo et al., 1988)

Diese Methode (schematisch dargestellt in Abb. 12) beruht auf der Tatsache, dass DNA-Substrate sich im elektrischen Feld schneller bewegen als der größere Komplex aus gebundenem Protein und DNA. Da die eingesetzte DNA radioaktiv markiert war, kann die Veränderung in der Mobilität der DNA nach erfolgter Proteinbindung mit Hilfe einer Autoradiographie detektiert werden.

Die Standard-Reaktionsansätze für die EMSAs mit einem Gesamtvolumen von 20 ul setzten sich aus 50 pM<sup>32</sup>P-markiertem 3-Strang-Substrat (10.000 cpm pro Ansatz, 10 nm definiert in Nukleotiden) und Protein in 1x DNA-Binde-Puffer zusammen. Wie an entsprechender Stelle vermerkt, wurden diese Standardbedingungen teilweise durch Zugabe von 3 mM ATP und 5 mM MgCb modifiziert, wobei dann auch EDTA-frei gearbeitet wurde. Die Proteine hRad51 (66 - 530 nM), Wtp53 (1 - 5 nM), p53(273H) (1 - 30 nM) und p53(1262) (alle humaner Herkunft), SSB (66 nM) von *E. coli* und BSA (150 nM) wurden entsprechend der zugehörigen Beschreibung zugegeben. In Kontrollen ohne das entsprechende Protein wurde dieses durch ein äquivalentes Volumen mit korrespondierendem Puffer substituiert. Nach Zugabe der markierten DNA wurden die Reaktionsgemische für 30 min auf Eis oder bei RT inkubiert, um ein vollständiges Bindungsgleichgewicht zwischen DNA-Substrat und Protein einzustellen. Nach Zugabe von 5x DNA-Ladepuffer wurde eine Gelelektrophorese in einem 4%igen nativen, kontinuierlichen Polyacrylamidgel (1:19 Bisacrylamid) in 1x RegG-Lauf-Puffer bei RT und einer Spannung von 160 V durchgeführt. Danach wurde das Gel auf Whatman-Papier unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Die Exposition erfolgte auf X-Omat-Filmen (Autoradiographie) oder alternativ mit einem Phospholmager-Screen, der mit der dazugehörigen Software direkt eingelesen werden konnte (s. 2.4.7.2). Für die Experimente zur Analyse der Bildung tertiärer Protein-Protein-DNA-Komplexe, wurden hRad51 und p53 mit der 3-Strang-DNA koinkubiert (30 min). Alternativ dazu wurde ein Präinkubationsschritt zur Ermöglichung der Protein-DNA-Komplexbildung lediglich eines der Proteine mit der DNA für 30 min auf Eis zwischengeschaltet, und anschließend erst die zweiten Protein-Komponente zugegeben und die Inkubation fortgesetzt (30 min).



## EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

**Abb 12:** Schematische Darstellung des Prinzips des *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA). Der Reaktionsansatz wurde für die kontinuierliche und native Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt und die unterschiedlichen Molekülkomplexe nach Ladung und Größe aufgetrennt. DNA-Substrate bewegten sich im elektrischen Feld schneller als größere Komplexe aus Protein und DNA. Da die DNA zuvor radioaktiv markiert worden war, konnten die DNA haltigen Molekülkomplexe und deren Mobilität mit Hilfe einer Autoradiographie detektiert werden. Abb. nach Janz (Janz, 1999).

10x DNA-Bindepuffer:	250 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 60% (v/v)
	Glycerol;10 mM DTT (frisch zusetzen).
10x RegG-Laufpuffer:	67 mM Tris/HCl, pH 8,0; 33 mM Natrium-Acetat; 20
	mM EDTA.
5x DNA-Ladepuffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 % (v/v) Glycerol; 0,1 M
	EDTA; 1 % (w/v) Bromphenolblau (oder
	Xylencyanol).
4%iges Polyacrylamidgel (40 ml):	4 ml 10x RegG-Laufpuffer; 4 ml 40% (w/v)
	Polyacrylamid (1:19 Bisacrylamid); 32 ml ddH2O;
	entgasen und 150 µl 10% (w/v) APS; 30 µl TEMED
	zugeben und Gel gießen.

#### 2.4.7.2 Exonuklease-Assay (Mummenbrauer et al., 1996)

Die Exonuklease-Assays entsprechen in der Durchführung im wesentlichen der in Kapitel 2.4.7.1 beschriebenen für die Gelretardations-Analysen, nur wurden die Reaktionen in Gegenwart von 3 mM ATP und 5 mM MgCl<sub>2</sub>, sowie 1x DNA-Bindepuffer ohne EDTA durchgeführt. Für die quantitative Analyse der Exonukleaseaktivität wurden den Reaktionsansätzen 50 pM <sup>32</sup>P-markiertes 3-Strang-Substrat (10.000 cpm pro Ansatz, 10 nm definiert in Nukleotiden) und 1-2 nM Wtp53 oder p53(273H) für 30-60 min bei RT zugefügt, da unter diesen Bedingungen die Substratentfernung <60% betrug. Zu den Reaktionsprodukten wurde nach Ablauf der Inkubationszeit sofort Proteinase K zugegeben
(8x Stoplösung), und die DNA durch diesen abschließenden 10 minütigen Inkubationsschritt bei 37°C von anhaftenden Proteinen befreit. Nach Zugabe von 5x DNA-Ladepuffer erfolgte die Auftrennung auf einem 4%igen nativen Polyacrylamidgel wie im vorangegangenen Kapitel 2.4.7.2 beschrieben. Das exonukleolytisch abgebaute 3-Strang-Substrat wandert aufgrund seiner verringerten Größe schneller im Gel. Die Detektion der Banden erfolgte mittels Autoradiographie, zum einen auf X-Omat-Filmen und zum anderen mittels Phospholmagerscreen, so dass eine quantitative Auswertung am Phospholmager mit der Software TINA 2,0 erfolgen konnte.

10x DNA-Bindepuffer:	250 mM Tris/HCl, pH 8,0; 60% (v/v) Glycerol; 10 mM			
	DTT (frisch zusetzen).			
8x Stoplösung:	200 mM EDTA, pH 8,0; 2% (w/v) SDS; 5 mg/ml			
	Proteinase K.			
5x DNA-Ladepuffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 % (v/v) Glycerol; 0,1 M			
	EDTA; 1 % (w/v) Bromphenolblau (oder			
	Xylencyanol).			
10x RegG-Laufpuffer:	67 mM Tris/HCl, pH 8,0; 33 mM Natrium-Acetat; 20			
	mM EDTA.			
4%iges Polyacrylamidgel (40 ml):	4 ml 10x RegG-Laufpuffer; 4 ml 40% (w/v)			
	Polyacrylamid (1:19 Bisacrylamid); 32 ml ddH2O;			
	entgasen und 150 µl 10% (w/v) APS; 30 µl TEMED			
	zugeben und Gel gießen.			

## 2.4.7.3 Strangtransfer-Assay

Die Strangtransfer-Assays wurden entweder mit markierter Doppelstrang-DNA (ds-DNA) und nicht-markierter Einzelstrang-DNA (ssDNA, Oligonukleotid 1) (Standardverhältnisse, s. Abb. 13) oder umgekehrten Markierungsverhältnissen durchgeführt (nicht-markierter Doppelstrang und markierter Einzelstrang). Der Doppelstrang bestand aus hybridisiertem Oligunukleotid 1 und dem komplementären Oligonukleotid 2. Der Strangtransfer wurde dann anhand der Freisetzung des radioaktiv markierten Oligonukleotids aus der Duplex-DNA (dazu siehe Abb.6. Kapitel) oder anhand des Auftauchens einer (radioaktiv-markierten) Duplex-DNA-Bande bei gleichzeitiger Abnahme der ssDNA-Bande nachgewiesen und quantifiziert.

Für die Studien zum Strangaustausch wurden 20 nM hRad51 für 10 min bei 37°C mit radioaktiv markiertem oder nicht-markierten Oligonukleotid 1 in einem Gesamtvolumen

von 20 µl in 1x Strangtransferpuffer zusammen mit 15 mM MgCl2, 3 mM ATP, 80 nM BSA und 1 - 30 nM p53 oder einem äquivalenten Volumen an p53-Lagerungspuffer vorinkubiert. Das hRad51 wurde teilweise ausgetauscht gegen äquvalente Volumina hRad51-Lagerungspuffer (in den Negativkontrollen), gegen 250-1.000 nM RecA oder 250 nM SSB. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der radioaktiv markierten oder nicht-markierten Duplex-DNA gestartet und die Inkubation wurde bei 37°C für die jeweils beschriebenen Zeiten fortgesetzt. Es wurden 4 nM unmarkiertes Oligonukleotid 1 (270 nM definiert in Nukleotiden) und 0,4 nM <sup>32</sup>P-markierte homologe Duplex-DNA (50 nM definiert in Nukleotiden) eingesetzt, um die Freisetzung der markierten ssDNA beobachten zu können. Zudem wurden 0,4 nM <sup>32</sup>P-markiertes Oligonukleotid 1 (30 nM definiert in Nukleotiden) und 0,4 nM nicht-markierte homologe Duplex-DNA (50 nM definiert in Nukleotiden) für die Reaktion zur Bildung radioaktiv-markierter Duplex-DNA benutzt. In Kontrollreaktionen wurde die Zugabe des jeweils nicht-markierten zweiten DNA-Partners weggelassen. Die Reaktionen wurden durch Inkubation bei 37°C für 10 min nach Proteinase K-Zugabe (8x Stoplösung) beendet und die DNA deproteinisiert. Die Proben wurden mit 5x DNA-Ladepuffer versetzt und baldmöglichst elektrophoretisch auf einem nativen TBEgepufferten 12% igen Polyacrylamidgel bei 10 V/cm für 23 h bei RT zur Auftrennung Die Quantifizierung der Enzymraten und der korrespondierenden gebracht. Standardabweichungen für den Strangaustausch oder für den exonukleolytischen DNA-Substratabbau wurden durch Phospholmager-Analyse der getrockneten Gele mit der dazugehörigen Software TINA 2,0 vorgenommen.

10x Strangtransferpuffer:	225 mM Tris/HCl, pH 7,4; 2mM DTT (frisch		
	zusetzten).		
8x Stoplösung:	200 mM EDTA, pH 8,0; 2% (w/v) SDS; 5 mg/ml		
	Proteinase K.		
5x DNA-Ladepuffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 % (v/v) Glycerol; 0,1 M		
	EDTA; 1 % (w/v) Bromphenolblau (oder		
	Xylencyanol).		
10x TBE-Laufpuffer:	0,89 M Tris/HCl, pH 8,3; 0,89 M Borsäure; 2,5 mM		
	EDTA.		
12%iges Polyacrylamidgel (40 ml):	4 ml 10x TBE-Laufpuffer; 12 ml 40% (w/v)		
	Polyacrylamid (1:19 Bisacrylamid); 24 ml ddH2O;		
	entgasen und 150 μl 10% (w/v) APS; 30 μl TEMED		
	zugeben und Gel gießen.		

## 2.5 Virologische Methoden

## 2.5.1 Herstellung von Virenüberständen

Zur Amplifikation von Virusüberständen wurden subkonfluente TC7- bzw. COS1-Zellen mit einem Virusüberstand, der auf eine EOI (*Efficiency of Infection*) von 0,001 verdünnt war, infiziert. Bei dieser niedrig-titrigen Infektion wird nur jede 1000ste Zelle infiziert und so die Vermehrung von defizienten Viren verhindert. Während die mit VP1-Mutanten-SV40-DNA transfizierten Zellen bei der permissiven Temperatur von 32°C inkubiert wurden, wurden die mit wt-SV40-DNA transfizierten bei 37°C gehalten. Nach 3-4 Wochen waren die Zellen vollständig lysiert. Die verbliebenen Zellen wurden durch zweimaliges Frieren und Tauen aufgebrochen und die Viren durch 2-minütiges Sonifizieren vollständig freigesetzt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (1.000 x g, 6 min, 4°C) pelletiert. Der virushaltige Überstand wurde sterilfiltriert (0,2 µm-Filter), aliquotiert und bei -70°C gelagert.

## 2.5.2 Infektion von eukaryontischen Zellen

Die Virenüberstände (aus 2.5.1) wurden bei RT aufgetaut und 10 s sonifiziert, um Aggregate aufzulösen. COS-1- oder CV1-Zellen in Schalen wurden vom Erhaltungsmedium befreit und mit Virenüberständen in der gewünschten Verdünnung infiziert, indem diese inkubiert (39°C, 1,5 h) und dabei mindestens alle 15 Minuten geschwenkt wurden. Danach wurde die Virussuspension abgesaugt, einmal mit DMEM gewaschen und inkubiert.

# 2.5.3 Bestimmung der MOI (*Multiplicity Of Infection*)

Um die Effizienz der Infektion zu bestimmen, wurden 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen/6-Loch-Ø3,5 cm-Schale COS-1-Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Der zu testende Virusüberstand (aus 2.5.1) wurde in geeigneter Weise mit DMEM verdünnt. Die Zellen wurden jeweils mit 200 µl des Virenüberstandes infiziert (s. 2.5.2). Nach Inkubation (39°C, 48 h) wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen entnommen. Die adhärent auf den Deckgläschen wachsenden Zellen wurden zunächst in kaltem Methanol fixiert (20°C, 5 min) und dann in Aceton permeabilisiert (-20°C, 5 min). Durch die indirekte Immunfluoreszenz (2.5.4.1) war es nun möglich, den Anteil der T-Ag-positiven gegen die Gesamtzahl der Zellen auszuzählen. Die EOI gibt die Anzahl der infektiösen Viruspartikel im Verhältnis zur eingesetzten Zellzahl an.

## 2.5.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Mit SV40 infizierte Zellen exprimieren das T-Ag, welches in der indirekten Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden kann. Die fixierten und permeabilisierten Zellen auf Deckgläschen (s. 2.5.3) wurden zunächst getrocknet. Zuerst wurde die Zellen auf den Deckgläschen mit PAb108 inkubiert (30 min, 37°C). Vor, zwischen und nach den Antikörperinkubationen wurden die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Als zweites folgte eine Inkubation mit Ziege-Anti-Maus-Biotin, als drittes Streptavidin-Cy3-Konjugat. Streptavidin bindet mit hoher Affinität an Biotin. Da mehrere Streptavidin-Moleküle an ein Biotin-Molekül binden, wird eine deutliche Signalverstärkung erreicht. Abschließend wurde zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und die Zellen in einem Tropfen Mounting Medium eingebettet. Nach Aushärtung (ü.N., im Dunkeln) konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden (Anregungswellenlänge  $\lambda$ =550 nm). Es wurden jeweils mindestens drei Gesichtsfelder ausgezählt. Die angefärbten Zellen wurden dann gegen die Gesamtzellzahl dividiert, um die MOI zu erhalten.

## 2.5.5 Rekombinations-Assay (Wiesmüller et al., 1996)

Im Rekombinations-Assay werden die interchromosomalen Rekombinationsfrequenzen geeigneter Viruspaare in verschieden Zellen gemessen. Die eingesetzten Viren tragen unterschiedliche Mutationen im VP1-Gen, die jeweils zu einem temperatursensitiven Phänotyp führen. Viruspartikel können nur bei der permissiven Temperatur von 32°C gebildet werden. Unter restriktiven Bedingungen (39°C) können sich nur die durch Rekombination zweier Mutantenpartikel entstandenen Wildtyp-Viren vermehren. Die Zellen wurden 24 h vor der Infektion mit einer Dichte von 1,5-2 x 10<sup>5</sup>-Zellen pro Loch einer 6-Loch-3,5 cm-Platte in Erhaltungsmedium mit Zusatz von 1 µM Östradiol ausgesät. Es wurden jeweils Zweifachbestimmungen für die Wildtyp-Viren und Vierfachbestimmungen für die Doppelinfektionen mit den Mutanten-Viren durchgeführt. Die Virenüberstände wurden bei RT aufgetaut, 10 s sonifiziert und auf die zur Infektion eingesetzte MOI verdünnt. Für die Doppelinfektionen wurden Virusmischungen hergestellt. Die Zellen wurden infiziert (s. 2.6.3) und inkubiert (84 h, 39°C). Die Platten wurden bei -20°C eingefroren, aufgetaut und erneut eingefroren, wieder aufgetaut und der Überstand sterilfiltriert und bis zur Bestimmung der Virustiter im Plaque-Assay (2.5.6) in Reaktionsgefäßen bei 4°C aufbewahrt.

## 2.5.6 *Plaque*-Assay (Wiesmüller *et al.*, 1996)

Zur Ermittlung der Anzahl der freigesetzten Viruspartikel im Rekombinations-Assay wurde für jeden Überstand ein *Plaque*-Assay angesetzt. Dieser Virusnachweis beruht darauf, daß Wilttyp-SV40-Viren CV1-Zellen lysieren. Vom initialen Infektionsherd aus können aufgrund der Mobilitätseinschränkung durch den Softagar (s.u.) nur die Nachbarzellen infiziert werden. Es bildet sich im Zellrasen ein sogenannter *Plaque* aus lysierten Zellen, der nach Anfärbung (s.u.) als Loch in Erscheinung tritt.

24 h vor der Infektion wurden 3 x 10<sup>6</sup> Zellen/10 cm-Schale ausgesät, so dass am nächsten Tag ein dichter Zellrasen entstanden war. Die Infektion (s. 2.6.3) erfolgte mit je 400 µl Zellüberstand aus dem Rekombinations-*Assay* (2.6.6). Die Wildtyp-Virenüberstände wurden dabei in geeigneter Weise verdünnt (1:1.000-1:10.000), die Überstände aus Doppel- und Einzelinfektionsüberständen wurden unverdünnt eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Platten mit je 12 ml flüssigem Softagar (40°C) überschichtet und nach Festwerden des Softagars 20 Tage (Wildtyp-Viren) bzw. 24 Tage (Doppelinfektionen) bei 39°C inkubiert.

Zur Fixierung und Färbung wurden die Schalen mit Kristallviolettlösung überschichtet und nach mindestens 2 h wurde der Softagar abgeschlagen, die Platten mit H<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet.

Softagar:	1,4 % (w/v) Sea Plaque Agarose in DMEM; 2 % FCS;		
	1/200 Nystatin; 1/1.000 Refobacin.		
Kristallviolett-Stammlösung:	2% (w/v) Kristallviolett; 1 Teil Formaldehyd (37%); 2 Teile		
	Ethanol; 7 Teile H₂O.		
Kristallviolett-Färbelösung:	1 Teil Kristallviolett-Stammlösung; 1 Teil Formaldehyd		
	(37%); 8 Teile H₂O.		

# 3. Ergebnisse

# 3.1 Die Rolle von Heteroduplex-Strangkreuzungen in den funktionellen Wechselwirkungen von humanem Rad51 und Wildtyp-p53

# 3.1.1 Der Effekt von hRad51-vermitteltem Strangtransfer auf die p53assoziierte Exonukleaseaktivität

In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Wiesmüller konnte ein Zusammenhang hergestellt werden zwischen der Erkennung von Heterologien auf Rekombinationsintermediaten und der Inhibition von homologen Rekombinationsprozessen durch Wtp53 (Dudenhöffer et al., 1998;1999). In Anbetracht dessen, dass Rad51 die initiale Strangtransferase in Eukaryonten darstellt (Benson et al., 1994; Sung und Robberson, 1995; Gupta et al., 1997), wurde zunächst der Strangaustausch durch humanes Rad51 (hRad51) in An- oder Abwesenheit von humanem p53 studiert. Für diesen Zweck wurden beide Proteine chromatographisch aufgereinigt, nachdem hRad51 in E.coli und p53 in Insektenzellen überexprimiert worden war. Da p53 an frühe Rekombinationsintermediate bindet, wurde die Aufmerksamkeit auf die frühe Phase des DNA-Austausches gerichtet, indem als Substrate Oligonukleotide benutzt wurden, wie sie in einem entsprechenden Assay von Gupta et. al. (1997) beschrieben worden waren.

Die folgenden Strangtransfer-Assays wurden mit <sup>32</sup>P-markierter Doppelstrang-DNA (dsDNA) und nicht-markierter Einzelstrang-DNA (ssDNA) durchgeführt. Der Strangtransfer wurde anhand der Freisetzung des radioaktiv markierten Oligonukleotids aus der Duplex– DNA nachgewiesen und quantifiziert (s. Abb. 13). Um Effekte zu vermeiden, die lediglich mit einer Änderung der Proteinkonzentration zusammenhängen, wurde zu jedem Reaktionsansatz ein Überschuß an BSA zugegeben.





**Abb. 13:** Strangaustausch wurde imitiert, indem ein nicht markiertes einzelsträngiges Oligonukleotid und eine homologe, <sup>32</sup>P-markierte DNA-Duplex sowie hRad51 zum Reaktionsansatz hinzugefügt wurden. Unter Strangtransferbedingungen kommt es so zu einer Verdrängung des radioaktiv markierten Einzel-DNA-Stranges aus der Duplex. Einzel- und Doppelstrang können anschließend mittels nativer Gelelektrophorese aufgetrennt und danach autoradiographisch detektiert werden.

Für das gereinigte hRad51 wurde Strangtransferaktivität nachgewiesen (Abb. 14, Spuren 6-8), wohingegen dies für BSA nicht zu beobachten war (Abb. 14, Spuren 4 und 5). Während einer Inkubationsperiode von 1-2 h bei 37°C wurden 10-20% des <sup>32</sup>P-markierten Oligonukleotides 1 durch hRad51 aus der markierten dsDNA verdrängt (Abb. 14, Spuren 7 und 8). Die spontane Freisetzung war vernachlässigbar gering (Abb. 14, Spuren 4 und 5). Mit lediglich <sup>32</sup>P-markierter Duplex konnte keine Freisetzung des radioaktiven Oligonukleotides 1 durch hRad51 beobachtet werden (Abb. 14, Spur 2), wodurch eine kontaminierende Helikase ausgeschlossen werden kann. Nach Zugabe von Wildtyp-p53 (Wtp53) anstatt hRad51 fand eine 70%ige Degradation der markierten DNA innerhalb von 120 min statt (Abb. 14, Spuren 9-11). Dieser DNA-Abbau ist auf die Exonukleaseaktivität von Wtp53 in Anwesenheit von Mg<sup>2+</sup>-lonen zurückzuführen (Mummenbrauer *et. al.*, 1996). Äußerst überraschend war nun jedoch, dass strangtransferaktives hRad51 die Menge an nukleolytisch abgebauter DNA durch Wtp53 bis zu 90% erhöhte (Abb. 14, Spuren 12-14).



**Abb. 14:** Durch hRad51 vermittelter Strangtransfer in Anwesenheit von humanem Wtp53. Die Strangtransfer-Assays wurden bei 37°C durchgeführt, wie im Teil "Material und Methoden" (Kapitel 2.4.7.3) beschrieben. Die schwarzen Pfeile neben den schematischen Illustrationen markieren die Positionen der ssDNA und der homologen Duplex-DNA, wobei die radioaktive Markierung durch einen Stern gekennzeichnet wurde. Die Reaktionsansätze enthielten Duplex-DNA, bestehend aus 5'-<sup>32</sup>P-markiertem Oligonukleotid 1 und nicht-radioaktivem Oligonukleotid 2 (\*2s) und einzelsträngiges, nicht markiertes Oligonukleotid 1 (*1s*). In den Kontrollreaktionen fehlten die nicht markierten einzelsträngigen Oligos (Spur 1-3). Das Auftauchen markierter Einzelstrang-DNA ist auf die Verdrängung des markierten Oligos aus der Duplex-DNA während des Strangaustausches zurückzuführen. hRad51 wurde in einer Konzentration von 20 nM (Spuren 2, 6-8, 12-14) eingesetzt, immunaffinitätgereinigtes humanes Wtp53 mit 2 nM (Spuren 3, 9-14).

Dieser stimulatorische Effekt beschränkte sich nicht auf die Versuchsbedingungen wie in Abb. 14, unter denen das Duplex-Molekül radioaktiv markiert war. Dieselben Ergebnisse erhielt man auch, wenn in umgekehrter Anordnung radioaktiv markierte ssDNA

und nicht markierte dsDNA im Strangtransfer-Assay eingesetzt wurden (Abb. 15). Es konnte kein Substratabbau mit hRad51 alleine beobachtet werden (Abb. 15, Spur 1), was bedeutet, dass die Unterschiede nicht auf eine kontaminierende Nuklease zurückzuführen sind. Die von hRad51 abhängige Steigerung der initialen Phase der p53-vermittelten Substratdegradation (<30% des Total-DNA-Abbaus) wurde als dreifach (±1) aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten berechnet.



**Abb. 15:** Stimulation des Wtp53-assoziierten DNA-Abbaus durch strangtransferaktives hRad51, aber nicht durch SSB. Die Strangtransferreaktionen wurden hier mit 5<sup>-32</sup>P-markiertem Oligonukleotid 1 und nicht markierter homologer Duplex-DNA 30 min inkubiert. Die Proteinkonzentrationen waren konstant für hRad51 (20 nM; Spuren 1, 7-9) und für SSB (20 nM; Spuren 3, 10-12), und steigend für p53 (1, 3 und 30 nM; Spuren 4-6, 7-9, 10-12). Die sich akkumulierenden finalen Degradationsprodukte bestehend aus 3 Nukleotiden (3*nts*) sind durch einen Pfeil markiert (Mummenbrauer *et al.*, 1996; Jean *et al.*, 1997).

Um zu prüfen, ob die Generierung bestimmter Reaktionsintermediate durch hRad51 für die Verstärkung der Exonukleaseaktivität von p53 eine Rolle spielt, wurden unter Strangtransferbedingungen ausschließlich markierte ss oder dsDNA eingesetzt, so dass der jeweilige DNA-Austauschpartner fehlte. Mit steigender Wtp53-Menge, kam es hierbei zu einer dosisabhängigen DNA-Degradation. Unter diesen Bedingungen erhöhte aber die gleichzeitige Zugabe von hRad51 den DNA-Abbau nicht (siehe Abb. 16a, b).



**Abb. 16:** Strangtransferkontrollen ohne DNA-Austauschpartner. In Kontrollreaktionen wurde 5<sup>-32</sup>Pmarkiertes Oligonukleotid 1 ohne Duplex-DNA unter Strangtransferbedingungen inkubiert (a) bzw. Duplex-DNA ohne den einzelsträngigen Austauschpartner (b). Die Proteinkonzentrationen waren ähnlich wie in Abb. 15 (20 nM hRad51; 1, 3, 10 und 30 nM p53).

Um die Möglichkeit zu prüfen, dass generell Strangtransfer die mit Wtp53 assoziierte Exonukleaseaktivität stimuliert, wurde das humane Rad51 durch ein Strangtransfer-Enzym eines weiter entfernten Organismus ersetzt, nämlich durch RecA von *E. coli*. Wie in Abb. 17 ersichtlich, wird der nukleolytische Abbau von Strangaustauschsubstraten in geringerem Maße auch durch katalytisch aktives RecA (Abb. 17, Spuren 2-4) erhöht. Dieser Effekt konnte gleichermaßen beobachtet werden mit radioaktiv markiertem Einzelstrang- und nichtmarkiertem Doppelstrang-Substrat (nicht gezeigt). Um ausschließen zu können, dass hRad51 oder RecA stimulatorisch auf die exonukleolytische Degradation durch p53 lediglich aufgrund ihrer DNA-Bindungseigenschaften wirken, wurde der Einfluß des Einzelstrang-DNA-Bindeproteins (SSB) von *E. coli* untersucht. Für SSB, welches keinen Strangtransfer katalysiert, konnte keine Erhöhung des durch p53 vermittelten Substratabbaus festgestellt werden (Abb. 17). Stattdessen trat sogar eine bis zu vierfache Inhibition auf (Abb. 17, Spuren 10 und 11), welche wahrscheinlich auf eine Kompetition um die DNA zurückzuführen ist.



**Abb. 17:** Strangtransferreaktionen mit RecA und SSB. Die Ansätze wurden jeweils 60 min bei 37°C inkubiert. Entsprechend der Markierungen wurden Proteinkonzentrationen von 14 nM und 28 nM (Spuren 5-8, 10 und 11) für p53 eingesetzt; für RecA 250 nM (Spur 2), 500 nM (Spuren 3, 7 und 8) und 1000 nM (Spur 4); sowie 250 nM für SSB (Spuren 9-10).

# 3.1.2 Heteroduplex-Kreuzungsstrukturen repräsentieren bevorzugte Substrate der Nukleaseaktivität von Wildtyp-p53, nicht aber von Mutanten-p53

# 3.1.2.1 3-strängige Heteroduplex-Kreuzungsstrukturen mit und ohne A/G-*Mismatch* als Substrate der Nukleaseaktivität von Wtp53

Ausgehend von der Beobachtung, dass p53 nukleolytisch DNA abbaut, welche in DNA-Austauschprozesse involviert ist, wurde im folgenden untersucht, ob es sich bei dieser DNA um frühe Rekombinationsintermediate handelt. Zu diesem Zweck wurden künstliche dreisträngige Kreuzungsmoleküle (3sDNAs) hergestellt, welche die natürlich auftretenden Strangtransfer-DNA-Intermediate nachahmen, und untersucht, ob diese 3sDNAs Substrate der p53-assoziierten Exonuklease darstellen.

Durch frühere Bindungsstudien war bereits bekannt, dass zumindest murines p53 diese 3sDNA zu binden vermag (Dudenhöffer *et al.*, 1998). Der Vergleich der Degradationseffizienzen von ssDNA versus dsDNA in Anwesenheit von Wtp53 (Abb. 16) zeigte, dass ssDNA schneller abgebaut wird als dsDNA. Daher wurde die künstliche 3sDNA eingesetzt und deren Abbau mit dem der ssDNA (entspricht dem "Top"-Oligonukleotid aus der 3sDNA) in Anwesenheit von Wtp53 verglichen. Das Vollelänge-"Top"-Oligo wurde schneller degradiert, wenn es Bestandteil der 3sDNA-Kreuzungsstruktur war (siehe Initialsteigungen in Abb. 29 und 30). Dieser Befund wurde zeitgleich durch zwei weitere spezifische Nachweismethoden bestätigt: zum einen durch meinen Laborkollegen F. Janus mittels eines Kompetitions-Experimentes (Süße *et al.*, 2000) und zum anderen durch meine Laborkollegin C. Janz mit anschließendem Nachweis der Reaktionsprodukte im denaturierenden DNA-Sequenzgel (Süße *et al.*, 2000). Im erstgenannten Assay kompetetierte die 3sDNA 5fach besser als die ssDNA.

Der DNA-Abbau durch gereinigtes Wtp53 konnte noch gesteigert werden, indem 3sDNA mit perfekt paarenden Doppelsträngen durch eine 3sDNA mit einem A/G-*Mismatch* innerhalb der basenpaarenden Region des "Top"-Oligonukleotides substituiert wurde (Abb. 18). Quantitative Exonukleaseaktivitäts-Messungen durch PhosphorImager-Evaluierung nach nativer Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese der Vollelänge-Substrat-DNA bestätigte die schnellere Entfernung von A/G-*Mismatch* haltiger DNA durch Wtp53 (Abb. 19). Die Präferenz für das A/G-*Mismatch*-Exonuklease-Substrat steht in Übereinstimmung mit früheren Bindungsstudien, in denen Wtp53 murinen Ursprungs eingesetzt wurde (Dudenhöffer *et al.*, 1998), sowie mit den K<sub>D</sub>-Werten für humanes Wtp53 mit *Match*- (6x10<sup>-11</sup>±1) und A/G-*Mismatch*-Substrat (1x10<sup>-11</sup>±1). Demgegenüber konnte mit hRad51 in fünf voneinander unabhängigen Experimenten keine signifikante Erhöhung der Exonukleaseaktivität mit

vorgefertigten 3sDNA-Kreuzungsstrukturen beobachtet werden. Dies legte nahe, dass der exonuklease-stimulierende Effekt, ausgeübt von hRad51, während des Strangaustausches entweder durch die Generierung des bevorzugten Exonukleasesubstrates verursacht wurde oder/und durch dynamische Interaktionen zwischen hRad51 und p53 während des Strangaustauschprozesses. Vorgefertigte 3sDNA-Kreuzungsstrukturen stellen eingefrorene Intermediate des DNA-Austauschprozesses dar (Dudenhöffer *et al.*, 1998), welche keinen weiteren Strangaustausch durch die Rekombinase zulassen, so dass der Austauschprozeß hierbei keine Rolle spielen kann.



**Abb. 18:** Substratspezifität der mit p53 assoziierten Exonukleaseaktivität. <sup>32</sup>P-markierte 3-strängige *Match*- (schematisch dargestellt durch zwei parallele Linien; Spuren 1,3 und 5) und 3-strängige A/G-*Mismatch*-Strangkreuzungs-DNA-Substrate (schematisch dargestellt durch zwei parallele Linien mit Dreieck; Spuren 2, 4 und 6) wurden in Exonuklease-Assays mit immunaffinitätsgereinigtem Wtp53 (2 nM; Spuren 3-6) bei Raumtemperatur und Reaktionszeiten von jeweils 60 min eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte anschließend im nativen Polyacrylamidgel, dessen zugehörige Autoradiographie hier abgebildet ist. Die exonukleolytische Degradation war abhängig von der Zugabe von 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Spuren 5 und 6). Die Pfeile an den schematischen Illustrationen markieren die Positionen der 3sDNA-Substrate und der akkumulierenden finalen Abbauprodukte, welche aus drei Nukleotiden (*3nts*) bestehen (Mummenbrauer *et al.*, 1996).

Frühere Experimente zur mit p53 assoziierten Exonukleaseaktivität gegenüber ssDNA zeigten einen Defekt für die Mutante p53(273H) (Mummenbrauer *et al.*, 1996). In Übereinstimmung mit diesem Befund war es nicht möglich, exonukleolytische Degradation von 3sDNA für diese Mutante für Reaktionszeiten von bis zu 60 min zu messen, wenn *Match*-Substrat benutzt wurde und eine Proteinkonzentration von 1 nM, welche für Wtp53 ausreichte, um 30% der markierten DNA zu schneiden (s. Abb. 19). Wenn *Mismatch*-Substrat eingesetzt wurde oder höhere p53(273H)-Konzentrationen, konnte eine Rest-Exonukleaseaktivität von p53(273H) nachgewiesen werden, genauer eine 10fach reduzierte Aktivität im Vergleich zu Wtp53.

#### 3. Ergebnisse



**Abb. 19:** Exonukleaseaktivitäten von Wtp53 versus Mutanten p53(273H) an 3sDNAs mit und ohne *Mismatch*. Exonuklease-Assays mit markierter 3sDNA ohne (3s) und mit A/G-*Mismatch* (3s-AG) wurden mit Wtp53 (Wt) oder p53(273H)-Protein durchgeführt. PhosphorImager-Analysen wurde zur Quantifizierung der eingebrachten und residualen Mengen an Vollelänge-DNAs benutzt. Die Exonukleaseaktivität ist dargestellt als % degradierte DNA nach 30 und 60 min Inkubationsdauer. In die Auswertung gingen die Werte dreier unabhängiger Messungen ein, in denen p53-Protein pro Reaktionsansatz jeweils mit einer Konzentration von 1 nM eingesetzt wurde.

# 3.1.2.2 p53-Exonukleaseaktivität an Rekombinationsintermediaten mit strangkreuzungsregion-nahem und -fernen A/G-*Mismatch*

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass Wtp53 Rekombinationsintermediate effizient attackiert, speziell solche mit einem A/G-Mismatch und zwar durch schrittweise Nukleotidentfernung mit einer 3'->5'-Polarität ausgehend vom Heteroduplexterminus, also dem Ende des Doppelstranges innerhalb der 3sDNA mit Basenfehlpaarungen (Süße et al., 2000). Um die Determinanten der Wechselwirkung und den Aktionsradius von Wtp53 an den künstlich generierten 3sDNA-Strukturen weiter spezifizieren zu können, wurden nun in unserer Arbeitsgruppe "lange" Rekombinationsintermediate generiert (s. Abb. 20). Diese unterscheiden sich von den bisher verwendeten "kurzen" Rekombinationsintermediaten darin, dass die der Strankreuzungsstelle benachbarte Heteroduplex 54 Basenpaare (Bp) statt 27 Bp lang ist (s. Abb. 20). Durch diese Verlängerung erhöht sich die Distanz zum terminal kreierten A/G-Mismatch, so dass dieser 39 statt (bisher) 11 Bp von der Strangkreuzung entfernt zu liegen kam. Der flexible zentrale Strang kann sich über eine Entfernung von 15 Bp entweder mit dem "Top"- oder dem "Bottom"-Strang paaren. Zudem wurden in das Hybrid Restriktionsenzym-Erkennungstellen eingebaut, um gezielt Protein-DNA-Komplexbildung mittels Protektions-Analysen untersuchen zu können, nachdem enzymatisch geschnitten wurde. Durch die größere Entfernung des Mismatch zur Strangkreuzung wurde es für ein einzelnes p53-Tetramer unmöglich, beide Strukturen gleichzeitig zu erkennen.



**Abb. 20:** Schematische Darstellung der 3sDNAs, "kurze" versus "lange". Es ist der detailierte Aufbau der "kurzen" 3sDNA (oder einfach 3sDNA genannt) (a) und der "langen" 3sDNA (b) gezeigt. Beide 3sDNAs bestehen aus drei Oligonukleotiden, die so konzipiert wurden, dass sie in spezifischer Art miteinander hybridisieren. So bilden sich drei voneinander unterscheidbare Hauptteile heraus: eine Heteroduplex zwischen "Top"- und "Central"-Oligonukleotid; eine zentrale flexible Verbindung, in deren Bereich das "Central"-Oligonukleotid sowohl mit dem "Top"- als auch mit dem "Bottom"-Oligonukleotid hybridisieren kann und ein Homoduplex-Bereich, in welchem das "Central"-Oligonukleotid mit dem "Bottom"-Oligonukleotid paart. Die "lange" 3sDNA unterscheidet sich von der "kurzen" 3sDNA vor allem darin, dass ihr Heteroduplex-Bereich wesentlich länger ist und so der terminal eingebaute *Mismatch* statt 8 Bp (bei der "kurzen" 3sDNA) 39 Bp von der Strangkreuzungsstelle entfernt liegt. Durch diese Distanzverlängerung wurde es für ein einzelnes p53-Tetramer unmöglich gemacht, gleichzeitig beide Strukturen, die Strangkreuzung und den *Mismatch*, zu erkennen. Durch in das Hybrid gezielt eingebaute Restriktionsenzym-Erkennungsstellen, ist es zudem für das gezielte Studium von Protein-DNA-Komplexbildungen durch Protektions-Analysen geeignet.

Da Protektions-Analysen meiner Laborkollegin C. Janz zeigten, dass Wtp53 die Rekombinationsintermediate in unmittelnarer Nähe der Strangkreuzungsstrukturen bindet (Janz *et al.*, 2002), fragte ich nun, ob "lange" Rekombinationsintermediate gleichermaßen effizient durch die p53-Nuklease attackiert werden wie "kurze". Im Experiment wurde der Abbau des Vollelänge-3sDNA-Substrates als Funktion der Zeit durch gelelektrophoretische Analyse und anschliessende PhosporImager-Quantifizierung der Substratbanden verfolgt. Die resultierende Exonukleaseaktivitätskurve zeigte, dass "lange" Rekombinationsintermediate zweifach langsamer abgebaut wurden als "kurze" (Abb. 21).





Abb. 21: Exonukleaseaktivitäten Wtp53 von an "langen" versus "kurzen" Rekombinationsintermediaten. (a) Die jeweilige "kurze" (Spuren 2, 4, 6, 8, 10) oder "lange" 3sDNA (Spuren 1, 3, 5, 7, 9), wurde mit 1 nM Wtp53 bei 37°C über einen Zeitraum von 5, 15, 30 oder 45 min inkubiert und die Produkte elektrophoretisch im nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die ausgewählte Autoradiographie in (a) zeigt ein repräsentatives Experiment. Zur Quantifizierung der nach Inkubationszeit noch vorhandenen Vollelänge-Substrat-DNA wurde das Verfahren der PhosphorImager-Analyse angewandt. (b) Im Diagramm ist der prozentuale DNA-Abbau dargestellt, wobei die Werte aus jeweils 2-4 Messungen ermittelt wurden (Mittelwert und Standardfehler). In den schematischen Zeichnungen steht das Dreieck für den A/G-Mismatch und der Stern für die Markierung mit <sup>32</sup>P.

## 3.1.3 Bildung von ternären hRad51-p53-DNA Komplexen an 3sDNA

Da die Bildung von Rekombinationsintermediaten durch hRad51 die exonukleolytische DNA-Degradation durch Wtp53 zu stimulieren scheint, sollte im folgenden der Frage nachgegangen werden, ob hRad51 und p53 am selben Strangtransferintermediat agieren. Dazu wurden die beiden rekombinanten und aufgereinigten Proteine mit <sup>32</sup>P-3sDNA-Kreuzungsstrukturen, markierten. künstlichen welche frühe Rekombinationsintermediate nachahmen (Dudenhöffer et al., 1998), inkubiert und die Bildung von Protein-DNA-Komplexen in Gel-Retardations- oder sog. *Electrophoretic Mobility* Shift Assays (EMSAs) analysiert (s. Kapitel 2.4.7.1).

Zunächst wurden die Bindungseigenschaften von hRad51 an das 3-Strang-Substrat bei steigenden Proteinkonzentrationen untersucht. Selbst ohne Glutaraldehyd-Fixierung konnte die Bildung stabiler Komplexe von hRad51 mit der 3sDNA (10 nM definiert in Nukleotiden) bei Proteinkonzentrationen ab 10-60 nM (abhängig von der individuellen Proteinpräparation) nachgewiesen werden. Hierbei konnte die Bildung von oligomeren Nukleoproteinen beobachtet werden, deren Größe mit steigenden Proteinkonzentrationen Vergleich (Abb. 22). Der der Bindung von hRad51 an 3sDNAzunahm Strangtransferintermediate versus an ssDNA-Substrat ergab, dass eine äquivalente Komblexbildung zweifach höhere Proteinkonzentrationen für das ssDNA-Substrat erforderte (Abb. 22, Spuren 2 und 3 versus 7 und 8).



**Abb. 22:** Vergleich der Bindungseigenschaften von hRad51 an ssDNA und 3sDNA-Kreuzungsstrukturen im *Electrophoretic Mobility Shift Assay.* <sup>32</sup>P-markierte ssDNA (*1s*; Spuren 1-5) oder 3sDNA-Kreuzungsstrukturen (*3s*; Spuren 6-10) wurden in Anwesenheit von 3 mM ATP und 5 mM MgCl<sub>2</sub> mit steigenden hRad51-Konzentrationen (66, 130, 260 und 520 nM) inkubiert und aufgetrennt. Das ssDNA- bzw. 3sDNA-Substrat wurde mit schmalen schwarzen Pfeilen gekennzeichnet, die DNA-Komplexe mit diversen hRad51-Oligomeren mit dicken grauen Pfeilen.

Humanes p53 bildet mit derselben 3sDNA-Struktur wie hRad51 stabile Komplexe in Form von Dimeren und Tetrameren bei solch niedrigen Proteinkonzentrationen wie 2 nM (Abb. 23). Demgegenüber interagiert es mit den jeweiligen ss oder dsDNA-Komponenten nicht spezifisch (Dudenhöffer *et al.*, 1998).



**Abb. 23:** Bindung von immunaffinitätsgereinigtem Wtp53 an 3sDNA. <sup>32</sup>P-markierte 3sDNA-Kreuzungsstrukturen wurden mit steigenden Wtp53-Konzentrationen inkubiert und anschließend im *Electrophoretic Mobility Shift Assay* analysiert. Wtp53 interagiert mit 3sDNAs in Form von Dimeren und Tetrameren schon in solch niedrigen Proteinkonzentrationen wie 2 nM.

Interessanterweise resultiert die Zugabe von Wtp53 zum Probenansatz mit 3sDNA und hRad51 in der Bildung größerer Komplexe (Abb. 24, Spur 4), was sich durch das Vorliegen von hRad51 und p53 an der selben DNA-Struktur in gemeinsamen Komplexen erklären ließe. Im Gegensatz dazu konnte dieser Effekt mit SSB von *E. coli* statt hRad51 nicht beobachtet werden (Abb. 24, Spuren 5-7). Hier wurden eher schwächere Wechselwirkungen von p53 mit der DNA erkennbar.





In Abb. 25 wurde die Reihenfolge, in der die Proteine zur Reaktion zugegeben wurden, variiert. Dabei zeigte sich, dass die Ausbildung ternärer Komplexe durch Präinkubation von hRad51 mit der DNA und erst späterer Zugabe von Wtp53 (Abb. 25, Spur 4) im Vergleich zur Koinkubation (Abb. 25, Spur 5) stimuliert wurde. Dies weist auf synergistische Interaktionen zwischen DNA-gebundenem hRad51 und p53 hin.

Ternäre Komplexe wurden auf Eis (Abb. 27) und bei Raumtemperatur (Abb. 24 und 25) in Anwesenheit von ATP und Mg<sup>2+</sup> gebildet, welche dafür bekannt sind, die Sekundärstruktur von Rad51 bei höheren Temperaturen zu stabilisieren (Namsarev und Berg, 1998).



**Abb. 25:** Bindungsstudien von hRad51 (66 nM) und immunaffinitätsgereinigtem Wtp53 (5 nM) an 3sDNAs. Diese wurden bei Raumtemperatur mit 3 mM ATP und 5 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Wtp53 wurde entweder alleine (Spur 3) oder zusammen mit hRad51 (Spur 5) zum Reaktionsansatz zugegeben. In Spur 4 wurde p53 erst nach einer Präinkubationsperiode mit hRad51 und DNA hinzugefügt. Im Vergleich zur Koinkubation von hRad51 und Wtp53 (Spur 5) verursachte eine Präinkubation von hRad51 mit der DNA und anschließende p53-Zugabe (Spur 4) eine noch effizientere Bildung dieser ternären hRad51-Wtp53-DNA-Komplexe.

## 3.1.4 Interaktionen von p53(273H) mit 3sDNA-Kreuzungsstrukturen

Aus zurückliegenden Arbeiten der Gruppe war bereits bekannt, dass die krebsassoziierte p53-Mutante p53(273H) in ihrer Fähigkeit, homologe DNA-Austauschprozesse zu inhibieren, eingeschränkt ist (Dudenhöffer *et al.*, 1999). Diese Mutante besitz Wildtyp-Konformation (Ory *et al.*, 1994), entbehrt aber Arginin 273, welches mit dem Phosphat-Rückgrat der DNA interagiert (Cho *et al.*, 1994). So sollte geklärt werden, ob dieser Aminosäureaustausch die Erkennung von Rekombinationsintermediaten betrifft. Zunächst wurden die Bindungseigenschaften der p53-Mutante p53(273H) bei steigenden Proteinkonzentrationen im Vergleich zu denen von Wtp53 analysiert. Für Wtp53 konnte bereits bei einer Konzentration von 2,5 nM eine deutliche Bindung von Wtp53-Tetrameren an das 3sDNA-Substrat beobachtet werden (Abb. 26, Spur 4), wohingegen zur Erzielung einer vergleichbaren Protein-DNA-Komplexbildung mit der Mutante p53(273H) fast die 10fache Proteinkonzentration benötigt wurde (Abb. 26, Spur 13).



**Abb. 26:** Bindung von Wtp53 versus p53(273H) an 3sDNA-Kreuzungsstrukturen. Die EMSAs wurden unter Standardbedingungen durchgeführt (s. Material und Methoden, Kapitel 2.4.7.1). Wtp53 und p53(273H) (beide immunaffinitätsgereinigt) wurden bei steigenden Proteinkonzentrationen verglichen.

Die vergleichende Analyse der Exonukleaseaktivitäten von Wtp53 und p53(273H) hatte ergeben, dass letztere gegenüber Wtp53 in ihrer Aktivität 10fach reduziert war und zwar sowohl für die *mismatch*-freie als auch für die *mismatch*-haltige DNA (Abb. 19). Dies bedeutet, dass die enzymologischen Eigenschaften des p53(273H) Proteins als Exonuklease perfekt mit den soeben dargestellten Bindungseigenschaften dieser Mutante korrelierten.

Im folgenden wurde die Mutante p53(273H) in ihren Interaktionen mit Komplexen aus 3sDNA und hRad51 analysiert. In dem in Abb. 27 dargestellten Experiment wurde die Bildung von Komplexen mit der DNA bei unterschiedlicher Reihenfolge der Zugabe der Proteinkomponenten zur Reaktion verfolgt. Dieser experimentelle Ansatz beruht darauf, dass für Wtp53 bereits gezeigt worden war, dass effizientere Bildung der ternären hRad51-Wtp53-DNA-Komplexe nach einer Präinkubation von hRad51 mit der DNA mit anschließender p53-Zugabe erfolgte (Abb. 25).

Im Gegensatz dazu band die Mutante p53(273H) bei derselben Proteinkonzentration nicht an die 3sDNA und bildete zudem keine ternären Komplexe (Abb. 27, Spur 7-10). Da jedoch, wie in Abb. 26 gezeigt, stabile Protein-DNA-Komplexe bei ca. 10fach höheren p53(273H)-Konzentrationen wie für Wtp53 entstehen, wurden entsprechend höhere p53(273H)-Mengen für die wiederholte Analyse mit hRad51 eingesetzt (Abb. 27, Spur 11-14). Im Gegensatz zu der Situation mit Wtp53, in der hRad51 die Bindung an

Rekombinationsintermediate durch p53 stimulierte (Abb. 27, Spur 4-6), wurde mit p53(273H) sogar eine schwächere Assoziation an den vorinkubierten hRad51-DNA-Komplex beobachtet (Abb. 27, Spur 13). Dies deutete an, dass die p53(273H)-Mutante nicht nur in der DNA-Bindung defekt ist, sondern darüberhinaus in der kooperativen Wechselwirkung mit den hRad51-Filamenten.



**Abb. 27:** Bindung von hRad51 und p53(273H) an 3sDNA-Kreuzungsstrukturen. Die EMSAs wurden unter Standardbedingungen durchgeführt (s. Kapitel 2.4.7.1). Die Positionen der DNA-Substrate und Protein-DNA-Komplexe wurden symbolisch dargestellt. In diesen DNA-Bindungsassays wurden Talon-aufgereinigte p53-Proteine und hRad51 in Anwesenheit von 3 mM ATP und 150 nM BSA eingesetzt. Die Inkubationen erfolgten auf Eis. HRad51 wurde in einer konstanten Konzentration von jeweils 130 nM (Spuren 3-6, 8-10, 12-14) verwendet. Mutantes p53(273H)-Protein wurde entweder in einer Konzentration von 6 nM (Spuren 7-10) oder 30 nM (Spuren 11-14) zugegeben. Protein-DNA-Komplexe mit Wtp53 (3 nM) und hRad51 wurden in den Spuren 4-6 geladen. Der Vermerk *Prä* bedeutet, dass das betreffende Protein (hRad51, Wtp53 oder p53(273H)) mit der 3sDNA vorinkubiert wurde bevor das zweite Protein hinzukam. Der dicke schwarze Pfeil markiert die Position des ternären Wtp53-hRad51-DNA-Komplexes nach Vorinkubation von hRad51 mit der DNA (Spur 5). Die weißen Pfeile verweisen auf die Regionen, in denen sich die residualen Komplexe zwischen p53(273H) und vorgefertigten hRad51-Nukleoproteinen befinden (Spur 13).

# 3.1.5 Interaktionen der tetramerisierungs-defekten p53(1262)-Mutanten mit Heteroduplex-DNA

Im nächsten Schritt wurde die Rolle der Tetramerisierung von p53 in der exonukleolytischen DNA-Degradation überprüft, da aus der Literatur bereits bekannt war, dass die Tetramerisierung von p53 sehr wichtig für die Kooperativität der Bindung von Konsensussequenzen ist, insbesondere wenn gebogene oder schlaufenförmige Sekundärstrukturen involviert sind (Balagurumoorthy *et al.*, 1995; Nagaich *et al.*, 1997a; b,

1999). Darüberhinaus bereits wurde früher gezeigt, Verlust der dass der Tetramerisierungsfähigkeit von p53 mit dem Verlust der Tumorsuppressor-Eigenschaften bei Li-Fraumeni-Patienten einhergeht (Varley et al., 1996). In den folgenden Experimenten wurde nun der Frage nach einer möglichen Rolle der Tetramerisierung bei der sequenzunabhängigen Interaktion von p53 mit Rekombinationsintermediaten nachgegangen. Für diese Untersuchungen, wurde die Mutante p53(1262) mit vier Aminosäureaustäuschen in der  $\alpha$ -helikalen Tetramerisierungsregion von p53 gewählt (Tarunina *et al.*, 1996). Diese Mutante ist beeinträchtigt in der transkriptionellen Transaktivierung des p21-Promotors im Die chromosomalen aber nicht im episomalen Kontext. Defekte werden in temeratursensitiver Art und Weise, nämlich erst bei 37°C und höheren Temperaturen offenbar.

Nach Inkubation von p53(1262) bei 37°C in steigenden Proteinkonzentrationen mit radioaktiv markierten 3sDNAs, wurde ersichtlich, dass DNA-Komplexe mit oligomerem p53(1262) während der Gel-Shift-Analyse erst ab 17 nM p53(1262) stabil blieben (Abb. 28, Spur 6), während man bei dieser Temperatur für Wtp53 diese oligomeren DNA-Komplexe schon ab 8 nM fand (Abb. 28, Spur 11).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

**Abb. 28:** 3sDNA-Bindung von p53(1262) im Vergleich zu Wtp53. Die DNA-Komplexbildung mit Wtp53 und p53(1262) wurde im EMSA bei 37°C verglichen. 3sDNA-Substrate wurden zusammen mit p53-Protein in den angeführten Konzentrationen in nM unter Zusatz von 150 nM BSA zur Reaktion gebracht. Die Positionen der Substratbanden und der DNA-Komplexe, welche oligomeres Wtp53 oder p53(1262) enthalten, wurden durch schematische Darstellungen verdeutlicht. Radioaktive Signale, die zwischen den durch die beiden Pfeile markierten Banden erscheinen, wiederspiegeln wahrscheinlich zerfallene Komplexe, welche nicht zu sehen waren, wenn der Versuch bei 4°C durchgeführt wurde.

Um im nächsten Schritt die Bedeutung der Tetramerisierung für den exonukleolytischen DNA-Abbau zu verstehen, wurde die Wtp53- und p53(1262)-abhängige DNA-Degradation bei 37°C untersucht. Hierfür wurden zunächst die Exonukleaseaktivitäten gegenüber ssDNA versus 3sDNA gleicher Länge und Sequenz verglichen. Wie aus Abb. 29

ersichtlich, sind die Exonuklease-Reaktionskurven für beide Proteine jeweils mit ssDNA kaum zu unterscheiden.



**Abb. 29:** Degradation von ssDNA durch p53(1262) versus Wtp53. Die eingesetzte radioaktiv markierte ssDNA entspricht dem "Top"-Oligonukleotid der 3sDNA. Sowohl Wtp53 als auch p53(1262) wurden in einer Finalkonzentration von 1 nM eingesetzt. Die Autoradiographie auf der linken Seite zeigt ein repräsentatives Experiment, während auf der rechten Seite die Werte der Exonukleaseaktivitäten (DNA-Abbau des Vollelänge-Substrates) von 2-6 Messungen in das Auswertungsdiagramm eingegangen sind (Mittelwerte und Standardfehler).

Im Gegensatz dazu, konnte nach Inkubation mit 3sDNA eine fünffach reduzierte Exonukleaseaktivität für p53(1262) im Vergleich zu Wtp53 detektiert werden (Abb. 30). Gleichzeitig war die für Wtp53 spezifische Rate mit 3sDNA doppelt so hoch wie mit ssDNA (vergleiche Initialsteigung in Abb. 29 versus 30).



**Abb. 30:** Degradation von 3sDNA durch p53(1262) versus Wtp53. Die eingesetzte radioaktiv markierte 3sDNA besteht aus den Oligonukleotiden "Top", "A/G-Central" und "Bottom". Sowohl Wtp53 als auch p53(1262) wurden in einer Finalkonzentration von 1 nM eingesetzt. Die Autoradiographie auf der linken Seite zeigt ein repräsentatives Experiment, während auf der rechten Seite die Werte der Exonukleaseaktivitäten (3sDNA-Abnahme) von 2-6 Messungen in das Auswertungsdiagramm eingegangen sind (Mittelwerte und Standardfehler).

Der Degradationsdefekt von p53(1262) konnte sowohl mit *mismatch*-freien als auch *mismatch*-haltigen 3sDNA-Varianten beobachtet werden (Abb. 31). Die residuale Exonukleaseaktivität durch p53(1262) scheint jedoch eine geringfügige Präferenz für Heteroduplices mit *Mismatch* wiederzuspiegeln (Abb. 31), so dass von einer residualen Korrekturlesefunktion von p53(1262) an Rekombinationsintermediaten ausgegangen werden kann.



**Abb. 31:** Degradation von 3sDNA durch p53(1262) versus Wtp53. Die eingesetzten radioaktiv markierten 3sDNAs enthielten im Heteroduplex-Bereich teilweise einen A/G-*Mismatch*, welcher in der schematischen Illustration in der Spalte DNA-Substrate durch ein Dreieck markiert wurde. Sowohl Wtp53 als auch p53(1262) wurden in einer Finalkonzentration von 1 nM eingesetzt. Die Autoradiographie zeigt ein repräsentatives Experiment, während in die darunter befindliche Werte-Berechnung für die mittleren Exonukleaseaktivitäten (3sDNA-Abbau in Prozent) jeweils 3 Messungen eingegangen sind.

# 3.2 Analyse der Beziehungen zwischen der von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase abhängigen Signaltransduktion und der Aktivität von p53 nach DNA-Schädigung

Eine der schnellsten Antworten eukaryontischer Zellen nach dem Auftauchen von DNA-Strangbrüchen ist die Poly(ADP-Ribo)sylierung von Proteinen, eine posttranslationale Modifikation, welche von dem nukleären Enzym Poly-ADP-Phosphoribosyl-Transferase (PARP-1) katalysiert wird (Le Rhun et al., 1998; Wesierska-Gadek et al., 1996; Boulikas, 1993). Für das DNA-Strangbruch erkennende Enzym PARP-1 werden Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Genomstabilität und bei der Einleitung des aktiven Zelltodes diskutiert. Unter den zahlreichen PARP-1-Substraten, bei welchen es sich vornehmlich um Checkpoint-Proteine und Reparaturfaktoren handelt, wurde auch p53 als solches identifiziert (Pleschke et al., 2000). Um einen möglichen Einfluß von posttranslationalen Modifikationen durch PARP-1 auf die rekombinations-regulatorischen Funktionen von p53 festzustellen, wurden in dieser Arbeit das Enzym bzw. dominant negative Varianten von PARP-1 in Primaten-Zelllinien überexprimiert und Rekombinationsanalysen durchgeführt. Dies war einerseits interessant, da für die PARP-1 selbst gefordert wurde, dass Poly-ADP-Ribosylierung von Proteinen intrachromosomale homologe Rekombination unterdrückt (Waldman und Waldman, 1991; Chatterjee et al., 1999). Andererseits ist PARP-1 wie DNA-PK (DNAabhängige Protein-Kinase) ein Sensor für DNA-Doppelstrangbrüche und damit ein potentieller Kandidat dafür, bei der Signalvermittlung, welche letzlich zur Vermeidung deregulierter Rekombinationsereignisse führt, mit p53 zusammenzuwirken. Desweiteren existieren Hinweise dafür, dass PARP-1 einige für Reparatur-Prozesse kritische Faktoren, wie XRCC1 (X-Ray Cross Complementing 1), DNA-Ligase III, DNA-Polymerase ß, p53 und DNA-PK an DNA-Schadensstellen rekrutiert (zur Übersicht siehe Le Rhun et al., 1998).

# 3.2.1 Herstellung der Werkzeuge für die Studien zur potentiellen Wechselwirkung zwischen PARP-1 und p53 bei der Kontrolle von DNA-Austauschprozessen

Um mögliche Effekte von PARP-1 auf die Rekombinationskontrolle durch p53 aufzudecken, sollte PARP-1 funktionell in Zellen mit unterschiedlichem p53-Status aktiviert und inaktiviert werden. PARP-1 ist in Säugerzellen an der Aufrechterhaltung der Genomstabilität beteiligt (Wesierska-Gadek *et al.*, 1996), weshalb PARP-1 konditional aktiviert und inaktiviert werden sollte, um unvorhergesehene Änderungen des genetischen Hintergrundes durch konstitutive Expression zu vermeiden. Zur Ausschaltung von PARP-1-

Funktionen wurde eine dominant negative Variante des PARP-1-Proteins designiert (Küpper *et al.*, 1995). Diese stellt die DNA-Binde-Domäne von PARP-1 (PARP-DBD) dar, welche nicht mehr zur Poly-ADP-Ribosylierung befähigt ist und der Wildtyp-Form von PARP-1 (WtPARP-1) den Zugang zu DNA-Brüchen versperrt.

Für die konditionale Expression wurde das auf dem östradiol-induzierbaren Gal4-Transkriptionsfaktor basierende System verwendet, in welchem ein über die Östrogen-Binde-Domäne östradiol-induzierbarer Gal4-Transkriptionsfaktor (Gal4-her) an eine durch einen Gal4-responsiven Promotor gesteuerte Expressionskassette gekoppelt ist (Braselmann et al., 1993). Aufgrund der wachstums-inhibierenden Eigenschaften von Wtp53 kann dieses in Zellen ebenfalls nur konditional überexprimiert oder konstitutiv exprimiert und funktionell induziert werden, wie dies mit den LLC-MK2-Wtp53her-Zellen gelang (Dudenhöffer et al., 1998). Es handelt sich dabei um Rhesusaffenzellen mit endogenem Mutanten-p53 ( $\Delta$ 237-239) und dem ektopisch exprimierten Fusionsprotein aus humanem Wtp53 und der Östrogenrezeptor-Östrogen-Bindedomäne (her). Das in diesen Zellen in seiner Wirkung östradiol-induzierbare Wtp53her zeigt bonafide Wtp53-Eigenschaften, d.h. es vermittelt Wachstumsarrest, schaltet Zielgene als transkriptioneller Transaktivator an und inhibiert Rekombinationsprozesse in Rekombinations-Testsystemen SV40basierend auf Minichromosomen und zellulären Chromosomen (Dudenhöffer et al., 1998; 1999; Akyüz et al., 2002). Die beiden induzierbaren Systeme bieten den Vorteil der vollen Kompatibilität, d.h. der Anschaltbarkeit durch Östradiol in beiden Fällen. Rekombinations-Assays, basierend auf dem genetischen Austausch zwischen zwei unterschiedlich mutierten SV40-Viren (Wiesmüller et al., 1996, Dudenhöffer et al., 1998), sollten nun auf WtPARP-1- und PARP-DBD-transgene Zellen vor dem Hintergrund von Wtp53 (p53her) bzw. Mutanten-p53 (∆237-239) angewendet werden (s. Kapitel 3.2.4).

Zu Beainn dieser Arbeit stand bereits eine Gal4-her exprimierende Rhesusaffenzellinie LMV2 (Dudenhöffer et al., 1999; 1998), welche sich von LLC-MK<sub>2</sub>-Zellen ableitete, zur Verfügung. Gal4-responsive Konstrukte für die induzierbare Expression von WtPARP-1 (PARP-1) bzw. der dominant negativen DNA-Binde-Domäne von PARP (PARP-DBD) wurden molekularbiologisch hergestellt und in Gal4-her exprimierende LLC-MK2-Rhesusaffenzellen eingeführt. Durch stabile Kotransfektion mit Expressionskonstrukten für die östradiol-induzierbare Form von Wtp53, p53her (Dudenhöffer et al., 1998), und PARP-1 gelang es, Zelllinien zu etablieren, in welchen entweder PARP-1, p53her oder beide Proteine exprimiert wurden. Die Etablierung dieser von LMV2 abgeleiteten stabilen Zelllinien erfolgte durch Frau E. Bendrat. Das Expressionsmuster bezüglich PARP-1 und p53 [Wtp53her und p53( $\Delta$ 237-239)] der erhaltenen östradiol-induzierbaren stabilen Klone läßt sich

folgendermaßen zusammenfassen: LMV2-p53her-Kl8 [endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: p53her], LMV2-PARP-Kl3 [endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: PARP-1], LMV2-PARPp53her-Kl1 [endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: p53her, PARP-1] und LMV2 [endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: -] und ist in Tab. 1 (Übersicht und Nomenklatur) und Abb. 32 (Expressionsmuster im Western) dargestellt.

systematische Bezeichnung	LMV2	LMV2-p53her-Kl8	LMV2-PARP-KI3	LMV2-PARPp53her-Kl1
Kurzbezeichnung	LMV2	Kl(on)8	Kl(on)3	KI(on)1
p53/PARP-1-Status				
an da nam				
endogen:				
p53(∆237-239)	+	+	+	+
PARP-1	+	+	+	+
exogen:				
p53her-Expression	-	+	-	+
PARP-1-Überexpression	-	-	+	+

**Tab. 1:** Übersicht zum p53/PARP-1-Status der von LMV2 abgeleiteten stabilen Klone. Da LMV2-Zellen endogen p53( $\Delta$ 237-239) und PARP-1 besitzen, trifft dies auch für alle von ihnen abgeleiten Klone zu. Die LMV2-Derivate exprimieren im Vergleich zu den LMV2-Parentalzellen zusätzlich exogenes p53her (LMV2-p53her-Kl8), PARP-1 (LMV2-PARP-Kl3) oder beides p53her und PARP-1 (LMV2-PARPp53her-Kl1), wobei dies für PARP-1 östradiol-abhängig ist. Die systematische Bezeichnung der erfolgreich hergestellten stabilen Zelllinien gliedert sich in drei Teile: a) Name der Parentalzelllinie (LMV2), b) exogenes Protein (p53her und/oder PARP-1) und c) Nummer des Klones (s. Tab. 2).

#### 3. Ergebnisse



**Abb. 32:** Western-Blot-Analyse der von LMV2 abgeleiteten stabilen Klone zum Nachweis der Expression von exogenem p53her und/oder PARP-1. Die für 24 h mit Östradiol induzierten (+) und nicht induzierten (-) Proben wurden mittels 8 (a) bzw. 10%iger (b) SDS-PAGE aufgetrennt, elektrotransferiert und die Banden entweder mit dem primären Antikörper Do1 (p53) oder F-I-23 (PARP-1) detektiert. LMV2-Gesamtzell-Lysate wurden jeweils als Negativkontrollen aufgetragen. Da p53( $\Delta$ 237-239) konstitutiv exprimiert wird, dient der p53( $\Delta$ 237-239)-Nachweis gleichzeitig als Auftragskontrolle. Das scheinbar reduzierte Expressionsniveau von p53( $\Delta$ 237-239) war auf einen einmaligen Transferartefakt zurückzuführen. (a) Expression von p53her in LMV2. LMV2-p53her-Kl8 (Klon 8) exprimiert p53her (90 kDa) im Gegensatz zur Parentalzelllinie LMV2. (b) Expression von PARP-1 in LMV2 und LMV2(p53her). LMV2-PARPp53her-Kl1 (Klon 1) zeigt nach Östradiolinduktion eine PARP-1-Zunahme (113 kDa), wohingegen das funktionell aktivierbare p53her (90 kDa) konstitutiv exprimiert wird. LMV2-PARP-KI3 (Klon 3) ohne p53her überexprimiert PARP-1 ausschließlich nach Östradiolzugabe. In den Zellen der Parentalzelllinie LMV2 konnte bei der dargestellten kurzen Expositionsdauer PARP-1 kaum nachgewiesen werden.

Parallel dazu konnte überraschenderweise von insgesamt 22 getesten, Hygromycin resistenten Klonen kein einziger Klon etabliert werden, welcher PARP-DBD in LMV2-Zellen mit endogenem Mutanten-p53 ( $\Delta$ 237-239) exprimiert (s. Tab. 2). Dies war vor allem auf die geringe Überlebensrate der entsprechenden Klone zurückzuführen. Demgegenüber konnten von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Alexander Bürkle, Universität Konstanz, CV1-Affenzellen und auch transformierte CO60-Zellen des chinesischen Hamsters isoliert werden, welche PARP-DBD vor dem Hintergrund von endogenem Wtp53 induzierbar und auch konstitutiv exprimieren (Küpper *et al.*, 1995; 1996; Tatsumi-Miyajima *et al.*, 1999). Ganz im Gegensatz zur nicht nachweisbaren PARP-DBD-Expression waren im hier verwendeten Zellsystem mit endogenem Mutanten-p53 ( $\Delta$ 237-239) 8 von 18 getesteten Klonen positiv für p53her und 4 von 12 getesteten Klonen positiv für PARP-1 (Tab. 2). Diese Klonierungsstatistik könnte auf eine synergistische Wirkung von Wtp53 und PARP-1 beim Schutz vor fatalen Genomschäden hinweisen, wodurch gegen das Überleben von Zellen mit Mutanten-p53 und PARP-DBD sogar in Gegenwart von geringen Mengen an Wtp53 (p53her)

selektioniert würde. Um jedoch Besonderheiten des LMV2-Systems als mögliche Ursache ausschließen zu können, müßte diese Hypothese durch weitere Klonierungsversuche mit alternativen Zelllinien mit mutiertem p53-Status geprüft werden.

Transfektionsplasmide	gepickte Klone	Überleben nach 35 d	getestete Klone	im Western positiv	
1.Versuch					
pGC-PARP6/phyg	10	1	1	PARP-DBD: 0	
pGC-PARP6/phyg/pSV53her	22	12	12	p53her: Kl5, Kl6; K <b>l8</b> , Kl13 PARP-DBD: 0	
pGC-PARP31/phyg	16	9	6	PARP-1: KI4, KI5, KI6	
pGC- PARP31/phyg/pSV53her	19	11	6	p53her: K <b>I1</b> , K <b>I3</b> ; Kl5, Kl6 PARP-1: K <b>I1</b>	
2. Versuch					
pGC-PARP6/phyg	20	3	3	PARP-DBD: 0	
pGC-PARP6/phyg/pSV53her	21	5	5	p53her: nicht getestet PARP-DBD: 0	

**Tab. 2:** Klonierungsstatistik zu PARP-1/p53her-Klonen in LMV2. Die LMV2-Zelllinie wurden mit den angegebenen Transfektionsplasmiden transfiziert. Ziel war die induzierbare Überexpression der PARP-1 (*pGC-PARP31/phyg*) bzw. einer dominant negativen PARP-1-Variante, der PARP-DBD (*pGC-PARP6/phyg*), in An- oder Abwesenheit von funktionell aktivierbarem Wtp53 (p53her). Der *pGC*-Vektor ist ein eukaryontischer Expressionsvektor (Braselmann *et al.*, 1993), welcher hier die Expression des *PARP-1*-Gens bzw. des Genabschnittes kodierend für PARP-DBD unter der Kontrolle des Gal4-Promotors erlaubt. Zur Expression von funktionell aktivierbarem p53 wurden LMV2-Zellen mit *pSV53her* transfiziert. Die Selektion stabiler Klone erfolgte über Hygromycinresistenz, welche durch Kotransfektion mit *phyg* vermittelt wurde. Der erste Klonierungsversuch wurde von Frau E. Bendrat unternommen, wodurch u.a. Klon 8 (LMV2-p53her-KI8), Klon 3 (LMV2-PARP-KI3) und Klon 1 (LMV2-PARPp53her-KI1) erfolgreich etabliert wurden. Diese sind auch in Fettdruck hervorgehoben, da sie für sämtliche Folgeversuche aufgrund der deutlich erkennbaren Proteinexpression bei gleichzeitig klarer Induzierbarkeit gemäß Western-Blot-Analyse (Abb. 1) ausgewählt wurden. Die Expressionsversuche zu PARP-DBD im LMV2-Zellsystem führten in zwei voneinander unabhängigen Ansätzen nicht zum Erfolg.

# 3.2.2 Charakterisierung der stabilen Klone LMV2-p53her-Kl8, LMV2-PARP-Kl3 und LMV2-PARPp53her-Kl1

## 3.2.2.1 Morphologie und Wachstumsverhalten in Zellkultur

Die PARP-1 und/oder p53her positiven Klone (s. Kapitel 3.2.1) zeigten im Vergleich zur Parentalzelllinie LMV2 Veränderungen bzgl. des Wachstumsverhaltens und teilweise auch bzgl. der Zellmorphologie. Zur quantitativen Beschreibung wurden die Generationszeiten der stabilen Klone ohne Östradiolzusatz und mit 1  $\mu$ M Östradiol im Medium ermittelt. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefasst. Da die dargestellten Zelllinien über den Versuchszeitraum ca. 50fach passagiert wurden, wurden

die Verdopplungszeiten während dieser Zeitspanne mehrmals bestimmt. Mit zunehmender Passagezahl veränderten sich die Generationszeiten, so dass in Tab. 3 statt diskreter Zahlenwerte Zahlenbereiche angegeben wurden, wobei fett gedruckte Werte kurz nach der Etablierung ermittelt wurden. Im Vergleich zur Ursprungszelllinie LMV2 zeigten die davon abgeleiteten Klone eine Verlängerung der Generationszeit bzw. sogar eine Abnahme der Zellzahl. Kurz nach der Etablierung der stabilen Klone benötigte beispielsweise die p53her exprimierende Zelllinie LMV2-p53her-Kl8 in Gegenwart von Östradiol die 4,4fache und die PARP-1-überexprimierende Linie LMV2-PARP-KI3 die 3fache Zeit zur Verdopplung. Unter diesen Bedingungen nahm die Anzahl der LMV2-PARPp53her-KI1-Zellen sogar um 20% ab. Auch in Abwesenheit von Östradiol war eine Verlängerung der Generationszeiten im Vergleich zur Parentalzellinie zu beobachten, allerdings deutlich weniger ausgeprägt als nach Östradiolzugabe. Dies war ein Hinweis darauf, dass ein Teil des Proteins auch ohne Induktion durch Östradiol konstitutiv aktiv war (p53her) bzw. geringfügig exprimiert wurde (PARP-1). Trotzdem wurde die Kultivierung der LMV2-PARPp53her-Kl1-Linie erst unter östradiol-freien Bedingungen möglich, was die Nützlichkeit der Induzierbarkeit des Expressionssystems deutlich machte. LMV2-PARPp53her-KI1-Zellen zeigten mit der 8- bis 10fachen Verdopplungszeit in Abwesenheit von Östradiol das langsamste Wachstum. Die Verlängerung der Generationszeit nahm bei den exogen PARP-1-überexprimierenden Zellen über die Passagen zu (LMV2-PARP-KI3 und LMV2-PARPp53her-KI1), während sie für die p53her exprimierenden Zellen abnahm, wobei die nicht östradiol-induzierten LMV2-p53her-KI8-Zellen LMV2-Parentalzelllinien-Niveau erreichten. Die Parentalzelllinie veränderte sich ebenfalls, die Generationszeit von anfangs 15 h erhöhte sich auf 24 h.

Klon-Bezeichnung	LMV2	LMV2-p53her-Cl8	LMV2-p31-Cl3	LMV2-p53herp31-Cl1
p53her/PARP-1-Status				
exogen:				
p53her	-	+	-	+
PARP-1	-	-	+	+
Generationszeiten:				
ohne Östradiol	<b>15</b> -24 h	24- <b>33</b> h	<b>30</b> -44 h	<b>6</b> -8 d
1 µM Östradiol	<b>15</b> -24 h	33- <b>66</b> h	<b>45</b> -80 h	-20 % / d

**Tab. 3:** Generationszeiten der p53her/PARP-1-Klone. Da die dargestellten Zelllinien über ca. 50 Passagen Verwendung fanden, wurden die Verdopplungszeiten wiederholt bestimmt, sowohl ohne als auch mit Östradiolzusatz im Medium (1  $\mu$ M). Die dabei auftretenden Veränderungen der Generationszeiten sind durch Zahlenbereiche gekennzeichnet, wobei fett hervorgehobene Zahlenwerte die Verdopplungszeit kurz nach Generierung der stabilen Klone angeben und der zweite Wert die letzte Messung widerspiegelt. Die Angabe "-20% / d" steht für eine 20%ige Abnahme der Zellzahl pro Tag.

Nicht nur das veränderte Wachstumsverhalten zeugte von einem deutlich veränderten Phänotyp der LMV2-Derivate, sondern teilweise auch die Zellmorphologie. Während zwischen der Ursprungszellinie LMV2 und der p53her exprimierenden Linie (Klon 8) – ohne als auch mit Östradiolinduktion – keine Unterschiede im Phänotyp der jeweiligen Zellen festgestellt werden konnten, ließ sich bei dem PARP-1 überexprimierendem Klon 3 eine vereinzelte (ohne Östradiol) bis zunehmende (mit Östradiol) Synzytienbildung erkennen (Daten nicht gezeigt). Die PARP-1 überexprimierende Zelllinie LMV2-PARPp53her-Kl1 schließlich zeigte schon ohne Östradiolzugabe ein von der Ursprungszellinie stark abweichendes Erscheinungsbild. Die Zellen nahmen ein stark polymorphes Aussehen bezüglich Gestalt und Größe an, welches von einem fibroblasten-artigen Phänotyp bis zu stark aufgeblähten von bis zu 10fach größeren, vielkernigen Zellen reichte. Die Synzytienbildung nahm unter Östradiolzugabe dem Anschein nach noch zu, so dass im Phasenkontrastmikroskop riesige Zellen mit 10 und mehr Nuklei beobachtet werden konnten (s. Abb. 36b). Bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Zellen nach spezifischer DNA-Färbung mit DAPI (s. Kapitel 3.2.2.3) zeigte sich jedoch, dass es sich bei diesen mehrkernigen Zellgebilden um Haufen von unvollständigen Kern- und Zellabschnürungen handelte (s. Abb. 36). Zudem zeigten diese mehrkernigen Gebilde stets Abschnürungen und bereits losgelöste DNA-Blasen, wie sie für apoptotische Vorgänge beschrieben werden (siehe dazu auch Kapitel 3.2.2.3).

### 3.2.2.2 Zellzyklusanalyse nach Östradiolinduktion und nach γ-Bestrahlung

Um die Verlängerung der Generationszeiten nach Induktion von p53her bzw. PARP-1-Expression der Beeinflussung bestimmter Wachstumsstadien zuordnen zu können, wurden Zellzyklusstudien durchgeführt. Gegenüber der Parentalzelllinie LMV2 war für Klon LMV2-PARPp53her-Kl1 mit 43% eine starke relative Abnahme des Zellanteils in G1 zu beobachten (Abb. 33a). Dabei resultierte die Östradiolzugabe zu den Zellen des Klones LMV2-PARPp53her-Kl1 vornehmlich in einer Akkumulation in G2 (39% versus 16% in LMV2). Die Klone LMV2-p53her-Kl8 und LMV2-PARP-Kl3 zeigten keine vergleichbar signifikanten Änderungen des G1-, S- und G2M-Zellzyklus-Profils. Doch konnte bei induzierten LMV2-PARP-Kl3-Zellen bereits nach 48 h in einem Teil der Zellen Apoptose beobachtet werden (3%), was nach 72 h noch deutlicher wurde (9%) (Abb. 33c). Apoptotische Zellen, gemessen als Zellen mit einem DNA-Gehalt, der geringer als der in G1-Phase-Zellen ist, traten bei LMV2-PARPp53her-Kl1-Zellen noch stärker und früher in Erscheinung (11% nach 12 h). Für den PARP-1 überexprimierenden Klon mit funktionell aktivem p53her (Klon 1) gab es eine weitere Besonderheit: 30% der Zellen waren polyploid. Bei der Darstellung *c* in Abb. 33 ist zu beachten, dass die prozentualen Anteile der

apoptotischen und polyploiden Zellen sich auf alle untersuchten Zellen der jeweiligen Probe beziehen, während sich die G1-, S- und G2M-Phasen-Anteile ausschließlich aus diesen drei Subpopulationen zusammensetzen und gemeinsam 100% ergeben.

Da PARP-1 als früher Sensor von DNA-Strangbrüchen bekannt ist und p53 als Schlüsselfaktor in der zellulären Antwort nach DNA-Schädigung fungiert, wurden im nächsten Schritt Zellzyklusanalysen nach γ-Bestrahlung, durch welche DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche verursacht werden (Khanna und Jackson, 2001), durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 33b zusammengefasst. Insgesamt ergab sich ein ähnliches Bild wie ohne Bestrahlung, d.h. für LMV2, LMV2-p53her-Kl8 und LMV2-PARP-Kl3 dominierte der Anteil der Zellen in G1 (56-59%), für LMV2-p53herPARP-Kl1-Zellen zeigte sich ein geringerer Anteil von Zellen in G1 (46%) mit einer gleichzeitigen Zunahme der Zellen in G2 (36%). Interessanterweise nahm jedoch der Anteil der apoptotischen Zellen in LMV2-PARP-Kl3-Zellen nach Bestrahlung noch weiter zu. So waren nach 72 h 13% der Zellen mit einem Sub-G1-DNA-Gehalt identifizierbar. LMV2-p53herPARP-Kl1-Zellen zeigten einen der Situation ohne Bestrahlung entsprechend hohen Anteil an apoptotischen Zellen von durchschnittlich 12%.



Α

Β

С



Abb. 33: Zellzyklusanalysen der p53her/PARP-1-Klone nach Östradiolinduktion und nach y-Bestrahlung. Der DNA-Gehalt Propidiumjodid gefärbter Zellen nach Fixierung wurde fluorometrisch im Durchflußzytometer analysiert und die Anzahl der Zellen in G1-, S- und G2M-Phase ermittelt, wobei die Summe der Zellen in G1, S und G2M als 100% definiert wurde. Die prozentualen Anteile der teilweise auftretenden apoptotischen und polyploiden Zellen beziehen sich hingegen auf alle untersuchten Zellen in der jeweiligen Probe. (a) Auswertung der Zellzyklusanalysen ohne Bestrahlung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den prozentualen Anteilen der Zellzyklusphasen G1, S und G2M, jeweils 24 und 48 h nach Östradiolzugabe. In Klon 1-Zellen konnte zudem eine polyploide Zellpopulation nachgewiesen werden, gekennzeichnet durch *P*. (b) Auswertung der Zellzyklusanalysen nach v-Bestrahlung mit 5 Gy. Die Funktionalität von p53her bzw. die PARP-1-Expression wurde bereits 4 h vor Bestrahlung durch Zugabe von 1 µM Östradiol zum Medium induziert, um zum Zeitpunkt der Bestrahlung ein maximales p53her- bzw. PARP-1- Expressions-Niveau zu gewährleisten (Dudenhöffer et al., 1999). Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwerte aus den prozentualen Anteilen der Zellzyklusphasen G1, S und G2M, jeweils 24 und 48 h nach Östradiolzugabe. (c) Auftauchen eines Sub-G1-Peaks. In Klon 3-Zellen zeigte sich 48 h und 72 h nach Östradiolzugabe und in Klon 1-Zellen bereits ohne Östradiolzugabe ein Sub-G1-Peak, welcher auf das Vorhandensein apoptotischer Zellen hindeutet. Die ermittelten Werte setzten sich aus 1-2 Einzelmessungen zusammen (Mittelwerte und Standardabweichungen).

3. Ergebnisse

# 3.2.2.3 Analyse der Kernmorphologie mittels DAPI-Färbung nach γ-Bestrahlung

Da gemäß der Zellzyklusanalyse mit Propidiumjodid gefärbten Zellen in PARP-1überexprimierenden Zellen Subpopulationen mit einem kleineren DNA-Gehalt als bei Zellen in der G1-Phase detektiert wurden, schien es sinnvoll die Morphologie der Kerne bzgl. möglicher apoptotischer Veränderungen genauer zu studieren. Zu diesem Zweck wurden auf Objektträger fixierte Zellen mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff 4´,6-Diamidin-2phenyl-indol (DAPI) behandelt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch die Morphologie der Kerne untersucht. Hierzu wurden die stabilen Klone LMV2-p53her-Kl8, LMV2-PARP-Kl3, LMV2-PARPp53her-Kl1 und die Kontrollzelllinie LMV2 12 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung mit einer Dosis von 5 Gy einer DAPI-Färbung unterzogen, parallel zu den jeweiligen nicht bestrahlten Vergleichszellen. 4 h vor der Bestrahlung wurden die betreffenden Zellen mittels Inkubation in Medium mit 1  $\mu$ M Östradiol zur Aktivierung von p53her oder/und zur Expression von exogener PARP-1 veranlaßt. Die Induktionszeit mit Östradiol der unbestrahlten Zellen lag entsprechend bei 16 h.

Die Auswertung der präparierten LMV2- und LMV2-p53her-Kl8-Zellen im Fluoreszenzmikroskop ergab ein einheitliches DAPI-Verteilungsmuster für beide Zelltypen sowohl mit als auch ohne Bestrahlung. Es waren pro Zelle einzeln vorliegende Zellkerne recht einheitlicher Größe (rund 10 µm Durchmesser) und Form zu erkennen (Abb. 3). Die Bereiche der Nukleoli erschienen ausgespart (geringere Konzentration an DNA, da hier vorwiegend rRNA und Proteine für deren Synthese vorliegen) und die restlichen Kern-Bereiche durch mehr oder weniger stark kondensiertes bzw. aufgelockertes Chromatin durchsetzt. Vereinzelt waren deutlich die stark leuchtenden Chromatiden (kondensiertes Chromatin) von sich mitotisch teilenden Zellen zu beobachten, die gerade die Meta- oder Ana-Phase durchliefen.

Im Gegensatz dazu bot sich bei LMV2-PARPp53her-Kl1 mit und auch ohne Bestrahlung jeweils ein sehr uneinheitliches Bild bezüglich Kern-Größe und –Form. Die mittels Zellzyklusanalyse und im Phasenkontrastmikroskop beobachteten polyploiden bzw. mehrkernigen Zellen, fanden in der DAPI-Färbung in Form großer (bis zu 50 µm Durchmesser), aus vielen, z.T. unvollständig abgeschnürten Kernen, bestehenden Gebilden ihre Bestätigung (Abb. 35 und 36). Als Vorraussetzung zur Bildung dieser Kernmorphologien mußten mehrere DNA-Synthese-Runden ohne Mitose (Endoreduplikation) bzw. mitotische Kernteilung ohne Zytokinese stattgefunden haben. Sehr auffällig war auch, dass diese mehrkernigen Zellen darüberhinaus ausnahmslos DNA in vesikulären Strukturen

abschnürten, wie dies für in Apoptose befindliche Zellen im Gegensatz zu nekrotischen Zellen beschrieben worden ist. Dies bestätigte die Beobachtungen in den Zellzyklusanalysen für diese Zelllinie, nämlich die Identifizierung eines Sub-G1-Peaks, also einer potentiell apoptotischen Zellpopulation. Interessanterweise konnten unter den intakten Zellen ohne Kernabschnürungen nur Zellen mit maximal zwei Kernen beobachtet werden. Auch dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass mit dem Fortschreiten der mitotischen Katastrophe die Zellen in eine Art Apoptose eintreten, wie dies in anderen Beispielen beobachtet worden ist (Chan *et al.*, 1999). Um apoptotische versus nekrotische Prozesse jedoch für LMV2-p53herPARP-KI1 mit Sicherheit nachweisen zu können, bedarf es in der Zukunft allerdings der Analyse durch weitere apoptose-spezifische Nachweismethoden, wie z.B. dem Nachweis der DNA-Leiter-Bildung an chromosomaler DNA.

Was LMV2-PARP-KI3 betraf, zeigten die nicht bestrahlten Kerne ein LMV2vergleichbares Aussehen und Verteilungsmuster (Abb. 35a), wohingegen die Zellkerne nach Bestrahlung vereinzelt (wesentlich seltener als bei LMV2-PARPp53her-KI1) als stark kondensiertes Chromatin mit Kernabschnürungen in Erscheinung traten (Abb. 35b).



**Abb. 34:** Kernmorphologie von LMV2- und LMV2-p53her-Kl8-Zellen. Gezeigt sind Zellen der Kontroll-Zelllinie LMV2 (a, b) und des stabilen Klones LMV2-p53her-Kl8 (c, d) ohne (a, c) und 12 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung mit 5 Gy (b, d) und anschließender DAPI-Färbung. Alle Kulturen wurden insgesamt 16 h mit östradiol-haltigem (1 µM) Kulturmedium inkubiert, d.h. dem Beginn der Östradiolinduktion folgte die Bestrahlung nach 4 h. Alle vier Kulturen zeigten nach fluoreszenzmikroskopischer Analyse ein gleichmäßiges Bild mit Zellkernen einer durchschnittlichen Größe von 10 µm und einer einheitlichen Form.



**Abb. 35:** Kernmorphologie von LMV2-PARP-KI3- und LMV2-PARPp53her-KI1-Zellen. Gezeigt sind Zellen der stabilen Klone LMV2-PARP-KI3 (a, b) und LMV2-PARPp53her-KI1 (c, d) ohne (a, c) und 12 h nach  $\gamma$ -Bestrahlung mit 5 Gy (b, d) und anschließender DAPI-Färbung. Alle Kulturen wurden insgesamt 16 h mit östradiol-haltigem (1 µM) Kulturmedium inkubiert, d.h. dem Beginn der Östradiol-induktion folgte die Bestrahlung nach 4 h. Die LMV2-PARPp53her-KI1-Zellen mit (d) und auch ohne Bestrahlung (c) boten jeweils ein sehr uneinheitliches Bild bezüglich Kern-Größe und -Form. Der lange Pfeil in Teilabbildung *c* und der rechte Pfeil in (d) (am rechten Rand) weisen auf vielkernige Gebilde jeweils einer mehrkernigen Zelle hin, welche zudem DNA-haltige Vesikel abschnüren. Der lange Pfeil links in Teilabbildung *d* weist auf Abschnürungen wie sie für in Apoptose befindliche Zellen typisch sind. Kondensation und Fragmentierung von Zellkernen konnte nach Bestrahlung vereinzelt ebenfalls in LMV2-PARP-KI3-Zellen beobachtet werden (lange Pfeile in *b*), nicht jedoch ohne Bestrahlung (a). Der kurze Pfeil in *b* zeigt auf eine sich in der Mitose befindliche Zelle mit Metaphase-Chromosomen.


Abb. 36: Morphologie von LMV2-p53herPARP-KI1-Zellen im Phasenkontrast und nach DAPI-Färbung und fluoreszenzmikroskopischer Analyse. Dargestellt ist ein Bildausschnitt mit LMV2-PARPp53her-KI1-Zellen 16 Stunden nach Östradiolzugabe zum Medium (ohne Bestrahlung) nach DAPI-Färbung (a) bzw. im Phasenkontrast (b). Gezeigt ist die Heterogenität der Zellmorphologie einschließlich des unterschiedlichen Erscheinungsbildes der Nuklei. Die drei im Durchlicht aufgeblähten und mehrkernig erscheinenden Zellen, zeigten nach DAPI-Färbung DNA-Strukturen, wie sie für in Apoptose befindliche Zellen beschrieben wurden (lange Pfeile). Sie bilden blasenförmige Abschnürungen, die teilweise die Größe normaler Zellkerne erreichen (vgl. die mit langen Pfeilen markierten DNA-Abschnürungen mit den Zellkernen normalen Phänotyps im oberen rechten Bereich des Bildausschnittes). Auffällig ist die unterschiedliche Größe der apoptotischen Kerngebilde. Die kurzen Pfeile deuten auf Kernfragmentierungen, welche nicht nur bei den drei auffällig großen und heterogenen Zellen in der Mitte zu beobachten waren, sondern auch bei kleineren, homogenen Zellen im oberen Bildrand und am unteren rechten Bildrand. Diese befanden sich möglicherweise in einem frühen Stadium der Apoptose, da die typische Kondensierung des Chromatins gut erkennbar war.

#### 3.2.3. Beeinflussung von p53-Zielgenen durch PARP-1

p53 wird nach DNA-Schädigung durch mehrere Kinasen (Meek et al., 1997), Acetylasen (Gu und Roeder, 1997) und möglicherweise auch durch den DNA-Strangbruch-Sensor, PARP-1 (Le Rhun et al., 1998; Wesierska-Gadek et al., 1996; Boulikas, 1993) posttranslational modifiziert. Einige posttranslationale Modifikationen des p53-Moleküls verstärken die Bindung an p53-Erkennungssequenzen, was p53 die transkriptionelle Anschaltung bestimmter Gene für die Ausübung von Wachstums-Arrest (z.B. p21) oder Apoptose (z.B. Bax) ermöglicht (El-Deiry et al., 1993; Miyashita et al., 1994; Miyashita und Reed, 1995). Da die Bedeutung der Poly(ADP-Ribosylierung) für die Ausübung der Aktivitäten von p53 noch widersprüchlich diskutiert wird (Vaziri et al., 1997; Malanga et al., 1998), sollte zunächst für die vorliegenden Zellsysteme überprüft werden, ob PARP-1 die transkriptionelle Anschaltung der p53-Zielgene p21 und Bax beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden die stabilen Klone LMV2-p53her-Kl8, -PARP-Kl3, -PARPp53her-Kl1 und die Kontrollzelllinie LMV2 12 h unbehandelt oder nach  $\gamma$ -Bestrahlung mit 5 Gy geerntet. 4 h vor der Bestrahlung wurden die betreffenden Zellen mittels Zugabe von 1 µM Östradiol zur Anschaltung von p53her oder/und zur Überexpression exogener PARP-1 veranlaßt. Die gesamte Induktionszeit mit Östradiol lag entsprechend für unbestrahlte und bestrahlte Zellen bei 16 h. Aus den geernteten Zellen mit und ohne Bestrahlung wurden Gesamtzellhomogenate hergestellt. Diese wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt, elektrotransferiert und die Banden von Interesse mittels spezifischer Primärantikörper, Peroxidase Sekundärantikörper gekoppelter und anschließender Chemilumineszenzreaktion und Autoradiographie detektiert (Abb. 37). Die  $\alpha$ -Aktin-Detektion diente als Ladekontrolle. Zyklin A läßt Rückschlüsse auf den Anteil der Zellen in der Zellzyklus-Phase S und G2 zu (Sherr, 1996).

Der deutlichste Unterschied für die untersuchten Proteine wurde für p21 beobachtet: bei kurzer Exposition konnte p21 sowohl mit als auch ohne Bestrahlung praktisch ausschließlich und sehr intensiv in den LMV2-PARPp53her-KI1-Zellen dargestellt werden. Bei längeren Expositionen war p21 schwächer auch in den anderen Zelltypen nachweisbar. Zumindest nach Bestrahlung ergab sich ein ähnliches Bild auch für die Bax-Expression, d.h. eine gegenüber den anderen Linien sehr hohe Expression in LMV2-PARPp53her-KI1-Zellen. Auch die Überexpression der PARP-1 vor dem Hintergrund von Mutanten-p53 in LMV2-PARP-KI3-Zellen verursachte nach Bestrahlung ein etwas angehobenes Bax-Niveau. Diese Beobachtung stand in Einklang sowohl mit dem Auftauchen eines Sub-G1-Peaks in der FACS-Analyse Propidiumjodid gefärbter LMV2-PARP-KI3-Zellen, insbesondere von bestrahlten Zellen (s. Kapitel 3.2.2.2), als auch mit dem Erscheinungsbild der Zellkerne nach

DAPI-Färbung im Fluoreszenzmikroskop (s. Kapitel 3.2.2.3), welche nach Bestrahlung zum Teil Kondensation und Fragmentierung von Zellkernen erkennen ließen. Interessanterweise wiesen die PARP-1-überexprimierenden Klone (LMV2-PARP-KI3 und LMV2-PARPp53her-KI1) beide einen höheren Zyklin A-Spiegel auf, was zumindest für LMV2-p53herPARP-KI1-Zellen mit den Daten der Zellzyklusanalysen korrelierte, welche für diesen Klon einen Anstieg der Anteile der Zellen in der Zellzyklusphase G2 auf Kosten der G1-Phase auswiesen.



**Abb. 37:** Western-Blot-Analysen der p53her/PARP-1-Klone mit und ohne  $\gamma$ -Bestrahlung. LMV2-, LMV2-p53her-Kl8- (Kl8), LMV2-PARP-Kl3- (Kl3) und LMV2-PARPp53her-Kl1-Zellen (Kl1) wurden mit Östradiol (1 µM) induziert und 4 h später 5 Gy  $\gamma$ -Bestrahlung ausgesetzt, um nach weiteren 12 h geerntet zu werden. Jeweils 2x10<sup>5</sup> Zellen der erhaltenen Gesamtzellhomogenate (mit und ohne Bestrahlung) wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Membrantransfer wurden die Banden von Interesse mittels spezifischer Antikörper gegen p21, Bax, Zyklin A bzw.  $\alpha$ -Aktin detektiert (siehe Material und Methoden). Die  $\alpha$ -Aktin-Detektion diente als Kontrolle, um sicher zu stellen, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

#### 3.2.4 Analyse des Einflusses von PARP-1 und p53 auf die homologe Rekombination im SV40-Testsystem

Die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität ist eine wichtige Funktion des Tumorsuppressorproteins p53 und es konnte gezeigt werden, dass p53 die homologe Rekombination zwischen SV40-Chromosomen inhibiert (Wiesmüller et al., 1996). Voraussetzung dieser Arbeit war die Etablierung eines Testsystems (Wiesmüller et al., 1996; Abb. 38a) für die guantitative Messung der homologen Rekombinationsraten zwischen SV40-Chromosomen. Dieses Testsystem beruht auf der Koinfektion von Affennierenzellen SV40-Virionen-Typen. mit zwei Die beiden genomischen SV40-DNAs tragen Punktmutationen im Virion-Protein-1-Gen (VP1) an zwei verschiedenen Stellen, die beide zur Expression eines temperatursensitiven VP1-Hüllproteins führen (Ng et al., 1985), deren Defekte sich nicht in trans komplementieren. Es können nur bei der permissiven Temperatur von 32°C Viren produziert werden, nicht jedoch bei der restriktiven Temperatur von 39°C. Das VP1-Protein liegt bei 39°C in einer Konformation vor, die keine Bildung von Viruspartikeln erlaubt. Die Koinfektion der Affennierenzellen erfolgte in dieser Arbeit mit definierter Effizienz der Infektion (MOI = Multiplicity Of Infection) von 1,3 für CV1-Zellen und 0,4 für LLC-MK<sub>2</sub> und LMV2-Zellen, wobei sich die MOI jeweils zur Hälfte in eine der beiden Virentypen aufspaltete (z.B. 0,2 + 0,2 für LLC-MK<sub>2</sub>). Daraus ergab sich, dass in der Kulturschale 20% der mit einem Virustyp infizierten Zellen auch das zweite Virusgenom enthielten. Homologe Rekombination zwischen beiden Mutantenvirengenomen konnte in vivo zur Rekonstitution von SV40-Wildtyp (Wt) führen (Abb. 38a). Mit dem dann exprimierten WtVP1-Protein konnten bei der restriktiven Temperatur von 39°C infektiöse Wildtypviruspartikel gebildet werden, deren Entstehung im Plaque-Assay (Abb. 38a) nachgewiesen werden konnten. Dieser Nachweis fand wiederum bei der restriktiven Dieser Virusnachweis beruht darauf, dass SV40-Wildtypviren Temperatur statt. Affennierenzellen der grünen Meerkatze (CV1) lysieren. Beim Plaque-Assay können die so freigesetzten Viren aufgrund ihrer Mobilitätseinschränkung durch den Softagar nur die direkt angrenzenden Zellen infizieren. Auf diese Weise entsteht nach 14 Tagen ein stecknadelkopfgroßes Loch im Zellrasen (Plaque).

Mit Hilfe der (östradiol-induzierbaren) stabilen Klone LMV2-p53her-Kl8 [endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: p53her], LMV2-PARP-Kl3 [endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: PARP-1], LMV2-PARPp53her-Kl1 [endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: p53her, PARP-1] und der Parentallinie LMV2 [endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: -] wurde der Einfluß von PARP-1 und p53 auf die homologe Rekombination im SV40-Rekombinations-Assay untersucht (Abb. 38b). Die zu testenden Zellen wurden in

getrennten Ansätzen mit den beiden Mutantenviren oder mit Wildtypvirus infiziert, bei 39°C inkubiert und der Virusüberstand später zur Reinfektion eines CV1-Zellrasens (*Plaque*-Assay, 39°C) benutzt. Die entstandenen *Plaques* wurden später ausgezählt und zur Berechnung der jeweiligen Rekombinationsfrequenz der Quotient aus den entstandenen *Plaque*-Zahlen der erfolgreich rekombinierten Mutantenviren und der entsprechenden Wildtypviren gebildet. Hinzu kam ein Korrekturfaktor von 5, welcher der Tatsache Rechnung trug, dass in den Ansätzen mit zwei Mutantenvirentypen nur 20% der viral infizierten Zellen auch doppel-infiziert waren.

Die mit Hilfe des SV40-Rekombinations-Tests erzielten Resultate wurden in Kooperation mit Frau Dipl.-Biol. G.-S. Boehden gewonnen. Die Rekombinationsfrequenzen von vier bis neun Einzelmessungen aus vier voneinander unabhängigen Versuchsreihen wurden gemittelt und mit Standardfehlern in Abb. 38b dargestellt. In Zellen ohne Wtp53, also mit endogenen Mutanten-p53, (LMV2-Kontrollzelllinie) erhielt dem man eine Rekombinationsfrequenz von 9,38x10<sup>-4</sup>, welche fünffach erniedrigt wurde durch Wtp53-Präsenz in LMV2-p53her-Kl8 (2,06x10<sup>-4</sup>). Dieses Ergebnis ähnelte früheren Daten der Arbeitsgruppe, in welchen mittels des entsprechenden Zellsystems ohne Gal4-her [LLC-MK<sub>2</sub>(neo) und LLC-MK<sub>2</sub>(p53her)21] im SV40-Rekombinations-Assay eine Repression der Rekombination durch p53her um den Faktor 12 ermittelt wurde (Dudenhöffer et al., 1998). Erstmalig wurden nun im SV40-Rekombinations-Assay PARP-1 überexprimierende Klone getestet, mit dem Ergebnis, dass in Abwesenheit von Wtp53 (LMV2-PARP-KI3) durch die alleinige PARP-1-Überexpression eine vergleichbare Inhibition der Rekombination erzielt wurde wie durch Wtp53-Expression ohne PARP-1-Überexpression. Mit einem anderen, PARP-1 überexprimierenden Klon (LMV2-PARP-Kl4) lag die Frequenz sogar unter der Nachweisgrenze des Systems von 10<sup>-5</sup> (nicht gezeigt). Überraschend war nun allerdings die fehlende Inhibition der Rekombination in LMV2-PARPp53her-KI1, der beide exogenen Proteine (p53her und PARP-1) koexprimierte. Unter den Bedingungen dieses Zellsystems war kein signifikanter Unterschied zur Kontrollzelllinie LMV2 detektierbar. Dies widersprach nicht nur den Daten für die singuläre PARP-1-Expression, sondern auch denen in der Literatur, die PARP-1 insofern eine antirekombinante Rolle bescheinigten, als mehrere Studien einen Anstieg der homologen Rekombination nach chemischer Inhibition der PARP-1 zeigen konnten (Ferro et al., 1984; Magnusson und Ramel, 1990; Waldman und Waldman, 1991; Puchta et al., 1995).



Abb. 38: Stabile Klone mit p53her und/oder überexprimierter PARP-1 im SV40-Rekombinations-Testsystem. (a) Schematische Darstellung der Funktionsweise des SV40-Rekombinations-Assays (Wiesmüller et al., 1996). Dieser repräsentiert ein Testsystem für die quantitative Erfassung der homologen Rekombination, basierend auf der Infektion mit SV40-Viren und anschließendem Austausch zwischen SV40-Chromosomen. Nach homologer Rekombination zwischen zwei SV40-Virusmutantengenomen kommt es zur Rekonstitution von SV40-Wildtypgenomen. Die resultierenden Viruspartikel sind nun wieder in der Lage CV1-Zellen zu lysieren (nach Reinfektion) und somit im Zellrasen Löcher (Plaques) zu verursachen, die quantitativ analysiert werden können. (b) Ergebnisse für die stabilen Klone im SV40-Rekombinations-Testsystem. Die ermittelten Rekombinationsfrequenzen für die östradiol-induzierten (1µM) stabilen Klone LMV2-p53her-Kl8 (Kl8), LMV2-PARP-KI3 (KI3), LMV2-PARPp53her-KI1 (KI1) und die Parentallinie LMV2 sind auf der rechten Seite der Abbildung dargestellt. Es wurden 4 - 9 Einzelmessungen gemittelt und die resultierenden Werte gemeinsam mit den Standardfehlern angegeben.

### 3.2.5. Analyse des Einflusses von stabil exprimierter PARP-1 bei der homologen Rekombination an episomal vorliegenden Rekombinationssubstraten

Durch die Etablierung eines neuen, auf der Rekonstitution des WtEGFP-Gens basierenden Testsystems, entwickelt innerhalb der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Wiesmüller (Akyüz et al., 2002), eröffnete sich die Möglichkeit zur Bestimmung von Rekombinationshäufigkeiten an DNA-Substraten im Kontext zellulärer Chromosomen und episomalen Substraten. Dieses Testsystem bestimmt Rekombinationsfrequenzen aus dem Anteil grünfluoreszierender Zellen innerhalb von 24 - 72 h nach Initiation. Der Assay wurde dass rekombinanter DNA-Austausch zwischen dergestalt designiert, zwei an unterschiedlicher Stelle mutierten EGFP-Genen die intensive Autofluoreszenz von EGFP reaktiviert. Demzufolge tauchen fluoreszierende Zellen in der Zellpopulation auf, wobei deren Anteil sehr rasch über FACScan-Analyse ermittelt werden kann. Die rekombinative Reparatur wird durch gezielte Doppelstrangbrucherzeugung innerhalb der 5'positionierten EGFP-Variante initiert (s. Abb. 39a). Diese Möglichkeit wurde durch die Einführung der 18 Bp langen Erkennungssequenz der I-Scel Meganuklease in die 5' positionierte, mutierte EGFP-Variante geschaffen (Rouet et al., 1994). Die Expression der Meganuklease erlaubt schließlich, dass in Zellen, welche das EGFP-basierte Rekombinationsplasmid stabil ins Genom integriert tragen, Doppelstrangbrüche im Chromosom an der Position der I-Scel-Erkennungssequenz entstehen. Der anschließende genetische Austausch zwischen der 5' positionierten, geschnittenen EGFP-Variante (Akzeptor-EGFP) und der 3' in gleicher Orientierung positionierten EGFP-Variante (Donor-EGFP) führt mit einer gewissen Häufigkeit zur Wiederherstellung der WtEGFP-Sequenz an der 5'-Position, welche einem CMV-Promotor zur Expression folgt. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Rekombinationsplasmid, bei welchem in der 3' positionierten EGFP-Variante durch Mutation das Startmethioninkodon durch zwei Stopkodons ersetzt wurde, können sowohl konservative als auch nicht-konservative, also deletierende, homologe Rekombinationsereignisse nachgewiesen werden. Als Rekombinationsakzeptoren standen EJ-, HR- und A-EGFP zur Verfügung, welche jeweils die 18 Bp lange I-Scel-Erkennungssequenz trugen. Alle drei Rekombinationsakzeptoren sind in der Chromophorregion (Kodons 65-67) mutiert. Entweder fehlen ihnen unterschiedlich große Bereiche in dieser Region (*A*- und *HR-EGFP*) oder sie enthalten eine Verdopplung von 5 Bp, also Mikrohomologien (EJ-EGFP). In die Deletionsstelle (*A*- und *HR-EGFP*) bzw. zwischen die verdoppelte Sequenz (*EJ-EGFP*) wurde die 18 Bp lange I-Scel-Erkennungssequenz (gekennzeichnet durch schwarzes Dreieck in Abb. 39a) inseriert. Die Induktion eines Doppelstrangbruches mit Hilfe der Meganuklease I-Scel im EJ-EGFP-Rekombinationsakzeptor hatte also zur Folge, dass

*WtEGFP* durch NHEJ (*Non Homologous End Joining*, s. Kapitel 1.1) zwischen den den Bruch flankierenden Mikrohomologien wie auch durch homologe Rekombination mit dem Donor rekonstituiert werden konnte. Die Rekombinationsakzeptoren  $\Delta$ - und *HR-EGFP* erlauben keinerlei NHEJ-vermittelte *WtEGFP*-Reaktivierung, sondern unterscheiden sich im Ausmaß der Deletion in der Chromophorregion und –noch viel wichtiger- in der Länge der Homologien zum Donor in der Nachbarschaft des Doppelstrangbruches. Für eine erfolgreiche homologe Rekombination wurde eine Mindestlänge von 200 Bp 100%iger Homologie der zu rekombinierenden Substrate als essentiell beschrieben (Elliot *et al.*, 1998; Rubnitz und Subramani, 1984). *HR-EGFP* weist mindestens 194 Bp und  $\Delta$ - *EGFP* 168 Bp an ununterbrochener Homologie zum Donor auf.

Um sicherzustellen, dass die mit Hilfe des auf SV40-Viren basierenden Systems gewonnenen Ergebnisse auch auf der Basis alternativer Testverfahren zutreffend sind, wurde nun das auf EGFP-Rekonstitution basierende System auf stabil PARP-1 und/oder p53her exprimierende Klone angewandt. Hierfür wurden die in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Klone mit stabiler PARP-1- und/oder p53her-Expression mit episomal vorliegenden Rekombinationssubstraten basierend auf 3'EGFP als Rekombinationsdonor und mit EJ-EGFP, HR-EGFP oder *A*-EGFP als Rekombinationsakzeptoren analysiert. Die stabilen Klone LMV2-p53her-Kl8 [endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: p53her], LMV2-PARP-Kl3 [endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: PARP-1], LMV2-PARPp53her-Kl1 [endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: p53her, PARP-1] und die Parentallinie LMV2 [endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: -] wurden mit dem Vektor p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-EJ, - $\Delta$  oder –HR (Abb. 39a) und dem pCMV-I-Scel-Meganuklease-Expressionsvektor kotransfiziert. Parallel dazu wurden die gleichen Klone mit pCMV-I-Scel und pEGFP-N1, also WtEGFP-Expressionsplasmid kotransfiziert (Positivkontrolle). Desweiteren wurde in parallelen Ansätzen der Rekombinationsvektor p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR gegen das Negativkontrollplasmid p5bPuroCMV-HR (mit Akzeptor HR-EGFP, ohne Donor) oder p5xtrshSV40-Hyg (mit Donor 3'EGFP, ohne Akzeptor) substituiert und mit pBS kotransfiziert. Nach 72 h Kultivierung in Gegenwart von 1 µM Östradiol wurden die Rekombinationshäufigkeiten durch Messung am FACScan mit Hilfe der Dot-Plot-Analyse bestimmt. Die Fluoreszenzauswertung erfolgte nicht wie bei der Einzelfluoreszenzanalyse üblich im FL1-Histogramm, sondern mittels Dot-Plot wegen der optimaleren Trennung von orangefarbener zellulärer Eigen- und grüner EGFP-Fluoreszenz. Während der Optimierungsarbeiten für dieses Rekombinationsmeßverfahren war nämlich beim Vergleich der ermittelten Werte im FL1-Histogramm gegenüber denen im FL1-FL2-Dot-Plot (FL1 für Grünfluoreszenz, FL2 für orange Eigenfluoreszenz) festgestellt worden, dass durch die Dot-Plot-Darstellungsweise die grünfluoreszierenden Zellen klarer von den nicht fluoreszierenden

getrennt werden konnten und sich somit ein extrem verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis ergab (Akyüz *et al.*, 2002). Die Anteile der grünfluoreszierenden Zellen wurden jeweils aus drei Messungen gemittelt. Um Rekombinationsfrequenzen bezogen auf die transfizierten Zellen zu erhalten, wurden diese Werte gegen die Positivkontrolle korrigiert. Aus den resultierenden Werten wurden relative Rekombinationsfrequenzen errechnet, indem die Werte mit der Kontrollzelllinie LMV2 als 100% definiert wurden. Die absoluten Rekombinationsfrequenzen mit LMV2-Zellen lagen für Donor *EJ-EGFP* bei 19,6%, *HR-EGFP* bei 11,5% und  $\Delta$ -*EGFP* bei 11,5%. In den Negativkontrollen konnten keine fluoreszierenden Zellen detektiert werden.

Die Ergebnisse zu den relativen Rekombinationsfrequenzen sind in Abb. 38b dargestellt. Nach Wtp53-Expression (LMV2-p53her-Kl8) wurden die Rekombinationsfrequenzen mit den verschiedenen Rekombinationssubstraten durchweg um 20-30% gesenkt, wobei die Limitierung der homologen Seguenzen in *A-EGFP* keinen deutlichen Effekt im Veraleich zur längeren homologen Veraleichsseguenz in HR-EGFP zeigte. Auch die Einführung von Mikrohomologien in EJ-EGFP für NHEJ zeigte keine Wirkung auf die Regulation der Rekombination durch Wtp53. Die PARP-1-Überexpression dem Hintergrund von Mutanten-p53 (LMV2-PARP-KI3) erbrachte dieselben vor Rekombinationsergebnisse wie jeweils das vergleichbare Zellsystem mit p53her-Expression (LMV2-p53her-KI8), also durchweg Reduktion der Rekombinationsfrequenzen. Unterschiede zeichneten sich jedoch für das LMV2-PARPp53her-KI1-Zellsystem mit Expression beider Proteine (p53her und PARP-1) ab. Während die Rekombination am Substrat mit EJ-EGFP in LMV2-PARPp53her-KI1 der in den Kontrollzellen LMV2 entsprach, konnte sogar eine 20-40% ige Steigerung der Rekombinationshäufigkeiten in LMV2-PARPp53her-KI1-Zellen versus LMV2-Zellen infolge der homologen Rekombination an HR- und *A-EGFP*-Substraten beobachtet werden. Dieses Ergebnis, nämlich eine fehlende Beeinflussung oder gar Steigerung der relativen Rekombinationsfrequenz infolge homologer Rekombination bei PARP-1-Überexpression und bei gleichzeitiger p53her-Expression stand zwar im Widerspruch zur inhibierenden Wirkung der Einzelfaktoren, war aber konsistent mit den im SV40-Rekombinations-Testsystem beobachteten Werten für diesen Klon.



Abb. 39: Rekombination an episomalen Substraten in stabilen Klonen mit p53her und/oder überexprimierter PARP-1. Vergleich der relativen Rekombinationsfrequenzen in den östradiolinduzierbaren stabilen Klonen LMV2-p53her-Kl8 (Kl8), LMV2-PARP-Kl3 (Kl3), LMV2-PARPp53her-Kl1 (KI1) und der Parentallinie LMV2 72 h nach Östradiolinduktion und Transfektion mit dem Rekombinationssubstrat p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-EJ, -HR oder -A, welche sich in der Beschaffenheit des Rekombinationsakzeptors unterscheiden (Beschreibung im Text). In allen Versuchsansätzen wurden Doppelstrangbrüche initiiert durch Kotransfektion mit dem pCMV-I-Scel-Meganuklease-Expressionsvektor. Die Transfektionseffizienzen lagen zwischen 1 und 55%. (a) Aufbau der Rekombinationssubstrate. In 3'EGFP wurde das Startmethionin des WtEGFP durch zwei Stopkodons ersetzt (schwarzes Kreuz). Nach Spaltung von EJ-, HR- oder Δ-EGFP an der I-Scel-Erkennungssequenz (schwarzes Dreieck) liefert 3'EGFP im Verlauf des genetischen Austausches die fehlende Information zur Rekonstitution von WtEGFP. Die innerhalb der für den Chromophor kodierenden Region lokalisierte I-Scel-Erkennungssequenz wurde durch ein schwarzes Dreieck markiert. (b) Relative Rekombinationsfrequenzen. Die absolute Rekombinationsfrequenz in der Kontrollzelllinie LMV2 wurde jeweils als 100% definiert und die Ergebnisse in den stabilen Klonen relativ dazu ins Verhältnis gesetzt.

#### 3.2.6. Untersuchungen zur Rolle von PARP-1 in der homologen Rekombination an episomal vorliegendem DNA-Substrat

Um sicherzustellen, dass die mit den stabilen, p53her und /oder PARP-1 exprimierenden Klonen in den Kapiteln 3.2.4 und 3.2.5 gewonnenen Daten mit Sicherheit nicht auf klonale Besonderheiten zurückzuführen sind, und um die Wirkung der dominant negativen PAPP-1-Variante PARP-DBD untersuchen zu können, wählte ich ein alternatives Expressionsverfahren im gleichen Parentalzelltyp LLC-MK<sub>2</sub>. Aus den Arbeiten von Dipl.-Biol. C. Dudenhöffer (Dudenhöffer et al., 1998) und Dipl.-Biol. G.-S. Boehden (Boehden et al., eingereicht) standen zwei von der Rhesusaffenzelllinie LLC-MK<sub>2</sub> abgeleitete Zelllinien zur Verfügung, nämlich die p53her exprimierende Linie LLC-MK<sub>2</sub>(p53her)21 und die Kontrollzelllinie LLC-MK<sub>2</sub>(neo), welche nur die endogene p53-Mutante p53( $\Delta$ 237-239) produziert. Zur Anwendung des neu entwickelten, auf EGFP-Fluoreszenz basierenden, Rekombinations-Assays (Akyüz et al., 2002) auf LLC-MK<sub>2</sub>(neo) und LLC-MK<sub>2</sub>(p53her)21 wurde der Rekombinationsvektor p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR (Abb. 40a) in die Zellen transient transfiziert. Zur Bestimmung der von I-Scel, also der Erzeugung von Doppelstrangbrüchen, abhängigen Rekombinationsfrequenzen mit PARP-DBD- bzw. PARP-1-Überexpression wurden die isogenen Klone LLC-MK<sub>2</sub>(neo) und LLC-MK<sub>2</sub>(p53her)21 jeweils mit den unter 1-6 aufgeführten Expressions- und Kontrollplasmiden und pCMV-I-Scel sowie p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR kotransfiziert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass in allen Transfektionsansätzen die gleichen Mengen an Gesamt-DNA eingesetzt wurden, indem mit dem Kontrollvektor pBS die Menge komplettiert wurde.

- 1.) pBS (Kontrollplasmid)
- 2.) pCMVp6 (Plasmid zur PARP-DBD-Expression mit vorgeschaltetem CMV-Promotor)
- 3.) pCMVp31(Plasmid zur PARP-1-Expression mit vorgeschaltetem CMV-Promotor)
- 4.) pBS und p5bPuroCMV-WtEGFP (Plasmid zur WtEGFP-Expression mit vorgeschaltetem CMV-Promotor, Positivkontrolle zu 1.)
- 5.) pCMVPp6 und p5bPuroCMV-WtEGFP (Positivkontrolle zu 2.)
- 6.) pCMVp31 und p5bPuroCMV-WtEGFP (Positivkontrolle zu 3.)

Desweiteren wurde der Rekombinationsvektor p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR gegen das Negativkontrollplasmid p5bPuroCMV-HR (mit Akzeptor *HR-EGFP*, ohne Donor) oder p5xtrshSV40-Hyg (mit Donor 3*´EGFP*, ohne Akzeptor) substituiert und mit pBS kotransfiziert.

Die Zellen wurden nach Transfektion in östradiol-haltigem Medium (1  $\mu$ M) zur Anschaltung von p53her kultiviert. 72 h nach Transfektion wurden die Rekombinationshäufigkeiten durch Messung am FACScan mit Hilfe der Dot-Plot-Analyse bestimmt. Die Anteile der grünfluoreszierenden Zellen wurden jeweils aus drei Messungen gemittelt. Um Rekombinationsfrequenzen bezogen auf die transfizierten Zellen zu erhalten, wurden diese Werte gegen die jeweilige Positivkontrolle korrigiert und anschließend relative Frequenzen in Bezug auf den Probenansatz von LLC-MK<sub>2</sub>(neo) mit pBS errechnet, der als 100% definiert wurde.

In den Negativkontrollen konnten keine fluoreszierenden Zellen detektiert werden. Die absoluten Rekombinationsfrequenzen lagen vier bis fünf Zehnerpotenzen höher als in vergleichbaren Experimenten mit SV40-Minichromosomen (Kapitel 3.2.4) oder mit chromosomal integriertem Rekombinationsvektor (Akyüz *et al.*, 2002 bzw. Kapitel 3.2.6. So wurde in der Referenzprobe LLC-MK<sub>2</sub>(neo) mit pBS eine absolute Rate von 29,3% ermittelt. In Abb. 40b sind die relativen Rekombinationsfrequenzen zusammengefasst. Durch PARP-DBD- bzw. PARP-1-Expression kam es sowohl in LLC-MK<sub>2</sub>(neo)- als auch in LLC-MK<sub>2</sub>(p53her)21-Zellen zu einer Inhibition der Rekombinations. Während im Zellsystem ohne p53 die PARP-DBD-Expression eine stärkere Rekombinationsinhibition als die PARP-1-Expression zur Folge hatte, war dieser Inhibitionseffekt im Zellsystem mit funktionell induziertem p53 nahezu gleich. Bemerkenswert war jedoch, dass die Inhibition der Rekombination, welche durch p53her-Expression verursacht wurde, durch zusätzliche Überexpression der PARP-DBD oder der PARP-1 geringfügig verstärkt wurde.

Die Expression der PARP-DBD und die PARP-1-Überexpression wurden im Western-Blot mit dem Antikörper F-I-23 nachgewiesen. Dieser monoklonale Antikörper erkennt PARP-1 N-terminal und daher nicht nur die Vollelänge-PARP-1 sondern auch die PARP-DBD (Abb. 41).



Abb. 40: PARP-abhängige Rekombination an episomalem Substrat. Vergleich der relativen Rekombinationsfrequenzen in LLC-MK<sub>2</sub>(neo) und LLC-MK<sub>2</sub>(p53her)21 72 h nach Transfektion mit den PARP-DBD- und PARP-1-Expressionsvektoren pCMVp6 bzw. pCMVp31, sowie episomalem Rekombinationssubstrat p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR. In allen Versuchsansätzen wurden Kotransfektion pCMV-I-Scel-Meganuklease-Doppelstrangbrüche initiiert durch mit dem Expressionsvektor. Außerdem wurde dem Medium nach der Transfektion 1µM Östradiol beigefügt. Die Transfektionseffizienzen reichten von 5-13%. (a) Aufbau des Rekombinationssubstrates. (b) Relative Rekombinationsfrequenzen. Die absolute Rekombinationsfrequenz in der Kontrollzelllinie LLC-MK<sub>2</sub>(neo) ohne PARP-Transfektion wurde als 100% definiert und die Ergebnisse in den transfizierten Klonen relativ dazu ins Verhältnis gesetzt.



**Abb. 41:** Western-Blot-Analyse zum Nachweis der PARP-DBD und der Volle-Länge-PARP-1 für die transienten Assays. Dargestellt ist das Proteinexpressionsmuster in LLC-MK<sub>2</sub>(neo) und LLC-MK<sub>2</sub>(p53her) 48 h nach Transfektion mit pCMVp6 (PARP-DBD, 38 kDa) oder pCMVp31 (PARP-1, 113 kDa) bzw. pBS (Negativkontrollvektor) nach Detektion mit dem Primärantikörper F-I-23. Als Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Aktin verwendet.

## 3.2.7 Rolle von PARP-1 in der homologen Rekombination im Kontext zellulärer Chromosomen

Es wurden MHHR-4- und MHHR-her12-Zellen verwendet, welche eigens dafür generiert wurden, um Rekombinationsereignisse im chromosomalen Genomkontext untersuchen zu können (Akyüz et al., 2002). Zur Generierung von MHHR-4-Zellen wurde der retrovirale Rekombinationsvektor p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR (Abb. 43a) in KMV5-Zellen (p53-negative humane Leukämie-Zelllinie mit Gal4-her-Expression) chromosomal integriert. Zur Änderung des p53-Status wurde in MHHR-her12-Zellen zusätzlich zur Rekombinationsvektorintegration das Fusionsprotein aus Wtp53 und der Östradiolbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors stabil zur Expression gebracht, da in diesem konditionalen System die Wachstumsinhibition durch Wtp53 während der Zellkultur unter östradiolfreien Bedingungen minimiert werden konnte (Roemer und Friedman, 1993). Die resultierenden Klone (MHHR 1-4 und MHHR-her12 und -13) wurden als puromycin-resistente Einzelzellklone in Softagar isoliert und die Integrität der chromosomal inserierten Rekombinationsplasmide mittels genomischer PCR von Dipl.-Biol. N. Akyüz überprüft (Akyüz et al., 2002) und über Western-Blot-Analyse die Expression von p53her bestätigt (s. Abb. 42). Ohne Einführung gezielter Doppelstrangbrüche lag der Anteil an EGFP-positiven Zellen unter 10<sup>-4</sup>, d.h. spontane Rekombinationsereignisse waren selten.





**Abb. 42:** Western-Blot-Analyse der Klone MHHR-her12 und –13 zum Nachweis von p53her. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Gesamtzelllysate der zu testenden Klone und anschließendem Membrantransfer erfolgte die Detektion der p53her-Bande (90 kDa) mittels Primärantikörper DO1. Die Parentalzelllinie KMV5 diente als Negativkontrolle.

Zur Bestimmung der von I-Scel abhängigen Rekombinationsfrequenzen mit PARP-1bzw. PARP-DBD-Überexpression wurden die repräsentativen Klone MHHR-4 (p53-negativ) und MHHR-her12 (mit p53her) jeweils mit dem I-Scel-Expressionsplasmid pCMV-I-Scel (Rouet *et al.*, 1994) und den folgenden aufgeführten Vektoren koelektroporiert:

- 1.) pBS (Kontrollplasmid mit vorgeschaltetem CMV-Promotor)
- 2.) pCMVp6 (Plasmid zur PARP-DBD-Expression mit vorgeschaltetem CMV-Promotor)
- 3.) pCMVp31 (Plasmid zur PARP-1-Expression mit vorgeschaltetem CMV-Promotor)
- 4.) pBS und pEGFP-N1 (Plasmid zur WtEGFP-Expression mit vorgeschaltetem CMV-Promotor (Positivkontrolle zu 1.)

- 5.) pCMVp6 und pEGFP-N1 (Positivkontrolle zu 2.)
- 6.) pCMVp31 und pEGFP-N1 (Positivkontrolle zu 3.)
- 7.) pGC (Kontrollplasmid mit vorgeschaltetem GC-Promotor)
- 8.) pGCp6 (Plasmid zur PARP-DBD-Expression mit vorgeschaltetem GC-Promotor)
- 9.) pGCp31 (Plasmid zur PARP-1-Expression mit vorgeschaltetem GC-Promotor)
- 10.) pGC und pEGFP-N1 (Positivkontrolle zu 7.)
- 11) pGCp6 und pEGFP-N1 (Positivkontrolle zu 8.)
- 12.) pGCp31 und pEGFP-N1 (Positivkontrolle zu 9.)

Der GC-Promotor enthält Gal4 responsive Elemente (sog. GREs), welche von Gal4her in KMV5-Zellen erkannt werden (Braselmann et al., 1993). Durch die Verwendung zweier verschiedener Promotoren sollten die Expressionsbedingungen variiert werden. Nach Kultivierung der elektroporierten Zellen für 72 h bei 37°C mit Östradiol (200 nM) wurden pro Messung 30.000 Zellen am FACScan analysiert. Der Anteil der grünfluoreszierenden Zellen wurde aus jeweils sechs Messungen aus zwei voneinander unabhängigen Versuchsreihen gemittelt. Um Rekombinationsfrequenzen, bezogen auf transfizierte Zellen zu erhalten, wurden diese Werte gegen die jeweilige Positivkontrolle (entspricht der Transfektionseffizienz) korrigiert.

Während die gemessene Rekombinationsfrequenz für die Parentalzelllinie MHHR-4 mit dem Kontrollvektor pBS in dieser Versuchsreihe bei 7,2x10<sup>-4</sup> lag, beobachtete ich nach Elektroporation mit pCMVp6 zur PARP-DBD-Expression und mit pCMVp31 zur PARP-1-Expression eine fast vollständige Unterdrückung des DNA-Austausches. So wurden für die PARP-DBD- bzw. PARP-1-exprimierenden Reaktionsansätze Werte von jeweils 0,1x10<sup>-4</sup> erreicht, also Werte im Bereich der Nachweisgrenze von 10<sup>-5</sup> bis 10<sup>-4</sup> (Abb. 43b). Da nach p53her-Expression mittels genomisch integriertem Expressionsvektor unter denselben Versuchsbedingungen eine 2-18fache Inhibition (für späte bzw. frühe Passagenzahlen) der homologen Rekombination nachgewiesen wurde (Akyüz et al., 2002), überraschte es nicht, dass Rekombinationsereignisse in den p53her exprimierenden MHHR-her12-Versuchsansätzen mit dem PARP-DBD- bzw. PARP-1-Vektor, pCMVp6 bzw. pCMVp31, nicht mehr detektierbar waren (nicht gezeigt).

Um ausschließen zu können, dass die mittels CMV-Promotor bewerkstelligte starke Expression der PARP-Varianten eine unphysiologisch starke Unterdrückung der Rekombination auslöste, wurde ein neues Expressionssystem erprobt, nämlich das von Gal4-her in östradiolabhängiger Art und Weise aktivierte pGC-Vektorsystem (siehe Kapitel 3.2.1). Dieses Expressions-Vektorsystem vermittelt eine um den Faktor 100 geringere Proteinexpression als pCMV-Vektorsysteme (Akyüz *et al.*, 2002). In der Versuchsreihe mit

entsprechend geringer exprimierter PARP-DBD oder PARP-1 (Abb. 43c) blieb die Rekombinationshäufigkeit im Vergleich zur Kontrolle in MHHR-4-Zellen praktisch unverändert. Wie erwartet zeigte der Vergleich der Rekombinationsfrequenzen zwischen den isogenen Klonen MHHR-4 und MHHR-her12, dass durch die Expression des humanen Wtp53 in Fusion mit der Östradiolbindedomäne des Östrogenrezeptors in MHHR-her12 die Rekombinationshäufigkeit abnahm. nämlich in dieser Versuchsreihe zweifach. Interessanterweise wurde in den MHHR-her12-Zellen die Inhibition der Rekombination durch PARP-DBD noch weiter verstärkt und zwar in SO starkem Maße, dass die Nachweisbarkeitsgrenze von hier 3x10<sup>-5</sup> unterschritten wurde (Abb. 43c). Fast das gleiche Ergebnis wie für die MHHR-her12-Zellen mit PARP-DBD, bot sich für jene mit PARP-1-Überexpression (Abb. 43c): Die Rekombinationsfrequenz betrug 0,6x10<sup>-4</sup>. Für die Koexpression von PARP-DBD bzw. PARP-1 und p53her auf niedrigem Niveau offenbarte sich ein synergistischer Effekt bezüglich der Inhibierung der homologen Rekombination.



**Abb. 43:** PARP-abhängige Rekombination an chromosomalem Substrat. Vergleich der Rekombinationshäufigkeiten für die isogenen Klone MHHR-4 (p53-negativ) und MHHR-her12 (p53her), welche mit Expressionsvektoren für PARP-DBD oder PARP-1 elektroporiert wurden. Alle Probenansätze wurden mit pCMV-I-Scel koelektroporiert und anschliessend für 72 h mit Östradiol im Medium (200 nM) inkubiert. (a) Aufbau des Rekombinationsvektor p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR. (b) MHHR-4-Zellen nach transienter Elektroporation mit pCMVp6 bzw. pCMVp31. PARP-DBD bzw. PARP-1 wurde mittels CMV-Promotor stark zur Expression gebracht. Als Kontrollvektor diente pBS. (c) MHHR-4 und MHHR-her12-Zellen nach transienter Elektroporation mit pGCp6 und pGCp31. Die Genexpression von PARP-DBD und PARP-1mittels pGCp6 und pGCp31 wurde über den schwachen GC-Promotor reguliert, Kontrollvektor war pGC. Es wurden jeweils sechs Einzelmessungen aus zwei unterschiedlichen Versuchsreihen berücksichtigt. Die Transfektionseffizienzen betrugen 23-33% (a) bzw. 11-15% (b).

### 3.2.8. Einfluß des Caspase-3,-6,-7,-8,-10-Inhibitors Z-DEVD-FMK auf die homologe Rekombination nach stabiler Expression von PARP

Aus den Ergebnissen in den Kapiteln 3.2.4 bis 3.2.7 ergab sich nun eine Diskrepanz für die Beeinflussung der Rekombinationsraten als Antwort auf stabile versus transiente PARP-1-Expression. In diesem Zusammenhang erschien es wichtig, dass in der Literatur bereits beschrieben wurde, dass PARP-1 einen Faktor darstellt, der unter bestimmten Umständen Apoptose und Nekrose verursachen kann (Shall und de Murcia, 2000). Nun wurden in dieser Arbeit Indizien dafür gesammelt, dass nach stabiler PARP-1-Überexpression, vor allem nach Bestrahlung, 3-17% der betreffenden Zellen absterben, wobei diese apoptotische Charakteristika aufwiesen (s. Kapitel 3.2.2.3 und 3.2.3). Vor allem in Klon LMV2-PARPp53her-Kl1 mit gleichzeitiger Expression von exogener PARP-1 und p53her wurde ein Anteil von bis zu 17% absterbenden Zellen beobachtet und gleichzeitig ein Anstieg homologer Rekombinationsereignisse festgestellt. Um zu überprüfen, ob mögliche apoptotische Vorgänge in der Zellpopulation einen indirekten Einfluß auf die homologe Rekombination ausübten, wurden Versuche mit dem Caspase-Inhibitor Z-DEVD-FMK [Z- $Asp(OCH_3)$ -Glu(OCH\_3)-Val-Asp(OCH\_3)-FMK] durchgeführt. Durch die Inhibition der Caspasen 3, 6, 7, 8 und 10 wird die Exekution der Apoptose gehemmt (Nicholson, 1995; 1996; Schlegel, 1996), welche möglicherweise einen indirekten Effekt auf die homologe Rekombination ausüben könnte. Darüberhinaus wurde Vorliegen das von Doppelstrangbrüchen als starkes Apoptosesignal variiert, indem diese Versuche zum einen mit I-Scel-Expression und zum anderen ohne durchgeführt wurden.

Die stabilen Klone LMV2-p53her-Kl8 (endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: p53her), LMV2-PARP-Kl3 (endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: PARP-1), LMV2-PARPp53her-Kl1 (endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: p53her, PARP-1) und LMV2 (endogen: p53( $\Delta$ 237-239), PARP-1; exogen: -) wurden jeweils mit Rekombinationssubstrat p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR (Abb. 43a) transfiziert. Eine Hälfte der Proben wurde zudem mit dem pCMV-I-*Sce*I-Meganuklease-Expressionsvektor kotransfiziert (Abb. 44a), die andere Hälfte nicht (Abb. 44b). Jeder dieser Ansätze wurde mit und ohne Caspase-Inhibitor-Zusatz durchgeführt (Abb. 44a,b). Nach 72 h (mit 1  $\mu$ M Östradiol) wurden die Rekombinationshäufigkeiten am FACScan und Datenauswertung mit Hilfe der Dot-Plot-Analyse bestimmt (s. Kapitel 3.2.5). Die Anteile der grünfluoreszierenden Zellen wurden jeweils aus drei Messungen gemittelt. Um Rekombinationsfrequenzen bezogen auf die transfizierten Zellen zu erhalten, wurden diese Werte gegen die Positivkontrolle (Transfektion mit dem Vektor p5bPuroCMV-WtEGFP) korrigiert. Aus den resultierenden Werten wurden

relative Rekombinationsfrequenzen errechnet, indem die mit der Kontrollzelllinie LMV2 erhaltenen Werte als 100% definiert wurden (absolute Rekombinationsfrequenz: 10,4%).

Die Ergebnisse der relativen Rekombinationsfrequenzen sind in Abb. 44a (mit I-Scel) und Abb. 44b (ohne I-Scel) dargestellt. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Änderungen zu den bereits in Abschnitt 3.2.5 ohne Caspase-Inhibitor und mit I-Scel erhaltenen Daten. Der einzige Unterschied in der Versuchsanordnung hier bestand darin, dass DMSO, also das Lösungsmittel des Caspase-Inhibitors, in den Kontrollen in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) zugegeben wurde. Auch dieses Ergebnis zeigte eine fehlende Inhibition der homologen Rekombination nach PARP-1-Überexpression und gleichzeitiger p53her-Expression, ja sogar eine leichte Stimulierung der Rekombination (Abb. 44a). Dies stand wiederholt im Widerspruch zur inhibierenden Wirkung von jeweils PARP-1 und p53her alleine, war aber konsistent mit den im SV40-Rekombinations-Testsystem für die mit LMV2-PARPp53her-KI1 beobachteten Werte (Abschnitt 3.2.4) und korrelierte mit den bisherigen Rekombinationsdaten, welche mit dem Testsystem basierend auf Wt*EGFP*-Rekonstitution erhalten worden waren (Abschnitt 3.2.5).

Nach Zugabe des Caspase-Inhibitors wurde im Vergleich zu den entsprechenden Versuchen ohne Caspase-Inhibitor ein signifikanter Unterschied (p=0,034) in den relativen Rekombinationsfrequenzen für Klon LMV2-PARPp53her-Kl1 festgestellt (Abb. 44a). Durch Caspase-Inhibition kam es zu einer Senkung der Frequenz unter die Werte, welche für die Parentalzelllinie LMV2 bestimmt wurden.

Ohne I-Scel (Abb. 44b) und ohne Caspase-Inhibitor bot sich im Vergleich zu den entsprechenden Versuchen mit Expression der Meganuklease ein etwas anderes Bild. Zunächst lagen die absoluten Raten insgesamt deutlich niedriger, so für die Kontrollzelllinie LMV2 bei 5,9% statt 10,4%. Nach Wtp53-Expression (LMV2-p53her-Kl8) konnte eine stärkere Inhibition der Rekombinationsfrequenz relativ zu LMV2 beobachtet werden (59%) im Vergleich zu dem Ergebnis mit I-Scel (84%). Darüberhinaus zeigte sich im Gegensatz zu allen bisherigen Ergebnissen mit I-Scel, dass die PARP-1-Überexpression vor dem Hintergrund von Mutanten-p53 (LMV2-p53her-Kl3) ohne I-Scel keine Wirkung auf die Regulation der Rekombination ausübte. Für das Zellsystem mit ektopischer Expression beider Proteine (p53her und PARP-1 in LMV2-PARPp53her-Kl1) konnte wiederum eine 39% ige Steigerung der Rekombinationshäufigkeiten versus den entsprechenden LMV2-Zellen mit *HR-EGFP*-Substrat beobachtet werden. Dieses Ergebnis, nämlich eine Steigerung der relativen Rekombinationsfrequenz infolge homologer Rekombination bei PARP-1-Überexpression und bei gleichzeitiger p53her-Expression stand nun erstmalig einer nicht

inhibierenden Wirkung von PARP-1 als Einzelfaktor gegenüber. Nach Zugabe des Caspase-Inhibitors, wurden im Vergleich zu den entsprechenden Versuchen ohne Caspase-Inhibitor wiederum signifikante Unterschiede in den relativen Rekombinationsfrequenzen ausschließlich für LMV2-PARPp53her-KI1-Zellen festgestellt (Abb. 44b). Auch hier verursachte die Inhibition der Caspasen eine Senkung der Frequenz, nämlich um 37% (p=0,009).





### 3.2.9 Effekt des Caspase-Inhibitors auf die homologe Rekombination nach transienter Expression von PARP-1

Ein indirekter Effekt durch mögliche apoptotische Vorgänge sollte auch für die Rekombinationsversuche, welche mit den isogenen Klonen LLC-MK<sub>2</sub>(neo) und LLC-MK<sub>2</sub>(p53her)21 durchgeführt worden waren, ausgeschlossen werden. Daher wurden diese beiden Zelllinien jeweils mit den unter 1-6 aufgeführten Plasmiden und dem Rekombinationssubstrat p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR kotransfiziert. Zudem wurde in der Hälfte dieser Versuche mit pCMV-I-*Sce*l kotransfiziert. Hierbei wurde darauf geachtet, daß in allen Transfektionsansätzen die gleichen Mengen an Gesamt-DNA eingesetzt wurden, indem mit dem Kontrollvektor pBS die Mengen ausgeglichen wurden.

- 1.) pBS (Kontrollplasmid)
- 2.) pCMVp6 (Plasmid zur PARP-DBD-Expression mit vorgeschaltetem CMV-Promotor)
- 3.) pCMVp31 (Plasmid zur PARP-1-Expression mit vorgeschaltetem CMV-Promotor)
- 7.) pBS und p5bPuroCMV-WtEGFP (Plasmid zur WtEGFP-Expression mit vorgeschaltetem CMV-Promotor (Positivkontrolle zu 1.)
- 8.) pCMVp6 und p5bPuroCMV-WtEGFP (Positivkontrolle zu 2.)
- 9.) pCMVp31 und p5bPuroCMV-WtEGFP (Positivkontrolle zu 3.)

Die Zellen wurden nach Transfektion in östradiol-haltigem Medium (1 µM) zur 72 Anschaltung von p53her kultiviert. h nach Transfektion wurden die Rekombinationshäufigkeiten durch Messung der grünfluoreszierenden Zellen bestimmt (n=3). Um Rekombinationsfrequenzen bezogen auf die transfizierten Zellen zu erhalten, wurden diese Werte gegen die jeweilige Positivkontrolle korrigiert und anschließend relative Frequenzen in Bezug auf die Werte zu LLC-MK<sub>2</sub>(neo) mit pBS errechnet, welche als 100% definiert wurden. Die resultierenden relativen Rekombinationsfrequenzen wurden in Abb. 45a (mit I-Scel) und Abb. 45b (ohne I-Scel) zusammengefasst.

Bei den Kontrollversuchen mit nur DMSO, aber ohne Caspase-Inhibitor ergaben sich keine Unterschiede zu den bereits in Abschnitt 3.2.6 durchgeführten Experimenten mit I-Scel-Expression. Darüberhinaus zeigten sich auch nach Zugabe des Caspase-Inhibitors keine signifikanten Unterschiede Unterschiede (Abb. 45a).

Ohne I-Scel (Abb.45b) und ohne Caspase-Inhibitor bot sich im Vergleich zu den entsprechenden Versuchen mit Rekombinationsinduktion durch gezielte Einführung von Doppelstrangbrüchen (mit I-Scel) ein etwas anderes Bild. Zunächst lagen die absoluten Raten für die Kontrollzelllinie LLC-MK<sub>2</sub>(neo) unter denen nach I-Scel-Expression (17% versus 29%). Nach Wtp53-Expression [LLC-MK<sub>2</sub>(p53her)21] konnte im Gegensatz zu

entsprechenden Versuchen mit dem LMV2-Zellsystem eine sehr ähnliche relative spontane Rekombinationsfrequenz (56%) im Vergleich zu den LLC-MK<sub>2</sub>(neo)-Kontrollzellen (100%) beobachtet werden wie nach I-*Sce*I-Expression (51% versus 100%). In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen mit I-*Sce*I verursachten sowohl die PARP-1- als auch die PARP-DBD-Überexpression vor dem Hintergrund von Mutanten-p53 [LLC-MK<sub>2</sub>(neo)] wie auch in denselben Zellen mit Wtp53 [LLC-MK<sub>2</sub>(p53her)21] eine Reduktion der relativen Rekombinationsfrequenzen, die sogar noch ausgeprägter war, als nach I-*Sce*I-Expression (PARP-1: 23% bzw. 15%; PARP-DBD: 32% bzw. 18%). Nach Zugabe des Caspase-Inhibitors wurden im Vergleich zu den entsprechenden Versuchen ohne Caspase-Inhibitor in allen Fällen mit und ohne I-*Sce*I keine signifikanten Unterschiede bzgl. der relativen Rekombinationsfrequenzen festgestellt (Abb. 45a,b).

Zusammenfassend scheinen die Rekombinationsdaten mit Caspase-Inhibitoren darauf hinzudeuten, dass apoptotische Prozesse die apparenten Rekombinationsfrequenzen nach transienter Expression von PARP-1 in LLC-MK<sub>2</sub>-Zellen nicht beeinflussen. Demgegenüber spielt die induzierbare, doch stabile Expression von PARP-1 in den von LLC-MK<sub>2</sub> abgeleiteten LMV2-PARPp53her-KI1-Zellen eine bzgl. der apparenten Frequenzen stimulierende Rolle.

3. Ergebnisse



**Abb. 45:** Vergleich der relativen Rekombinationsfrequenzen mit und ohne Caspase-Inhibitor in LLC-MK<sub>2</sub>(neo) und LLC-MK<sub>2</sub>(p53her)21. 72 h nach Transfektion der Zellen mit Vektoren zur Expression von PARP-DBD und PARP-1 unter der Kontrolle eines CMV-Promotors sowie mit dem Rekombinationsplasmid p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR wurde der Anteil grünfluoreszierender Zellen bestimmt. (a) Messung der Rekombinationsfrequenzen nach gezielter Einführung von Doppelstrangbrüchen. Alle Versuchsansätze wurden mit dem pCMV-I-Scel-Meganuklease-Expressionsvektor kotransfiziert. Die Transfektionseffizienzen reichten von 4-33%. (b) Messung der spontanen Rekombinationshäufigkeiten. Die Transfektionseffizienzen reichten von 3-26%.

#### 4. Diskussion

Ergebnisse dieser Arbeit etablieren die Existenz einer funktionellen Die Wechselwirkung zwischen hRad51 und p53 in vitro während der Bildung von Heteroduplex-Strangkreuzungs-Strukturen durch hRad51 und ergänzen damit bisherige Berichte über genetische und physikalische Wechselwirkungen beider Proteine (Stürzbecher et al., 1996; Lim und Hasty, 1996). Die dargestellten Beobachtungen begründen ein neues Modell der p53-vermittelten Rekombinationsregulation und deuten eine mögliche Rolle der p53assoziierten 3'->5'-Exonukleaseaktivität an. die in der Auflösuna von Strangaustauschintermediaten mit fehlgepaarten Basen besteht.

#### 4.1 Von hRad51 vermittelter Strangaustausch stimuliert die p53assoziierte Exonukleaseaktivität.

Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe ließen vermuten, dass p53 die Genauigkeit der homologen Rekombination kontrolliert, indem es in DNA-Austauschprozesse eingreift, welche bestimmte Basenfehlpaarungen erzeugen würden (Dudenhöffer et al., 1998). Biochemische Studien (Mummenbrauer et al., 1996; Jean et al., 1997; Huang, 1998; Janus et al., 1999b; Nasheuer et al.; 2002) erbrachten Beweise für eine intrinsische 3'->5'-Exonukleaseaktivität von p53, welche möglicherweise Funktionen in der Genauigkeitskontrolle bei der DNA-Replikation oder der DNA-Reparatur ausübt. Die in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen ermöglichten die Untersuchung der funktionellen Wechselwirkungen von p53 in der initialen Phase des hRad51-abhängigen Strangaustausches. Für die initialen Schritte der Erkennung von Sequenzhomologien und der Stranginvasion ist hRad51 essentiell und auch ausreichend (Benson et al., 1994; Sung und Robberson, 1995; Gupta et al., 1997). Unter Strangtransferbedingungen degradierte die mit p53 assoziierte Exonuklease die eingesetzten kurzen Oligonukleotidsubstrat-DNAs. Die nukleolytische Aktivität wurde durch die Anwesenheit von katalytisch aktivem hRad51 stimuliert. Obwohl weniger ausgeprägt, war dieser Effekt auch prinzipiell mit RecA-Protein zu beobachten, was darauf hindeutet, dass Strangtransferaktivitäten generell einen stimulatorischen Effekt verursachen. Damit übereinstimmend, übte hRad51 keinen Effekt auf den Abbau von einzelsträngigen (ss) oder doppelsträngigen (ds) Substrat-DNAs alleine aus. In Einklang mit den zugehörigen DNA-Bindungsstudien (Dudenhöffer et al., 1998; diese Arbeit), konnte in Exonuklease-Assays eine Substratpräferenz von p53 für künstliche Strangkreuzungsmoleküle versus ssDNAs gezeigt werden, wobei verschiedene Substratoder Kompetitor-DNAs benutzt wurden (Süße et al., 2000). Die Verstärkung der intrinsischen Exonukleaseaktivität von p53 wurde demnach zumindest teilweise durch die von hRad51

abhängige Bildung von Strangtransferintermediaten verursacht, was die Hypothese einer regulatorischen Rolle von p53 während homologer Rekombinationsereignisse untermauert. Gegenwärtig ist allerdings nicht klar, ob p53 zusätzlich in den hRad51-vermittelten Strangaustauschprozess direkt eingreift, was ebenfalls die Inhibition homologer Rekombinationsereignisse erklären würde (Wiesmüller *et al.*, 1996; Bertrand *et al.*, 1997; Mekeel *et al.*, 1997; Dudenhöffer *et al.*, 1998). Es besteht auch die Möglichkeit, dass p53 die Wanderung der Kreuzungsstruktur (*Branch Migration*) nach dem initialen Strangaustausch verzögert. Dies müßte in zukünftigen Experimenten mit weiteren DNA-Substraten und in Gegenwart der auxiliären Faktoren hRad52 und RPA geklärt werden.

#### 4.2 p53 interagiert mit hRad51-Nukleoproteinen.

Auf funktionelle Verbindungen zwischen hRad51 und p53 in der homologen Rekombination deuteten schon frühere Daten hin. Diese demonstrierten, dass Rekombinationsfrequenzen durch Simian-Virus 40-T-Antigen vermittelte Störung der von p53 abhängigen Inhibition erhöht werden (Wiesmüller *et al.*, 1996) und dies von hRad51 abhängig ist (Xia *et al.*, 1997). Auch die Möglichkeit einer stimulierenden Rolle in *End-Joining*-Prozessen wurde für p53 diskutiert (Bill *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1999). Die Verstärkung des *Rejoining* von DNA-Doppelstrangbrüchen durch p53 scheint hierbei auf dessen C-terminale nichtspezifische DNA-Bindedomäne angewiesen zu sein. Im Gegensatz dazu, sind die sequenz- und strukturspezifisch mit DNA interagierenden Aminosäurereste und die Konformationsintegrität innerhalb der betreffenden *Core*-Domäne verantwortlich für die Inhibition der homologen Rekombinationsprozesse und für die Erkennung von Strangkreuzungsmolekülen durch p53 (Dudenhöffer *et al.*, 1999). Dies impliziert, dass den verschiedenen Typen der Doppelstrangbruchreparatur durch p53 unterschiedliche Mechanismen der Regulation unterliegen.

Die hier veröffentlichten biochemischen Experimente legen nahe, dass ternäre hRad51-p53-DNA-Komplexe zu einem frühen Zeitpunkt des Strangtransferprozesses während der homologen Rekombination existieren. In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass hRad51 Koaggregate bildet, in welche ssDNAs und homologe Duplices während des Strangtransferprozesses eingebunden sind (Baumann *et al.*, 1996), konnte hier gezeigt werden, dass hRad51 stabil mit 3-strängigen Rekombinationsintermediaten (3sDNAs) interagiert, welche aus einer flexiblen Verbindungsregion im Zentrum und einem abgegrenzten Heteroduplexterminus bestehen. Unter Benutzung dieser hRad51-DNA-Komplexe, die bereits an 3sDNAs vorgefertigt wurden, um die katalytisch aktiven Nukleoproteinfilamente während des Strangtransfers nachzuahmen, konnte beobachtet

werden, dass p53 stabil mit diesen Komplexen interagiert. Demgegenüber konnte bei Proteinkonzentrationen, die für Wildtyp-p53 ausreichten (Wtp53), mit der DNA-Kontaktmutante p53(273H) und mit der Konformationsmutante p53(273P) (nicht gezeigt) weder eine Bindung an Rekombinationsintermediate, noch ternäre Komplexbildung beobachtet werden. Aus der Reihenfolge der Komponentenzugabe zur Assav-Mischung für die effizienteste Komplexbildung, nämlich erst 3sDNA und hRad51 und später Wtp53, und wegen des Defektes in der Bildung ternärer Komplexe mit der DNA-Kontaktmutante p53(273H), den man auch noch mit hohen Konzentrationen beobachten konnte, wird ersichtlich, dass für die Bildung ternärer Komplexe nicht nur die Erkennung von Heteroduplex-Strangkreuzungs-Strukturen durch p53 eine Rolle spielt, sondern auch Wechselwirkungen von p53 mit hRad51-Nukleoproteinen bedeutsam sind. Diese Daten deuten darauf hin, dass ein p53-Tetramer das der Heteroduplex-Strangkreuzung nächstgelegene hRad51-Filament kontaktiert, was mit der Beobachtung übereinstimmen würde, dass hRad51 zur Ausführung der Stranginvasion kooperativ an ssDNA bindet und dabei Heteroduplex-Strangkreuzungen erzeugt (Baumann et al., 1996). Es ist in diesem Zusammenhang wichtig, dass Heteroduplex-Strangkreuzungen auch der entscheidende Faktor für die sequenz-unabhängige DNA-Bindung durch p53 (Dudenhöffer et al., 1998) zu sein scheinen.

Physikalische Wechselwirkungen zwischen hRad51 und p53 mögen eine Rolle in der korrekten Positionierung von p53 an der neu gebildeten Heteroduplex-Verbindung während der homologen Rekombination spielen, um die Genauigkeitskontrolle zu unterstützen. Ein ähnlicher Typ synergistischer Wechselwirkungen wurde für Mre11 beschrieben, eine 3'->5'-Exonuklease, welche im nicht-homologen End-Joining-Pathway (NHEJ) involviert ist und welcher durch Komplexbildung mit Rad50 stimuliert wird (Paull und Gellert, 1998). Es wurde berichtet, dass die p53-Core-Domäne zwei Regionen benötigt (Aminosäure 94 bis 160 und 264 bis 315), um hRad51 in vitro physikalisch zu binden (Buchhop et al., 1997). Interessanterweise ist der C-Terminus einschließlich der Oligomerisierungsdomäne von p53 für weitere heterologe Protein-Protein-Wechselwirkungen bedeutsam (Wang et al., 1993; 1994; 1995; Leveillard et al., 1996; Schneider et al., 1998; Albor et al., 1998), zwischen diesen möglichen auch mit dem hRad51-Komplexpartner BRCA1 (Ouchi et al., 1998; Zhang et al., 1998). C-terminal trunkiertes p53, ohne Oligomerisierungs-Domäne (Aminosäure 1-333), ist nicht in der Lage, homologe Rekombinationsereignisse zu inhibieren und kann auch keine 3sDNA-Kreuzungsstrukturen in vitro binden (Dudenhöffer et al., 1999). Daraus läßt sich schlußfolgern, dass Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem p53-Core und hRad51 nicht ausreichend sind für die Regulierung homologer Rekombinationsprozesse. Eher

scheinen die Bindung der Rekombinationsintermediate durch p53 und möglicherweise auch Protein-Protein-Interaktionen *via* C-terminaler Regionen Vorraussetzung zu sein.

#### 4.3 Nukleolytische Prozessierung von Rekombinationsintermediaten durch p53 und ihre mögliche Rolle.

Meine biochemischen Experimente mit isolierten Protein- und DNA-Komponenten indizieren, dass p53-Protein Exonukleaseaktivität an doppelsträngigen Enden von 3strängigen Kreuzungs-DNAs in einer 3'->5'-Orientierung ausübt. Wie gemäß der DNA-Bindungsaffinitäten von p53 vorausgesagt wurde (Dudenhöffer et al., 1998; diese Arbeit), war die Degradation schneller, wenn p53 auf ein eingebautes A/G-Mismatch in dieser spezifischen Erkennungsstruktur stieß. In mitotisch wachsenden Zellen mit lediglich einigen wenigen, spontan entstandenen, Rekombinationsorten (Bernstein und Bernstein, 1991), sind deutlichere Unterschiede zwischen den exonukleolytischen Aktivitäten an Match- und Mismatch-Heteroduplex-DNAs zu erwarten verglichen mit dem Effekt, der bei den für die Signaldetektion in vitro notwendigen DNA-Konzentrationen beobachtet wurde. Zusammen mit den Daten dieser Arbeit, welche die Reihenfolge der hRad51-p53-DNA-Komplex-Bildung betreffen, könnte dies andeuten, dass p53 während der Rekombination aktiv Heteroduplices auflöst, welche Sequenzdivergenzen aufweisen, die unmittelbar nach dem initialen Strangaustausch durch Rad51 entstanden sind. Es wurde gezeigt, dass von Rad51 abhängiger Strangtransfer den Zusammenschluß kurzer Fehlpaarungsbereiche erlaubt (Cox, 1997; Namsaraev und Berg, 2000), so dass Mechanismen existieren müssen, die eine fehlerfreie Rekombinationsreparatur garantieren. Ein solcher Mechanismus wurde beschrieben mit dem MutS-Homolog MSH2, dem Schlüsselelement der eukaryontischen postreplikativen Mismatch-Reparatur, welche ebenfalls dafür bekannt ist, Rekombination zwischen divergierenden Sequenzen zu inhibieren (zusammengefasst in Modrich und Lahue, 1996). Die Ergebnisse aus vorangegangenen und der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass in Vertebraten p53 Teil eines parallelen Pathways sein könnte, der zu einer höchstgenauen Rekombinationsreparatur durch komplementäre Mismatch-Erkennung führt (Dudenhöffer et al., 1998). Bezüglich der vermuteten Rolle von p53, die Genauigkeit von Rekombinationsprozessen zu einem frühen Zeitpunkt zu kontrollieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere faszinierende Beobachtung gemacht: Eine zweifach verlangsamte nukleolytische Degradation des 3-strängigen Strangkreuzungssubstrates, wenn die Entfernung des Heteroduplex-Endes von der Strangkreuzungsregion von 27 auf 54 Bp erhöht wurde und damit der terminal kreiierte A/G-Mismatch 39 statt 11 Bp von der Strangkreuzung entfernt lag. Durch die größere Entfernung des Mismatch zur Strangkreuzung ist es für ein einzelnes p53-Tetramer unmöglich, beide Strukturen

gleichzeitig zu erkennen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass sowohl die Anzahl von DNAbindenden als auch von exonuklease-aktiven p53-Molekülen in dem von der flexiblen Strangkreuzung weiter entfernt gelegenen Heteroduplex-Teil geringer war. Dies widerum ist ein deutliches Indiz dafür, dass die p53-abhängige 3'->5'-Exonukleaseaktivität bevorzugt im Komplex mit einer neu gebildeten Verzweigungsstruktur ausgeübt wird. Es ist daher vorstellbar, dass p53 nicht nur an frühe Rekombinationsintermediate bindet, sondern exonukleolytisch fehlgepaarte Bereiche korrigiert, die von DNA-Austausch oder von der replikativen Verlängerung eines eingefädelten DNA-Strangendes stammen. Ursächlich weil die bevorzugte Polarität des Strangtransfers durch Rad51 in vitro 5'->3'relativ zur dsDNA verläuft (Sung und Robberson, 1995; Baumann et al., 1996; Baumann und West, 1997; 1999; Namsarev und Berg, 1997; 2000), scheint es jedoch schwierig, die Orientierung der nukleolytischen Prozessierung durch p53 mit einer Rolle in der Genauigkeitskontrolle durch den Abbau des neu transferierten Stranges in Einklang zu bringen. Dennoch, hRad51abhängiger Strangtransfer kann in vitro in beide Richtungen ausgeführt werden. In der zellulären Umgebungssituationen kann man sich außerdem vorstellen, dass hRad51 den Strangaustausch unter bestimmten Bedingungen am 3'-Ende innerhalb des DNA-Doppelstranges startet. Wenn beispielsweise die Replikationsgabel auf eine DNA-Läsion oder einen Einzelstrangbruch trifft, muß hRad51 beim Strangtransfer das neu synthetisierte 3'-Ende verwenden, um Rekombinationsreparatur zu initiieren, und hierbei die doppelsträngige Schwesterchromatid-DNA als Donor benutzen zu können (Cox, 1997; Haber, 1999). Die 3'->5'-Polarität der intrinsischen Exonuklease von p53 ist also kompatibel mit der Polarität des Strangaustausches während der DNA-Synthese, welcher dem Bypass unreparierter Läsionen an der Replikationsgabel dient (Haber, 1999; Flores-Rozas und Kolodner, 2000). Die Hinweise auf eine Teilnahme von p53 an replikations-assoziierten Rekombinationsprozessen nehmen in der Tat zu. So bindet p53 an Enzyme der DNA-Replikation, wie an das humane Einzelstrang-DNA-Binde-Protein RPA und die Polymerase  $\alpha$ (Wold, 1997; Kühn et al., 1998). Ein weiterer Hinweis für die Polarität des Strangaustausches in vivo kommt aus Studien mit Hefezellen, in welchen 3'-Einzelstrangenden nach der Prozessierung von Doppelstrangbrüchen entstehen. Diese stellen Substrate für den Mechanismus des Single-Strang-Annealings (SSA) wie auch für den von Rad51 abhängigen homologen Rekombinationsmechanismus der Genkonversion dar (Lin et al., 1984; 1990; White und Haber, 1990; Sun et al., 1991; Sugarwara und Haber, 1992). Während dieser zwei Hauptwege der auf Sequenzhomologien basierenden Doppelstrangbruchreparatur in S. cerevisiae dienen die 3'-Enden der Doppelstrangbrüche gleichzeitig auch als Primer für die lückenfüllende DNA-Synthese. Haber und Kollegen (Paques und Haber, 1997; Sugawara et al., 1997) haben gezeigt, dass nach der Invasion überstehende, nicht-homologe 3'-Enden durch die Rad1/Rad10-Endonuklease an der Verzweigung von der Duplex-DNA entfernt

4. Diskussion

werden. Diese Endonuklease der Exzisions-Reparatur wird durch die *Mismatch*-Reparatur-Proteine MSH2 und MSH3 rekrutiert, welche die verzweigte DNA-Struktur erkennen. Die Entfernung nicht-homologer 3'-Enden - kürzer als 30 Nukleotide - unterliegt einem anderen Mechanismus, in welchen die Korrekturleseaktivität der Polymerase  $\delta$  involviert ist (Paques und Haber, 1997). Kürzlich wurde gezeigt, dass die nach Doppelstrangbruch induzierte Genkonversion beide PCNA-assoziierten DNA-Polymerasen, also  $\delta$  und  $\varepsilon$ , erfordert, sowie Polymerase  $\alpha$ , DNA-Primase, Rad27p und die Prozessierungsfaktoren PCNA und RFC (Holmes und Haber, 1999). Interessanterweise wurde von anderen Gruppen für p53 aus Säugern eine Rolle als Korrekturlese (*Proofreader*) -Exonuklease für Polymerase  $\alpha$ postuliert, ausgehend von Protein-Protein-Wechselwirkungsstudien *in vitro* (Kühn *et al.*, 1998) und von Replikations-Assays (Huang, 1998; Nasheuer *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer komplementären Rekombinationskorrektur durch MSH2 und p53 (Dudenhöffer *et al.*, 1998).

In meiner Arbeit wurden Beobachtungen angestellt, welche nahelegen, dass das gleiche p53-Oligomer, welches selbstständig Strangkreuzungs-DNAs erkennt, exonukleolytische Degradation an 3-strängigen Strangkreuzungs-DNAs in 3'->5'- Orientierung ausübt und zwar innerhalb der Regionen, die theoretisch mit hRad51 gepaart sind. Deshalb könnte p53 als *Proofreader* während Genkonversionsprozessen fungieren und zwar an der Schnittstelle zwischen Stranginvasion mittels Rad51 und der Strangsynthese durch eine unbekannte Polymerase.

Aufgrund der Strangtransfer-, Exonuklease- und Bindungs-Studien, die gerade diskutiert wurden, läßt sich vermuten, dass p53 und hRad51 ihre rekombinativen Reparatur-Funktionen in enger Nachbarschaft zueinander ausführen und während oder kurz nach dem Strangtransfer interagieren, möglicherweise um p53 die Ausbildung stabiler Komplexe mit der Heteroduplex zu erleichtern. Entsprechend dem mechanistischen Modell, welches die Genauigkeitskontrolle von Rekombinationsprozessen durch p53 beschreibt, würde sich an die Erkennung von rekombinativen DNA-Strukturen mit Basenfehlpaarungen unmittelbar die nukleolytische Zerstörung dieser fehlerhaften Heteroduplices anschließen.

## 4.4 Die krebs-relevante Mutante p53(273H) zeigt keine rekombinations-assoziierten biochemischen Aktivitäten.

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass verglichen mit den biochemischen Eigenschaften von Wtp53, welche der Regulation von Rekombinationsprozessen zugrunde liegen (Dudenhöffer *et al.*, 1998; 1999), p53(273H) Defekte in allen diesen Eigenschaften

zeigt. Die hier durchgeführten biochemischen Experimente zeigten für p53(273H) eine ca. 3sDNA-Kreuzungsstrukturmoleküle zu erkennen 10fach reduzierte Kapazität, und exonukleolytisch in einer 3'->5'-Orientierung abzubauen. In der Kristallstruktur wurde Arginin 273 als ein Rest identifiziert, welcher für die DNA-Bindung bedeutsam ist, was auf seine Teilnahme an elektrostatischen Wechselwirkungen mit einer Phosphatgruppe des DNA-Rückgrates zurückzuführen ist (Cho et al., 1994). Trotz der Strukturähnlichkeiten zwischen der Core-Domäne von p53 und der katalytischen Domäne der AP-Reparatur Endonuklease/Exonuklease III von E. coli (Mol et al., 1995) und der kürzlichen Entdeckung einer zweiten Bindungsstelle für ein divalentes Ion in p53 (Palecek et al., 1999) ist es noch unklar, wie ein aktives Zentrum von p53 als Exonuklease beschaffen ist. Aus den dreidimensionalen Strukturen von Nukleosid-Monophosphat-Kinasen und G-Proteinen wurde deutlich, dass Arginine dafür verantwortlich sind, negative Ladungen zu stabilisieren, welche während der Phosphoryl-Transferreaktionen auftreten (Scheffzek et al., 1998). In der humanen AP-Endonuklease (HAP1) scheint das Arginin 156 die Phosphatgruppe 5' zu dem reaktiven Phosphat zu stabilisieren (Gorman et al., 1997). In Analogie dazu könnte man eine Rolle von Arginin 273 bei p53 während der nukleolytischen Attacke der DNA vermuten, was die herabgesetzten Exonukleaseaktivitäten von p53(273H) über einen reinen Defekt in der DNA-Bindung hinaus erklären würde. Aus der Tatsache heraus, dass p53(273H) von dem für Wtp53-Konformation spezifischen Antikörper PAb1620 erkannt wird (Ory et al., 1994), war es unerwartet, nicht nur defekte Interaktionen mit der DNA zu finden, sondern zudem den Verlust der synergistischen Wechselwirkungen mit Rad51-Nukleoproteinen. Die präzise Rolle von Arginin 273 in diesen Wechselwirkungen gilt es noch genauer zu klären. Vorstellbar wäre, dass Konformationsänderungen von p53, welche als Begleiterscheinung der DNA-Bindung beschrieben wurden, eine Vorraussetzung für die korrekte Positionierung von p53 neben hRad51 an der Heteroduplex-DNA darstellt (Waterman et al., 1995; McLure und Lee, 1998).

Wie bereits erwähnt, besitzt p53(273H), welches die zweithäufigste p53-Mutante bei Krebspatienten darstellt, noch Eigenschaften von Wtp53, wie partielle sequenzspezifische transkriptionelle Transaktivierung und wie Wachstums-Arrestfunktion (Dudenhöffer *et al.*, 1999; Saintigny *et al.*, 1999). Demgegenüber wurden signifikant herabgesetzte Aktivitäten in der Rekombinationskontrolle für diese Mutante ermittelt (Dudenhöffer *et al.*, 1999; Akyüz *et al.*, 2002), welche mit einer Zunahme genomischer Instabilitäten einhergehen sollten und damit zur Förderung des tumorigenen Potentials der Mutante entscheidend beitragen sollten. Durch die biochemischen Daten dieser Arbeit konnte man dem molekularen Hintergrund, welcher dem Rekombinationskontroll-Defekt dieser Mutante zugrunde liegt, einen Schritt näher kommen.

# 4.5 Die Rolle der Tetramerisierung von p53: Hinweise aus biochemischen Untersuchungen mit der Mutante p53(1262).

Da p53(1-333), welchem der C-Terminus einschließlich der Tetramerisierungsdomäne fehlt, nicht in der Lage ist, homologe Rekombinationsprozesse zu inhibieren, jedoch p53(1-363) ohne den Mismatch erkennenden C-Terminus, aber mit Tetramerisierungsdomäne, voll aktiv ist, wurde der Tetramerisierungsdomäne für die rekombinations-relevanten biochemischen Aktivitäten ein hoher Stellenwert eingeräumt (Dudenhöffer et al., 1999). Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist deswegen die Feststellung, dass die Tetramerisierung von p53 eine wichtige Voraussetzung für die nukleolytische Degradation von Rekombinationsintermediaten darstellt. Dieses Ergebnis war zunächst insofern überraschend, als dass die gegen ssDNA gerichtete Exonukleaseaktivität, also gegen das unter den rekombinations-irrelevanten Substraten bevorzugte DNA-Substrat (Jean et al., 1997; Huang, 1998; Süße et al., 2000; Bakhanashvili, 2001), durch die betreffenden Aminosäureaustäusche in der  $\alpha$ -helikalen Tetramerisierungsregion nicht beeinträchtigt wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit, welche das ssDNA-Substrat betreffen, stimmen jedoch mit früheren Mapping-Studien überein, welche besagen, dass die katalytische Domäne der Exonukleaseaktivität sich in der zentralen Core-Domäne befindet (Mummenbrauer et al., 1996; Janus et al., 1999b; Skalski et al., 2000). Während in den Gel-Shift-Assays dieser Arbeit erhöhte Proteinkonzentrationen der Mutante p53(1262) erforderlich waren, um eine vergleichbar stabile 3sDNA-Bindung wie mit Wtp53 zu erhalten, konnte meine Laborkollegin Dipl.-Biol. C. Janz in entsprechenden Protektionsanalysen keine Defekte der Mutante feststellen (Janz et al., 2002). P53(1262) scheint demnach die Kreuzungsregion wie Wtp53 zu kontaktieren, aber 3sDNA-Komplexe mit reduzierter Stabilität zu bilden. Um also die maximale Exonukleaseaktivität mit 3-strängigen Kreuzungsstrukturen zu erzielen, ist es offensichtlich notwendig, dass p53 stabile tetramere DNA-Komplexe bildet. In Anbetracht der schädlichen Effekte unkontrollierter nukleolytischer DNA-Degradation in vivo, scheint es vernünftig, diese Aktivität durch spezifische DNA-Wechselwirkungen und durch Stabilisierung des Kontaktes mit bereits an das DNA-Substrat gebundenem Rad51 und anderen Proteinen auf ausgewählte Stellen zu beschränken.

Interessanterweise, sind oligomerisierungsdefekte Mutanten nicht immer inaktiv in der transkriptionellen Transaktivierung und der Wachstumssuppression (Tarunina *et al.*, 1996; Chene und Bechter, 1999a, b; Atz *et al.*, 2000). Um mögliche Verbindungen zwischen der Überwachung der homologen Rekombination durch p53 und der Tumorsuppression zu

verstehen, wäre es daher für zukünftige Experimente interessant zu klären, ob verschiedene, bei Li-Fraumeni- und/oder Krebs-Patienten auftauchende, Oligomerisierungsmutanten von p53 ihre Fähigkeit, DNA-Austauschereignisse zu unterdrücken, eingebüßt haben.

#### 4.6 Postulierung eines Modells für die Aufhebung homeologer Rekombinationsereignisse durch p53.

Anhand der dargestellten Ergebnisse, läßt sich ein mechanistisches Modell für die Aufhebung homeologer Rekombinationsereignisse durch p53 erstellen (s. Abb. 46). Nachdem die zentrale Strangtransferase Rad51 zusammen mit Proteinen der Rad52-Epistasegruppe und dem Einzelstrang-Bindeprotein RPA den initialen Strangaustausch eingeleitet hat, kommt es zur Bildung einer Heteroduplexstruktur. Diese von Rad51 komplexierte, *mismatch*-haltige Heteroduplex wird von p53 mit hoher Spezifität erkannt, so dass es zur kooperativen Bindung von p53 in Tetrameren direkt in der Region der Kreuzungsstelle kommt. p53 erkennt den *Mismatch*, stoppt möglicherweise den Strangaustausch und löst die *mismatch*-haltige DNA exonukleolytisch in 3'->5'-Richtung auf, um anschließend – nach Ausführung seiner Korrekturlesefunktion - von den doppelsträngigen DNAs zu dissoziieren.

Parallel zu p53 ist der *Mismatch*-Reparaturfaktor MSH2 dafür bekannt, an Heteroduplexstrukturen zu binden (Alani *et al.*, 1997; Marsischky *et al.*, 1999). Auffällig ist, dass p53 eine maximale Bindungsaffinität für 3strängige Rekombinatinsintermediate mit A/G- und C/T-Fehlpaarungen aufweist, während MutS-Homodimere und MSH2/MSH6-Heterodimere G/T- und A/C-Fehlpaarungen besser erkennen (De Wind *et al.*, 1995; Dudenhöffer *et al.*, 1998). Diese Beobachtung weist auf eine Genauigkeitskontrolle von DNA-Austauschereignissen durch komplementäre Aktivitäten von p53 und MSH2 hin.

Ähnlich wie für die vorgeschlagene Rolle von MSH2, scheint p53 die korrekte Paarung zwischen homologen Sequenzen während der rekombinativen Reparatur zu überwachen. Der unkontrollierte Austausch zwischen fehlgepaarten Sequenzen, spontane und UV-induzierte Schwesterchromatidaustäusche steigen in p53-defizienten Zellen an. (Ishizaki *et al.*, 1994; Cleaver *et al.*, 1999; Schwartz und Russell, 1999). In Übereinstimmung mit der Rolle von p53 als Überwacher von abberanten Rekombinationsereignissen trägt es zur Stabilität repetetiver Sequenzen in menschlichen Genomen bei (Gebow *et al.*, 2000). Die Aufrechterhaltung der Genomstabilität durch die Kontrolle von Rekombinationsereignissen ist eine entscheidende tumorsuppressive Eigenschaft des p53 Proteins. Die Charakterisierung verschiedener p53 Mutanten bezüglich ihrer tumorsuppressiven Eigenschaft, sowohl in der

Rekombinationskontrolle als auch als transkriptioneller Transaktivator, ist ein kritischer Schritt für das Verständnis von Resistenzen in Tumoren gegenüber verschiedenen Therapeutika.



**Abb. 46:** Modell für die p53-abhängige Genauigkeitskontrolle der homologen Rekombination. Während der natürlichen Generierung von Heteroduplices durch Rad51, RPA und die auxiliären Faktoren der Rad52-Epistasegruppe können Basenfehlpaarungen (*Mismatch*) als Ergebnis des DNA-Austausches zwischen nicht-perfekten homologen Sequenzen auftreten. p53-Homotetramere und MSH2, in Form von Heterodimeren mit MSH6 oder MSH3, stellen unabhängig voneinander die Genauigkeit des initialen Strangaustausches durch transiente Interaktion mit der Heteroduplex-Verbindung sicher. Es hängt vom *Mismatch*-Typ ab, ob die Wechselwirkungen durch MSH2 oder p53 stabilisiert werden. Infolge dieser Interaktionen wird der Prozesse des Strangaustausches durch Rad51 aufgehoben und/oder die nukleolytische Korrektur der fehlgepaarten Region gestattet. Abbildung nach Prof. Dr. Wiesmüller (Akyüz et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der PARP-1 in der Doppelstrangbruch-Reparatur hinsichtlich eines Zusammenwirkens mit p53 untersucht, wobei PARP-1 als von p53 stromabwärts gelegenes Element vermutet wird und Hinweise darauf bestehen, dass PARP-1 die Effektivität der p53-vermittelten DNA-Schadensantwort modifiziert (Valenzuela *et al.*, 2002). Zur Einführung der Strangbrüche wurde die ortsspezifische *IScel*-Nuklease verwendet. Aufgrund dieser Strategie, konnten indirekte Effekte der PARP-1 oder/und p53 auf die Rekombination ausgeschlossen werden, die durch andere Reparatur-Aktivitäten der beiden Enzyme verursacht wurden (z.B. bei der Nukleotid- oder Basen-Exzision-Reparatur).

### 4.7 Die Inhibition der konservativen homologen Rekombination durch p53 wird durch die Anzahl der Doppelstrangbrüche beeinflusst.

Unter Benutzung eines Systems auf der Grundlage der Reaktivierung der intensiven EGFP-Fluoreszenz konnte rekombinative Reparatur ohne die Ausübung eines selektiven Drucks, wie in den bisherigen Systemen üblich, detektiert werden (Akyüz et al., 2002). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Wtp53 die homologie-vermittelte Doppelstrangbruch-Reparatur herunter reguliert, unabhängig davon, ob p53 in den Zellen endogen exprimiert oder als exogenes Protein überexprimiert wird. Daneben konnte ich auch für die homologe Rekombination zwischen Minichromosomen des SV40-Virus einen inhibitorischen Effekt des Tumorsuppressorproteins p53 in seiner Wildtyp-Form darstellen. Diese Beobachtungen stimmen mit früheren Studien unserer und weiterer Arbeitsgruppen überein, welche eine Suppression der spontanen homologen Rekombination durch p53 aufzeigten (Wiesmüller et al., 1996; Bertrand et al., 1997; Mekeel et al., 1997; Akyüz et al., 2002). Im Gegensatz dazu, sahen Willers und Kollegen (Willers et al., 2001) diesen Effekt mit episomalen Rekombinationssubstraten nicht, welche durch ein polyomavirusbasierendes Replikon amplifiziert wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Rekombinations-Herabregulation durch p53 mit extrachromosomalem genauso wie mit chromosomal integriertem Substrat gezeigt.

Desweiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden, dass unter spontanen Rekombinationsbedingungen die Inhibition der Rekombination durch Wtp53 stärker war als nach gezielter Einführung eines Doppelstrangbruches durch die Meganuklease *I-Scel*. Dies war zutreffend für beide hier verwendete stabile Zellsysteme, in denen jeweils p53her nach Östradiolinduktion vor dem Hintergrund von endogenem Mutanten-p53(Δ237-239) [LMV2-p53her-Kl8, LLC-MK<sub>2</sub>(p53her)21] mit der entsprechenden, nicht p53her exprimierenden Zelllinie verglichen wurde (LMV2, LLC-MK2-neo).

Diese verminderte Rekombinationsregulation bei zunehmender Anzahl von Doppelstrangbrüchen, aber gleichbleibender Konzentration des exogenen Wtp53, könnte darauf zurückzuführen sein, dass Wtp53-Moleküle nach DNA-Doppelstrangbruch-Generierung und der damit verbleibenden Signaltransduktion über Kinasen wie ATM zunehmend der Ausübung ihrer Funktion als transkriptioneller Transaktivator nachkommen und damit dem Pool der rekombinations-regulierenden Moleküle entzogen würden. Dieser Vorstellung entsprächen auch bereits existierende Modelle gemäß derer Wtp53, z.B. in unterschiedlich phosphorylierter Form, entweder die Rekombination reguliert oder als transkriptioneller Transaktivator fungiert, aber nicht beide Funktionen gleichzeitig ausüben kann (Albrechtsen *et al.*, 1999). Gegen dieses Erklärungsmodell spricht jedoch, dass p53 bereits in sehr geringen Mengen in der Zelle rekombinations-regulierend wirkt und eine sehr hohe Affinität für DNA-Rekombinationsintermediate aufweist, wohingegen für die transkriptionelle Transaktivatoraktivität eine deutliche Zunahme der Proteinmenge erforderlich ist (Dudenhöffer *et al.*, 1998; 1999).

Die wohl wahrscheinlichste Erklärung für die hier mit und ohne IScel beobachteten Unterschiede in der p53-vermittelten Rekombinationsregulation beruht auf früheren Beobachtungen (Saintigny et al., 1999; Süße et al., 2000; Akyüz et al., 2002), welche zu dem Schluß führten, dass die von Wtp53 ausgeübte rekombinations-regulatorische Funktion vornehmlich auf konservative homologe Rekombinationsprozesse unter Mitwirkung von Rad51 gerichtet ist. Dies bedeutet, dass p53 Genkonversion, jedoch nicht Single-Strand-Annealing (SSA), einen von Rad51 unabhängigen Doppelstrangbruch-Reparaturweg kontrolliert. Das in den auf EGFP-Rekonstitution basierenden Rekombinationsexperimenten eingesetzte **DNA-Substrat** erlaubt. allerdings nur nach Generierung eines Doppelstrangbruches im Marker-Gen, den Nachweis beider Reaktionswege zu etwa gleichen Anteilen (Akyüz et al., 2002). In dieser Situation wurde eine leichte Unterdrückung durch p53 festgestellt. Weit deutlicher wurde diese jedoch ohne gezielte Einführung eines Doppelstrangbruches, wenn Genkonversion als Mechanismus der EGFP-Rekonstitution dominiert. Dies bedeutet, dass auch hier in Übereinstimmung mit den früheren Arbeiten (Saintigny et al., 1999; Süße et al., 2000; Akyüz et al., 2002) Hinweise dafür gesammelt wurden, dass p53 als Rekombinationsregulator für das SSA keine bedeutende Rolle spielt, im Gegensatz seiner klaren Mitwirkung bei konservativen ganz zu Rekombinationsprozessen.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde bei konstanter Proteinmenge eine 10fach geringere Suppression der I-Scel-initiierten Doppelstrangbruchreparatur durch p53 festgestellt, wenn das Rekombinationsplasmid in

zahlreichen Kopien durch Lipofektion eingeführt wurde und nicht in einigen wenigen Kopien chromosomal integriert vorlag. Bereits in früheren Experimenten war beobachtet worden, dass insbesondere bei hohen DNA-Rekombinationssubstrat-Mengen, wie nach transienter Transfektion, das Verhältnis zwischen der p53-Menge und der Anzahl der DNA-Substrate eine Rolle für die Regulationskapazität spielt (Akyüz et al., 2002). In den hier verwendeten stabilen Klonen wurde die Konzentration an Wtp53 (p53her) durch den SV40-Promotor des Expressionskonstruktes reguliert. Die Proteinstabilität spielte eine untergeordnete Rolle, da die Östradiolbindedomäne in Abwesenheit von Östradiol die Interaktion mit Ubiguitin-Ligasen und damit den Abbau des Proteins verhindert. In der Folge blieb die Menge an p53-Protein in den Zelllinien auch nach Einführung von Doppelstrangbrüchen recht stabil und änderte sich auch nach Zugabe von Östradiol im Verlauf der Experimente nicht signifikant. Aufgrund der Einführung von Doppelstrangbrüchen änderte sich jedoch das Verhältnis von Wtp53-Molekülen zur DNA-Strangbruchanzahl dramatisch. Durch Lipofektion können 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> DNA-Moleküle von der Zelle aufgenommen werden (Tseng et al., 1997), wohingegen chromosomal lediglich 4-6 Kopien vorlagen (Akyüz et al., 2002). In Übereinstimmung hierzu betrugen die absoluten Rekombinationsfrequenzen zwei bis drei Zehnerpotenzen höhere Werte im experimentellen System mit episomalem Rekombinationssubstrat bei hoher Kopienzahl (Plasmidtransfektion: 10<sup>-2</sup>-10<sup>-1</sup>) im Vergleich zu den Experimenten mit chromosomal integriertem Rekombinationsvektor oder mit SV40-Minichromosomen (10<sup>-3</sup> -10<sup>-4</sup>). Letztere wiesen zu Beginn der Rekombinationsexperimente aufgrund der gewählten MOI ebenfalls Kopienzahlen um die 2 pro infizierter Zelle auf. So wurde vor dem negativen MHHR-Zellen eine Rekombinationsfrequenz von 7x10<sup>-4</sup> p53-Hintergrund in im chromosomalen Kontext (diese Arbeit) erreicht, bzw. von 22% mit dem identischen, transient eingeführten Rekombinationssubstrat in MHHR-Zellen (Akyüz et al., 2002) bzw. von 29% in LLC-MK<sub>2</sub>(neo)-Zellen mit Mutanten-p53. Dies bedeutet 34x10<sup>2</sup> fach höhere Werte für den episomalen Kontext. In den entsprechenden Situationen lag die Rekombinationsunterdrückung durch p53her bei jeweils frisch etablierten Klonen bei 18fach (MHHR-her12; Akyüz et al., 2002) und 2fach [LLC-MK2(p53her)21; diese Arbeit]. In ähnlicher Weise wurde Rekombination zwischen SV40-Minichromosomen durch p53her im LMV2-Zellsystem 5fach unterdrückt, jedoch nur um 20-40% an episomalen EGFP-basierten Substraten (mit und ohne Doppelstrangbruch) gesenkt. Insgesamt muß aufgrund dieser Beobachtungen von einer gewissen Abhängigkeit der Rekombinationsinhibition vom p53/DNA-Substrat-Verhältnis ausgegangen werden, obwohl p53 bereits in geringen Mengen rekombinations-regulierend wirkt.

Gerade weil das Basalniveau von geschätzten 1.000-10.000 p53-Molekülen in der Zelle zur stetigen Überwachung der Rekombination ausreicht (Patschinsky und Deppert,

1990), ist es vorstellbar, dass die Zelle bei einer dramatischen Veränderung der Schadenssituation, wie z.B. in transienten Experimenten mit hoher Kopienzahl an nackten DNA-Rekombinationssubstraten, die p53-Aktivitäten an das Schadensausma angepasst werden. Trotz der Beweise für die Unabhängigkeit der Funktionen von p53 in Wachstumsregulation und Apoptoseinduktion versus Rekombinationskontrolle, die durch unser und weitere Labors gelangen (Wiesmüller et al., 1996; Dudenhöffer et al., 1999; Saintigny et al., 1999; Süße et al., 2000; Willers et al., 2000), blieb bis heute die Frage ungeklärt, in welcher Art und Weise die multiplen Funktionen koordiniert werden. In diesem Zusammenhang ist bisher noch völlig ungeklärt, ob posttranslationale Modifikationen die Aktivitäten von p53 bei der Regulation von Rekombinationsprozessen im Vergleich zur transkriptionellen Transaktivierungsaktivität beeinflussen, in Analogie zur entgegengesetzten Regulierbarkeit der Exonuklease- und seguenzspezifischen DNA-Bindungsaktivität. Nach der Entdeckung dualer Funktionen in Checkpoint-Kontrolle und DNA-Rekombination stellt sich heute die Frage, welche Umschaltmechanismen zwischen den Aktivitäten wirken bzw. die Assemblierung des jeweiligen Multienzymkomplexes in den Zellen auslösen. Innerhalb der Signaltransduktion als Antwort auf Strahlung repräsentiert die bei Ataxia Telangiectasia (AT) Patienten mutierte PI3-Kinase ATM ein Schlüsselenzym (Petrini, 2000; Thompson und Schild, 2001). Diese Kinase ist p53 und BRCA1 vorgeschaltet, desweiteren dem p53 Binding Protein 1 (pBP1), dem bei Nijmegen Breakage Syndrom Patienten mutierten Nbs1, und indirekt über die Kinase c-Abl auch Rad51. Die Bedeutung dieser Phosphorylierungs-Ereignisse liegt sowohl in der Vermittlung von molekularen Interaktionen zur Bildung von Reparatur- und Überwachungs-Komplexen wie auch in der Checkpoint-Kontrolle in der G1-, S- oder G2-Phase. Nach ionisierender Bestrahlung löst ATM auch indirekt Phosphorylierung und Acetylierung an weiteren p53-Resten aus, so dass ATM am Ausgangspunkt einer Modifikationskaskade zu stehen scheint (Saito et al., 2002). Insgesamt beinhaltet die Signaltransduktion via p53 Interaktionen mit und posttranslationale Modifikationen durch Kinasen (ATM, ATR, DNA-PK, CHK1, CHK2, Cyclin abhängige Kinasen (CDK) 1 und 2, CDK7-cyclin Hp36Mat1 (CAK-Kinase), Protein Kinase C (PKC), Casein Kinase 1 (CK1), Casein Kinase 2 (CK2), Jun N-terminale Kinase), Phosphatasen, Acetyl-Transferasen (PCAF, p300/CBP), SUMO-1 und die Poly-ADP-Phosphoribosyl-Transferase (Lohrum and Scheidtmann, 1996; Agarwal et al., 1997; Knippschild et al., 1997; Lane, 1998; Schneider et al., 1998; Gostissa et al., 1999; Meek, 1999; Rodriguez, et al. 1999; Schuster et al., 1999; Abraham et al., 2000; Ababneh et al., 2001; Valenzuela et al., 2002). Die Bedeutung posttranslationaler Modifikationen für die Stabilisierung von p53 wie für die transkriptionelle Transaktivierungsaktivität wurde und wird weiter eingehend untersucht, insbesondere seit Antikörper zur Verfügung stehen, welche spezifisch, bestimmte Phosphorylierungs- und
Acetylierungs-Stellen auf p53 erkennen. Demgegenüber ist nichts darüber bekannt, wie sich diese Modifikationen auf die Überwachung der Rekombination durch p53 auswirken.

Eine der Modifikationsformen von p53, welche bislang noch am wenigsten verstanden wird, ist die Poly(ADP-Ribosylierung). In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Poly(ADP-Ribosylierung) von p53 in transienten und stabilen zellulären Expressionssystemen mit dem Schwerpunkt auf die Beeinflussung der Rekombinationsregulation analysiert. Hierzu wurde PARP-1 in Zellen mit und ohne Wtp53 anschließend überexprimiert und homologe Rekombination mit Hilfe des fluoreszenzbasierten Testsystems wie auch des auf SV40-Viren basierenden Systems quantifiziert.

### 4.8 PARP-1-Überexpression unterdrückt die homologe Rekombination in Abwesenheit von Wtp53.

Wenn in Abwesenheit von Wtp53 PARP-1 via CMV-Promotor sehr hoch überexprimiert wurde, so stellte sich unabhängig vom Zellsystem und unabhängig von der Präsentation der EGFP-basierten Rekombinationssubstrate auf episomalen oder chromosomal integrierten Plasmiden eine inhibierende Wirkung im Verlauf der homologen Rekombination mit und ohne gezielte Einführung von Doppelstrangbrüchen ein. Wie in dieser Arbeit für das LMV2-Zellsystem gezeigt wurde, traf dies auch für die stabile und induzierbare Expression von PARP-1 via GRE-Promotoren zu, wobei der Nachweis für Rekombination an episomalen Plasmiden nach +Scel-vermittelter Spaltung und an SV40-Minichromosomen erbracht wurde, wobei letztere an die spontane Generierung von Einzelund Doppelstrangbrüchen an der Replikationsgabel während der massiven viralen DNA-Synthese gekoppelt ist (Janz und Wiesmüller, 2002). Demgegenüber wurde für das stabile System mit gemäßigter Überexpression via GRE-Promotoren kein signifikanter Unterschied zwischen den Rekombinationsfrequenzen der Kontroll- und PARP-1 überexprimierenden Zelllinie beobachtet, wenn gezielte Spaltung episomaler Plasmidsubstrate durch die Meganuklease I-Scel unterblieb. Auch im MHHR-4-Zellsystem mit nur 4-6 chromosomal integrierten Substraten und transienter, gemäßigter PARP-1-Expression wurde kein signifikanter Unterschied für die homologen DNA-Austauschraten nach IScel-vermittelter Spaltung beobachtet. Die Gesamtheit dieser Ergebnisse, insbesondere jedoch die dramatische Steigerung der Inhibition durch hohe PARP-1-Expression via CMV-Promotor im gleichen MHHR-4-Zellsystem veranschaulicht die Bedeutung der zellulären PARP-1-Konzentration für das Ausmaß der inhibierenden Wirkung, ähnlich wie für p53 (Akyüz et al., 2002). Die Rekombinationsmessungen im LMV2-System mit und ohne I-Scel-vermittelte

Generierung von Doppelstrangbrüchen veranschaulichen die Bedeutung von Strangbrüchen als Voraussetzung für die von PARP-1 bei der Rekombination ausgeübte Funktion und machen als initiales Ereignis eine direkte molekulare Wechselwirkung wahrscheinlich, möglicherweise die in der Literatur postulierte Bindung von freien DNA-Einzel- oder Doppelstrangbruchenden, welche gezielt (*I-Scel*) oder spontan (SV40-Replikation) im Verlaufe von Reparatur- und Replikations-Prozessen entstehen können (Althaus und Richter, 1987; Gradwohl et al., 1987, Weinfeld et al., 1997; Bramson et al., 1993; Le Cam et al., 1994; D'Silva et al., 1999). Insgesamt paßt die Beobachtung einer Inhibition der homologen Rekombination durch PARP-1-Überexpression zu Berichten anderer Arbeitsgruppen. So wurde nach PARP-1-Ausschaltung bei PARP-1 Knockout-Mäusen nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien eine ansteigende Genominstabilität beobachtet, welche sich durch erhöhte Frequenzen von Schwesterchromatidaustäuschen und Mikronukleus Bildung auszeichnete (Wang et al., 1995; 1997; Murcia et al., 1997). Außerdem wurde durch Inhibition der PARP-1 durch chemische Inhibitoren (Waldmann und Waldmann, 1991; D'Amours et al., 1999) oder durch dominant negative Mutanten (Schreiber et al., 1995) oder auch durch Suppression der PARP-1 durch Antisense-RNA (Ding und Smulson, 1994) ein Anstieg der Frequenzen der spontanen Rekombination, der Genamplifikation, der Schwesterchromatidaustäusche und der Mikronukleusbildung nach Behandlung mit genotoxischen Agenzien gezeigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bzgl. Der Rolle von PARP-1 bei der homologem Rekombination in Abwesenheit von Wtp53 korrelieren demnach mit den Literaturdaten, da die durch PARP-1-Expression nach Induktion von Doppelstrangbrüchen beobachtete Inhibition der homologen Rekombination einer Genom-Stabilisierung entspricht.

### 4.9 Unterdrückung der homologen Rekombination durch Überexpression von PARP-DBD.

Um weiter zu klären, ob die rekombinations-inhibierende Wirkung von PARP-1 mit ihrer Eigenschaft als Poly(ADP-Phosphoribosyl)-Transferase oder mit ihrer Fähigkeit, DNA-Strangenden zu binden, zusammenhängt, wurden in dieser Arbeit weiterhin Versuche mit der DNA-Binde-Domäne der PARP-1 unternommen. Dieser PARP-DBD fehlen die enzymatischen Eigenschaften, die vor allem auch zur Automodifikation und damit zur Abdissoziation des Moleküls von den DNA-Enden benötigt werden, wodurch PARP-DBD dominant negativ auch für endogene PARP-1 wirkt (Küpper *et al.*, 1990; 1995). Diese Experimente mußten im transienten Test durchgeführt werden, da sich PARP-DBD in reproduzierbarer Art und Weise trotz Induzierbarkeit des Expressionsvektors nicht in stabil etablierten Klonen der LMV2-Parental-Zelllinie exprimieren ließ, wohingegen PARP-1 in

einem Drittel der getesteten Klone zur Expression gebracht werden konnte. Diese Beobachtung könnte daraufhin deuten, dass LLC-MK<sub>2</sub>-Zellen (Parentalzellen von LMV2) im Gegensatz zu anderen Zellsystemen wie CV1-Affenzellen und auch CO60-Zellen des chinesischen Hamsters (Küpper et al., 1995; 1996; Tatsumi-Miyajima et al., 1999), in welchen nicht nur die induzierbare, sondern auch die konstitutive Expression von PARP-DBD gelang, besonders empfindlich für die DNA-Reparatur unterdrückende Wirkung von PARP-DBD sind. So ist vorstellbar, dass das Fehlen der rekombinativen Reparatur aufgrund stabiler PARP-DBD-Bindung an spontan entstehende DNA-Brüche das Fortschreiten der Replikation und damit der Proliferation verhindert (Cox et al., 2000) und damit eine Aufzucht dieser Klone nicht zuläßt. Aufgrund der bisherigen Beobachtungen mit östradiolinduzierbaren Expressionssystemen (Dudenhöffer et al., 1998; 1999) ist es sehr wahrscheinlich, dass das in dieser Arbeit verwendete Expressionssystem trotz Induzierbarkeit schon aufgrund seiner Basalexpression in Abwesenheit des Induktors Östradiol eine Unterdrückung der Replikation hervorruft. Für eine hohe Durchlässigkeit im Falle des hier verwendeten LMV2-Zellsystems spricht, dass tatsächlich ein erhöhtes PARP-1-Expressionsniveau in den stabilen Klonen LMV2-PARP-KI3, LMV2-PARP-KI4 und LMV2-PARPp53her-KI1 bereits ohne Gabe von Östradiol nachweisbar war. Anders als im System von A. Bürkle und Kollegen (Küpper et al., 1990; 1995; Molinete et al., 1993), ist das LMV2-Zellsystem durch fehlendes endogenes Wtp53 gekennzeichnet, es besitzt endogen mutantes p53( $\Delta$ 237-239). Da sowohl Wtp53 als auch PARP-1 genomstabilisierende Eigenschaften besitzen, potenziert sich eine Ausschaltung beider Proteine möglicherweise derart dramatisch, dass die entsprechenden Zellen aufgrund von einer massiven Anhäufung von chromosomalen Aberrationen nicht mehr lebensfähig sind.

Überraschenderweise resultierte die transiente Expression der PARP-DBD in einer Unterdrückung der homologen Rekombination, die unabhängig vom Zellsystem und der Präsentation des Rekombinationssubstrates mindestens vergleichbar stark, meist aber noch stärker ausgeprägt als die durch PARP-1 war. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass erstens die Blockierung von DNA-Enden durch PARP-DBD ausreicht, um DNA-Austauschprozesse zu unterdrücken, und, zweitens, die rekombinations-inhibierende Wirkung der überexprimierten PARP-1 zumindest teilweise ebenfalls auf diese, die DNA-Enden blockierende Wirkung zurückzuführen ist. Diese Interpretation wurde auch durch weiterführende Messungen gestützt, in welchen 3-Aminobenzamid, also ebenfalls ein kompetitiver Inhibitor der PARP-1 (Huletsky *et al.*, 1989; Rankin *et al.*, 1989), zu einer Senkung der Rekombinationsfrequenzen führte, und zwar quantitativ in ganz ähnlicher Weise wie dies für PARP-DBD beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass also auch das volle Länge PARP-1-Molekül nach pharmakologischer

Ausschaltung der Enzymaktivität wie PARP-DBD als ausschließlich DNA-Enden bindendes Molekül fungiert und so die Rekombination unterdrückt.

# 4.10 Die rekombinations-inhibierende Wirkung von PARP-1 wird in Gegenwart von Wtp53 im transienten Expressionssystem verstärkt.

Nachdem der Effekt von PARP-1 im Wtp53-freien Zellsystem als inhibierend beschrieben werden konnte, stellte sich als nächstes die Frage, wie sich diese Wirkung in Kombination mit dem Tumorsuppressor, Rekombinations-, Wachstums- und Apoptose-Regulator (Lane und Crawford, 1997; Lu et al., 2003; Kuerbitz et al., 1992; Mercer, 1998; Lowe et al., 1993; Yonish-Rouach et al., 1991; Ding und Fisher, 1998) und Poly(ADP-Ribosylierungs)-Substrat p53 (Malanga et al., 1998; Pleschke et al., 2000; Smulson et al., 2000) darstellte. Das klarste Ergebnis aus den Rekombinationsversuchen mit transienter Proteinexpression war die Tatsache, dass sich für die Koexpression von PARP-1 und p53her unabhängig vom Zellsystem und der Substratpräsentation ein synergistischer Effekt bzgl. der Inhibition der homologen Rekombination zeigte. Da sich dieser synergistische Effekt gualitativ und guantitativ ganz ähnlich auch für die Kombination aus PARP-DBD und p53her darstellte, kann die Wirkung von PARP-1 auch vor dem Hintergrund von Wtp53 zumindest teilweise durch seine DNA-bindenden Eigenschaften erklärt werden. Dies bedeutet, dass unter diesen experimentellen Bedingungen PARP-1 über die Blockierung von DNA-Enden und Wtp53 über den Abbruch früher Rekombinationsereignisse (Dudenhöffer et al., 1998; Süße et al., 2000) komplementär der homologen Rekombination entgegenwirken. Die Daten sprechen also in Bezug auf die DNA-Rekombination gegen eine mögliche Rolle von PARP-1 als ein Molekül, welches DNA-Brüche erkennt und nachfolgend die Schadenssignale mittels Poly(ADP-Ribosylierung) an p53 als Rekombinationsinhibitions ausführendes Molekül überträgt (Murcia und Murcia, 1994; Oei et al., 1997; D'Amours et al., 1999). Natürlich besteht theoretisch auch die Möglichkeit, dass die inhibierende Wirkung von PARP-DBD als konstitutiv DNA-Enden bindendes Molekül und von PARP-1 als transient DNA-Enden bindendes Molekül und poly(ADP-ribosylierendes) Enzym quantitativ zufällig gleich ausfällt. In diesem Szenario wäre die rekombinations-inhibierende Wirkung von PARP-1 sowohl auf die Blockierung von DNA-Enden, als auch auf eine mögliche Stimulierung der rekombinations-inhibierenden Wirkung von Wtp53 durch Poly(ADP-Ribosylierung) zurückzuführen.

Bereits seit 20 Jahren ist bekannt, dass PARP-1 bei der DNA-Reparatur involviert ist. Auf molekularer Ebene wurden sowohl Wechselwirkungen mit XRCC1, einem DNA- Reparaturprotein, welches zusammen mit der DNA-Polymerase β und der DNA-Ligase III an der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) beteiligt ist (Masson et al., 1998) und Interaktionen mit p53 wie auch dessen Poly(ADP-Ribosylierung) in vitro und in vivo beschrieben (Pleschke et al., 2000; Smulson et al., 2000). Darüberhinaus existieren zahlreiche Studien, die auf eine Rolle von PARP-1 bei der p53-vermittelten DNA-Schadensantwort hinweisen, wobei die Art und die Konsequenzen dieser Wechselwirkung sehr kontrovers diskutiert werden (s. Übersichtsartikel von Olivier et al., 1999). So wird vermutet, dass PARP-1 die p53-Akkumulation induziert, entweder durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen oder durch Poly(ADP-Ribosylierung) (Malanga et al., 1998). Übereinstimmend mit diesen molekularen Indizien zeigen PARP-1-defiziente Zellen Defekte in der DNA-Reparatur und die vermutlich resultierenden daraus genomischen Instabilitäten (Schwesterchromatidaustäusche, chromosomale Aberationen, Mikronukleibildung u.a.) (Trucco et al., 1998; Dantzer et al., 2000). Konsequenterweise sind PARP-1-Null-Mäuse auch hypersensitiv gegenüber alkylierenden Agenzien oder y-Strahlung, also gegenüber DNA-Schädigungen, welche die BER induzieren (Menissier de Murcia et al., 1997; Masutani et al., 2000). Paradoxerweise zeigen PARP-1-Null-Mäuse keine erhöhte Krebs-Suszeptibilität, wie dies für heterozygote oder homozygote Keimbahndeletionen in p53 gezeigt wurde. Letztgenannte Mäuse zeichnen sich durch frühe Tumorbildung aus (innerhalb der ersten Lebenswochen) als Resultat defekter Zellzykluskontrolle (zusammengefaßt in Lakin und Jackson, 1999; Oren, 1999; Sionov und Haupt, 1999), durch Resistenz gegenüber durch DNA-Schäden induzierte Apoptose und durch eine Erhöhung der genetischen Instabilität, angezeigt durch Aneuoloidien, Allelverluste, Schwesterchromatidaustäusche und Genamplifikationen (Livingstone et al., 1992; Ishizaki et al., 1994). Grundsätzlich ist klar, dass beide Proteine, PARP-1 (Menissier de Murcia et al., 1997; Wang et al., 1997; Trucco et al., 1998; Simbulan-Rosenthal et al., 1999a) und p53, eine Rolle bei der Vermeidung genomischer Instabilitäten spielen (Harvey et al., 1993; Lee et al., 1994). Studien mit Kreuzungs-Mausmodellen (Conde et al., 2001) zeigten jedoch überraschend gegensätzlich, dass PARP-1<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup>-Mäuse entweder weniger zu Tumoren neigten als PARP-1<sup>+/+</sup>p53<sup>-/-</sup>-Mäuse oder, wie für PARP-1 als Tumorsuppressor erwartet, mehr (Tong et al., 2001). Unumstritten blieb jedoch, dass in Doppel-Knockout-Mäusen eine Erhöhung der genomische Instabilität beobachtet wurde. Beispielsweise wurde in embryonalen Fibroblasten von PARP- $1^{-1}p53^{-1}$ -Mäusen eine dreifache Zunahme von Mikronuklei gegenüber Wildtypzellen beobachtet, während in embryonalen Fibroblasten von PARP-1<sup>+/+</sup>p53<sup>-/-</sup>-Mäusen lediglich eine Erhöhung um das 1,4 - 1,9fache gefunden wurde (Conde et al., 2001). Diese Beobachtungen implizieren, dass das Fehlen beider Proteine, PARP-1 und p53, einen synergistischen Effekt auf die Genomstabilität ausübt, wobei unklar bleibt, ob die Tumorigenität mit dem Ausmaß an genomischer Instabilität korreliert.

Es wurde auch gezeigt, dass PARP-1 die DNA-PK-Aktivität *in vitro* stimuliert, welche wiederum über seine katalytische Untereinheit die p53-Aktivität durch Phosphorylierung zu regulieren scheint (Ruscetti *et al.*, 1998). Tatsächlich wurde beobachtet, dass Mäuse mit einer Defizienz in beiden Proteinen, also in der PARP-1 und der katalytischen Untereinheit der DNA-PK (dem Produkt des *Scid*-Gens; Maizels, 1999) eine starke Neigung zur Bildung von T-Zell-Lymphomen entwickelten. Keine der beiden genetischen Defizienzen allein erwies sich als ausreichend, um diesen Phänotyp zu verursachen, so dass eine Kooperation zwischen PARP-1 und DNA-PK bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität denkbar zu sein scheint (Morrison *et al.*, 1997). Demnach könnte die Rolle der PARP-1 bei einer möglichen Stimulierung der rekombinations-inhibierenden Wirkung von p53 komplexerer Natur sein als eine direkte Aktivierung, PARP-1 könnte über die DNA-PK und/oder andere poly(ADP-ribosylierte) Proteine das Signal eines DNA-Schadens an p53 weitergeben.

Eine Trennung der beiden Wirkungsmechanismen von PARP-1 und Wtp53 in der DNA-Rekombination könnte möglicherweise in der Zukunft durch Experimente mit C-terminal trunkierten p53-Varianten versucht werden, da p53 von PARP-1 am C-Terminus modifiziert wird (Malanga *et al.*, 1998). Eine indirekte Wirkung von PARP-1 über zwischengeschaltete DNA-PK könnte wiederum in Zelllinien mit durch Mutation ausgeschalteter PARP-1 und/oder DNA-PK geprüft werden.

## 4.11 Die rekombinations-inhibierende Wirkung von PARP-1 wird in Gegenwart von Wtp53 im stabilen Expressionssystem neutralisiert.

Überraschenderweise verursachte PARP-1-Überexpression in Anwesenheit von Wtp53 im stabilen Zellsystem keinerlei Herabregulierung der Rekombinationsaktivitäten, sondern zum Teil sogar eine Stimulierung der Austauschaktivitäten. Dies bedeutet, dass sich die rekombinations-unterdrückende Wirkung von PARP-1, welche sowohl im transienten Expressionssystem mit und ohne Wtp53 als auch im stabilen Wtp53-freien Expressionssystem feststellbar war, nach stabiler Expression von PARP-1 und Wtp53. Dies traf sowohl auf Ergebnisse mit dem SV40-Rekombinations-Testsystem als auch auf die Daten mit dem auf *EGFP*–Reaktivierung basierenden Rekombinations-Testsystem zu. Desweiteren spielte hierbei die PARP-1/DNA-Substrat-Ratio keine Rolle, da im gleichen Zellsystem mit PARP-1-Überexpression vor Wtp53-negativem Hintergrund eine 34fache Unterdrückung des DNA-Austausches zwischen einzelnen SV40-Minichromosomen bzw.

eine 20-30% ige Inhibition an multiplen Plasmidkopien zu beobachten war. In LMV2-PARPp53her-Kl1-Zellen scheint also weder das Modell der ergänzenden Rekombinationsinhibition über molekulare Wechselwirkungen mit dem DNA-Schaden bzw. den Rekombinationsintermediaten noch das Modell einer durch PARP-1 vermittelten p53-Aktivierung als Rekombinationsantagonist zuzutreffen. Interessanterweise zeigte jedoch dieser Klon LMV2-PARPp53her-Kl1 insbesondere nach Östradiolinduktion einige besonders auffällige Eigenschaften, nämlich dramatisch verlangsamtes Wachstum, das Auftauchen von apoptotischen Zellen gemäß FACS-Analyse von propidiumjodid-gefärbten Zellen, gemäß DAPI-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie sowie gemäß der Hochregulierung von Bax vor und nach Bestrahlung der Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen nach Östradiolinduktion, also nach Aktivierung von p53her und nach gesteigerter PARP-1-Expression die Apoptose einleiteten. Es wurde beschrieben, dass bereits die Überexpression von p53 ausreichend ist, um in verschiedenen Zelltypen Apoptose zu induzieren (Yonish-Rouach et al., 1991). Möglicherweise ist in LMV2-PARPp53her-KI1-Zellen durch konstitutive p53her-Expression und partielle Aktivierung durch geringe Restkonzentrationen an östradiolähnlichen Molekülen während der Kultivierung der Zellen im östradiol-befreiten Medium diese Voraussetzung zumindest partiell erfüllt (Dudenhöffer et al., 1998). Darüberhinaus zeigt die Western-Analyse dieses Klons auch eine erhöhte Basalexpression von PARP-1 bereits vor Zugabe des Hormons zum Medium. Dies bedeutet, dass während der gesamten Kultivierungsdauer von Klon LMV2-PARPp53her-Kl1 ein erhöhter Spiegel an poly(ADPribosyliertem) p53 in den Zellen vorlag, während dies im transienten Expressionssystem nur für einen kurzen Zeitraum von 48-72 h zu erwarten war.

In der Literatur wurde bzgl. der Aktivitäten von p53 als transkriptioneller Transaktivator, Zellzyklusregulator und Apoptoseinduktor sowohl eine Stimulierung wie auch eine Inhibierung durch Poly(ADP-Ribosylierung) diskutiert (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1999b; Bargonetti *et al.*, 2002). In unserem System spricht die Anschaltung der p53-Zielgene *p21* und *Bax* in Klon LMV2-p53herPARP-Kl1 vor allem nach Bestrahlung für eine Stimulierung dieser Aktivitäten durch PARP-1. Grundsätzlich wurde Apoptoseinduktion als Ergebnis einer PARP-1-Aktivierung auch unabhängig von p53 beschrieben. In Übereinstimmung damit beobachtete ich hier, dass nach Bestrahlung von Wtp53-freien und PARP-1 überexprimierenden LMV2-PARP-Kl3-Zellen bis zu 13% der Zellen gemäß Zellzyklusanalyse in die Apoptose gingen. Im p53her-positiven und PARP-1 überexprimierenden Klon LMV2-p53herPARP-Kl1 lag der Anteil der apoptotischen Zellen konstant, also bereits wenige Stunden nach Östradiolgabe, bei einem Anteil von rund 10%. Obwohl  $\gamma$ -Strahlen zu Doppelstrangbrüchen führen und als potente PARP-1-Aktivatoren gelten (Olivier *et al.*, 1999), konnte  $\gamma$ -Strahlung in diesen Zellen die Zahl der apoptotischen Zellen nicht weiter

steigern. Es schien also, dass bereits durch Überexpression der PARP-1 in diesem System die Apoptose maximal induziert wurde. Übereinstimmend mit Gegenselektion durch Apoptoseinduktion war auch die Etablierung von LMV2-Klonen, welche in Gegenwart von p53her stabil PARP-1 überexprimierten, selten, da nur ein einziger Klon unter 6 getesteten isoliert werden konnte. Demgegenüber konnten parallel dazu von 18 getesteten Klonen 8 mit stabiler p53her-Expression isoliert werden.

Zellklon LMV2-PARPp53her-KI1 zeigte auch Anzeichen einer dramatisch erhöhten Genominstabilität, welche sich in massiver Polyploidie ausdrückte. Interessanterweise wurde von M.Miwa, Universität Tsukuba/ Japan, auf dem 13. Internationalen Symposium der ADP-Ribosylierung (New York) berichtet, dass die Überexpression der PARP-3 oder nur ihres N-Terminus Zentriolenduplikation vermeidet und einen G1/S-Zellzyklusblock verursacht. Außerdem wurden unter diesen Bedingungen PARP-1, PARP-2 und PARP-3 mit der mitotischen Spindel assoziiert vorliegend gefunden (Murcia, 2001). Eine Überexpression von PARP-1 könnte möglicherweise das stöchiometrische Gleichgewicht verschoben haben und so Endoreduplikation, also Genomverdopplung ohne Mitose und Kernteilung ohne Zellteilung verursacht haben. Eine dominant negative Wirkung von überexprimierter PARP-1 auf PARP-3 könnte auch die Verschiebung des Anteils der Zellen in G1 zu G2 erklären. Unklar bleibt jedoch, wieso dies ausschließlich in den Zellen mit Wtp53 (p53her) beobachtet wurde. In diesem Zusammenhang ist jedoch bemerkenswert, dass Wtp53 sowohl G1/S-Zellzyklusarrest als auch G2/M-Arrest verursacht, indem es nach DNA-Schädigung die Gene p21 bzw. 14-3-3 $\sigma$  transkriptionell transaktiviert (Vogelstein *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 1999). Paradoxerweise war jedoch in Klon LMV2-PARPp53her-Kl1, also nach PARP-1-Überexpression in Gegenwart von p53her das Auftauchen polyploider Zellen und von Zellen mit mitotisch kondensiertem Chromatin beobachtet worden, so dass sich die Frage stellt, ob möglicherweise Hyper-Poly(ADP-Ribosylierung) von Wtp53 mit dem Verlust der Repression der cdc2- und Zyklin B-Promotoren einherging und so den Übergang von der G2 in die M-Phase ermöglichte (Dassalaris et al., 1999). Es ist in diesem Zusammenhang auch wichtig anzumerken, dass  $14-3-3\sigma$  /-Zellen eine dem Klon LMV2-PARPp53her-Kl1 sehr ähnliche polynukleäre Morphologie mit Mikronukleation und mitotischer Katastrophe aufweisen (Chan et al., 1999), die sich von allgemeineren Formen der Apoptose durch das Fehlen der DNA-Leiterbildung unterscheidet. Zukünftige Experimente sollten demnächst weiterführend klären, ob Klon LMV2-PARPp53her-Kl1 nach Östradiolgabe die typischen DNA-Spaltungsmuster der Apoptose aufweist.

Um zu überprüfen, ob die Einleitung der Apoptose durch PARP-1-Überexpression im p53her-positiven Klon LMV2-PARPp53her-Kl1 wie in anderen Fällen postuliert zu einer

4. Diskussion

Erhöhung der DNA-Brüche (Sim und Liu, 2001) und damit indirekt zu einer Steigerung und nicht zur erwarteten Senkung der DNA-Rekombinationsfrequenzen führte, wurden in dieser Arbeit schließlich Rekombinationsmessungen in Gegenwart des Caspase-Inhibitors durchgeführt. Es zeigte sich, dass für die PARP-1-Expression im transienten System die Caspase-Inhibition keine Auswirkungen auf die Häufigkeit der rekombinativen Reparatur hatte. Die gleiche Beobachtung wurde auch für die PARP-1-Expression mit den Wtp53-freien stabilen Zellklonen gemacht (Klon LMV2-PARP-Kl3). Im Gegensatz dazu konnte für den stabilen Klon LMV2-PARPp53her-Kl1 mit PARP-1-Überexpression und p53her eine signifikante (p=0,034 bis p=0,009) Herabsetzung der Rekombinationsfrequenzen erzielt werden. Daraus läßt sich ableiten, dass apoptotische Prozesse, verursacht durch Koexpression von PARP-1 und Wtp53 und die damit verbundenen Signalübertragungsvorgänge, rekombinations-stimulierend wirken.

Zusammenfassend läßt sich aufgrund meiner Ergebnisse zur rekombinationsregulatorischen Wirkung von PARP-1 sagen, dass PARP-1 nach Überexpression als DNA-Enden bindendes Molekül Rekombinationsprozesse blockiert. Bereits ohne PARP-1-Überexpression, wird davon ausgegangen, dass normalerweise pro 1000 Basenpaare 1 PARP-1-Molekül in der Zelle vorliegt, d.h. insgesamt 3 Millionen PARP-1-Moleküle (bei 3 Milliarden Basenpaaren pro Zelle). Diese Interpretation meiner Daten wäre mit den in der Literatur existierenden Daten zur Unterdrückung von Schwesterchromatidaustäuschen durch PARP-1 in Einklang zu bringen (Wang et al., 1997). Im Gegensatz zu den publizierten Daten verursachte jedoch auch Inaktivierung von PARP-1 durch Expression der dominant negativen PARP-Variante wie auch durch pharmakologische Inhibition einen antirekombinogen Effekt. Da jedoch in meiner Arbeit zum ersten Mal DNA-Rekombinationsmessungen nach gezielter Einführung von Doppelstrangbrüchen in mehreren Zellsystemen mit mehreren DNA-Substrattypen vorgenommen wurden, sind diese den indirekten zytogenetischen Analyseverfahren aus der Literatur überlegen und damit in Bezug auf die direkte Wirkung in der DNA-Rekombination aussagekräftiger. Meine Daten mit stabilen Zellklonen deuten weiter an, dass indirekte Effekte der PARP-1-Expression auf die Genomstabilität durch Signalübertragung via p53 zu einer scheinbaren Umkehrung der Effekte führen können. Dies veranschaulicht, dass für die Analyse der molekularen Wirkungsweise von PARP-1 in der DNA-Reparatur transiente gegenüber stabilen Expressionssystemen vorzuziehen sind, um Abweichungen aufgrund von Zellzyklus- und Apoptosevariationen zu vermeiden. Die sich wechselseitig beeinflussenden Effekte von PARP-1 und p53 in DNA-Reparatur oder Wachstums- bzw. Apoptosekontrolle könnten jedoch die zum Teil sehr großen Unterschiede in den publizierten Ergebnissen bzgl. der

kombinierten Wirkung während der Tumorentstehung erklären (Conde et al., 2001; Tong et al., 2001).

#### 5. Zusammenfassung

Ein Durchbruch bei der Aufklärung der genom-stabilisierenden Wirkung von p53 wurde erzielt, als man zeigen konnte, dass p53 Rekombinationsprozesse unterdrückt, insbesondere wenn bestimmte Basenfehlpaarungen auf der nach Strangaustausch erzeugten Heteroduplex (DNA-Doppelstrang aus Einzelsträngen unterschiedlicher Herkunft) auftauchen. Weiterhin gelang es durch Mutantenanalysen herauszuarbeiten, dass Rekombinations- und Wachstumskontrolle zwei unterscheidbare Aktivitäten von p53 darstellen, welche möglicherweise unabhängig voneinander zur Tumor supprimierenden Wirkung beitragen.

Darauf aufbauend gelang es in dieser Arbeit unter Anwendung biochemischer Analyseverfahren zu zeigen, dass p53 und die Rekombinase hRad51 an rekombinativen DNA-Strukturen physikalisch und funktionell miteinander wechselwirken. So konnte in Strangtransfer-Experimenten und Exonukleaseaktivitäts-Tests gezeigt werden, dass strangtransfer-aktives hRad51 den p53-vermittelten nukleolytischen DNA-Abbau durch die Erzeugung von Rekombinationsintermediaten stimuliert. Durch Bindungsstudien konnte herausgearbeitet werden, dass hRad51 oligomer in Assoziation mit künstlichen, dreisträngigen Rekombinationsintermediaten die Bildung stabiler Komplexe aus p53 und diesen 3-Strang-Strukturen fördert. Mechanistische Studien ergaben weiterhin, dass rekombinative DNA-Strukturen bevorzugte Substrate für die exonukleolytische Korrektur durch p53 insbesondere dann darstellen, wenn die genannten Basenfehlpaarungen in der Heteroduplex vorliegen, was die Hypothese einer aktiven Fehlerbeseitigung durch p53 stützt. Es zeigte sich weiter, dass diese exonukleolytische Korrekturaktivität mit zunehmender Strangkreuzungsregion Entfernung von der abnimmt, also gegen frühe Rekombinationsintermediate gerichtet zu sein scheint.

Die krebs-assoziierte Mutante p53(273H) war und ist von allergrößtem Interesse, da sie als 3'->5' Exonuklease inaktiv ist und keine Rekombinationskontrolle ausübt, jedoch noch Teilaktivitäten in der transkriptionellen Transaktivierung und Wachstumskontrolle aufweist. Im Vergleich zu Wtp53 erwies sich die Mutante p53(273H) genau in den die Rekombination betreffenden biochemischen Eigenschaften, d.h. in der Bindung und exonukleolytischen Degradierung von Rekombinatiosintermediaten und in der kooperativen Wechselwirkung mit hRad51-Filamenten als defekt. Dadurch konnte zur Klärung der Ursachen des DNA-Reparaturdefektes dieser Mutante und möglicherweise auch seiner kanzerogenen Wirkung beigetragen werden. Demgegenüber führten Untersuchungen zur Rolle der Tetramerisierung bei diesen sequenz-unabhängigen DNA-Interaktionen von p53 zu

dem Ergebnis, dass die Ausbildung stabiler, tetramerer p53-Komplexe in Nachbarschaft von DNA-Kreuzungsstrukturen für den effizienten exonukleolytischen Angriff von 3-Strang-DNA-Strukturen notwendig zu sein scheint. Aufgrund dieser Daten konnte ein mechanistisches Modell vorgeschlagen werden, bei welchem es zu einer frühzeitigen p53-Rekrutierung nach der initialen Stranginvasion durch hRad51 kommt und p53 als Fehlerkorrekturmechanismus für Strangaustauschereignisse fungiert.

Aufgrund der vermuteten Rolle von posttranslationalen Modifikationen bei der Generierung von p53-Subpopulationen mit multiplen Funktionen bei der Vermeidung der Krebsentstehung, befasste sich diese Arbeit weiterführend mit der Analyse der Poly-ADP-Phosphoribosyl-Transferase (PARP-1) als Bestandteil einer Signaltransduktionskette zwischen DNA-Strangbrucherkennung und p53-Modifikation. Um zu verstehen, in welcher Weise PARP-1 die Rekombinationskontrolle von p53 beeinflußt, wurden in gezielt veränderten zellulären Systemen Rekombinationsmessungen mit Hilfe des auf SV40 und des auf EGFP-Rekonstitution basierenden Testsystems mit einer Serie von episomal und chromosomal integrierten DNA-Substraten zur *I-Scel*-Meganuklease induzierten Doppelstrangbruchreparatur durchgeführt. Die Ergebnisse aus Wtp53-freien Zellsystemen nach Expression von PARP-1 oder der PARP-1-DNA-Binde-Domäne (PARP-DBD) demonstrierten eine dosisabhängige Rekombinationsinhibition durch PARP-1 und veranschaulichten die Bedeutung von Strangbrüchen als Vorraussetzung für die von der PARP-1 bei der Rekombination ausgeübte Funktion. Nach transienter Expression von PARP-1 oder PARP-DBD in wtp53-haltigen Zellen zeigte sich ein synergistischer Effekt bzgl. der Inhibition der homologen Rekombination. Dies bedeutet, dass die Wirkung von PARP-1 auch vor dem Hintergrund von Wtp53 über die Blockierung von DNA-Enden erklärt werden kann, wobei Wtp53 über den Abbruch früher Rekombinationsereignisse komplementär der homologen Rekombination entgegenwirkt. Die Daten sprechen also in Bezug auf die DNA-Rekombination gegen eine mögliche Rolle von PARP-1 als ein Molekül, welches DNA-Brüche erkennt und nachfolgend die Schadenssignale mittels Poly(ADP-Ribosylierung) an p53 als das die Rekombinationsinhibition ausführende Molekül überträgt. Überraschenderweise kehrte sich jedoch die Wirkung von PARP-1 nach stabiler Koexpression von PARP-1 und Wtp53 um. Hier konnte ein Zusammenhang zwischen der Einleitung der Apoptose, möglicherweise über Signalübertragung via p53 und der unerwarteten Zunahme der DNA-Austauschfrequenzen beobachtet werden. Dies veranschaulicht, dass für die Analyse der molekularen Wirkungsweise von PARP-1 in der DNA-Reparatur transiente Expressionssysteme vorzuziehen sind, um Abweichungen aufgrund indirekter Effekte auf Wachstum und Tod der Zellen zu vermeiden.

### 6. Literaturverzeichnis

Ababneh, M., Gotz, C., and Montenarh, M., 2001, Downregulation of the cdc2/cyclin B protein kinase activity by binding of p53 to p34(cdc2), *Biochem Biophys Res Commun* **283**(2):507-12.

Abraham, J., Spaner, D., and Benchimol, S., 1999, Phosphorylation of p53 protein in response to ionizing radiation occurs at multiple sites in both normal and DNA-PK deficient cells, *Oncogene* **18**(8):1521-7.

Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R., Wang, Z. Q., Wagner, E. F., and Stark, G. R., 1997, Defective induction but normal activation and function of p53 in mouse cells lacking poly-ADP-ribose polymerase, *Oncogene* **15**(9):1035-41.

Akyüz, N., 2001, Entwicklung und Applikation eines auf Fluoreszenzdetektion basierenden Test-Systems für DNA-Austausch-Ereignisse, *Dissertation*.

Akyüz, N., Boehden, G. S., Janz, C., Süsse, S., and Wiesmüller, L., 2000, Potential roles of p53 in recombination, *Gene Ther Mol Biol* **5**:56-72.

Akyüz, N., Boehden, G. S., Süsse, S., Rimek, A., Preuss, U., Scheidtmann, K.-H., and Wiesmüller, L., 2002, DNA substrate dependence of the p53-mediated regulation of double-strand break repair, *Mol Cell Biol* **22**:6306-6317.

Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Grosse, F., Kim, E., Wiesmuller, L., and Deppert, W., 1999, Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53, *Oncogene* **18**(53):7706-17.

Althaus, F. R., and Richter, C., 1987, ADP-ribosylation of proteins. Enzymology and biological significance, *Mol Biol Biochem Biophys* **37**:1-237.

Alvarez-Gonzalez, R., and Althaus, F. R., 1989, Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents, *Mutat Res* **218**(2):67-74.

Alvarez-Gonzalez, R., and Jacobson, M. K., 1987, Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo, *Biochemistry* **26**(11):3218-24.

Atz, J., Wagner, P., and Roemer, K., 2000, Function, oligomerization, and conformation of tumorassociated p53 proteins with mutated C-terminus, *J Cell Biochem* **76**:572-584.

Ausubel, F. M., 1992, Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biologie, *Greene Pub. Associates;Wiley,Brooklyn,NY*.

Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K. P., Szekely, L., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K. G., 1995, p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain, *Nucleic Acids Res.* **23**:362-369.

Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K. P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K. G., 1994, p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:413-417.

Banks, L., Matlashewski, G., and Crawford, L., 1986, Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression, *Eur. J. Biochem.* **159**:529-534.

Bargonetti, J., Manfredi, J. J., Chen, X., Marshak, D. R., and Prives, C., 1993, A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein, *Genes Dev* **7**:2565-2574.

Baum, C., Forster, S., Hegewisch-Becker, S., and Harbers, K., 1994, An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines, *Bio Techniques* **17**:1058-1062.

Baumann, P., Benson, F. E., and West, S. C., 1996, Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions *in vitro*, *Cell* **87**:757-766.

Baumann, P., and West, S. C., 1997, The human Rad51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A, *EMBO J.* **16**:5198-5206.

Baumann, P., and West, S. C., 1999, Heterduplex formation by human Rad51 protein: Effects of DNA end-structure, hRP-A and hRad52, *J Mol Biol* **29**:363-374.

Belmaaza, A., and Chartrand, P., 1994, One-sided invasion events in homologous recombination at double-strand breaks, *Mutat Res* **314**:199-208.

Benjamin, R. C., and Gill, D. M., 1980, Poly(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks, *J Biol Chem* **255**(21):10502-8.

Benson, F. E., Baumann, P., and West, S. C., 1998, Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair, *Nature* **391:**401-404.

Benson, F. E., Stasiak, A., and West, S. C., 1994, Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E.coli RecA, *EMBO J.* **13:**5764-5771.

Bernstein, C., and Bernstein, H., 1991, Aging, sex, and DNA repair (I. Academic Press, ed.), San Diego, CA.

Bertrand, P., Rouillard, D., Boulet, A., Levalois, C., Soussi, T., and Lopez, B. S., 1997, Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein, *Oncogene* **14**(9):1117-22.

Bill, C. A., Yu, Y. J., Miselis, N. R., Little, J. B., and Nickoloff, J. A., 1997, A role for p53 in DNA end rejoining by human cell extracts, *Mutat Res DNA Repair* **385**(1):21-29.

Blakesley, R. W., and Boezi, J. A., 1977, A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G250, *Anal Biochem* **82**(2):580-2.

Boehden, G. S., 2003, Analyse der Rolle von DNA-cis-Elementen bei der homologen Rekombination, *Dissertation*.

Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* **72**:248-54.

Brain, R., and Jenkins, J. R., 1994, Human p53 directs DNA strand reassociation and is photolabelled by 8-azido ATP, *Oncogene* **9**:1775-1780.

Bramson, J., Prevost, J., Malapetsa, A., Noe, A. J., Poirier, G. G., DesNoyers, S., Alaoui-Jamali, M., and Panasci, L., 1993, Poly(ADP-ribose) polymerase can bind melphalan damaged DNA, *Cancer Res* **53**(22):5370-3.

Braselmann, S., Graninger, P., and Busslinger, M., 1993, A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:1657-1661.

Bressan, D. A., Baxter, B. K., and Petrini, J. H., 1999, The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in Saccharomyces cerevisiae, *Mol Cell Biol* **19**(11):7681-7.

Brown, D. R., Deb, S., Munoz, R. M., Subler, M. A., and Deb, S. P., 1993, The tumor suppressor and the onocprotein simian virus 40 T antigen bind to overlapping domains on thew MDM2 protein, *Mol. Cell. Biol.* **13**:6849-6857.

Buchhop, S., Gibson, M. K., Wang, X. W., Wagner, P., Stuerzbecher, H. W., and Harris, C. C., 1997, Interaction of p53 with the human Rad51 protein, *Nucleic Acids Res* **25**(19):3868-3874.

Butler, A. J., and Ordahl, C. P., 1999, Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription, *Mol Cell Biol* **19**(1):296-306.

Caamano, J., Ruggeri, B., Momiki, S., Sickler, A., Zhang, S. Y., and Klein-Szanto-AJP, 1991, Detection of p53 in primary lung tumors and nonsmall cell lung carcinoma cell lines, *Am. J. Pathol.* **139**:839-845.

Cao, L., Alani, E., and Kleckner, N., 1990, A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in S. cerevisiae, *Cell* **61**(6):1089-101.

Cervantes, M. D., Farah, J. A., and Smith, G. R., 2000, Meiotic DNA breaks associated with recombination in S. pombe, *Mol Cell* **5**(5):883-8.

Cervantes-Laurean, D., Jacobson, E. L., and Jacobson, M. K., 1996, Glycation and glycoxidation of histones by ADP-ribose, *J Biol Chem* **271**(18):10461-9.

Cervantes-Laurean, D., Minter, D. E., Jacobson, E. L., and Jacobson, M. K., 1993, Protein dycation by ADP-ribose: studies of model conjugates, *Biochemistry* **32**(6):1528-34.

Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B., 1999, 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage, *Nature* **401**(6753):616-20.

Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T. D., 2000, Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53, *Genes Dev* **14**(3):278-88.

Chen, J., Marechal, V., and Levine, A. J., 1993, Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains, *Mol.Cell.Biol.* **13:**4107-4114.

Chen, J., Silver, D. P., Walpita, D., Cantor, S. B., Gazdar, A. F., Tomlinson, G., Couch, F. J., Weber, B. L., Ashley, T., Livingston, D. M., and Scully, R., 1998, Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells, *Mol Cell* **2**:317-328.

Chen, J. J., Silver, D., Cantor, S., Livingston, D. M., and Scully, R., 1999, BRCA1, BRCA2 and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway, *Cancer Res* **59**:1752s-1756s.

Chen, P.-L., Chen, C.-F., Chen, Y., Xiao, J., Sharp, Z. D., and Lee, W.-H., 1998, The BRC repeats in BRCA2 are critical of RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment, *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:5287-5292.

Chene, P., and Bechter, E., 1999, p53 mutants without a functional tetramerisation domain are not oncogenic, *J Mol Biol* **286**:1269-1274.

Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P., 1994, Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations, *Science* **265**:346-355.

Conde, C., Mark, M., Oliver, F. J., Huber, A., de Murcia, G., and Menissier-de Murcia, J., 2001, Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice, *Embo J* **20**(13):3535-43.

Coppola, S., Nosseri, C., Maresca, V., and Ghibelli, L., 1995, Different basal NAD levels determine opposite effects of poly(ADP- ribosyl)polymerase inhibitors on H2O2-induced apoptosis, *Exp Cell Res* **221**(2):462-9.

Cox, M. M., 1997, Recombinational crossroads: Eukaryotic enzymes and the limits of bacterial precedents, *Proc Natl Acad Sci USA* **94:**11764-11766.

Cox, M. M., Goodman, M. F., Kreuzer, K. N., Sherratt, D. J., Sandler, S. J., and Marians, K. J., 2000, The importance of repairing stalled replication forks, *Nature* **404**(6773):37-41.

D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G. G., 1999, Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions, *Biochem J* **342**(Pt 2):249-68.

Dantzer, F., de La Rubia, G., Menissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., and Schreiber, V., 2000, Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP- ribose) polymerase-1, *Biochemistry* **39**(25):7559-69.

de Murcia, G., and Menissier de Murcia, J., 1994, Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor, *Trends Biochem Sci* **19**(4):172-6.

de Murcia, J. M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F. J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., Walztinger, C., Chambon, P., and de Murcia, G., 1997, Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14):7303-7.

De Zutter, J. K., and Knight, K. L., 1999, The hRad51 and RecA proteins show significant differences in cooperative binding to single-stranded DNA, *J Mol Biol* **293**(4):769-80.

Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P., 1995, Mice lacking p21 cip1/waf1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control, *Cell* **82**:675-684.

Deppert, W., 1994, The yin and yang of p53 in cellular proliferation, *Cancer Biol* **5**:187-202. Ding, H. F., and Fisher, D. E., 1998, Mechanisms of p53-mediated apoptosis, *Crit Rev Oncog* **9**(1):83-98.

Ding, R., and Smulson, M., 1994, Depletion of nuclear poly(ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression: influences on genomic stability, chromatin organization, and carcinogen cytotoxicity, *Cancer Res* **54**(17):4627-34.

Donehower, L. A., and Bradley, A., 1993, The tumor suppressor p53, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **1155**:181-205.

D'Silva, I., Pelletier, J. D., Lagueux, J., D'Amours, D., Chaudhry, M. A., Weinfeld, M., Lees-Miller, S. P., and Poirier, G. G., 1999, Relative affinities of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinase for DNA strand interruptions, *Biochim Biophys Acta* **1430**(1):119-26.

Dudenhöffer, C., Kurth, M., Janus, F., Deppert, W., and Wiesmüller, L., 1999, Dissociation of the recombination control and the sequence-specific transactivation function of p53, *Oncogene* **18**:5773-5784.

Dudenhöffer, C., Rohaly, G., Will, K., Deppert, W., and Wiesmüller, L., 1998, Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination, *Mol. Cell. Biol.* **18**:5332-5342.

Earle, E., Saxena, A., MacDonald, A., Hudson, D. F., Shaffer, L. G., Saffery, R., Cancilla, M. R., Cutts, S. M., Howman, E., and Choo, K. H., 2000, Poly(ADP-ribose) polymerase at active centromeres and neocentromeres at metaphase, *Hum Mol Genet* **9**(2):187-94.

El-Deiry, W. S., 1998, p21/p53, cellular growth control and genomic integrity, *Curr Top Microbiol Immunol* **227**:121-137.

El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B., 1992, Definition of a consensus binding site for p53, *Nature Gen* **1**:45-49.

El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B., 1993, WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell* **75**:817-825.

El-Hizawi, S., Lagowski, J. P., Kulesz-Martin, M., and Albor, A., 2002, Induction of gene amplification as a gain-of-function phenotype of mutant p53 proteins, *Cancer Res* **62**:3264-3270.

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

Featherstone, C., and Jackson, S. P., 1999, DNA double-strand break repair, Curr Biol 9(20):R759-61.

Fernandez, A., Ribeiro, J. M., Costas, M. J., Pinto, R. M., Canales, J., and Cameselle, J. C., 1996, Specific ADP-ribose pyrophosphatase from Artemia cysts and rat liver: effects of nitroprusside, fluoride and ionic strength, *Biochim Biophys Acta* **1290**(1):121-7.

Fernandez, A., Ribeiro, J. M., Costas, M. J., Pinto, R. M., Canales, J., and Cameselle, J. C., 1996, Specific ADP-ribose pyrophosphatase from Artemia cysts and rat liver: effects of nitroprusside, fluoride and ionic strength, *Biochim Biophys Acta* **1290**(1):121-7.

Ferro, A. M., and Olivera, B. M., 1982, Poly(ADP-ribosylation) in vitro. Reaction parameters and enzyme mechanism, *J Biol Chem* **257**(13):7808-13.

Fiers, W., Contreras, R., Haegemann, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Heverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G., and Ysebaert, M., 1978, Complete nucleotide sequence of SV40 DNA, *Nature* **273**:113-120.

Firmenich, A. A., Elias-Arnanz, M., and Berg, P., 1995, A novel allele of Saccharomyces cerevisiae *RFA1* that is dificient in recombination and repair and suppressible by *RAD52*, *Mol. Cell. Biol.* **15**:1620-1631.

Flores-Rozas, H., and Kolodner, R. D., 2000, Links between replication, recombination and genome instability, *Trends Biochem Sci* **25**:196-200.

Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P. P., Will, H., and Schneider, C., 2000, Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform, *EMBO J* **19**:6185-6195.

Ford, J. M., and Hanawalt, P. C., 1997, Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts, *J Biol Chem.* **272**(44):28073-28080.

Fox, M. E., and Smith, G. R., 1998, Control of meiotic recombination in Schizosaccharomyces pombe, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **61**:345-78

Frank-Vaillant, M., and Marcand, S., 2001, NHEJ regulation by mating type is exercised through a novel protein, Lif2p, essential to the ligase IV pathway, *Genes Dev* **15**(22):3005-12.

Fried, M., and Crothers, D. M., 1981, Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis, *Nucleic Acids Res* **9**(23):6505-25.

Furuse, M., Nagase, Y., Tsubouchi, H., Murakami-Murofushi, K., Shibata, T., and Ohta, K., 1998, Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination, *Embo J* **17**(21):6412-25.

Galande, S., and Kohwi-Shigematsu, T., 1999, Poly(ADP-ribose) polymerase and Ku autoantigen form a complex and synergistically bind to matrix attachment sequences, *J Biol Chem* **274**(29):20521-8.

Game, J. C., and Mortimer, R. K., 1974, A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast, *Mutat Res.* **24:**281-292.

Garner, M. M., and Revzin, A., 1981, A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system, *Nucleic Acids Res* **9**(13):3047-60.

Gebow, D., Miselis, N., and Liber, H. L., 2000, Homologous and nonhomologous recombination resulting in deletion: effects of p53 status, microhomology, and repetitive DNA length and orientation, *Mol Cell Biol.* **20**:4028-4035.

Gluzman, Y., 1981, SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants, *Cell* **23**:175-182.

Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M., and Del Sal, G., 1999, Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1, *Embo J* **18**(22):6462-71.

Gottlieb, T. M., and Oren, M., 1996, p53 in growth control and neoplasia, *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1287**(2-3):77-102.

Gotz, C., Scholtes, P., Prowald, A., Schuster, N., Nastainczyk, W., and Montenarh, M., 1999, Protein kinase CK2 interacts with a multi-protein binding domain of p53, *Mol Cell Biochem* **191**(1-2):111-20.

Gradwohl, G., Mazen, A., and de Murcia, G., 1987, Poly(ADP-ribose) polymerase forms loops with DNA, *Biochem Biophys Res Commun* **148**(3):913-9.

Graham, F. L., and van der Eb, A. J., 1973, A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA, *Virology* **52**:456-467.

Gupta, R. C., Bazemore, L. R., Golub, E. I., and Radding, C. M., 1997, Activities of human recombination protein Rad51, *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **94:**463-468.

Gurney, E. G., Tamowski, S., and Deppert, W., 1986, Antigenic binding sites of monoclonal antibodies specific for simian virus 40 large T antigen, *J. Virol.* **57**:1168-1172.

Haber, J., 1999, DNA recombination: the replication connection, *Trends Biol Sci* **24**:271-275. Haber, J., 1999, Gatekeepers of recombination, *Nature* **398**:665-666.

Hakem, R., de la Pompa, J., L., Elia, A., Potter, J., and Mak, T. W., 1997, Partial rescue of *BRCA1*<sup>5-6</sup> early embryonic lethality by *p*53 od *p21* null mutation, *Nature Genet.* **16**:298-302.

Hanahan, D., 1983, Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids, *J Mol Biol* **166**(4):557-80.

Harlow, E., Crawford, L. V., Pim, D. C., and Williamson, N. M., 1981, Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumor antigens, *J. Virol.* **9**:861-869.

Harvey, M., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., Bradley, A., and Donehower, L. A., 1993, Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice, *Nat Genet* **5**(3):225-9.

Hatakeyama, K., Nemoto, Y., Ueda, K., and Hayaishi, O., 1986, Purification and characterization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Different modes of action on large and small poly(ADP-ribose), *J Biol Chem* **261**(32):14902-11.

Hilz, H., 1981, ADP-ribosylation of proteins - a multifunctional process, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362**:1415-1425.

Hinds, P. W., Finlay, C. A., Quartin, R. S., Baker, S. J., Fearon, E. R., Vogelstein, B., and Levine, A. J., 1990, Mutant p53 cDNAs from human colon carcinomas can cooperate with ras in transformation of primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes, *Cell Growth Diff.* **1**:571-580.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C., 1991, p53 mutations in human cancers, *Science* **253**:49-53.

Holmes, A. M., and Haber, J. E., 1999, Double-strand break repair in yeast requires both leading and lagging strand DNA polymerases, *Cell* **96**:415-424.

Huang, P., 1998, Excision of mismatched nucleotides from DNA: a potential mechanism for enhancing DNA replication fidelity by the wild-type p53 protein, *Oncogene* **17**:261-270.

Huletsky, A., de Murcia, G., Muller, S., Hengartner, M., Menard, L., Lamarre, D., and Poirier, G. G., 1989, The effect of poly(ADP-ribosyl)ation on native and H1-depleted chromatin. A role of poly(ADP-ribosyl)ation on core nucleosome structure, *J Biol Chem* **264**(15):8878-86.

Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A., and Lane, D. P., 1993, Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53, *Nucleic Acids Res.* **21**:3167-3174.

Ikejima, M., and Gill, D. M., 1988, Poly(ADP-ribose) degradation by glycohydrolase starts with an endonucleolytic incision, *J Biol Chem* **263**(23):11037-40.

Ishizaki, K., Ejima, Y., Matsunaga, T., Hara, R., Sakamoto, A., Ikenaga, M., Ikawa, Y., and Aizawa, S., 1994, Increased UV-induced SCEs but normal repair of DNA damage in p53- deficient mouse cells, *Int J Cancer* **58**(2):254-7.

Jacks, T., and Weinberg, R. A., 1996, Cell-cycle control and its watchman, Nature 381:643-644.

Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmüller, L., Grosse, F., and Deppert, W., 1999, The dual role model of p53 in maintaining genomic integrity, *Cell Mol Life Sci.* **55**:12-27.

Janus, F., Albrechtsen, N., Knippschild, U., Wiesmüller, L., Grosse, F., and Deppert, W., 1999, Different regulation of the p53 core domain activities 3' to 5' exonuclease and sequence-specific DNA binding, *Mol Cell Biol* **19**:2155-2168.

Janz, C., 1999, Studien zum biochemischen Mechanismus der Regulation von Rekombinationsprozessen durch das Tumorsuppresorprotein p53, *Diplomarbeit*.

Janz, C., Süsse, S., and Wiesmüller, L., 2002, p53 and recombination intermediates: role of DNA tetramerization at DNA junctions in complex formation and exonucleolytic degradation, *Oncogene* **21**:2130-2140.

Janz, C., and Wiesmüller, L., 2002, Wild-type p53 inhibits replication-associated homologous recombination, *Oncogene* **21**:5929-5933.

Jasin, M., 1996, Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases, *Trends Genet*. **12:**224-228.

Jean, D., Gendron, D., Delbecchi, L., and Bourgaux, P., 1997, p53-mediated DNA renaturation can mimic strand exchange, *Nucl Acids Res* **25**(20):4004-4012.

Johnson, R. D., and Jasin, M., 2000, Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells, *EMBO J.* **19**:3398-3407.

Kanaar, R., and Hoeijmakers, J. H. J., 1998, From competition to collaboration, Nature 391:335-338.

Kanaar, R., J.H.J., H., and van Gent, D. C., 1998, Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair, *Trends Cell Biol.* **8:**483-489.

Karran, P., 2000, DNA double strand break repair in mammalian cells, *Curr Opin Genet Dev* **10**(2):144-50.

Kasher, M. S., Wakulchik, M., Cook, J. A., and Smith, M. C., 1993, One-step purification of recombinant human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein and its binding to the retinoblastoma gene product, *Biotechniques* **14**(4):630-41.

Kastan, M. B., and Lim, D. S., 2000, The many substrates and functions of ATM, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **1**:79-86.

Kim, W. J., Lee, S., Park, M. S., Jang, Y. K., Kim, J. B., and Park, S. D., 2000, Rad22 protein, a rad52 homologue in Schizosaccharomyces pombe, binds to DNA double-strand breaks, *J Biol Chem* **275**(45):35607-11.

Knippschild, U., Milne, D. M., Campbell, L. E., DeMaggio, A. J., Christenson, E., Hoekstra, M. F., and Meek, D. W., 1997, p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response b topoisomerasedirected drugs, *Oncogene* **15**(14):1727-36.

Komarov, P. G., Komarova, E. A., Kondratov, R. V., Christov-Tselkov, K., Coon, J. S., Chernov, M. V., and Gudkov, A. V., 1999, A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy, *Science 85* **1733-1737**:1733-1737.

Kotake, K., Ozaki, N., Mizuta, M., Sekiya, S., Inagaki, N., and Seino, S., 1997, Noc2, a putative zinc finger protein involved in exocytosis in endocrine cells, *J Biol Chem* **272**(47):29407-10.

Kowalczykowski, S. C., 1991, Biochemistry of genetic recombination: energetics and mechanisms of DNA strand exchange, *Annu Rev Biophys Chem* **20**:539-575.

Kreimeyer, A., Wielckens, K., Adamietz, P., and Hilz, H., 1984, DNA repair-associated ADP-ribosylation in vivo. Modification of histone H1 differs from that of the principal acceptor proteins, *J Biol Chem* **259**(2):890-6.

Kucherlapati, R., and Smith, G. R., 1988, Genetic Recombination. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V., and Kastan, M. B., 1992, Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation, *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16):7491-5.

Kühn, C., Müller, F., Melle, C., Nasheuer, H. P., Janus, F., Deppert, W., and Grosse, F., 1999, Surface plasmon resonance measurements reveal stable complex formation between p53 and DNA-polymerase alpha, *Oncogene* **18**:769-774.

Kupper, J. H., de Murcia, G., and Burkle, A., 1990, Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation by overexpressing the poly(ADP- ribose) polymerase DNA-binding domain in mammalian cells, *J Biol Chem* **265**(31):18721-4.

Kupper, J. H., Muller, M., and Burkle, A., 1996, Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation potentiates carcinogen induced gene amplification in SV40-transformed Chinese hamster cells, *Cancer Res* **56**(12):2715-7.

Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**:680-685.

Laker, C., Stocking, C., Bergholz, U., Hess, N., De Lamarter, J. F., and Ostertag, W., 1987, Autocrine stimulation after transfer of the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor gene and autonomous growth are distinct but interdependent steps in the oncogenic pathway, *Proc Natl Acad Sci. USA* **84**:8458-8462.

Lakin, N. D., and Jackson, S. P., 1999, Regulation of p53 in response to DNA damage, *Oncogene* **18**(53):7644-55.

Lambert, S., Saintigny, Y., Delacote, F., Amiot, F., Chaput, B., Lecomte, M., Huck, S., Bertrand, P., and Lopez, B. S., 1999, Analysis of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells, using tandem repeat sequences, *Mutat Res.* **433**:159-168.

Lane, D. P., 1992, Cancer: p53, guardian of the genome, Nature 358: 15-16.

Lane, D. P., and Crawford, L. V., 1979, T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells, *Nature* **278**:261-263.

Le Cam, E., Fack, F., Menissier-de Murcia, J., Cognet, J. A., Barbin, A., Sarantoglou, V., Revet, B., Delain, E., and de Murcia, G., 1994, Conformational analysis of a 139 base-pair DNA fragment containing a single-stranded break and its interaction with human poly(ADP-ribose) polymerase, *J Mol Biol* **235**(3):1062-71.

Le Rhun, Y., Kirkland, J. B., and Shah, G. M., 1998, Cellular responses to DNA damage in the absence of Poly(ADP-ribose) polymerase, *Biochem Biophys Res Commun* **245**(1):1-10.

Le, S., Moore, J. K., Haber, J. E., and Greider, C. W., 1999, RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase, *Genetics* **152**(1):143-52.

Lee, H., Sun, D., Larner, J. M., and Wu, F. S., 1999, The tumor suppressor p53 can reduce stable transfection in the presence of irradiation, *J Biomed Sci.* **6**:285-292.

Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A., and Griffith, J., 1995, p53 and its 14 kDa Cterminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches, *Cell* **81**(7):1013-1020.

Leveillard, T., Andera, L., Bissonnette, N., Schaeffer, L., Bracco, L., Egly, J. M., and Wasylyk, B., 1996, Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumour-associated mutations, *Embo J* **15**(7):1615-1624.

Levine, A. J., 1997, p53, the cellular gatekeeper for growth and division, Cell 88(3):323-331.

Levine, A. J., Momand, J., and Finlay, C. A., 1991, The p53 tumour suppressor gene, *Nature* **351**:453-456.

Lewis, L. K., and Resnick, M. A., 2000, Tying up loose ends: nonhomologous end-joining in Saccharomyces cerevisiae, *Mutat Res* **451**(1-2):71-89.

Liang, S.-H., and Clarke, M. F., 2001, Regulation of p53 localisation, *Eur J Biochem.* 268:2779-2783.

Lim, D.-S., and Hasty, P., 1996, A mutation in mouse *rad51* results in an early embryonic lethal that is suppressed by a *p53* mutation, *Mol. Cell. Biol.* **16**:7133-7143.

Lin, J. Y., and Simmons, D. T., 1990, Transformation by simian virus 40 does not involve the mutational activation of p53 to an oncogenic form, *Virology* **176**:302-305.

Lin, W., Hata, T., and Kasamatsu, H., 1984, Subcellular distribution of viral structural proteins during simian virus 40 infection, *J. Virol.* **50**:363-371.

Lin, X., Ramamurthi, K., Mishima, M., Kondo, A., and Howell, S. B., 2000, p53 interacts with the DNA mismatch repair system to modulate the cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide, *Mol Pharmacol.* **58**:1222-1229.

Lisby, M., Rothstein, R., and Mortensen, U. H., 2001, Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15):8276-82.

Liu, D., Huang, C. L., Kameyama, K., Hayashi, E., Yamauchi, A., Sumitono, S., and Yokomise, H., 2002, Topoisomerase Ilalpha gene expression is regulated by the p53 tumor suppressor gene in nonsmall cell lung carcinoma patients, *Cancer* **15**:2239-2247.

Livingstone, L. R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T., and Tlsty, T. D., 1992, Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53, *Cell* **70**:923-935.

Lohrum, M., and Scheidtmann, K. H., 1996, Differential effects of phosphorylation of rat p53 on transactivation of promoters derived from different p53 responsive genes, *Oncogene* **13**(12):2527-39.

Ludwig, T., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E., and Efstratiadis, A., 1997, Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of Brca1, Brca2, Brca1/Brca2, Brca1/p53, and Brca2/p53 nullizygous embryos, *Genes Dev* **11**(10):1226-1241.

Lutzker, S. G., and Levine, A. J., 1996, A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells is activated by either DNA damage or cellular differentiation, *Nature Med* **2**(7):804-810.

Malanga, M., and Althaus, F. R., 1994, Poly(ADP-ribose) molecules formed during DNA repair in vivo, *J Biol Chem* **269**(26):17691-6.

Malanga, M., Pleschke, J. M., Kleczkowska, H. E., and Althaus, F. R., 1998, Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions, *J Biol Chem* **273**(19):11839-43.

Manteuil, S., Pages, J., Stehelin, D., and Girard, M., 1973, Replication of simian virus 40 deoxyribonucleic acid: analysis of the one-step growth cycle, *J Virol.* **11**:98-106.

Marmorstein, L. Y., Ouchi, T., and Aaronson, S. A., 1998, The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51, *Proc Natl Acad Sci. USA* **95**:13869-13874.

Marsischky, G. T., Lee, S., Griffith, J., and Kolodner, R. D., 1999, Saccharomyces cerevisiae MSH2/6 complex interacts with Holliday junctions and facilities their cleavage by phage resolution enzymes, *J Biol Chem.* **274**:7200-7206.

Masson, M., Menissier-de Murcia, J., Mattei, M. G., de Murcia, G., and Niedergang, C. P., 1997, Poly(ADP-ribose) polymerase interacts with a novel human ubiquitin conjugating enzyme: hUbc9, *Gene* **190**(2):287-96.

Masutani, M., Nozaki, T., Nakamoto, K., Nakagama, H., Suzuki, H., Kusuoka, O., Tsutsumi, M., and Sugimura, T., 2000, The response of Parp knockout mice against DNA damaging agents, *Mutat Res* **462**(2-3):159-66.

McLure, K. G., and Lee, P. W. K., 1998, How p53 binds DNA as a tetramer, *EMBO J* **17**:3342-3350. Meek, D. W., 1999, Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification?, *Oncogene* **18**(53):7666-75.

Mekeel, K. L., Tang, W., Kachnic, L. A., Luo, C. M., DeFrank, J. S., and Powell, S. N., 1997, Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination, *Oncogene* **14**(15):1847-57.

Menisser-de Murcia, J., Mark, M., Wendling, O., Wynshaw-Boris, A., and de Murcia, G., 2001, Early embryonic lethality in PARP-1 Atm double-mutant mice suggests a functional synergy in cell proliferation during development, *Mol Cell Biol* **21**(5):1828-32.

Miro, A., Costas, M. J., Garcia-Diaz, M., Hernandez, M. T., and Cameselle, J. C., 1989, A specific, low Km ADP-ribose pyrophosphatase from rat liver, *FEBS Lett* **244**(1):123-6.

Mirzayans, R., Enns, L., Dietrich, K., Barley, R. D. C., and Paterson, M. C., 1996, Faulty DNA polymerase delta/epsilon-mediated excision repair in response to gamma radiation or ultraviolet light in p53-deficient fibroblast strains from affected members of a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome, *Carcinogenesis* **17**(4):691-698.

Miwa, M., Tanaka, M., Matsushima, T., and Sugimura, T., 1974, Purification and properties of glycohydrolase from calf thymus splitting ribose-ribose linkages of poly(adenosine diphosphate ribose), *J Biol Chem* **249**(11):3475-82.

Modrich, P., and Lahue, R., 1996, Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology, *Annu. Rev. Biochem.* **65:**101-133.

Molinete, M., Vermeulen, W., Burkle, A., Menissier-de Murcia, J., Kupper, J. H., Hoeijmakers, J. H., and de Murcia, G., 1993, Overproduction of the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells, *Embo J* **12**(5):2109-17.

Moreau, S., Ferguson, J. R, and Symington, L. S., 1999, The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance, *Mol Cell Biol* **19**(1):556-66.

Morrison, C., Smith, G. C., Stingl, L., Jackson, S. P., Wagner, E. F., and Wang, Z. Q., 1997, Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis, *Nat Genet* **17**(4):479-82.

Mortensen, U. H., Bendixen, C., Sunjevaric, I., and Rothstein, R., 1996, DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20):10729-34.

Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., Fischer, A., and de Villartay, J. P., 2001, Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency, *Cell* **105**(2):177-86.

Moynahan, M. E., Chiu, J. W., Koller, B. H., and Jasin, M., 1999, Brca1 controls homology-directed DNA repair, *Mol Cell.* **4**:511-518.

Moynahan, M. E., Cui, T. Y., and Jasin, M., 2001, Homology-directed DNA repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation, *Cancer Res.* **61**:4842-4850.

Mummenbrauer, T., Janus, F., Mueller, B., Wiesmueller, L., Deppert, W., and Grosse, F., 1996, p53 protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity, *Cell* **85**(7):1089-1099.

Nakamura, S., Roth, J. A., and Mukhopadhyay, T., 2000, Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination, *Mol Cell Biol.* **20**:9391-9398.

Namsarev, E., and Berg, P., 1997, Characterization of strand exchange activity of yeast Rad51 protein, *Mol Cell Biol.* **17**:5359-5368.

Nasheuer, H. P., Smith, R., Bauerschmidt, C., Grosse, F., and Weisshart, K., 2002, Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**:41-94.

Ng, S. C., Behm, M., and Bina, M., 1985, DNA sequence alterations responsible for the synthesis of thermosensitive VP1 in temperature-sensitive BC mutants of simian virus 40, *J. Virol.* **54**:646-649.

Oberosler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., and Stahl, H., 1993, p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids, *EMBO J.* **12**:2389-2396.

Oei, S. L., Griesenbeck, J., and Schweiger, M., 1997, The role of poly(ADP-ribosyl)ation, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **131**:127-73.

Oka, J., Ueda, K., Hayaishi, O., Komura, H., and Nakanishi, K., 1984, ADP-ribosyl protein lyase. Purification, properties, and identification of the product, *J Biol Chem* **259**(2):986-95.

Okayama, H., Honda, M., and Hayaishi, O., 1978, Novel enzyme from rat liver that cleaves an ADP-ribosyl histone linkage, *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(5):2254-7.

Oliver, F. J., Menissier-de Murcia, J., Nacci, C., Decker, P., Andriantsitohaina, R., Muller, S., de la Rubia, G., Stoclet, J. C., and de Murcia, G., 1999, Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice, *Embo J* **18**(16):4446-54.

Ooi, S. L., Shoemaker, D. D., and Boeke, J. D., 2001, A DNA microarray-based genetic screen for nonhomologous end-joining mutants in Saccharomyces cerevisiae, *Science* **294**(5551):2552-6.

Oren, M., Maltzman, W., and Levine, A. J., 1981, Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells, *Mol. Cell. Biol.* **1**:101-110.

Oren, M., and Rotter, V., 1999, Introduction: p53--the first twenty years, Cell Mol Life Sci 55(1):9-11.

Ouchi, T., Monteiro, A. N. A., August, A., Aaronson, S. A., and Hanafusa, H., 1998, BRCA1 regulates p53-dependent gene expression, *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(5):2302-2306.

Paques, F., and Haber, J. E., 1997, Two pathways for removal of nonhomologous DNA ends during double-strand break repair in Saccharomyces cerevisiae, *Mol Cell Biol.* **17**:6765-6771.

Paques, F., and Haber, J. E., 1999, Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae, *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2):349-404.

Parsons, C. A., Baumann, P., Van Dyck, E., and West, S. C., 2000, Precise binding of single-stranded DNA termini by human RAD52 protein, *Embo J* **19**(15):4175-81.

Passalaris, T. M., Benanti, J. A., Gewin, L., Kiyono, T., and Galloway, D. A., 1999, The G(2) checkpoint is maintained by redundant pathways, *Mol Cell Biol* **19**(9):5872-81.

Patschinsky, T., and Deppert, W., 1990, Phosphorylation of p53 in primary, immortalized, and transformed Balb/c mouse cells, *Oncogene* **5**:1071-1076.

Paull, T. T., and Gellert, M., 1998, The 3' to 5' exonuclease activity of the Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks, *Mol Cell* **1**:969-979.

Peterson, G. L., 1983, Determination of total protein, Methods Enzymol 91:95-119.

Petrini, J. H., 2000, The Mre11 complex and ATM: collaborating to navigate S phase, *Curr Opin Cell Biol* **12**(3):293-6.

Petukhova, G., Van Komen, S., Vergano, S., Klein, H., and Sung, P., 1999, Yeast Rad54 promotes Rad51-dependent homologous DNA pairing via ATP hydrolysis-driven change in DNA double helix conformation, *J Biol Chem* **274**:29453-29462.

Pierce, A. J., Stark, J. M., Araujo, F. D., Moynahan, M. E., Berwick, M., and Jasin, M., 2001, Double-strand breaks and tumorigenesis, *Trens Cell Biol* **11**:S52-59.

Pleschke, J. M., Kleczkowska, H. E., Strohm, M., and Althaus, F. R., 2000, Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins, *J Biol Chem* **275**(52):40974-80.

Plessis, A., Perrin, A., Haber, J. E., and Dujon, B., 1992, Site-specific recombination determined by F Scel, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus, *Genetics* **130**:451-460.

Prives, C., and Hall, P. A., 1999, The p53 pathway, J Pathol 187(1):112-26.

Radding, C., 1991, Helical interactions in homologous pairing and strand exchange driven by RecA protein, *Biol Chem* **266**:5355-5358.

Rankin, P. W., Jacobson, E. L., Benjamin, R. C., Moss, J., and Jacobson, M. K., 1989, Quantitative studies of inhibitors of ADP-ribosylation in vitro and in vivo, *J Biol Chem* **264**(8):4312-7.

Reed, M., Woelker, B., Wang, P., Wang, Y., Anderson, M. E., and Tegtmeyer, P., 1995, The G terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation, *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(21):9455-9459.

Renzing, J., and Lane, D. P., 1995, p53-dependent growth arrest following calcium phosphatemediated transfection of murine fibroblasts, *Oncogene* **10**:1865-1868.

Richardson, C., and Jasin, M., 2000, Coupled homologous and nonhomologous repair of a doublestrand break preserves genomic integrity in mammalian cells, *Mol Cell Biol.* **20**:9068-9075.

Roca, A. I., and Cox, M. M., 1990, The RecA protein: structure and function, *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25**:415-456.

Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Llorente, M., Vazquez, I., Lucas, P., Esteban, M., Martinez, A. C., and del Real, G., 1999, A human immunodeficiency virus type 1 Env-granulocyte-macrophage colonystimulating factor fusion protein enhances the cellular immune response to Env in a vaccinia virusbased vaccine, *J Gen Virol* **80**(Pt 1):217-23.

Roemer, K., and Friedman, T., 1993, Modulation of cell proliferation and gene expression by a p53estrogen receptor hybrid protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* **90**:9252-9256.

Rouet, P., Smith, F., and Jasin, M., 1994, Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci. USA* **91**:6064-6068.

Rubnitz, J., and Subramani, S., 1984, The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells, *Mol Cell Biol.* **4**:2253-2258.

Ruscetti, T., Newman, J., Peat, T. S., Francis, J., Nolan, R., Terwilliger, T. C., Peterson, S. R., and Lehnert, B. E., 1998, A nondenaturing purification scheme for the DNA-binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase, a structure-specific DNA-binding protein, *Protein Expr Purif* **14**(1):79-86

Ryan, K. M., Phillips, A. C., and Vousden, K. H., 2001, Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein, *Curr Opin Cell Biol.* **13**:332-337.

Saintigny, Y., Rouillard, D., Chaput, B., Soussi, T., and Lopez, B. S., 1999, Mutant p53 proteins stimulate spontaneous and radiation-induced intrachromosomal homologous recombination independently of the alteration of the transactivation activity and of the G1 checkpoint, *Oncogene* **18**(24):3553-63.

Saito, I., Hatakeyama, K., Kido, T., Ohkubo, H., Nakanishi, S., and Ueda, K., 1990, Cloning of a fulllength cDNA encoding bovine thymus poly(ADP-ribose) synthetase: evolutionarily conserved segments and their potential functions, *Gene* **90**(2):249-54.

Sastry, S. S., Buki, K. G., and Kun, E., 1989, Binding of adenosine diphosphoribosyltransferase to the termini and internal regions of linear DNAs, *Biochemistry* **28**(13):5670-80.

Sastry, S. S., and Kun, E., 1990, The interaction of adenosine diphosphoribosyl transferase (ADPRT) with a cruciform DNA, *Biochem Biophys Res Commun* **167**(2):842-7.

Sawadogo, M., Van Dyke, M. W., Gregor, P. D., and Roeder, R. G., 1988, Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. I. Complete purification and identification of USF from HeLa cell nuclei, *J Biol Chem* **263**(24):11985-93.

Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Wiesmüller, L., Kabsch, W., Stege, P., Schmitz, F., and Wittinghofer, A., 1998, X-ray crystallographic analysis of the GAP related domain from neurofibromin and its implications, *EMBO J* **17**:101-114.

Schneider, C., Newman, R. A., Sutherland, D. R., Asser, U., and Greaves, M. F., 1982, A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix, *J Biol Chem* **257**(18):10766-9.

Schneider, E., Montenarh, M., and Wagner, P., 1998, Regulation of CAK kinase activity by p53, *Oncogene* **17**(21):2733-41.

Schreiber, V., Hunting, D., Trucco, C., Gowans, B., Grunwald, D., De Murcia, G., and De Murcia, J. M., 1995, A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage, *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11):4753-7.

Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D. M., 1997, Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells, *Cell* **88**(2):265-275.

Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D. S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., and Bradley, A., 1997, Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2, *Nature* **386**(6627):804-10.

Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V., 1990, Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis, *Mol. Cell. Biol.* **10**:6565-6577.

Shen, Z. Y., Pardington-Purtymun, P. E., Comeaux, J. C., Moyzis, R. K., and Chen, D. J., 1996, Associations of UBE21 with RAD52, UBL1, p53, and RAD51 proteins in a yeast two-hybrid system, *Genomics* **37**(2):183-186.

Sherr, C. J., 1998, Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway, Genes Dev 12:2984-2991.

Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C., 2000, The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites, *Genes Dev* **14**(3):289-300.

Shieh, S. Y., Taya, Y., and Prives, C., 1999, DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization, *Embo J* **18**(7):1815-23.

Shieh, W. M., Ame, J. C., Wilson, M. V., Wang, Z. Q., Koh, D. W., Jacobson, M. K., and Jacobson, E. L., 1998, Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers, *J Biol Chem* **273**(46):30069-72.

Shinohara, A., and Ogawa, H., 1998, Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination, *Nature* **391**:404-407.

Shinohara, A., Ogawa, H., and Ogawa, T., 1992, Rad51 protein involved in repair and recombination in Saccharomyces cerevisiae is a RecA-like protein, *Cell* **69**:457-470.

Shinohara, A., Shinohara, M., Ohta, T., Matsuda, S., and Ogawa, T., 1998, Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing, *Genes Cells* **3**(3):145-56.

Siegel, J., Fritsche, M., Mai, S., Brandner, G., and Hess, R. D., 1995, Enhanced p53 activity and accumulation in response to DNA damage upon DNA transfection, *Oncogene* **11**(7):1363-1370.

Sim, S. P., and Liu, L. F., 2001, Nucleolytic cleavage of the mixed lineage leukemia breakpoint cluster region during apoptosis, *J Biol Chem* **276**(34):31590-5.

Simbulan-Rosenthal, C. M., Haddad, B. R., Rosenthal, D. S., Weaver, Z., Coleman, A., Luo, R., Young, H. M., Wang, Z. Q., Ried, T., and Smulson, M. E., 1999, Chromosomal aberrations in PARP(/-) mice: genome stabilization in immortalized cells by reintroduction of poly(ADP-ribose) polymerase cDNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23):13191-6.

Simbulan-Rosenthal, C. M., Rosenthal, D. S., Luo, R., and Smulson, M. E., 1999, Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 during apoptosis in human osteosarcoma cells, *Cancer Res* **59**(9):2190-4.

Simonin, F., Poch, O., Delarue, M., and de Murcia, G., 1993, Identification of potential active-site residues in the human poly(ADP-ribose) polymerase, *J Biol Chem* **268**(12):8529-35.

Singh, N., Poirier, G., and Cerutti, P., 1985, Tumor promoter phorbol-12-myristate-13-acetate induces poly(ADP)- ribosylation in fibroblasts, *Embo J* **4**(6):1491-4.

Sionov, R. V., and Haupt, Y., 1999, The cellular response to p53: the decision between life and death, *Oncogene* **18**(45):6145-57.

Smith, J., and Rothstein, R., 1995, A mutation in the gene encoding the Saccharomyces cerevisiae single-stranded DNA-binding protein Rfa1 stimulates a RAD52- independent pathway for direct-repeat recombination, *Mol. Cell. Biol.* **15**:1632-1641.

Smith, M. L., Chen, I. T., and Fornace, A. J., Jr., 1995, Does the p53 up-regulated Gadd45 protein have a role in excision repair? Reply, *Science* **270**(5238):1005-1006.

Smulson, M. E., Simbulan-Rosenthal, C. M., Boulares, A. H., Yakovlev, A., Stoica, B., Iyer, S., Luo, R., Haddad, B., Wang, Z. Q., Pang, T., Jung, M., Dritschilo, A., and Rosenthal, D. S., 2000, Roles of poly(ADP-ribosyl)ation and PARP in apoptosis, DNA repair, genomic stability and functions of p53 and E2F-1, *Adv Enzyme Regul* **40**:183-215.

Stasiak, A. Z., Larquet, E., Stasiak, A., Muller, S., Engel, A., Van Dyck, E., West, S. C., and Egelman, E. H., 2000, The human Rad52 protein exists as a heptameric ring, *Curr Biol* **10**(6):337-40.

Steinmeyer, K., and Deppert, W., 1988, DNA binding properties of murine p53, Oncogene 3:501-507.

Strudwick, S., and Borden, K. L., 2002, The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus, *Differentiation* **70**(1):10-22.

Stürzbecher, H. W., Brain, R., Addison, C., Rudge, K., Remm, M., Grimaldi, M., Keenan, E., and Jenkins, J. R., 1992, A C-terminal a-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization, *Oncogene* **7**:1513-1523.

Stürzbecher, H.-W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U., and Buchhop, S., 1996, p53 is linked directly to homologous recombination processive RAD51/RecA protein interaction, *EMBO J.* **15**.

Sugawara, N., and Haber, J. E., 1992, Characterization of double-strand break-induced recombination: homology, requirements and single-stranded DNA formation, *Mol Cell Biol* **12**:563-575.

Sugawara, N., Paques, F., Colaicovo, M., and Haber, J. E., 1997, Role of Saccharomyces cerevisiae Msh2 ad Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination, *Proc Natl Acad Sci. USA* **94**:9214-9219.

Sugiyama, T., New, J. H., and Kowalczykowski, S. C., 1998, DNA annealing by RAD52 protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11):6049-54.

Sun, H., Treco, D., and Szostak, J. W., 1991, Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site, *Cell* **64**:1155-1161.

Sung, P., and Robberson, D. L., 1995, DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA, *Cell* **82**:453-461.

Süsse, S., Janz, C., Janus, F., Deppert, W., and Wiesmüller, L., 2000, Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53, *Oncogene* **19**:4500-4512.

Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., and Takeda, S., 1998, Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells, *EMBO J.* **17**:5497-5508.

Tang, W., Willers, H., and Powell, S. N., 1999, p53 directly enhances rejoining of DNA double-strand breaks with cohesive ends in y-irradiated mouse fibroblasts, *Cancer Res.* **59**:2562-2565.

Tatsumi-Miyajima, J., Kupper, J. H., Takebe, H., and Burkle, A., 1999, Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation potentiates alkylation-induced shuttle-vector mutagenesis in Chinese hamster cells, *Mol Cell Biochem* **193**(1-2):31-5.

Thompson, L. H., and Schild, D., 2001, Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability, *Mutat Res* **477**(1-2):131-53.

Tong, W. M., Cortes, U., and Wang, Z. Q., 2001, Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian angel protecting the genome and suppressing tumorigenesis, *Biochim Biophys Acta* **1552**(1):27-37.

Trucco, C., Oliver, F. J., de Murcia, G., and Menissier-de Murcia, J., 1998, DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines, *Nucleic Acids Res* **26**(11):2644-9.

Tuszuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., and Morita, T., 1996, Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:6236-6240.

Usui, T., Ohta, T., Oshiumi, H., Tomizawa, J., Ogawa, H., and Ogawa, T., 1998, Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination, *Cell* **95**(5):705-16.

Valencia, M., Bentele, M., Vaze, M. B., Herrmann, G., Kraus, E., Lee, S. E., Schar, P., and Haber, J. E., 2001, NEJ1 controls non-homologous end joining in Saccharomyces cerevisiae, *Nature* **414**(6864):666-9.

van den Bosch, M., Lohman, P. H., and Pastink, A., 2002, DNA double-strand break repair by homologous recombination, *Biol Chem* **383**(6):873-92.

Van Dyck, E., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., and West, S. C., 1999, Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein, *Nature* **398**:728-731.

Van Dyck, E., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., and West, S. C., 2001, Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single-strand annealing, *EMBO Rep* **2**(10):905-9.

Van Dyck, L., and Langer, T., 1999, ATP-dependent proteases controlling mitochondrial function in the yeast Saccharomyces cerevisiae, *Cell Mol Life Sci* **56**(9-10):825-42.

Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., and McCawley, P., 1977, The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda, *In vitro* **13**:213-217.

Vogelstein, B., and Kinzler, K. W., 1992, p53 function and dysfunction, Cell 70:523-526.

Vogelstein, B., and Kinzler, K. W., 1993, The multistep nature of cancer, Trends Genet 9:138-141.

Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J., 2000, Surfing the p53 network, Nature 408(6810):307-10.

Vojtesek, B., Bartek, J., Midgley, C. A., and Lane, D. P., 1992, An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53., *J. Immunol. Methods* **151**:237-244.

Waldman, A. S., and Waldman, B. C., 1991, Stimulation of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells by an inhibitor of poly(ADP-ribosylation), *Nucleic Acids Res* **19**(21):5943-7.

Wang, P., Reed, M., Wang, Y., Mayr, G., Stenger, J. E., Anderson, M. E., Schwedes, J. F., and Tegtmeyer, P., 1994, p53 domains: Structure, oligomerization, and transformation, *Mol. Cell. Biol.* **14**:5182-5191.

Wang, X. W., Tseng, A., Ellis, N. A., Spillare, E. A., Linke, S. P., Robles, A. I., Seker, H., Yang, Q., Hu, P., Beresten, S., Bemmels, N. A., Garfield, S., and Harris, C. C., 2001, Functional interaction of p53 and BLM DNA helicase in apoptosis, *J Biol Chem* **276**(35):32948-55.

Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J.-M., Wang, Z., Friedberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G., Bohr, V. A., Weeda, G., Hoeijmakers, J. H. J., Forrester, K., and Harris, C.

C., 1995, p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity, *Nature Genet.* **10:**188-195.

Wang, Y., Reed, M., Wang, P., Stenger, J. E., Mayr, G., Anderson, M. E., Schwedes, J. F., and Tegtmeyer, P., 1993, p53 domains: Identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions, *Genes Dev* **7**:2575-2586.

Wang, Z. Q., Stingl, L., Morrison, C., Jantsch, M., Los, M., Schulze-Osthoff, K., and Wagner, E. F., 1997, PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis, *Genes Dev* **11**(18):2347-58.

Waterman, J. L. F., Shenk, J. L., and Halazonetis, T. D., 1995, The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding, *EMBO J.* **14:**512-519.

Weaver, R. F., and Weissmann, C., 1979, Mapping of RNA by a modification of the Berk-Sharp procedure: the 5' termini of 15 S beta-globin mRNA precursor and mature 10 s beta-globin mRNA have identical map coordinates, *Nucleic Acids Res* **7**(5):1175-93.

Weinfeld, M., Chaudhry, M. A., D'Amours, D., Pelletier, J. D., Poirier, G. G., Povirk, L. F., and Lees-Miller, S. P., 1997, Interaction of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase with radiation-induced DNA strand breaks, *Radiat Res* **148**(1):22-8.

West, S., 1992, Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination, *Annu Rev Biochem* **61**:603-640.

Whitacre, C. M., Hashimoto, H., Tsai, M. L., Chatterjee, S., Berger, S. J., and Berger, N. A., 1995, Involvement of NAD-poly(ADP-ribose) metabolism in p53 regulation and its consequences, *Cancer Res* **55**(17):3697-3701.

Wickham, T. J., Davis, T., Granados, R. R., Shuler, M. L., and Wood, H. A., 1992, Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system, *Biotechnol Prog* **8**:391-396.

Wielckens, K., George, E., Pless, T., and Hilz, H., 1983, Stimulation of poly(ADP-ribosyl)ation during Ehrlich ascites tumor cell "starvation" and suppression of concomitant DNA fragmentation by benzamide, *J Biol Chem* **258**(7):4098-104.

Wielckens, K., Schmidt, A., George, E., Bredehorst, R., and Hilz, H., 1982, DNA fragmentation and NAD depletion. Their relation to the turnover of endogenous mono(ADP-ribosyl) and poly(ADP-ribosyl) proteins, *J Biol Chem* **257**(21):12872-7.

Wiesmüller, L., 1999, Genetische Stabilität durch p53.

Regulation von Wachstum und DNA-Rekombination, BIOforum 9:530-533.

Wiesmüller, L., 2000, Genetic stabilization by p53 involves growth regulatory and repair pathways, *J Biomed Biotech* **1**:7-10.

Wiesmüller, L., Cammenga, J., and Deppert, W., 1996, *In vivo* assay of p53 function in homologous recombination between simian virus 40 chromosomes, *J. Virol.* **70**:737-744.

Wiesmüller, L., Janus, F., Süße, S., Janz, C., and Deppert, W., 1999, Human Rad51 and p53 functionally interact on joint DNA molecules, .

Wiley, S. R., Kraus, R. J., Zuo, F., Murray, E. E., Loritz, K., and Mertz, J. E., 1993, SV40 early-to-late switch involves titration of cellular transcriptional repressors, *Genes Dev* **7**:2206-2219.

Willers, H., McCarthy, E. E., Hubbe, P., Dahm-Daphi, J., and Powell, S. N., 2001, Homologous recombination in extrachromosomal plasmid substrates is not suppressed by p53, *Carcinogenesis* **22**:1757-1763.

Willers, H., McCarthy, E. E., Wu, B., Wunsch, H., Tang, W., Taghian, D. G., Xia, F., and Powell, S. N., 2000, Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G1/S cell cycle checkpoint control, *Oncogene* **19**:632-639.

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

Wilson, S., Warr, N., Taylor, D. L., and Watts, F. Z., 1999, The role of Schizosaccharomyces pombe Rad32, the Mre11 homologoue, and other DNA damage response proteins in non-homologous end joining and telomere length maitenance, *Nucl Acids Res.* **27**(13):2655-2661.

Wold, M. S., 1997, Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism, *Annu.Rev.Biochem.* **66**(66):61-92.

Wong, A. K., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V., and Bartel, P. L., 1997, RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2, *J Biol Chem* **272**(51):31941-4.

Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., and Levine, A. J., 1993, The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop, *Genes Dev* **7**:1126-2232.

Wu, X., Ranganathan, V., Weisman, D. S., Heine, W. F., Ciccone, D. N., O'Neill, T. B., Crick, K. E., Pierce, K. A., Lane, W. S., Rathbun, G., Livingston, D. M., and Weaver, D. T., 2000, ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response, *Nature* **405**(6785):477-82.

Xia, S. J., Shammas, M. A., and Shmookler Reis, R. J., 1997, Elevated recombination in immortal human cells is mediated by HsRAD51 recombinase, *Mol. Cell. Biol.* **17**:7151-7158.

Yang, H., Jeffrey, P. D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N. H., Zheng, N., Chen, P. L., Lee, W. H., and Pavletich, N. P., 2002, BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure, *Science* **297**(5588):1837-48.

Yang, T. T., Namba, H., Hara, T., Takmura, N., Nagayama, Y., Fukata, S., Ishikawa, N., Kuma, K., Ito, K., and Yamashita, S., 1997, p53 induced by ionizing radiation mediates Dna end-jointing activity, but not apoptosis of thyroid cells, *Oncogene* **14**(13):1511-1519.

Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M., 1991, Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6, *Nature* **352**(6333):345-7.

Zhang, H. B., Somasundaram, K., Peng, Y., Tian, H., Zhang, H. X., Bi, D. K., Weber, B. L., and El-Deiry, W. S., 1998, BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity, *Oncogene* **16**(13):1713-1721.

Zuo, F., Kraus, R. J., Gulick, T., Moore, D. D., and Mertz, J. E., 1997, Direct modulation of simian virus 40 late gene expression by thyroid hormone and its receptor, *71* **71**:427-436.

# 7. Anhang

# 7.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Proteine der Doppelstrangbruchreparatur	3
Abb. 2:	Mechanismen der Reparatur von Doppelstrangbrüchen, schematisch	7
Abb. 3:	Prinzip des auf EGFP-Rekonstitution entwickelten Testsystems	11
Abb. 4:	Charakterisierung des Tumorsuppressors p53	13
Abb. 5:	Mutationshäufigkeiten von p53 in humanen Tumoren	15
Abb. 6:	PARP-1, Struktur und Poly(ADP-Ribosylierungs)-Partner	17
Abb. 7:	Künstlich erzeugtes 3-Strang-DNA-Substrat	39
Abb. 8:	Reinigung von hRad51	55
Abb. 9:	Testexpression von humanen p53-Varianten im Baculosystem	57
Abb. 10:	Elutionsprofil von immunaffinitätsgereinigtem Wtp53	59
Abb. 11:	Elutionsprofil von TALON-säulen-aufgereinigtem Wtp53 mit 6x-Histidin-	
	Schwanz	61
Abb. 12:	Schematische Darstellung des Prinzips des Electrophoretic	
	Mobility Shift Assay (EMSA)	63
Abb. 13:	Strangaustausch wurde imitiert (Schema)	69
Abb. 14:	Durch hRad51 vermittelter Strangtransfer in Anwesenheit von humanem	
	Wtp53	70
Abb. 15:	Stimulation des Wtp53-assoziierten DNA-Abbaus durch strangtransferaktive	es
	hRad51	71
Abb. 16:	Strangtransferkontrollen ohne DNA-Austauschpartner	72
Abb. 17:	Strangtransferreaktionen mit RecA und SSB	72
Abb. 18:	Substratspezifität der mit p53 assoziierten Exonukleaseaktivität	74
Abb. 19:	Exonukleaseaktivitäten von Wtp53 versus Mutanten p53(273H) an	
	3sDNAs mit und ohne <i>Mismatch</i>	75
Abb. 20:	Schematische Darstellung der 3sDNAs, "kurze" versus "lange"	76
Abb. 21:	Exonukleaseaktivitäten von Wtp53 an "langen" versus "kurzen"	
	Rekombinationsintermediaten	77
Abb. 22:	Vergleich der Bindungseigenschaften von hRad51 an ssDNA und 3sDNA	78
Abb. 23:	Bindung von immunaffinitätsgereinigtem Wtp53 an 3sDNA	79
Abb. 24:	Koinkubation von immunaffinitätgereinigtem Wtp53 und hRad51 oder/und	
	SSB an 3sDNA	79
Abb. 25:	Bindungsstudien von hRad51 (66 nM) und immunaffinitätsgereinigtem	
	Wtp53 (5 nM) an 3sDNAs	80

Abb. 26:	Bindung von Wtp53 versus p53(273H) an 3sDNA-Kreuzungsstrukturen	81
Abb. 27:	Bindung von hRad51 und p53(273H) an 3sDNA-Kreuzungsstrukturen	82
Abb. 28:	3sDNA-Bindung von p53(1262) im Vergleich zu Wtp53	83
Abb. 29:	Degradation von ssDNA durch p53(1262) versus Wtp53	84
Abb. 30:	Degradation von 3sDNA durch p53(1262) versus Wtp53	84
Abb. 31:	Degradation von 3sDNA durch p53(1262) versus Wtp53	85
Abb. 32:	Western-Blot-Analyse der von LMV2 abgeleiteten stabilen Klone zum	
	Nachweis der Expression von exogenem p53her und/oder PARP-1	89
Abb. 33:	Zellzyklusanalysen der p53her/PARP-1-Klone nach Östradiol-Induktion	
	und nach γ-Bestrahlung	94
Abb. 34:	Kernmorphologie von LMV2- und LMV2-p53her-Kl8-Zellen	98
Abb. 35:	Kernmorphologie von LMV2-PARP-Kl3- und LMV2-PARPp53her-Kl1-Zellen	99
Abb. 36:	Morphologie von LMV2-p53herPARP-KI1-Zellen im Phasenkontrast und	
	nach DAPI-Färbung	100
Abb. 37:	Western-Blot-Analysen der p53her/PARP-1-Klone mit und	
	ohne γ-Bestrahlung	102
Abb. 38:	Stabile Klone mit p53her und/oder überexprimierter PARP-1 im SV40-	
	Rekombinations-Testsystem	105
Abb. 39:	Rekombination an episomalen Substraten in stabilen Klonen mit p53her	
	und/oder überexprimierter PARP-1	109
Abb. 40:	PARP-abhängige Rekombination an episomalem Substrat	<u>112</u>
Abb. 41:	Western-Blot-Analyse zum Nachweis der PARP-DBD und der	
	Volle-Länge-PARP-1 für die transienten Assays	112
Abb. 42:	Western-Blot-Analyse der Klone MHHR-her12 und –13 zum	
	Nachweis von p53her	113
Abb. 43:	PARP-abhängige Rekombination an chromosomalem Substrat	115
Abb. 44:	Vergleich der Rekombinationsfrequenzen mit und ohne Caspase-Inhibition	
	in den (östradiol-induzierbaren) stabilen Klonen	118
Abb. 45:	Vergleich der relativen Rekombinationsfrequenzen mit und ohne	
	Caspase-Inhibitor in LLC-MK <sub>2</sub> (neo) und LLC-MK <sub>2</sub> (p53her)21	121
Abb. 46:	Modell für die p53-abhängige Genauigkeitskontrolle der homologen	
	Rekombination	131
Tab. 1:	Übersicht zum p53/PARP-1-Status der von LMV2 abgeleiteten	
	stabilen Klone	88
Tab. 2:	Klonierungsstatistik zu PARP-1/p53her-Klonen in LMV2	90
Tab. 3:	Generationszeiten der p53her/PARP-1-Klone	91
## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs	Absorption
AK	Antikörper
Amp	Ampere
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATM	Ataxia Telengiactasia Mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia Telengiactasia Mutated Related
BER	Base Excission Repair
Вр	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
С	Cytosin
C`	Carboxy-Terminus
ca.	circa
CAK	CDK Activated Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CHAPS	3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
Ci	Curie
CK1	Casein 1-Like Kinase
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegali Virus
cpm	Impulse (counts) pro Minute
CREB	Cyclin Adenosine Monophosphate (cAMP) Response Element
	Binding Protein
d	Тад
d.h.	das heißt
Da	Dalton

DNA-PK	dsDNA-Proteinkinase
DAPI	4´,6-Diamidino-2-phenyl-indol
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythreitol
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylenglykoldiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatische Retikulum
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
G	Guanin
GST	Glutathion-S-Transferase
Gy	Gray
h	Stunde
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure)
HIPK2	Hypoxia Inducible Protein Kinase 2
HR	homologe Rekombination
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Нуд	Hygromycin-Resistenz-Gen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KHD	Kinesin homologe Sequenz
I	Liter
Lac	Lactose
LB	Luria-Bertani-Medium
LTR	Long Terminal Repeat
m	Meter

m	milli
Μ	molar (mol/l)
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MARK	Mikrotubuliaffinität regulierende Kinase
MDM2	Mouse Double Minute 2 Gen
MEF	Maus Embryofibroblasten
min	Minute
MMR	Mismatch Repair
MOI	Multiplicity Of Infection
mRNA	"Messenger" Ribonukleinsäure
MSH2	MutS-Homolog
MSV	Moloney-Mouse-Sarcoma-Virus
MTSB	Mikrotubuli-stabilisierender Puffer
MW	Molekulargewicht
n	nano
N´	Amino-Terminus
NaOH	Natriumhydroxid
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom Protein
NER	Nucleotide Excission Repair
NES	Nucleus Export Signal
NF-κB	Nucleo Factor-κB
NGF	Nerven-Wachstumsfaktor
NHEJ	nicht-homologes End-Joining
NkHR	nicht-konservative homologe Rekombination
NLS	Nucleus Localisation Signal
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP40	Nonidet <sup>®</sup> P40
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1
PARP-3	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-3
PAS	Protein A-Sepharose
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigene
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGS	Protein G-Sepharose

рН	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-
	Konzentration
PHF	Paired Helical Filaments"
PI	Propidiumiodid
PIPES	Piperazin-N,N´-bis[2-ethansufonsäure]
PML	Promyolzyteres-Leukämie-Protein
ΡοΙα	DNA-Polymerase alpha
ΡοΙβ	DNA-Polymerase beta
Puro	Puromycin-Resistenz-Gen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPA	Replication-Protein A
RPC	Reverse-Phase Chromatographie
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCE	Sister Chromatide Exchange
SCID	Severe Combined Immune Deficiency
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektophorese
S	Sekunde
SSA	Single-Strand-Annealing
SSC	Sideward Scatter
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonucleinsäure
SV40	Simian Virus 40
Т	Thymidine
Tab.	Tabelle
TAF	TBP-assoziierte Faktoren
TBP	TATA-Box Binding Protein
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TC	Tissue Culture
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
TGN	trans Golgi Netzwerk
TNF	Tumornekrosefaktor
ΤΟΡΟΙ	Topoisomerase I
TOPOII	Topoisomerase II

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ts	temeratursensitiv
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumenanteil
w/v	Gewicht pro Volumen
WRN	Werner's Syndrom Protein
Wt	Wildtyp
XRCC1	X-ray cross complementing
XRCC4	X-ray cross complementing 4
z.B.	zum Beispiel

## 7.3 Veröffentlichungen

- Piriapolis, Uruguay, Südamerika: "VII Jornadas Cientificas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias", 28.-30.04/1995

Teilnahme mit Poster: "Cinetica de la Reacción de peroxinitrito con bicarbonato. Influencia del bicarbonato en las oxidaciones mediadas por peroxinitrito".

- Heidelberg: "10th Symposium of the Division of Experimental Cancer Research (AEK) of the German Cancer Society", 24.-26.03.1999

Teilnahme mit Poster: "Model for the mechanism underlying fidelity control of hRad51dependent recombination events by p53".

- Trieste, Italien: Workshop "P53: Twenty Years On",20.-22.04.1999 Vortrag von Lisa Wiesmüller: "Model for the mechanism underlying fidelity control of hRad51dependent recombination events by p53", von Friedemann Janus, Silke Süße, Christine Janz, Wolfgang Deppert und Lisa Wiesmüller.

- Essen:" 6. Tagung des DNA-Reparatur-Netzwerkes, 18.-21.07.2000 Teilnahme mit Poster: " Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53".

- Heidelberg: " 11th AEK Congress of the German Cancer Society", 04.-06.04.2001 Teilnahme mit Vortrag: " Mechanistic link between p53 and hRad51 in homologous recombination".

- Göttingen: Workshop "Enzymology of DNA Repair", 19.-20.04.2002 Teilnahme/ Vortrag von Lisa Wiesmüller: " The tumor supressor p53 as a regulator of homologous recombination – indications for direct interactions".

177

- Süße S., Janz C., Janus F., Deppert W., and Wiesmüller L. (2000) Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53. *Oncogene* **19**, 4500-4512.

- Akyüz N., Boehden G.S., Janz C., Süße S., and Wiesmüller L. (2000). Potential roles of p53 in recombination. *Gene. Ther. Mol. Biol.* **5**, 1-17. (Review)

- Janz C., Süße S., and Wiesmüller L. (2002). p53 and recombination intermediates: role of tetramerization at DNA junctions in complex formation and exonucleolytic degradation. *Oncogene* **21**, 2130-2140.

- Akyüz N., Boehden G.S., Süße S., Rimek A., Preuss U., Scheidtmann K.H., and Wiesmüller L. (2002). DNA Substrate Dependence of the p53-mediated regulation of double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol* **22**, 6306-6317.

## 7.4 Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Lisa Wiesmüller für die spontane und herzliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe, ihre energische Unterstützung in zum Teil schwierigen Situationen zum reibungsfreien Fortgang des Forschungsvorhabens, die offenen Diskussionen, Anregungen und, wenn notwendig, Geduld und Rücksichtnahme. Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Herrn Prof. Dr. H.-P. Mühlbach dankbar.

Herrn Prof. Dr. W. Deppert, Herrn Prof. Dr. F.O. Fackelmayer und Herrn Prof. Dr. J.M. Buerstedte danke ich für die Überlassung der Arbeitsplätze in ihren Abteilungen.

Herrn Prof. Dr. Alexander Buerkle danke ich für die Überlassung von Arbeitsmaterial und vor allem für die beflügelnden Diskussionen und seine außergewöhnlich herzliche Art.

Herrn Dr. Nils Albrecht danke ich für die vielen kleinen Labor-Tips, die sympatische Zusammenarbeit und seine philosophischen Denkansätze.

Mein besonders herzlicher Dank geht an Christine Janz alias Tini, Gisa Boehden, Nuray Akyüz und Anja Restle für ihre freundschaftliche und kollegiale Verbundenheit, in guten wie in schlechten Zeiten.

Frau Evelyn Bendrat verdanke ich diverse Vektoren und Zelllinien, auf die ich zurückgreifen durfte. Nicht nur dafür, sondern auch für die freundschaftliche Zusammenarbeit und ausgeprägte Hilfsbereitschaft möchte ich mich bedanken.

Stellvertretend für die Unterstützung durch die Mitarbeiter des Heinrich-Pette-Instituts, besonders der Abteilung Tumorvirologie, bedanke ich mich bei Doris Weidemann für ihre Hilfsbereitschaft und kollegial-unkomplizierte Art.

An dieser Stelle, geht ein besonders herzlicher Dank an Stefan Wolers und Frauke Wolers, u.a. für die Wohngelegenheit in Übergangszeiten Hamburg-Ulm und Unterstützung aller Art. Dies trifft auch für Silke, Steffi, Marcus, Doreen, Roland und Henk zu.

Meiner Mutter danke ich für das häufig notwendige "Sponsoring".

Bedanken möchte ich mich auch bei den sich etwas unverständlich artikulierenden, aber dafür sehr hilfsbereiten schwäbischen Kollegen Melanie, Shan, Pia, Jasmin, Claudia, Bernd, Andi, Martina, Elke, Tom, Sonja, Sandras... für die herzliche Aufnahme im Spätzle-Maultaschen-Kulturkreis. Vielen Dank auch an alle, die ich hier nicht namentlich erwähnen konnte, damit die Arbeit nicht noch länger wird.