

**Entwicklung und Applikation eines
auf Fluoreszenzdetektion basierenden Test-Systems
für DNA-Austausch-Ereignisse**

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

vorgelegt von

Nuray Akyüz
aus Trabzon (Türkei)

Hamburg

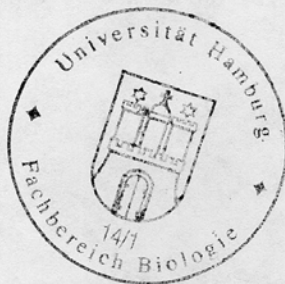
2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H.-P. Mühlbach

Weitere Gutachter der Dissertation:
Frau Priv.-Doz. Dr. L. Wiesmüller

Tag der Disputation: 18. Januar 2002

Hamburg, den 11. Dezember 2001



A handwritten signature in dark ink, appearing to read "U. Wienand".

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	DSB-Reparatur	1
1.1.1	NHEJ (Nicht-homologes <i>End-Joining</i>)	2
1.1.2	Konservative Homologe Rekombination (kHR)	3
1.1.3	SSA (<i>Singel Strand Annealing</i>)	5
1.2	Meganuklease I- <i>SceI</i>	6
1.3	EGFP (<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>)	7
1.4	RFP (<i>Red Fluorescent Protein</i>)	8
1.5	Das Tumorsuppressorprotein p53	8
1.5.1	Hinweise für eine Beteiligung von p53 bei der homologen Rekombination	12
2.	Problemstellung	15
3.	Material und Methoden	17
3.1.	Materialien	17
3.1.1	Geräte	17
3.1.2	Chemikalien und Biochemikalien	18
3.1.3	Sonstige Materialien	20
3.1.4	Puffer und Lösungen	21
3.1.5	Nährmedien	23
3.1.6	Antikörper	25
3.1.7	DNA	25
3.1.8	Oligonukleotide	29
3.1.9	Biologisches Material	31
3.1.9.1	Bakterienstämme	31

3.1.9.2	Eukaryontische Zelllinien.....	31
3.2	Methoden.....	35
3.2.1	Molekularbiologische Method.....	35
3.2.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35
3.2.1.2	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	36
3.2.1.3	Isolierung der Restriktionsfragmente und PCR-Produkte.....	36
3.2.1.4	Kinasierung von PCR-Fragmenten.....	36
3.2.1.5	Herstellung von glatten DNA-Enden.....	37
3.2.1.6	Behandlung mit alkalischer Phosphatase.....	37
3.2.1.7	Ligation.....	37
3.2.1.8	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	38
3.2.1.9	Fällung der DNA mit Ethanol.....	38
3.2.1.10	Einfrieren von Bakterienkulturen.....	38
3.2.1.11	Herstellung von kompetenten Bakterien.....	38
3.2.1.12	Transformation von Ligationsansätzen.....	39
3.2.1.13	Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
3.2.1.14	Quantifizierung und Reinheitsbestimmung der Plasmid-DNA.....	40
3.2.1.15	Sequenzanalyse der DNA.....	40
3.2.2	Zellkulturtechniken.....	41
3.2.2.1	Erhaltung und Kultur von eukaryontischen Zellen.....	41
3.2.2.2	Bestrahlung von Zellen.....	42
3.2.2.3	Transfektion von eukaryontischen Zellen.....	42
3.2.2.4	Bestimmung der Transfektionseffizienz und Reporterassays.....	43
3.2.2.5	Retrovirale Infektion von eukaryontischen Zellen.....	43
3.2.2.6	GTU- und MOI-Bestimmung.....	44
3.2.2.7	Selektion und Klonierung von eukaryontischen Zellen.....	44
3.2.2.7.1	Selektion und Klonierung von adhären wachsenden Zellen.....	44
3.2.2.7.2	Selektion und Klonierung von Suspensionskultur-Zellen.....	45
3.2.2.8	Präparation von genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen.....	46
3.2.2.9	Präparation von episomaler DNA.....	46
3.2.2.10	Propidiumiodid-Färbung.....	47
3.2.2.11	Rekombinations-Messung.....	47
3.2.2.12	Durchflußzentrifugation (Elutriation).....	48
3.2.2.13	Durchflußzytometrie.....	49
3.2.3	Proteinchemische Techniken.....	50
3.2.3.1	Präparation von Zellhomogenaten.....	50
3.2.3.2	Zellfraktionierung.....	50
3.2.3.3	Immunpräzipitation.....	50
3.2.3.3.1	Lyse.....	50
3.2.3.3.2	Immunpräzipitation mit ungekoppeltem Antikörper.....	51
3.2.3.3.3	Immunpräzipitation mit gekoppeltem Antikörper.....	51

3.2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	52
3.2.3.5	Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure.....	52
3.2.3.6	Western-Blot-Analyse.....	53
4.	Ergebnisse.....	55
4.1	Klonierungsstufen bei der Erzeugung der Expressionsvektoren und retroviralen Rekombinationsvektoren.....	57
4.1.1	Klonierung unterschiedlicher Gene in den pGC-Vektor für von Östradiol abhängiger Expression.....	57
4.1.1.1	Klonierung des Vektors <u>EGFP in pGC</u>	57
4.1.1.2	Klonierung des Vektors <u>I-SceI in pGC</u>	57
4.1.1.3	Klonierung der Vektoren <u>wtp53 in pGC</u> und <u>p53(138V) in pGC</u>	58
4.1.1.4	Klonierung der Vektoren <u>wtp53-IRES-I-SceI in pGC</u> und <u>p53(138V)-IRES-I-SceI in pGC</u>	59
4.1.2	Herstellung der Rekombinationsvektoren.....	60
4.1.2.1	Insertion des Rekombinationsdonors in den retroviralen Vektor <u>p5N-M</u>	60
4.1.2.2	Insertion der Abstandhalter und des Rekombinationsakzeptors.....	61
4.1.2.2.1	Vorbereitung des Rekombinationsakzeptors (Δ -EGFP) in <u>pUC-Puro</u>	61
4.1.2.2.2	Insertion des <i>Hygromycin-Resistenz</i> -Gens als Abstandhalter.....	62
4.1.2.2.3	Rekombinationsvektor-Varianten mit dem <i>I-SceI</i> -Gen als Abstandhalter.....	64
4.1.2.2.3.1	Klonierung des retroviralen Rekombinationsvektors <u>p5xEsGal4-I-SceI-bPuro-Δ</u>	64
4.1.2.2.3.2	Rekombinationsvektor-Varianten mit <i>p53</i> -Gen als Abstandhalter.....	65
4.1.2.2.3.2.1	Klonierung des Plasmids <u>pCMV-IRES-I-SceI</u>	65
4.1.2.2.3.2.2	Fertigstellung der Rekombinationsvektoren <u>p5xEhSceI-IRESswtp53-Gal4nPuro-Δ</u> und <u>p5xEhSceI-IRESsp53(138V)-Gal4nPuro-Δ</u>	66
4.1.2.2.4	Rekombinationsvektor-Varianten mit dem <i>Hygromycin-Resistenz</i> - und dem <i>I-SceI</i> -Gen als Abstandhalter.....	67
4.1.2.2.5	Herstellung neuer Akzeptorgen-Varianten.....	68
4.1.2.2.5.1	Erzeugung neuer Akzeptorgene und Klonierung in <u>pUC-Puro</u>	69
4.1.2.2.5.2	Fertigstellung der Rekombinationsvektoren mit <i>HR-EGFP</i> bzw. <i>EJ-EGFP</i> als Akzeptor und dem <i>I-SceI</i> -Gen als Abstandhalter.....	70
4.1.3	Optimierung des Rekombinations-Test-Systems durch verbesserte Vektordesign.....	71
4.1.3.1	Generierung der Plasmide <u>pUC-PuroCMV-Δ</u> , <u>pUC-PuroCMV-HR</u> und <u>pUC-PuroCMV-EJ</u>	71
4.1.3.1.1	Klonierung der Plasmide <u>pCMV-Δ</u> , <u>pCMV-HR</u> und <u>pCMV-EJ</u>	71
4.1.3.1.2	Klonierung des Plasmids <u>pUC-Puro-Δhalb</u>	72
4.1.3.1.3	Fertigstellung der Plasmide <u>pUCPuroCMV-Δ</u> , <u>pUCPuroCMV-HR</u> und <u>pUCPuroCMV-EJ</u>	73
4.1.3.2	Fertigstellung der Rekombinationsvektoren <u>p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ</u> , <u>p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-HR</u> und <u>p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-EJ</u>	73
4.1.3.3	Fertigstellung der retroviralen Rekombinationsvektoren <u>p5xEsCMV-HygbPuroCMV-Δ</u> , <u>p5xEsCMV-HygbPuroCMV-HR</u> und <u>p5xEsCMV-HygbPuroCMV-EJ</u>	74

4.1.3.4	Fertigstellung der retrovirenalen Rekombinationsvektoren <u>p5xwtsGal4-I-SceIbpuroCMV-Δ, -HR und -EJ</u>	75
4.1.3.5	Generierung des <i>Stop-EGFP</i> -Gens als neuem Rekombinationsdonor.....	76
4.1.3.6	Fertigstellung der retrovirenalen Rekombinationsvektoren <u>p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-Δ, p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-HR und</u> <u>p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-EJ</u>	77
4.1.3.7	Optimierte Rekombinationsvektor-Varianten mit einem <i>Hygromycin-Resistenz</i> -Gen im Abstandhalter Bereich.....	78
4.1.3.7.1	Vorbereitung der Rekombinationsvektorstufe <u>p5xtrsHyg</u>	78
4.1.3.7.2	Fertigstellung der retrovirenalen Rekombinationsvektoren <u>p5xtrsSV40-HygBpuroCMV-Δ, -HR und -EJ</u>	79
4.1.4	Herstellung von Positiv-Kontrollplasmiden.....	80
4.1.4.1	Klonierung des Vektors <u>p5bPuro-wtEGFP</u>	80
4.1.4.2	Klonierung der Vektoren <u>p5xwtEGFP</u> und <u>p5nwtEGFP</u>	81
4.1.4.3	Klonierung des Vektors <u>p5bPuro-CMV-wtEGFP</u>	81
4.1.5	Herstellung von Negativ-Kontrollplasmiden und NHEJ-Plasmid.....	82
4.1.5.1	Klonierung der Negativ-Kontroll- bzw. NHEJ-Vektoren ohne Donor und ohne Abstandhalter.....	82
4.1.5.2	Klonierung der Negativ-Kontroll- bzw. NHEJ-Vektoren ohne Donor und mit Abstandhalter.....	83
4.2	Zellsysteme	85
4.2.1	Vorversuche.....	85
4.2.1.1	Feststellung der Selektionsbedingungen.....	85
4.2.1.2	Auswahl der optimalen Transfektionsmethode.....	86
4.2.1.3	Bestimmung der Messsensitivität am Durchflußzytometer.....	87
4.2.1.4	Etablierung der Elutriation von Leukämiezellen.....	88
4.2.1.5	Verbesserung der retrovirenalen Transduktionseffizienz.....	90
4.2.2	Etablierung eines Zellsystems zur Expression von Proteinen in Abhängigkeit von Östradiol.....	91
4.2.2.1	Zelllinien zur konstitutiven Expression des Transkriptionsfaktors GalERVP.....	91
4.2.2.1.1	Nachweis der GalERVP-Aktivität über Western-Blot-Analyse.....	92
4.2.2.1.3	Nachweis der GalERVP-Aktivität über EGFP-Fluoreszenz.....	93
4.2.3	Zelluläre Verteilung von ektopisch exprimierter Meganuklease I-SceI.....	95
4.2.4	Etablierung eines zellulären Test-Systems zur Bestimmung von Rekombinationsraten.....	95
4.2.4.1	Nachweis der Transgen-Expression nach genomischer Integration des retrovirenalen Rekombinationsvektors.....	96
4.2.4.1.1	Transkriptionelle Transaktivierung durch p53.....	97
4.2.4.1.2	Bestimmung der minimalen Östradiol-Konzentration für die GalERVP-Aktivität.....	98
4.2.4.1.3	Charakterisierung der Proteinakkumulation nach Östradiol-Induktion.....	99
4.2.4.1.3.1	Zeitverläufe der Protein-Expression nach Östradiol-Gabe in der Western-Blot-Analyse.....	99
4.2.4.1.3.2	Zeitverlauf der Protein-Expression nach Östradiol-Gabe gemäß FACS-Analyse.....	100
4.2.4.1.4	Rekombinationsmessung in I-SceI-Δ2-Zellen.....	101
4.2.5	Optimierung des Test-Systems zur Messung von Rekombinationsraten.....	102

4.2.5.1	Fluoreszenzauswertung über Dot-Plot-Darstellung.....	103
4.2.5.2	Rekombinationsratenbestimmung am FACS-Dot-Plot.....	104
4.2.5.3	Vergleich der EGFP-Expression unter der Kontrolle des 5'-LTRs und des CMV-Promotors.....	105
4.2.5.4	Bestimmung der EGFP-Leuchtintensitäten für unterschiedliche Expressionskonstrukte..	107
4.2.6	Rekombinationsratenbestimmung in KMV5-Leukämiezellen.....	108
4.2.6.1	Initiation der Rekombination durch I-SceI-Expression nach Östradiol-Induktion.....	109
4.2.6.2	Initiation der Rekombination nach Konstitutive I-SceI-Expression.....	114
4.2.7	Etablierung eines Zellsystems zur Messung von Rekombination im chromosomalen Kontext.....	116
4.2.8	Rekombinationsratenbestimmung im chromosomalen Kontext.....	117
4.2.9	Die Rolle von p53 bei der homologen Rekombination von chromosomal integrierten Substraten.....	119
4.2.10	Nachweis der Integrität des Rekombinationsvektors nach Insertion ins zelluläre Genom..	120
4.2.11	Rolle von p53 bei der HR mit unterschiedlichen Substrattypen und beim NHEJ.....	122
4.2.12	Untersuchungen mit endogen exprimiertem p53 und episomal vorliegenden Rekombinationssubstraten.....	124
4.2.13	Untersuchungen mit exogen exprimiertem p53.....	126
4.2.13.1	Untersuchungen zur Rolle von Krebsrelevanten p53-Mutanten bei der Rekombination..	127
4.2.13.2	Analyse von spezifisch inaktivierten p53-Mutanten bei der Rekombination.....	130
4.2.13.3	Spezifisch inaktivierte p53-Mutanten und episomale Rekombinationssubstrate.....	132
4.2.13.4	Spezifisch inaktivierte p53-Mutanten mit chromosomal integrierte Rekombinationssubstrate.....	133
4.2.14	Dosisabhängigkeit der Rekombinationsinhibition durch p53.....	135
4.2.14.1	Dosisabhängigkeit der Rekombinationsinhibition durch p53 mit chromosomal integrierten Rekombinationssubstraten.....	135
4.2.14.2	Dosisabhängigkeit der Rekombinationsinhibition durch p53 mit episomalen Rekombinationssubstraten.....	137
4.2.14.2.1	Abhängigkeit der Rekombinationsraten von der DNA-Substrat-Dosis.....	137
4.2.14.2.2	Rekombinationsraten in Abhängigkeit von der p53-Dosis.....	138
4.2.15	Unterscheidung von rekonstituierender und inaktivierender Rekombination durch Zwei-Fluoreszenzfarben-Analyse.....	139
4.2.16	Rekombination nach Bestrahlung oder Etoposid-Behandlung.....	141
5.	Diskussion.....	143
5.1	Entwicklung eines reaktionsschnellen Test-Systems zur Bestimmung von DSB-Reparatur-Ereignissen.....	143
5.2	Anwendungspotential des fluoreszenzbasierten Test-Systems.....	151
5.3	Analyse der Rolle von p53.....	152
6.	Zusammenfassung.....	160
7.	Literaturverzeichnis.....	163
8.	Anhang.....	174
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	174

8.2	Tabellenverzeichnis.....	176
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	177
8.4	Veröffentlichungen.....	180
8.5	Danksagung.....	181
8.6	Lebenslauf.....	182

1. Einleitung

Die Integrität des Genoms ist für das Überleben der Zellen essentiell, weshalb Zellen multiple Mechanismen zur Fehlerbeseitigung und -vermeidung entwickelt haben. Die Bedeutung der Entfernung von DNA-Läsionen spiegelt sich deutlich in einer Vielzahl von Krebsanfälligkeitsyndromen. So führen Defekte im Nukleotid-Exzisionsreparaturweg (NER) zu *Xeroderma pigmentosum*, welches unter anderem mit erhöhtem Auftreten von Hautkrebs assoziiert ist. *Mismatch*-Reparatur (MMR)-Defekte erhöhen die Sensitivität für Dickdarmkrebs und anderer Krebsarten (Kolodner, 1995). Eine dritte Art der Fehlerbeseitigung ist die rekombinative Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur, deren Inaktivierung Sensitivität gegenüber Bestrahlung und Immunschwäche hervorruft und im Falle von Mutationen in den *BRCA1*- und *BRCA2*-Genen die Ursache für die familiäre Anfälligkeiten gegenüber Brust- und Eierstockkrebs ist (Kinzler und Vogelstein, 1997). Während die MMR und NER sich auf die Reparatur von Basenfehlpaarungen und -modifikationen beziehen, können DSBs und Quervernetzungen nur über Rekombination repariert werden.

1.1 DSB-Reparatur

DSBs können infolge von äußeren Einflüssen wie z. B. von ionisierenden Strahlen oder DNA-schädigenden Agenzien hervorgerufen werden, oder treten während zellulärer Prozesse spontan, wie z. B. bei der DNA-Replikation oder bei der V(D)J-Rekombination und Meiose, auf (Hiom, 1999; Kowalczykowski, 2000; Flores-Rozas und Kolodner, 2000; Wilson, 1999). Während die DSBs meiotischen Ursprungs für die Entstehung der Artenenvielfalt essentiell sind, stellen sie für die genomische Integrität sich mitotisch teilender Zellen eine große Bedrohung dar. Während ein einziger DSB zum Zelltod führen kann, kann ein falsch reparierter DSB zu onkogenen Chromosomen-Aberrationen sowie zu Translokationen führen

(Hiom, 1999). Wenn eine Zelle die Fähigkeit verloren hat DSBe zu reparieren, sich aber trotzdem mitotisch teilt, kann es auch zur fehlerhaften Trennung homologer Chromosomen führen, was wiederum in Aneuploidie resultieren würde (Slebos und Taylor, 2001). Um DSBe beheben zu können, wurden von der Zelle zwei Reparaturwege entwickelt: Nicht-homologes *End-Joining* (NHEJ), auch illegitime Rekombination genannt, und homologe Rekombination (HR), welche vereinfachend in die beiden häufigsten Typen, die Genkonversion und das SSA (*single strand annealing*) unterteilt wird (Karran, 2000). Diese DSB-Reparaturwege sind von der Hefe bis zum Säuger hoch konserviert, wobei in der Hefe DSBe überwiegend über HR repariert werden (Paques und Haber, 1997). Für höhere Eukaryonten wurde früher angenommen, dass NHEJ dominiert (Jeggo *et al.*, 1995). Jedoch zeigten die jüngsten Untersuchungen, dass der HR-Anteil 30-50 % der DSB-Reparatur auch bei Säugern ausmacht (Lambert *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 1998).

1.1.1 NHEJ (Nicht-homologes *End-Joining*)

NHEJ repräsentiert eine Art der DSB-Reparatur, welche ohne ausgedehnte Sequenzhomologie ablaufen kann, wobei DNA-Enden mit keinerlei oder nur sehr kurzen homologen Sequenzen von 1-5 Bp zusammengefügt werden. NHEJ ist im Gegensatz zur HR häufig mit Fehlern behaftet, so dass es in *S. cerevisiae* zur Deletion von 1-22 Nukleotiden an der Bruchstelle kommt (Wilson *et al.*, 1999). In Säugetieren werden mittels NHEJ unter anderem auch DSBe im Laufe der V(D)J-Rekombination prozessiert, was bei SCID (*severe combined immune deficiency*)-Mäusen aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung deutlich wurde. SCID-Mäuse können durch eine Mutation im DNA-PK-Gen keine B- und T-Lymphozyten bilden, d. h. die V(D)J-Rekombination ist in diesen Tieren gestört (Wagener, 1999). Für NHEJ sind die Proteine DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) und eine LigaseIV/Xrcc4-Komplex notwendig. DNA-PK repräsentiert eine Kinase aus der PI3-Kinase-Familie, welche bei der Signaltransduktion in Zellen nach DNA-Schädigung beteiligt sind. DNA-PK kann *in vitro* auch p53 phosphorylieren, scheint aber kein essentieller Faktor der von p53 abhängigen zellulären Antwort auf DNA-Schäden zu sein, da in Zellen ohne DNA-PK die Funktionen von wtp53 nicht beeinflusst werden (Meek, 1999). DNA-PK ist der primäre DNA-Schaden-Erkennungsfaktor und hat ein hohes *Steady-State*-Niveau in der Zelle. Es besteht aus einer katalytischen Proteinkinase-Domäne (DNA-PK_{KD}) und einer DNA bindenden Komponente (Ku). Die Bindung von Ku, einem Heterodimer von Ku70 und Ku80 (auch Ku86 genannt), an DNA-Enden aktiviert die katalytische Aktivität der DNA-PK_{KD}. Die Komplexbildung stabilisiert die Interaktion zwischen Holo-DNA-PK und DNA-Enden. Nach

Prozessierung möglicher nichthomologer Enden durch die Nuklease Mre11/Rad50/NBS und/oder Polymerasen (Haber, 1998) wird ein Heterodimer aus der DNA-LigaseIV und Xrcc4 (*X-ray cross complementing 4*) an die Schnittstelle rekrutiert und die Enden ligiert, wobei im Ergebnis Deletionen oder Insertionen an der Bruchpunktregion entstehen können.

1.1.2 Konservative Homologe Rekombination (kHR)

Proteine, die bei der Ausführung der homologen Rekombination benötigt werden, sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Zur Einleitung von kHR, meist vom Typ der unilateralen Genkonversion, sind neben dem Einzelstrangbindeprotein RPA (*replication protein A*) und Mitgliedern aus der Rad52-Epistase-Familie ein 100%ig homologer Strangabschnitt von 200 Bp notwendig (Elliott *et al.*, 1998; Rubnitz und Subramani, 1984). In Hefe wurden die Proteine aus der Rad52-Epistase-Gruppe besonders gut charakterisiert, so dass man heute weiß, dass hierzu die Proteine Rad51-55, Rad 57, Rad 59, Mre11 und XRS2 gehören. Entsprechende Homologe wurden auch in Säugetieren nachgewiesen (Lambert *et al.*, 1999). Bindung von Rad52, welches ähnlich wie Ku eine hohe Affinität zu dsDNA-Enden hat (Van Dyck *et al.*, 1999), initiiert an DSB-Enden die Rekrutierung von Rad51. Die Schlüsselfunktion bei der HR ist eine Filament-Bildung an ssDNA durch das RecA-Homolog Rad51 und anschließender Strangtransfer in einer Reaktion, welche durch Rad52 und RPA unterstützt wird (New *et al.*, 1998; Benson *et al.*, 1998).

Funktion	<i>E. coli</i>	Hefe	Säugetiere	Anmerkung
Einzelstrangbindung	SSB RecA	RPA Rad51	RPA Rad51	
Strangaustausch	RecA	Rad51 Rad52 Rad55/57	Rad51 Rad52 Xrcc2 Xrcc3 Rad51B-D	Suche nach Homologien Stimulation von Rad51 Stimulation von Rad51 Ähnlichkeit mit Rad51 Ähnlichkeit mit Rad51
Helikase/Exonuklease	RecBCD	Rad50/Mre11/Xrs2 Rad54	Rad50/Mre11/NBS Rad54	
Mediator	nicht essentiell	Rad53 Rad59	Rad53	Kinase

Tabelle 1: Vergleich der bei der homologen Rekombination involvierten Proteine von Prokaryonten und Eukaryonten (s. Friedberg *et al.*, 1995; Kanaar *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1999).

Die 5'-Enden der DNA am DSB werden zuerst exonukleolytisch degradiert, so dass lange 3'-ssDNA entstehen. Bei dieser Prozessierung der DNA-Enden scheint der Rad50/Mre11/NBS-Komplex in noch nicht völlig geklärter Weise beteiligt zu sein (Haber,

1998). Katalysiert durch Rad51 kommt es dann zu einer Invasion von 3'-ssDNA-Enden in einen homologen dsDNA-Abschnitt, welcher sich in der G1-Phase des Zellzyklus auf dem homologen Chromosom und in der S- bzw. G2-Phase auch auf dem Geschwisterchromatid befinden kann. Einige Modelle zum Strangtransfer wurden entwickelt, nämlich DNA-Lücken-Reparatur (*DNA gap repair*) und von Synthese abhängige Strangligation (Ferguson und Holloman, 1996; Paques *et al.*, 1998). Bei der DNA-Lücken-Reparatur dringen beide ssDNA-Enden in die homologe Duplex ein und die Lücke wird mittels DNA-Synthese aufgefüllt. Die resultierenden *Holliday-Junctions* werden mit oder ohne *Cross-Over* getrennt. Bei der von Synthese abhängigen Strangligation dringt dagegen nur ein ssDNA-Ende in die homologe Duplex ein und das eingedrungene Ende wird für die Auffüll-Synthese als Primer benützt. Nach DNA-Synthese wird der neusynthetisierte Strang mit dem anderen Ende des DSBes ligiert und der komplementäre Strang synthetisiert. Bei der Reparatur kleinerer Lücken überwiegt die HR ohne *Cross-Over*, während bei größeren Lücken eine Trennung mit *Cross-Over* bevorzugt wird (Dronkert *et al.*, 2000).

Die Notwendigkeit der einzelnen beteiligten Proteine aus der Rad52-Epistase-Gruppe ist unterschiedlich: Während die Rad51-Null-Maus durch frühe embryonale Lethalität gekennzeichnet ist (Lim und Hasty, 1996), sind Rad52-Null-Mäuse lebensfähig und fruchtbar (Rijkers *et al.*, 1998). Obwohl Zellen aus Rad52-Null-Mäusen rekombinationsdefizient sind, sind sie nicht hypersensitiv gegenüber DSBen. Rad54-Null-Mäuse sind ebenfalls lebensfähig und fruchtbar, jedoch sind die Zellen hypersensitiv gegenüber DSB-induzierenden Agenzien (Essers *et al.*, 1997). Rad54 gehört zur SWI2/SNF2-Proteinfamilie, dessen Mitglieder DNA-Protein-Interaktionen in ATP-abhängiger Weise modulieren (Kingston *et al.*, 1996). Das Rad54-Protein aus der Hefe ist eine dsDNA-abhängige ATPase, das mit Rad51, dem HR-Schlüsselprotein, beim Suchen der homologen Matrizen-DNA wechselwirkt (Clever *et al.*, 1997; Golub *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1996; Petukhova *et al.*, 1998; Swagemakers *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 1999). Zwei mit Rad51 verwandte Proteine, Xrcc2 und Xrcc3, interagieren beide mit Rad51 und beeinflussen die DSB-Reparatur (Liu *et al.*, 1998; Pierce *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass die fünf mit Rad51 verwandten Proteine Xrcc2, Xrcc3, Rad51B, Rad51C und Rad51D einen funktionellen Komplex bilden und mit Rad51, ähnlich wie die Rad51-Homologen Rad55 und Rad57 aus der Hefe, kooperieren (Sonoda *et al.*, 2001). Ein Teil der Rad51-Moleküle kolokalisiert mit den Tumorsuppressorproteinen Brca1 und Brca2 in mitotischen Zellkernen, wobei DNA-Schäden die Relokalisation der drei Proteine an PCNA (*proliferating cell nuclear antigene*)-Orte zur Folge haben (Scully *et al.*, 1997a/b; Chen *et al.*, 1998). Während Brca2 direkt an Rad51 bindet, wird Brca1 nach DNA-Schädigung rekrutiert.

Beide Proteine sind für die HR in Säugern notwendig (Moynahan *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999). Neben Funktionen in der DNA-Reparatur sind für Brca1 transkriptionelle Regulatorfunktionen beschrieben worden, nicht aber für Brca2 (Sonoda *et al.*, 2001). Der *Mismatch*-Reparatur-Faktor Msh2 kontrolliert außerdem die Genauigkeit der HR, indem er den genetischen Austausch zwischen divergierenden Sequenzen inhibiert (Modrich und Lahue, 1996). Auch die regulatorische Beteiligung von p53 bei der HR wird zunehmend klarer, da gezeigt werden konnte, dass Zellen mit mutiertem p53 durch erhöhte HR-Raten gekennzeichnet sind (Wiesmüller *et al.*, 1996; Bertrand *et al.*, 1997; Mekeel *et al.*, 1997; s. auch 1.5.1). Auch für physikalische Interaktionen zwischen p53 mit Rad51 mit Brca1 und Brca2 gibt es Hinweise, was auf ein Zusammenspiel der genannten Proteine bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität hindeutet (Stürzbecher *et al.*, 1996; Ouchi *et al.*, 1998; Marmorstein *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Kürzlich wurde auch postuliert, dass das Vorhandensein von mehreren Rad51-Homologen (s. oben) in Säugetieren und deren Interaktionen mit regulatorischen Proteinen wie Brca1, Brca2 und p53 zu einer Koordination von Rad51-Funktionen in einer von Cyklin-Kinasen oder *Checkpoint*-Faktoren abhängigen Art führen kann (Sonoda *et al.*, 2001).

1.1.3 SSA (*Single Strand Annealing*)

Die prädominante Form der nkHR, nämlich das SSA, wurde bisher bei der Hefe im Detail untersucht, wodurch sich folgendes Bild ergab: Entsteht ein DSB innerhalb unmittelbar aufeinander folgender gleichorientierter DNA-Sequenzen, die eine homologe Region von mindestens 60-90 Nukleotiden besitzen (Wilson *et al.*, 1999), sind die Voraussetzungen für DSB-Reparatur durch SSA erfüllt. Zunächst werden am DSB die 5'-Stränge exonukleolytisch degradiert, so dass lange 3'-ssDNA-Überhänge entstehen (Klein, 1995). Anschließend werden die resultierenden komplementären ssDNA-Überhänge zu dsDNA hybridisiert, nichthomologe ssDNA-Überläufe nukleolytisch entfernt und die Enden ligiert. Damit bedingt SSA den Verlust von Zwischensequenzen (Dronkert *et al.*, 2000).

In der Hefe wird SSA von Rad52, Rad50, Mre11 und Xrs2 ausgeübt (Karran, 2000). Einmal an DNA-Enden gebunden, verhindert Rad52 den exonukleolytischen DNA-Abbau durch den Nuklease-Komplex Rad50/Mre11/Nbs. Auch eine Assoziation von DNA-Enden durch intermolekulare Rad52-Rad52-Interaktionen wurde beobachtet (Hiom, 1999). Rad50 ist ein ATP-abhängiges DNA-Bindeprotein und stimuliert Mre11 in seiner wichtigsten Aktivität, der 3'-5'-dsDNA-Exonukleaseaktivität. Nbs (auch als Nibrin oder p95 bekannt) ist das funktionell homologe Protein zum Xrs2 aus der Hefe. Das Nbs-Gen ist in Patienten mit dem

Nijmegen Breakage Syndrom mutiert. Nach Bestrahlung bilden Rad50 und Mre11 einen Komplex und lokalisieren in nukleären Foci (Maser *et al.*, 1997). Diese Bildung von Foci bedingt die Phosphorylierung von Mre11, welche wiederum nur in Anwesenheit eines funktionellen Nbs stattfindet (Dong *et al.*, 1999). Nach erfolgreicher Hybridisierung der komplementären ssDNAs zu einer dsDNA werden vor der Ligation nichtgepaarte Einzelstrangabschnitte entfernt, höchstwahrscheinlich durch die strukturspezifische Endonuklease-Aktivität des XPF/Ercc1-Komplexes, welches dem Rad1/Rad10-Komplex aus der Hefe entspricht. Zur Rekrutierung eines Endonuklease-Komplexes sind außerdem Msh2 und Msh3 notwendig, wie in der Hefe gezeigt wurde. Msh2 und Msh3 zeigen also Aktivitäten nicht nur in der *Mismatch*-Reparatur, wo sie als Heterodimer die Korrektur von größeren Basenfehlpaarungen und einzelsträngigen DNA-*Loops* bewirken, sondern auch beim SSA in der DSB-Reparatur (Karran, 2000).

1.2 Meganuklease I-SceI

DNA-DSBe können durch ionisierende Strahlen, durch Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien oder während des natürlichen DNA-Metabolismus entstehen (Moynahan und Jasin, 1997). Experimentell können DSBe durch spezifische Endonukleasen künstlich erzeugt werden. Die Meganuklease (I-SceI) wurde in Hefe-Mitochondrien entdeckt, wo sie für die Intron-Mobilität verantwortlich ist (Colleaux *et al.*, 1986). Die sogenannte Dodekapeptidfamilie, zu denen auch I-SceI angehört, schneidet intronlose Gene am Introninsertionsort und initiiert die Verbreitung bzw. Insertion der Gruppe-I-Introns. Die Dodekapeptidfamilie ist in drei Klassen unterteilt: Die Mitglieder der Klasse I, zu denen I-SceI, I-SceII, I-SceIII, I-SceIV, I-CreI, I-CeuI und I-CsuI zählen, schneiden die DNA innerhalb deren Erkennungssequenz und erzeugen dadurch 4 Bp lange 3'-Überhänge. Die Mitglieder der Klasse II, zu denen I-TevI und I-TevII zählen, schneiden die DNA außerhalb deren Erkennungssequenz und erzeugen 2 Bp lange 3'-Überhänge, während die Klasse III mit einem einzigen bekannten Mitglied nach DSB 2 Bp lange 5'-Überhänge erzeugt (Perrin *et al.*, 1993). Das 235 Aminosäuren lange Protein I-SceI (Plessis *et al.*, 1992) besitzt eine 18 Bp lange nicht palindromische Erkennungssequenz (Perrin *et al.*, 1993). Die für I-SceI kodierende cDNA wurde gemäß dem Säuger-Universalcode genetisch optimiert und mit einer NLS (Kernlokalisationssignal) ausgestattet. Die resultierende synthetische cDNA wurde in Säugerzellen überexprimiert und erwies sich als nicht toxisch (Rouet *et al.*, 1994; Jasin, 1996). Das Zusammentreffen eines I-SceI-Proteins und eines Plasmids mit I-SceI-Erkennungssequenz wurde in Säugetier-Zellen erfolgreich zur Initiation der Rekombination

eingesetzt und führte zur 10-100fachen Erhöhung der spontanen Rekombinationsraten (Routte *et al.*, 1994a/b; Dronkert *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 1998; Sprung *et al.*, 1999; Richardson *et al.*, 1998; Smih *et al.*, 1995; Cholika *et al.*, 1995; Moynahan und Jasin, 1997; Brenneman *et al.*, 1996).

1.3 EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)

Das Grünfluoreszenzprotein GFP wurde als an Aequorin assoziiertes Protein entdeckt und ist an der Biolumineszenz der Coelenteraten beteiligt (Prasher, 1995). Trotz identischer Chromophor-Regionen unterscheiden sich die bekanntesten und am besten charakterisierten GFPe von der Qualle *Aequorea victoria* und von *Renilla reniformis* (Cubitt *et al.*, 1995) in ihrem Biolumineszenz-Verhalten und ihrer Sensitivität gegenüber Temperaturwechsel oder pH-Veränderungen und in ihrer Tendenz zur Dimerisierung (Tsien, 1998). Nach Klonierung der cDNA für das *Aequorea*-GFP (Prasher *et al.*, 1992) und dessen Kommerzialisierung durch die Firma Clontech wurde GFP zu einem der interessantesten Werkzeuge der Molekularbiologie: GFPe wurden zur Identifizierung transformierter Zellen, zum Genexpressions-Nachweis, zur Identifizierung der zellulären Lokalisation nach Markierung von Proteinen mit GFPe, zur Markierung unizellulärer Organismen oder speziellen Zellen eines multizellulären Organismus erfolgreich eingesetzt (Prasher, 1995). wtGFP ist ein 238 Aminosäuren langes Protein und liegt hauptsächlich als Monomer vor und neigt erst bei höheren Konzentrationen zur Dimerisierung. *Aequorea*-GFP (wtGFP) hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 395 nm und ein Emissionsmaximum bei 508 nm. Für die Grünfluoreszenz essentiell sind eine von Sauerstoff abhängige posttranslationale Modifikation der Chromophor-Region, welche sich aus einem Aminosäuretriplet (Ser65-Tyr66-Gly67) zusammensetzt und die Ummantelung des Chromophors vor Ausbleicheffekten durch das umgebende Medium. Gereinigtes GFP zeichnet sich aus durch hohe Stabilität gegenüber Temperaturwechsel bis auf 65 °C, gegenüber pH-Änderungen bis pH 11, gegenüber 1 % SDS und gegenüber den meisten Proteasen. Für die Funktionalität ist die Proteinstruktur extrem wichtig, so dass die Deletion von mehr als einer Aminosäure am N-Terminus und mehr als 10-15 Aminosäuren am C-Terminus mit dem Verlust der Grünfluoreszenz einhergehen (Cubitt *et al.*, 1995, Tsien, 1998). Nach seiner Kommerzialisierung wurden mehrere GFP-Varianten hergestellt, die durch unterschiedlichste Eigenschaften gekennzeichnet sind (Expression in Bakterien, Sensitivität gegenüber pH-Änderung etc.). Eine dieser Varianten ist das EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), das durch zwei Aminosäuresubstitutionen, nämlich Phe64 zu Leu

und Ser65 zu Thr, und insgesamt 190 stummen Basenmutationen gegenüber wtGFP gekennzeichnet ist. Dadurch wurde beim EGFP das Exzitationsmaximum auf 490 nm erhöht und die Anregung von GFP am FACScan mittels Standard-Argon-Laser (488 nm) ermöglicht (Limón *et al.*, 1997), vor allem aber wurden nach Exzitation bei 488 nm für EGFP 35fach höhere Fluoreszenz-Intensitäten gegenüber wtGFP gemessen (Cormack *et al.*, 1996). Neben den oben genannten Verwendungsmöglichkeiten wurden GFPe in den letzten Jahren auch als Marker für den Gen-Transfer (Bierhuizen *et al.*, 1997a/b; Muldoon *et al.*, 1997), für die Virustiterbestimmung (Limón *et al.*, 1997) und als Marker für erfolgreiche Rekombination eingesetzt (Pierce *et al.*, 1999; Slebos und Taylor, 2001).

1.4 RFP (*Red Fluorescent Protein*)

RFP (DsRed) wurde aus der indopazifischen Seeanemone *Discosoma sp.* isoliert und dient wahrscheinlich dem Schutz des Organismus gegenüber gefährlichen UV-Strahlen des Sonnenlichtes (Matz *et al.*, 1999). Genau wie GFP braucht der Fluorophor in DsRed keine Kofaktoren oder Substrate für die Fluoreszenz. Es hat ein Exzitationsmaximum bei 558 nm und wird effizient auch bei 488 nm (Argon-Laser) angeregt. Der Emissionsmaximum liegt bei 583 nm und erlaubt die Detektion mit einem Rhodamin oder Prompidiumiodid-Filter. Aufgrund seines deutlich getrennten Emissionsspektrum eignet sich DsRed sehr gut für die Doppelmarkierung mit GFPe.

DsRed ist ein 28 kDa schweres Polypeptid und hat denselben Chromophor wie das wtGFP (Gln66-Tyr67-Gly68). Die Aminosäuresequenz-Homologie zwischen den beiden Proteinen liegt bei 23 %. Die Proteinfaltung von DsRed und damit auch die Fähigkeit zur Fluoreszenz verläuft bei Raumtemperatur über ca. zwei Tage und ist von Sauerstoff abhängig. Im Gegensatz zu GFP neigt DsRed zur Bildung von Tetramären und unter Umständen sogar zur Bildung von hochmolekularen Oligomeren (Yarbrough *et al.*, 2001).

1.5 Das Tumorsuppressorprotein p53

Instabilitäten im genetischen Material der Körperzellen (Veränderung einzelner Nukleotide, Verlust, Austausch oder Verdopplung von Chromosomen-Segmenten, Fehlen oder Überzähligkeit einzelner Chromosomen) können zur Entwicklung hyperproliferativer Zellpopulationen bis hin zum Tumor und zur Metastasierung führen, wenn im Verlauf dieses Mehrstufenprozesses Onkogene aktiviert oder Tumorsuppressoren inaktiviert werden. Besonders deutlich wird die Notwendigkeit für die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität zur Vermeidung von Krebs am Beispiel des Tumorsuppressors p53, welches durch

Gen-Mutation oder Deletion der beiden Allele in 50-60 % aller Tumore ausgeschaltet ist. In einer weiteren Fraktion der Tumore führen epigenetische Mechanismen, wie Ausschluss aus dem Zellkern, beschleunigter Abbau oder Komplexbildung des Proteins, indirekt zur funktionellen Inaktivierung von p53 (Wiesmüller, 2000).

Nach der Entdeckung von p53 (Lane und Crawford, 1979) im Komplex mit dem großen Tumor-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) führten weitere Experimente zunächst zu der Annahme, dass *p53* ein Onkogen sei. Weitere Untersuchungen in den späten 80er Jahren zeigten jedoch, dass man bis dahin mit Mutanten-p53 gearbeitet hatte und dass *wtp53* dagegen einen Tumorsuppressor repräsentiert. Das *p53*-Gen ist beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (Isobe *et al.*, 1986) und bei der Maus auf Chromosom 11 (Czosnek *et al.*, 1984; Rotter *et al.*, 1984) lokalisiert. Das menschliche *p53*-Gen hat eine Genomlänge von 12,5 kbp und ist auf 11 Exons verteilt. Die mRNA variiert von Spezies zu Spezies zwischen 1,8 bis 3,0 kbp (Soussi *et al.*, 1990) und das humane Translationsprodukt hat eine Größe von 393 Aminosäuren (Levine und Momand, 1990). Selbst zwischen p53 aus *Xenopus* und dem Menschen beträgt die Sequenz-Homologie 40 % und steigt innerhalb der insgesamt fünf hochkonservierten Bereiche (s. Abb. 1) weiter auf 90 % an (Jenkins *et al.*, 1988; Soussi *et al.*, 1990; Zakut-Houri *et al.*, 1985).

Das Tumorsuppressorprotein p53 wird auf biochemischer Ebene in drei Domänen unterteilt (s. Abb. 1): Die aus überwiegend sauren Aminosäuren bestehende N-terminale Transaktivator-Domäne erstreckt sich von den Aminosäuren 1 bis 42 (Fields und Jang, 1990; Lin *et al.*, 1994). Die Bindung von p53 an Proteine des Transkriptionsapparates wie z. B. an TFIIH und an TBP-assoziierte Faktoren (TAFs) erfolgt vermutlich in dieser Region (Lu und Levine, 1995; Seto *et al.*, 1992; Thut *et al.*, 1995). Auch das MDM2-Protein (*Murine Double Minute Protein Chromosome 2*) bindet an diese Domäne (Brown *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1993; Picksley *et al.*, 1994), hemmt dadurch die Transaktivierungsfunktion von p53 (Chen *et al.*, 1994; Zambetti und Levine, 1993) und initiiert außerdem die p53-Degradierung über das Ubiquitin-Proteasomen-System (Nakamura *et al.*, 2000; Rodriguez, 2000). p19^{ARF}, das Produkt des Tumorsuppressorgens *ARF* (*Alternative Reading Frame*) kann mittels direkter Bindung an das MDM2-Protein dessen antagonistische Wirkung auf p53 aufheben und über Stimulierung der p53-Acetylierung die Stabilisierung von p53 initiieren (Prives, 1998; Ryan *et al.*, 2001). In der N-terminalen Domäne sind auch mehrere Phosphorylierungsstellen lokalisiert: Ser15 wird von ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase*) und DNA-PK (dsDNA-aktivierte Protein Kinase), Thr18 von CK1 (*Casein 1-like Kinase*) und Ser20 und

Ser37 von der ATR (*A-T-Related Kinase*) und DNA-PK phosphoryliert (Liang und Clarke, 2001).

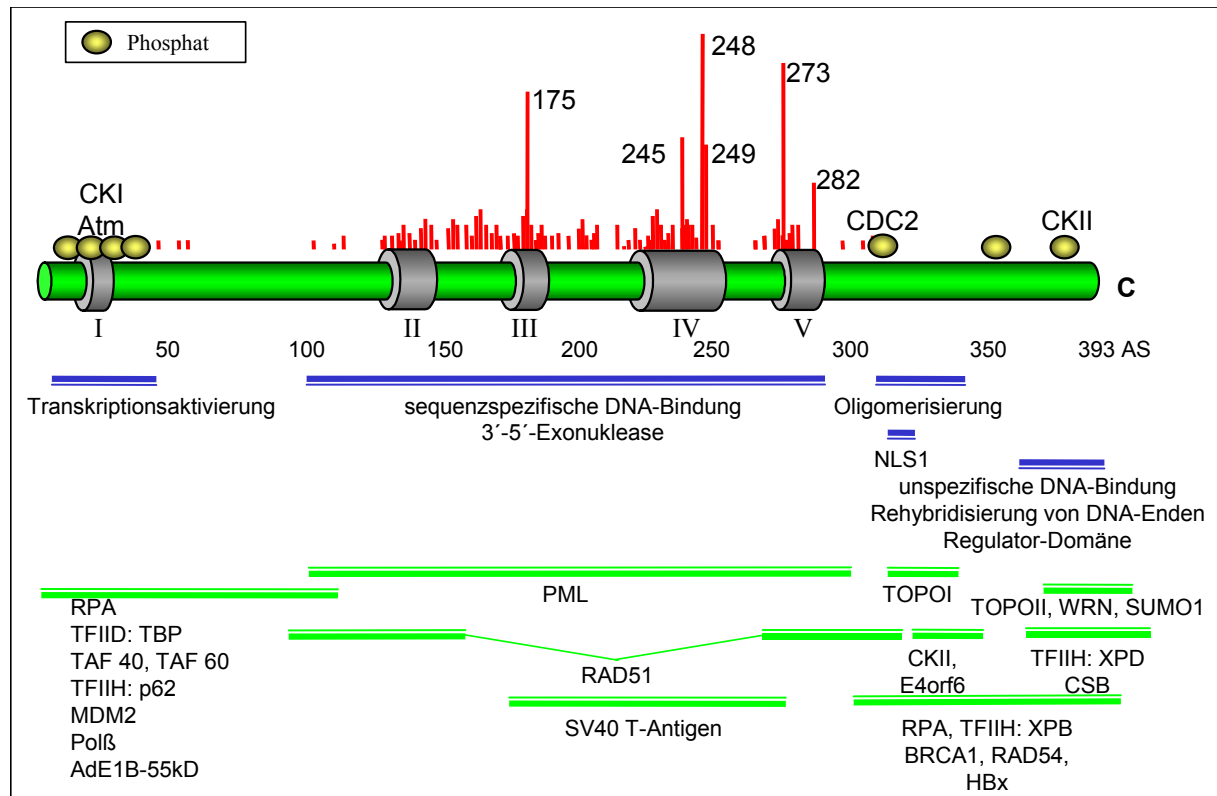


Abb. 1: Schematische Darstellung der p53-Domänen. Die Verteilung der krebsverursachenden Mutationen mit Häufigkeitsprofil und die Phosphorylierungsstellen sind angegeben. Die hoch-konservierten Regionen sind mit den römischen Ziffern I-V gekennzeichnet und in grau hervorgehoben. Funktionelle Domänen sind in blau und Interaktionsregionen mit den angegebenen Proteinen in grün gekennzeichnet.

Die zentrale, hydrophobe Domäne erstreckt sich zwischen den Aminosäuren 100 bis 300 und ist für die sequenzspezifische DNA-Bindung essentiell (Bargonetti *et al.*, 1993; El-Deiry *et al.*, 1992). Auf DNA-Ebene ist für die sequenzspezifische DNA-Bindung neben der DNA-Konsensussequenz auch die räumliche Struktur der DNA von Bedeutung (Kim *et al.*, 1997). Die zentrale Domäne beherbergt auch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Mummenbrauer *et al.*, 1996). Die p53-Mutationen, die in den meisten menschlichen Tumorzellen nachgewiesen wurden, betreffen diese zentrale Domäne (Hollstein *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 1991). Besonders häufig wurden Mutationen an den Aminosäuren 175, 248 und 273 beobachtet (Deppert, 1994; Donehower und Bradley, 1993). Über diese Region interagiert p53 außerdem mit dem Tumorsuppressorprotein PML, welches mit p53 und CBP in nukleären Foci kolokalisiert und dessen N-terminale Phosphorylierung und C-terminale Acetylierung stimuliert. Der Verlust von PML in der Zelle führt zur Beeinträchtigung der p53-Stabilisierung, so dass auch PML einen p53 regulatorisch vorgeschalteten Faktor repräsentiert (Ryan *et al.*, 2001).

Die C-terminale Domäne kann in drei Bereiche unterteilt werden (Ko und Prives, 1996): Eine flexible *Linker*-Region (Aminosäuren 300-320) zwischen der zentralen DNA-Bindedomäne und der Oligomerisierungsdomäne (Aminosäuren 320-360), über welche die p53-Monomere sich zu Dimeren und anschließend zu Tetrameren zusammenlagern (Stürzbecher *et al.*, 1992), und eine extrem C-terminale Domäne aus 30 Aminosäuren mit multiplen Aktivitäten. Diese Region interagiert unspezifisch mit DNA und RNA (Foord *et al.*, 1991; Oberosler *et al.*, 1993; Steinmeyer und Deppert, 1988), bindet DNA-schadenartige Strukturen, wie einzelsträngige DNA-Enden (Bakalkin *et al.*, 1995), und reguliert die DNA-Bindungs- und Exonuklease-Aktivitäten der zentralen Domäne (Bayle *et al.*, 1995; Janus *et al.*, 1999; Hupp *et al.*, 1993; Wolkowicz *et al.*, 1998). Neben der sequenzspezifische DNA-Bindung ist die Tetramerisierung eine Voraussetzung für die effektive Ausübung der Transaktivierungsfunktion und wird mittels Phosphorylierung durch CKII an Ser392 stabilisiert, während Phosphorylierung durch Cyklin-abhängige Kinase Cdk2/CyklinB und Cdk2/CyklinA destabilisierend wirkt (Liang und Clarke, 2001). Alle drei NLSe (Kern-Lokalisationssignale) von p53 sind innerhalb des C-Terminus lokalisiert (Shaulsky *et al.*, 1990). Das zweiteilige NLS1 erstreckt sich zwischen den Aminosäuren 305-322 und repräsentiert das wichtigste NLS. Außerdem befindet sich in der C-terminalen Domäne auch ein NES-Motiv (Kern-Exportsignal), welches zwischen den Aminosäuren 340-351 lokalisiert ist (Liang und Clarke, 2001). Mehrere Lysine am C-Terminus sind Acetylierungsreste für Histon-Acetyltransferasen wie p300/CBP und pCAF (Ryan *et al.*, 2001), und sind somit für die p53-Stabilisierung nötig. In proliferierenden Zellen liegen pro Zelle 1000 bis 10000 p53-Moleküle vor (Oren *et al.*, 1981; Patschinsky und Deppert, 1990). Unter diesen Bedingungen hat wtp53 eine kurze Halbwertszeit von 5 bis 20 min. DNA-Schäden infolge von z. B. Bestrahlung mit UV- oder ionisierenden Strahlen oder von Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen führen zur raschen Akkumulation von p53 durch die oben erwähnten posttranslationalen Modifikationen (Maltzman und Czyzyk, 1984; Nelson und Kastan, 1994), nämlich Phosphorylierung am N-Terminus und Acetylierung am C-Terminus (Lutzker und Levine, 1996; Siegel *et al.*, 1995). Durch diese p53-Stabilisierung wird in der Zelle entweder Zellzyklusarrest oder Apoptose eingeleitet. Von p53 abhängiger Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Kastan *et al.*, 1991) wird vor allem über die transkriptionelle Aktivierung des *p21^{Waf1/Cip1}*-Gens reguliert (El-Deiry *et al.*, 1993). *p21^{Waf1/Cip1}* inhibiert durch direkte Bindung Cdk2 und verhindert die von Cdk2 abhängige Phosphorylierung des Retinoblastom-Genprodukts (*Rb*). Da die für die Dissoziation des E2F-Rb-Komplexes essentielle Phosphorylierung des Rb so nicht stattfinden kann, bleibt E2F komplexiert und die von E2F abhängige Transkription der DNA-Synthese-

Phasen-Gene, wie z. B. CyklinE, CyklinA und PCNA (*Proliferating Cell Nuklear Antigen*), kann nicht stattfinden. Außerdem kann p21^{Waf1/Cip1} direkt an PCNA, einen Hilfsfaktor der DNA-Polymerase δ , binden und damit zur Inhibition der von PCNA abhängigen DNA-Replikation (Waga *et al.*, 1994) nicht aber der von PCNA abhängigen DNA-Reparatur führen (Li *et al.*, 1994). Neben einem G1-Arrest wurde auch die Beteiligung von p53 am S- und G2/M-Arrest beschrieben (Jacks und Weinberg, 1996): Durch die transkriptionelle Aktivierung des *14-3-3 σ* -Gens wird die Aktivierung der Cdk1-Kinase inhibiert, welche für den G2-M-Phasen-Übergang benötigt wird.

Alternativ zur Einleitung des Zellzyklusarrestes kann die p53-Stabilisierung über Aktivierung von Zielgenen, die für Todesrezeptoren wie CD95(APO-1/Fas-R) und für den Antagonisten des anti-apoptotischen Faktors Bcl2, nämlich Bax, kodieren, zur aktiven Zelltod (Apoptose) führen (Clarke *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1993; Miyashita und Reed, 1995; Ryan *et al.*, 1993; Shaw *et al.*, 1992; Yonish-Rouach *et al.*, 1991). Während Apoptose einen Schutzmechanismus gegen irreparable Schädigung darstellt, wird durch den G1-Arrest der Zelle genügend Zeit zur Reparatur der entstandenen Schäden gegeben, bevor diese durch die anschließende Teilung an die nachkommende Generation weitergegeben werden. Obwohl die transkriptionelle Aktivierung des *p21*-Gens durch p53 eine zentrale Rolle für seine Tumor-Suppressoraktivität spielt, zeigten p21-Null-Mäuse im Gegensatz zu p53-Null-Mäusen keine erhöhten Krebs-Suszeptibilitäten (Deng *et al.*, 1995), was vermuten lässt, dass weitere Aktivitäten von p53 der Entstehung von Tumoren entgegenwirken (Wiesmüller, 2000).

1.5.1 Hinweise für eine Beteiligung von p53 bei der homologen Rekombination

Die Erzeugung von p53-Null-Mäusen machte deutlich, dass p53 nicht nur bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden funktionell ist, sondern auch eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Genom-Stabilität/-Integrität spielt. So zeigte sich, dass p53 Aneuploidien, Allel-Verlusten, Schwesterchromatidaustauschen und Gen-Amplifikationen entgegenwirkt (Cleaver *et al.*, 1999; Harvey *et al.*, 1993; Ishizaki *et al.*, 1994; Livingstone *et al.*, 1992; Schwartz und Russel, 1999). Parallel dazu wurden biochemische Aktivitäten von p53 bei der Erkennung von DNA-Schäden, der Rehybridisierung von DNA-Enden, dem Strangtransfer und der exonukleolytischen Degradierung von DNA beobachtet und konsequenterweise die Beteiligung von p53 an DNA-Reparaturprozessen postuliert (Albrechtsen *et al.*, 1999). Insbesondere die 3'-5'-Exonukleaseaktivität warf die Frage auf, ob p53 an der Genauigkeitskontrolle der DNA-Replikation, an der Entfernung von ungepaarten

DNA-Regionen während der postreplikativen *Mismatch*-Reparatur oder an der Prozessierung von DNA-Enden während der DSB-Reparatur beteiligt ist. Im Zusammenhang mit der Beteiligung von p53 bei der DNA-Replikation ist auch interessant, dass für p53 die physikalische Interaktion mit dem Einzelstrangbindeprotein RPA und der DNA-Polymerase α nachgewiesen wurde (Kühn *et al.*, 1999; Wold, 1997). Die Annahme, dass p53 an der DNA-Reparatur beteiligt ist, wird unterstützt durch Befunde über die Bindung an Reparatur-Proteine, wie z. B. an die Helikasen XPB und XPD des dualen Transkriptionsinitiations-/Reparatur-Faktors TFIIH, die Helikase CSB, die an der Kopplung der Transkription und dem NER (*Nucleotide Excision Repair*) beteiligt ist, die Topoisomerase I und II, die bei Transkription, Replikation, Reparatur und Rekombination mitwirken, das Werner's Syndrom Protein (WRN), eine Helikase und Exonuklease mit genomstabilisierender Wirkung, und Refl und die Polymerase β mit Funktionen beim BER (*Base Excisions Repair*) (Albortsen *et al.*, 1999; Albrechtsen *et al.*, 1999; Blander *et al.*, 1999; Cowell *et al.*, 2000; Gobert *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2001). Wie die Bedeutung der einzelnen Interaktionen einzuordnen ist, bedarf noch weiterer Klärung. So ist auch die direkte Beteiligung von p53 bei der NER über Modulation von TFIIH-Aktivität unsicher: Während einige Gruppen in Zellen mit reduzierten wtp53-Niveaus NER-Defekte gesehen haben (Ford und Hannawalt, 1997; Mirzayans *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995), beobachteten andere mit p53-defizienten Zellen nach UV-Bestrahlung eher eine Erhöhung von SCEs (*Sister Chromatid Exchanges*) als Unterschiede bei der NER (Cleaver *et al.*, 1999; Ishizaki *et al.*, 1994). Kürzlich wurde von zwei bis dreifacher Stimulierung der BER durch wtp53 berichtet, wobei die krebsrelevanten Mutanten sich einheitlich als inaktiv erwiesen, jedoch mit verkürzten p53-Varianten widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden (Offer *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001).

Während die Beteiligung von p53 am NHEJ ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt ist (Bill *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1997), ist dessen inhibitorische Wirkung auf das HR von mehreren Gruppen berichtet worden. Die Interaktion von p53 mit Faktoren, die an der HR beteiligt sind, wie z. B. Rad51 und die Rad51-Komlexpartner BRCA1 und BRCA2, wurde beschrieben (Albrechtsen *et al.*, 1999; Marmorstein *et al.*, 1998). Inaktivierung von p53 durch Mutationen, durch Sequestrierung oder durch Interaktion mit viralen Tumor-Antigenen führt zu fünf- bis 100facher Erhöhung der spontanen inter- und intrachromosomalen HR-Raten (Bertrand *et al.*, 1997; Dudenhöffer *et al.*, 1998; Dudenhöffer *et al.*, 1999; Mekeel *et al.*, 1997; Meyn *et al.*, 1994; Saintigny *et al.*, 1999; Wiesmüller *et al.*, 1996; Willers *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 1997). Darüberhinaus wurden Daten für bestimmte p53-Mutanten erhalten, die Funktionen in Bezug auf Inhibierung von HR und Induktion von G1/S-

Arrest in unterschiedlicher Weise ausüben (Dudenhöffer *et al.*, 1999; Saintigny *et al.*, 1999; Willers *et al.*, 2000). Schließlich zeigte sich, dass p53 spezifisch mit *Holliday-Junctions* und 3-Strang-Rekombinationsintermediaten in einer sequenzunabhängigen Weise interagiert (Dudenhöffer *et al.*, 1998; Janz *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1997; Süsse *et al.*, 2000) und dass dessen Neigung zur Komplexbildung mit *DNA-Junctions* in Gegenwart von Rad51 erhöht ist (Süsse *et al.*, 2000). Basenfehlpaarungen, die während des Strangtransfers auf den Rekombinationsintermediaten entstehen können, haben die Erhöhung der Affinität gegenüber diesen Intermediaten, deren exonukleolytischen Abbau und verstärkte Rekombinationsregulation zur Folge (Dudenhöffer *et al.*, 1998; Süsse *et al.*, 2000). In der Summe führten die genannten Bindungseigenschaften und Aktivitäten bei der Rekombination zu der Annahme, dass p53 zusammen mit Rad51 komplementär zum *Mismatch*-Reparatur-Faktor MSH2 zur Genauigkeit des Strangaustauschprozesses beiträgt (Dudenhöffer *et al.*, 1998; Süsse *et al.*, 2000).

2. Problemstellung

DSBe, die infolge von äußeren Einflüssen, wie z. B. von ionisierenden Strahlen oder DNA-schädigenden Agenzien hervorgerufen werden oder während zellulärer Prozesse spontan, wie z. B. bei der DNA-Replikation oder bei der V(D)J-Rekombination und Meiose auftreten (Hion, 1999; Kowalczykowski, 2000; Flores-Rozas und Kolodner, 2000; Wilson, 1999), stellen eine Bedrohung für die genomische Integrität von sich mitotisch teilenden Zellen dar. Aus diesem Grunde repräsentiert die rekombinative Reparatur eine der wichtigsten und vor allem auf unterschiedlichste DNA-Schädigungen reagierende DNA-Reparatur-Form. Bisher wurden Rekombinationsereignisse mit Hilfe von Test-Systemen, die auf der Rekonstitution eines Selektionsmarkers oder auf der Rekonstitution eines intakten SV40-Genoms basieren, bestimmt. Der erste Typ setzt eine Selektionsphase von mehreren Wochen voraus. Das in unserer Arbeitsgruppe besonders gut charakterisierte, auf SV40-Viren basierende Test-System erlaubt die Bestimmung von Rekombinationsereignissen nur im episomalen Kontext. Außerdem führt die SV40-Infektion zur Synchronisierung der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. Dies macht die Bestimmung von Reparaturereignissen im Kontext der zellulären Chromosomen und die Analyse von an der Reparatur beteiligten Proteinen unter Berücksichtigung der Regulation im Zellzyklus unmöglich.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte schwerpunktmäßig ein Test-System entwickelt werden, welches durch eine kurze Reaktionszeit bei gleichzeitig hoher Sensitivität gekennzeichnet ist. Dies sollte durch die Bestimmung von Rekombinationsereignissen mittels Rekonstitution eines intakten *EGFP*-Gens aus zwei deletierten Varianten ermöglicht werden. Außerdem sollten Rekombinationsvektoren durch die Auswahl unterschiedlicher Rekombinations-Donor- und Akzeptorsequenzen die Bestimmung von Rekombinationsereignissen vom Typ

der Genkonversion, dem SSA, dem NHEJ und gekoppelter Prozesse im chromosomalen Kontext erlauben.

Die Initiation der HR durch ionisierende Strahlung ist auf die Erzeugung von DNA-DSBen zurückzuführen. Ionisierende Strahlung verursacht aber auch Einzelstrangbrüche, Basenschäden und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Die Initiation der HR durch Erzeugung von DSBen in einer bestimmten Genkopie auf dem zellulären Genom erfordert jedoch den Einsatz unphysiologisch hoher Strahlungsdosen. Aus diesem Grunde sollte zur Initiation der DSB-Reparatur die Meganuklease I-SceI in Verbindung mit der 18 Bp langen Erkennungssequenz in einer *EGFP*-Variante eingesetzt werden. Mit Hilfe dieses spezifischen Werkzeugs in Verbindung mit dem auf EGFP basierenden Rekombinations-Test-System sollte es möglich sein, neue Fragen nach den Regulationsmechanismen definierter DSB-Reparatur-Pfade zu stellen.

In unsere Arbeitsgruppe konnte für das SV40-Test-System bereits gezeigt werden, dass das Tumorsuppressorprotein p53 HR-Ereignisse reguliert (Wiesmüller *et al.*, 1996; Dudenhöffer *et al.*, 1998). In dieser Arbeit sollte die Beteiligung von wtp53 und verschiedensten p53-Mutanten bei der Rekombination an chromosomal oder episomal vorliegenden *EGFP*-Substraten analysiert werden. Zur Untersuchung von endogen reguliertem p53 sollten isogene menschliche Zelllinien lymphoiden Ursprungs, nämlich TK6 und WTK1, mit unterschiedlichem p53-Status eingesetzt werden. Für die Analyse verschiedener ektopisch exprimierter p53-Varianten sollte die p53-negative Leukämie-Zelllinie K562 verwendet werden, um mögliche dominante Effekte endogener p53-Varianten ausschließen zu können. Um die regulierbare Expression von sowohl dem Wachstumsinhibitor p53 als auch der Endonuklease I-SceI zu erreichen, sollten induzierbare Systeme auf der Basis von durch Östradiol aktivierbaren Proteinen bzw. Transkriptionsfaktoren eingesetzt werden. Mit Hilfe dieser sensitiven, reaktionsschnellen und kontrollierten Verfahren sollten die für p53 spezifischen Aktivitäten bei der DSB-Reparatur nicht nur im Hinblick auf die Beteiligung an unterschiedlichen Reparaturwegen, sondern auch auf die Bedeutung für die Tumorsuppression charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Agarosegelelektrophoresesystem Horizon[®]: Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

Analysenwaage PM460: Mettler, Gießen

Bestrahlungsanlage LISA 1: Rotabel SLPI, Genas, Frankreich

Brutschränke: Heraeus, Hannover

Durchflußzytometer Coulter Epics[®]

XL-MCL: Beckman, München

Durchflußzytometer DAKO Galaxy: DAKO[®] Diagnostika GmbH, Hamburg

Durchflußzytometer FACScalibur: Becton Dickinson, Heidelberg

Elutriator Coulter J6-MC: Beckman, München

Geldokumentationsanlage: Intas, Göttingen

Gene Pulser[®] mit Pulse Controller: Biorad, München

Immunfluoreszenz-Mikroskop Axiovert: Zeiss, Jena

PCR-Gerät: MWG-Biotech, Ebersberg

Photometer Bio Spec: Shimadzu, Duisburg

Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem: Hoefer Pharmacia Biotech, Freiburg

Power Supply EPS 1000: Pharmacia Biotech, Freiburg

Power Supply EPS 2A 200: Hoefer, San Francisco, USA

Sterilbank: Heraeus, Hannover

Western-Blotkammer TE Series: Hoefer, Pharmacia Biotech, Freiburg

Zentrifugen

5415C:	Eppendorf, Hamburg
5810R:	Eppendorf, Hamburg
Coulter ZU L70:	Beckman, München
Rotanta 96R:	Hettich, Tuttlingen
Sorvall RC-5B:	Du Pont, Bad Homburg

3.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamide/Bis Solution (19:1) 40% (w/v):	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Agarose:	Sigma, München
Ammoniumperoxodisulfat (APS):	Merck, Darmstadt
Ampicillin:	Serva, Heidelberg
Bacto Agar:	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Trypton:	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Yeast-Extract:	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bromphenolblau:	Merck, Darmstadt
Carbenicillin:	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
Dimethylpimelimidat:	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO):	Sigma, München
DMEM:	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
DMSO:	Sigma, München
DNA Marker λ /Hind III:	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Längenmarker 1Kb+:	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
dNTPs:	New England Biolabs, Frankfurt am Main; MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Ethanolamin:	Sigma, München
FCS/low estradiol:	Promocell, Heidelberg
FCS:	PAA, Cölbe
FCS:	Roche, Mannheim
G418 (Geneticin):	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Glutamin:	Biochrom, Berlin
Hygromycin B:	Roche, Mannheim
Kanamycin:	Serva, Heidelberg
Klenow-Fragment:	New England Biolabs, Frankfurt am Main

Leupeptin:	Biomol, Hamburg
Luminol:	Sigma, München
Magermilchpulver:	De Vau Ge Gesundheitswerk, Lüneburg
Natriumpyruvat:	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Natriumtetraborat:	Merck, Darmstadt
Nonidet P40:	Fluka, Neu Ulm
PCI [Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)]:	Biomol, Hamburg
p-Cumarin Säure:	Sigma, München
Pefablock:	Biomol, Hamburg
Penicillin/Streptomycin:	Biochrom, Berlin
Pepstatin A:	Biomol, Hamburg
Pierce Super-Signal-ULTRA chemiluminescent substrate:	Pierce, Illinois, USA
Polybren:	Sigma, München
Propidiumiodid (PI):	Sigma, München
Proteinase K:	Sigma, München
Puromycin:	Serva, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen:	New England Biolabs, Frankfurt am Main; MBI-Fermentas, St. Leon-Rot; Roche, Mannheim
RNAse A:	Sigma, München
RPMI 1640 ohne Phenolrot:	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
RPMI 1640:	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Streptomycin:	Biochrom, Berlin
T4-DNA-Polymerase:	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T4-Polynukleotid-Kinase:	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Taq-DNA-Polymerase:	QIAGEN, Hilden
TEMED:	Serva, Heidelberg
Tetracyclin:	Serva, Heidelberg
Trasylol® 500000KIE (Aprotinin):	Bayer, Leverkusen
Trisma Base:	Serva, Heidelberg
Trypsin:	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Tween 20:	Fluka, Neu Ulm

Viapurex Steriles Wasser:	Baxter, Unterschleißheim
β -Mercaptoethanol:	Serva, Heidelberg
β -Östradiol:	Sigma, München

Die nicht auf der Liste aufgeführten Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Biorad (München), Merck (Darmstadt), Serva (München) und Sigma (München) bezogen.

3.1.3 Sonstige Materialien

ABI PRISM Big Dye Ready Reaction Cycle

Sequencing Kit:	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
CAT-ELISA Kit:	Roche, Mannheim
Concert High Purity Plasmid Maxiprep System:	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
DOTAP Transfektionreagenz:	Roche, Mannheim
Dounce-(Hand)-Homogenisator:	NeoLab, Heidelberg
Einfrierröhrchen:	Nunc GmbH, Wiesbaden Biebrich
Elektroporationsküvetten (0,4cm):	Biorad, München
FACS-Röhrchen PS 12-75:	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Farbfilm Elite Chrome 400 Kodak:	Amersham, Buchler-KG, Braunschweig
Filterpapier Whatman 3MM:	Schleicher und Schüll, Dassel
Immobilon™-P Membran:	Millipore, Eschborn
Lipofektamin-Transfektionsreagenz:	Gibco, BRL Life Technologies, Eggenstein
Nucleobond, AX500:	Macherey & Nagel, Düren
Polypropylenröhrchen 15ml/50ml:	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Prestained SDS-Molecular Weight Marker 7B:	Sigma, München
ProteinG-Sepharose (PGS):	Sigma, München
QIAEX II DNA Purification Kit:	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit:	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit:	QIAGEN, Hilden
QIAmp Mini DNA Kit:	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR-Purification Kit:	QIAGEN, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit:	Roche, Mannheim
Reaktionsgefäße 0,5ml/1,5ml/2ml:	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm Kodak X-OMAT® / Biomax™MR:	Amersham Buchler KG, Braunschweig
Sheath-Lösung (ISOTON II):	Beckman und Coulter, Krefeld

Spinnerflaschen in verschiedenen Größen:	Bellco Glass, Inc., Vineland, NJ, USA
Sterivex (Sterilfilter):	Millipore, Eschborn
ZK-96-, 24- und 6-Loch- Platte:	Nunc GmbH, Wiesbaden Biebrich
ZK-Flasche 25 cm ² /90 cm ² :	Nunc GmbH, Wiesbaden Biebrich
ZK-Platte 9 cm ² (beschichtet oder unbeschichtet):	Nunc GmbH, Wiesbaden Biebrich

3.1.4 Puffer und Lösungen

3,3 % Weich-Agar Stammlösung	3,3 g	Bacto Agar
	add. auf 100 ml ddH ₂ O (autoklavieren)	
2xHeBS:	247 mM	NaCl,
	10 mM	KCl,
	1,4 mM	Na ₂ HPO ₄
	42 mM	Hepes
5xDNA-Stoppuffer:	50 %	Glyzerin,
	0,1 M	EDTA,
	1 %	Bromphenolblau
ECL-Lösung 1:	2,5 mM	Luminol,
	400 µM	p-Cumarin Säure,
	100mM	Tris/HCl, pH 8,5
ECL-Lösung 2:	13 mM	H ₂ O ₂ ,
	100 mM	Tris/HCl, pH 8,5
Hypotonischer Lysis-Puffer:	20 mM	HEPES pH 7,4
	5 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
	5 mM	EGTA
	1 mM	MgCl ₂
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	Aprotinin, Leupeptin, Pefablock und Pepstatin A (frisch zugeben, s. Proteinaseinhibitoren)	
NP40-Lysispuffer:	1 %	NP40
	50 mM	HEPES
	150 mM	NaCl
	Aprotinin, Leupeptin, Pefablock und Pepstatin A (frisch zugeben, s. Proteinaseinhibitoren)	

PBS:	140 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	8 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Proteinaseinhibitoren:		
Trasyol [®] (Wirkstoff Aprotinin):	1,4 mg/ml	Infusionslösung
Leupeptin (1000x):	5 mg/ml	in 50% Glyzerin
Pefablock (200x):	25 mg/ml	in 50% Glyzerin
Pepstatin A (200x):	1 mg/ml	in Ethanol
10xSDS-PAGE-Laufpuffer:	151 g	Trisbase (2,5M)
	720 g	Glycin (19M)
	50 g	SDS (10%) mit ddH ₂ O auf 5l.
2xSDS-Probenpuffer:	125 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	20 %	Glyzerin
	4 %	SDS
	3,1 %	DTT
	0,05 %	Bromphenolblau
	4 %	β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
4xSDS-Sammelgelpuffer:	0,5 M	Tris/HCl, pH 6,8
	0,4 %	SDS
4xSDS-Trenngelpuffer:	1,5 M	Tris/HCl, pH 8,8
	0,4 %	SDS
TAE (50x):	121 g	Trisbase
	27,55 ml	Eisessig
	50 ml	0,5M EDTA, pH 8,0 mit ddH ₂ O auf 500ml auffüllen
TBS-T:	20 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	137 mM	NaCl
	0,2 %	Tween 20
TBS-T-5% MP:	5 %	Magermilchpulver in TBS-T
TCM-Puffer:	10 mM	Tris/HCl, pH 8
	10 mM	CaCl ₂
	10 mM	MgCl ₂

TE-Puffer:	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA
TES:	0,8 %	SDS in TE
TFB-I-Puffer:	100 mM	RbCl
	50 mM	MnCl ₂
	10 mM	CaCl ₂
	30 mM	Kaliumacetat
	15 %	Glyzerin; mit 0,2M Essigsäure auf pH 5,8
TFB-II-Puffer:	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂
	15 %	Glyzerin, mit NaOH auf pH 7,0
Tris-Glycin-Puffer:	250 mM	Glycin
	50 mM	Tris/HCl, pH 8,3.
Trypsin-Lösung:	0,05 %	Trypsin
	0,5 mM	EDTA, pH 8,0 in 1x PBS.

Standardpuffer und Lösungen, die nicht aufgeführt sind, wurden, wie im Methodenbuch von Sambrock *et al.*, 1989 beschrieben, angesetzt.

3.1.5 Nährmedien

Antibiotikum-haltiges LB-Medium:	LB-Medium mit verschiedenen Antibiotika, die in folgenden Konzentrationen verwendet wurden:	
	50-100 µg/ml	Ampicillin
	50-100 µg/ml	Carbenicillin
	30 µg/ml	Kanamycin
	30 µg/ml	Streptomycin
	12 µg/ml	Tetrazyklin
Erhaltungsmedium DMEM 5(10)/1:	5-10 %	FCS
	1 %	Penicillin/Streptomycin
	in DMEM-Flüssigmedium	

Erhaltungsmedium RPMI Ø12/1:	12 %	FCS (östradiolarm)
	1 %	Penicillin/Streptomycin
	1 %	Glutamin
	in phenolrotfreiem RPMI1640-Flüssigmedium	
Erhaltungsmedium RPMI 10/1:	10 %	FCS
	1 %	Penicillin/Streptomycin
	1 %	Glutamin
	in RPMI1640-Flüssigmedium	
Konditioniertes Selektionsmedium:	Selektionsmedium versetzt mit frischem, sterilfiltrierten Überstand von Zellen, in einem Verhältnis von 1:2 bis 4:1	
LB-Agar:	15 g	Bacto Agar in 1l LB-Medium (autoklavieren und nach dem Abkühlen auf 50 °C mit oder ohne Antibiotika ausplattieren)
LB-Medium:	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl in 1l ddH ₂ O, pH 7,4
Ψ-Broth- Medium:	10 mM	MgSO ₄
	10 mM	MgCl ₂ in LB-Medium pH mit KOH auf 7,6 bringen
Selektionsmedium:	Erhaltungsmedium mit frisch zugegebenem Selektionsagens (G418, Hygromycin oder Puromycin (Konzentrationen s. Tab. 3)	
FCS (gestrippt):	10 g	Norit A (Aktivkohle)
	1 g	Dextran 40
	1 lt	FCS (PAA), 30 min rühren lassen, anschließend bei 14000 rpm abzentrifugieren und Überstand sterilfiltrieren.

3.1.6 Antikörper

Primär-Antikörper:

anti-HA-tag:	monoklonaler Maus-Antikörper 12CA5 gegen das Hämagglutinin-Epitop, die Nonapeptidsequenz YPYDVPDYA vom Influenza Hemagglutinin Protein (Hybridomaüberstand, Arbeitskonzentration 1:20-1:50)
anti-hMDM2:	monoklonaler Maus-Antikörper gegen das humane MDM2-Protein, erkennt ein N-terminales Epitop zwischen den Aminosäuren 26 und 150 (Calbiochem, Bad Soden, Arbeitskonzentration 1:1000)
anti-hp21(WAF-1):	monoklonaler Maus-Antikörper, der das humane p21 ^{WAF} -Protein erkennt (Calbiochem, Bad Soden, Arbeitskonzentration 1:1000)
DO1:	monoklonaler Maus-Antikörper gegen das humane p53-Protein, erkennt ein N-terminales Epitop zwischen den Aminosäuren 20 und 25 (Calbiochem, Bad Soden, Arbeitskonzentration 1:1000-1:5000)
PAb421:	monoklonaler Maus-Antikörper gegen das humane p53-Protein, erkennt ein C-terminales Epitop zwischen den Aminosäuren 372 und 382 (Hybridomaüberstand, Arbeitskonzentration 1:200)

Sekundär-Antikörper

Ziege anti-Maus, konjugiert mit Peroxidase: Biomol, Hamburg (Arbeitskonzentration 1:10000)

3.1.7 DNA

<u>p5CMV-Red-EJ:</u>	Retroviraler Kontrollvektor bei der Untersuchung von Rekombinationsereignissen. Er erlaubt die Expression des RFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Als Rekombinationsakzeptor wurde das <i>EJ-EGFP</i> -Gen 5' vom <i>RFP</i> -Gen kloniert (Hinsch, 2000).
<u>p5CMV-Red-HR:</u>	Retroviraler Kontrollvektor bei der Untersuchung von Rekombinationsereignissen. Er erlaubt die Expression des RFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Als Rekombinationsakzeptor wurde das <i>HR-EGFP</i> -Gen 5' vom <i>RFP</i> -Gen kloniert (Hinsch, 2000).

- p5N-M: Retroviraler Expressionsvektor mit einer multiplen Klonierungsstelle. Der Vektor enthält das Verpackungssignal und den 5'- und 3'-LTR des MPSV. Der Vektor wurde von Frau Carol Stocking, HPI, Hamburg, zur Verfügung gestellt.
- p5PuroCMV-N'-CMV-Red-EJ: Retroviraler Vektor zur Untersuchung von Rekombinationsereignissen. Er erlaubt die Expression des RFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Als Rekombinationsakzeptor wurde das *EJ-EGFP*-Gen 5' vom *RFP*-Gen und die Donorkassette, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz*-Gen und dem Donor *N'-EGFP* unter der Kontrolle des CMV-Promotors, 3' von der CMV-RFP-Kassette kloniert (Hinsch, 2000).
- p5PuroCMV-N'-CMV-Red-HR: Retroviraler Vektor zur Untersuchung von Rekombinationsereignissen. Er erlaubt die Expression des RFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Als Rekombinationsakzeptor wurde das *HR-EGFP*-Gen 5' vom *RFP*-Gen und die Donorkassette, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz*-Gen und dem Donor *N'-EGFP* unter der Kontrolle des CMV-Promotors, 3' von der CMV-RFP-Kassette kloniert (Hinsch, 2000).
- p5PuroCMV-wtEGFP-CMV-Red-EJ: Retroviraler Kontrollvektor zur Untersuchung von Rekombinationsereignissen. Er erlaubt die Expression des RFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Als Rekombinationsakzeptor wurde das *EJ-EGFP*-Gen 5' vom *RFP*-Gen und ein Fragment, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz*-Gen und dem *wt-EGFP*-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors, 3' von der CMV-RFP-Kassette kloniert (Hinsch, 2000).
- p5PuroCMV-wtEGFP-CMV-Red-HR: Retroviraler Kontrollvektor zur Untersuchung von Rekombinationsereignissen. Er erlaubt die Expression des RFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Als Rekombinationsakzeptor wurde das *HR-EGFP*-Gen 5' vom *RFP*-Gen und ein Fragment, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz*-Gen und dem *wt-EGFP*-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors, 3' von der CMV-RFP-Kassette kloniert (Hinsch, 2000).

- pBlueScriptII KS ^(+/-): Ein Plasmidderivat des pBR322 mit einer multiplen Klonierungsstelle (Stratagene, Heidelberg). Das Plasmid wurde im Text als pBS bezeichnet.
- pC53.248 ^{*}: Vektor zur Expression des humanen p53 mit einer Arginin zu Tryptophan Mutation an Position 248 unter der Kontrolle des CMV-Promotors.
- pC53.4.2N ^{*}₃: Vektor zur Expression des humanen p53 mit einer Arginin zu Histidin Mutation an Position 273 unter der Kontrolle des CMV-Promotors.
- pC53.Cx22AN ^{*}₃: Vektor zur Expression des humanen p53 mit einer Arginin zu Histidin Mutation an Position 175 unter der Kontrolle des CMV-Promotors.
- pC53.Cx3 ^{*}₃: Vektor zur Expression des humanen temperatursensitiven p53 mit einer Alanin zu Valin Mutation an Position 143 unter der Kontrolle des CMV-Promotors.
- pC53.Cx7AN ^{*}₃: Vektor zur Expression des humanen p53 mit einer Asparagin-Säure zu Glycin Mutation an Position 281 unter der Kontrolle des CMV-Promotors.
- pC53.wt ^{*}₃: Vektor zur Expression des humanen wtp53 unter der Kontrolle des CMV-Promotors.
- pCAT-4: Vektor zur Expression des CAT-Gens unter der Kontrolle des Gal4-Promotors (Brasermann *et al.*, 1993).
- pCMV-I-SceI: Vektor zur Expression von I-SceI unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Der Vektor wurde von Frau Dr. Maria Jasin, Memorial Sloan-Katherine Cancer Center, New York, USA zur Verfügung gestellt (Rouet *et al.*, 1994).
- pDsRed-N1: Vektor zur Expression des *RFP*-Gens unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Eine multiple Klonierungsstelle erlaubt die C-terminale Markierung von Proteinen mit dem RFP (Clontech, Californien, USA)
- 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)
- pGC-Vektor: Eukaryontischer Expressionsvektor. Der Vektor basiert auf pSP65 und erlaubt die Expression eines klonierten Gens unter der Kontrolle des Gal4-Promotors (Brasermann *et al.*, 1993).

- pIRESHyg: Eukaryontischer Vektor zur Expression eines klonierten Gens gemeinsam mit dem *Hygromycin-Resistenz*-Gen über eine gemeinsame mRNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Clontech, Californien, USA).
- pKEX-174Y: Vektor zur Expression von p53 aus der Ratte mit einer Cystein zu Tyrosin Mutation an Position 174 unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Preuss *et al.*, 2000).
- pKEX-wt: Vektor zur Expression von wtp53 aus der Ratte unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Preuss *et al.*, 2000).
- pMV-GalER-VP: Retroviraler Vektor zur Expression des östradiolabhängigen chimären Transkriptionsfaktors GalERVP unter der Kontrolle des 5'LTRs des murinen Moloney-Leukämie-Virus (Brasemann *et al.*, 1993).
- pRetro-On: Retroviraler Expressionsvektor mit einem durch Tetrazyklin aktivierbaren Promotor. Erlaubt die Expression von klonierten Genen in Anwesenheit von Tetrazyklin/Doxyzyklin (Clontech, Californien, USA).
- pSV2-CAT: Vektor zur konstitutiven Expression des CAT-Gens unter der Kontrolle des SV40-Promotors (Winnacker, 1985).
- pSV53(1-333)her: Vektor zur Expression eines um 60 Aminosäuren verkürzten humanen wtp53 (Aminosäuren 1-333) 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 (Dudenhöffer *et al.*, 1999).
- pSV53(1-363)her: Vektor zur Expression eines um 30 Aminosäuren verkürzten humanen wtp53 (Aminosäuren 1-363) 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 (Dudenhöffer *et al.*, 1999).
- pSV53(138V)her: Vektor zur Expression des humanen temperatursensitiven p53 mit einer Valin zu Alanin Mutation an Position 138 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. Der Vektor wurde von Frau Dr. Christine Dudenhöffer hergestellt.

<u>pSV53her:</u>	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).
<u>pUC18:</u>	Ein Plasmidderivat von <u>pBR322</u> mit einer multiplen Klonierungsstelle (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
<u>pUC-Puro:</u>	Ein Plasmidderivat von <u>pUC18</u> . Der Vektor <u>pRetro-On</u> wurde mit den Restriktionsendonukleasen <i>NaeI</i> und <i>EcoRI</i> verdaut und das <i>Puromycin-Resistenz-Gen</i> mit <u>pUC-18</u> nach <i>EcoRI</i> - und <i>SmaI</i> -Verdau ligiert. Der Vektor wurde von Frau Dipl. Biol. Gisa S. Boehden hergestellt.

Die mit " * " bezeichneten Plasmide wurden von Frau Dr. Katrin Will, zur Verfügung gestellt. Die Vektoren die im Rahmen dieser Arbeit kreiert wurden, werden unter 4.1 ausführlich beschrieben.

3.1.8 Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden in 5'- zu 3'-Richtung angegeben. Die hochgestellten Zahlen geben die Positionen der Oligonukleotide innerhalb der jeweiligen Sequenz an. Zur besseren Übersicht ist die Puromycin-Sequenz in der Farbe violett und die *EGFP*-Sequenz in grün, die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* in hellblau, *I-SceI* in dunkelblau, *BamHI* in violett, *XbaI* in dunkelgrün und *SexAI* in violett (unterstrichen) dargestellt. Alle synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg bezogen.

hp53-1-1	³²⁶ CCAGAATGCCAGAGGCTGCTC ³⁴⁶ (p53-cDNA)
hp53-2-2	⁴³⁴ GGAAGGGACAGAAGATGACAG ⁴¹² (p53-cDNA)
hp53-3-1	⁸¹¹ GGCTCTGACTGTACCACCATCG ⁸³² (p53-cDNA)
hp53-4-2	¹⁰³⁵ GGGCAGCTCGTGGTGAGGCTC ¹⁰¹⁵ (p53-cDNA)
Puro-1-1	²⁰⁰¹ CCC ^{GAACCTCCCCTTCTAC} ¹⁹⁸² (pRetro-On)
Hyg-1-1	¹⁸⁸¹ GGAAAGCCTGAACTACCGCGA ¹⁹⁰² (pIRES-Hyg)
Hyg-2-2	²⁸¹⁵ GCTTCTGCGGGCGATTGTGTGA ²⁷⁹⁴ (pIRES-Hyg)
Hyg-3-2	²²⁷⁵ GAACCCGCTCGTCTGGCTAAG ²²⁵⁵ (pIRES-Hyg)
Hyg-4-1	²⁷⁹⁴ TACACAAATCGCCCGCAGAAGC ²⁸¹⁵ (pIRES-Hyg)
Sce-1-1	⁴³ GGTCCGA ^{ACTCTAACTGCTGA} ⁶⁴ (I-SceI-cDNA)

Sce-1-2	⁶³⁸ AGATCAGGTAAGACATAGAATC ⁶⁰⁸ (I-SceI-cDNA)
Sce-1-2b	⁴¹² TCGGGGTCAGGTAGTTTTCA ³⁹³ (I-SceI-cDNA)
Sce-3-1	⁶¹⁶ TCTTACCTGATCTTCTACAACCTG ⁶³⁹ (I-SceI-cDNA)
Sce-4-2	⁶³ CAGCAGTTTAGAGTTCGGACCGA ⁴¹ (I-SceI-cDNA)
EGFP-11	⁸¹⁶ GTTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCG ⁸⁴⁴ GAATTC→ →TAGGGATAACAGGGTAAT ⁸⁹⁰ GCTTCAGCCGCTACCCCGAC ⁹⁰⁹ (pEGFP-N1)
EGFP-12	¹²³⁶ GTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGAGCTGC ¹²⁰⁹ (pEGFP-N1)
EGFP-13	AGGAGGGAATTCGGATCC ¹⁴⁰⁷ → →GCGGCCGCTTTACTTGTACAGCT ¹³⁸⁵ (pEGFP-N1)
EGFP-14	TCCCTAGAATTC ⁸⁴⁴ CGGGCAGCTTGCCGGTGGTGC ⁸²⁴ (pEGFP-N1)
EGFP-15	¹⁹³³ CGCGCGACCTGGTGCATGACCCGCAAGCCCGGT→ →GCC ¹⁸⁸⁸ (pRetro-On)/ ⁶⁷⁹ ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC ⁶⁹⁹ (pEGFP-N1)
EGFP-16b	⁸⁷² TGAC ⁸⁷⁵ TAGGGATAACAGGGTAAT ⁸⁸⁰ → →GGCGTGCAGTGCTTCAGCCG ⁸⁹⁹ (pEGFP-N1)
EGFP-17b	⁸⁸⁵ CACGCC ⁸⁸⁰ ATTACCTGTTATCCCTA ⁸⁷⁵ GTCA→ →GGGTGGTCACGAGGGTG ⁸⁵⁵ (pEGFP-N1)
EGFP-18	⁸⁹⁰ CACTGCACGCCGTAGGTCAG ⁸⁷¹ (pEGFP-N1)
EGFP-20-2	⁷⁰⁷ GTGAACAGCTCCTCGCCCTTG ⁶⁸⁷ (pEGFP-N1)
EGFP-21-1	¹³⁷² CTCGGCATGGACGAGCTGTAC ¹³⁹² (pEGFP-N1)
EGFP-EJ1	⁸⁷² TGACCTAC ⁸⁷⁹ TAGGGATAACAGGGTAAT ⁸⁷⁵ → →CCTACGGCGTG ⁸⁸⁵ (pEGFP-N1)
EGFP-EJ2b	⁸⁸⁵ CACGCCGTAGG ⁸⁷⁵ ATTACCTGTTATCCCTA ⁸⁷⁹ GTAGGTC→ →AGGGTGGTCACGA ⁸⁶⁰ (pEGFP-N1)
EGFP-PCR1	⁶⁸² GTGAGCAAGGGCGAGGAGCT ⁷⁰¹ (pEGFP-N1)
EGFP-PCR2	¹⁴⁰⁰ CTTACTTGTACAGCTCGTCCAT ¹³⁷⁸ (pEGFP-N1)
EGFP-PCR3	¹¹³¹ GACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTA ¹¹⁰⁸ (pEGFP-N1)
EGFP-Sce-1	CTAGGGATAACAGGGTAATG
EGFP-Sce-2	CATTACCTGTTATCCCTAG
EGFP-Seq 1-1	⁹¹⁸ GCAGCACGACTTCTTCAAGT ⁹³⁷ (pEGFP-N1)
EGFP-Seq 2-1	¹¹⁷³ GTTACCTTGATGCCGTTCT ¹¹⁵⁴ (pEGFP-N1)
EGFP-Seq 3	¹¹²⁸ GTTGTGGCTGTTGTAGTTGTA ¹¹⁰⁸ (pEGFP-N1)
EGFP-Seq 4	¹¹²¹ CTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTT ¹⁰⁹⁹ (pEGFP-N1)
trgEGFP1	AGGAGGCTCGAGTAGTGA ⁶⁸² → →GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT ⁷⁰³ (pEGFP-N1)

trgEGFP2	GCTGCTCTCGAG ¹⁴⁰⁷ GCGGCCGCTTTACTTGTACAGCT ¹³⁷⁵ (pEGFP-N1)
EGFP-wt-1	⁸⁶² GTGACCACCCTGACCTAC ⁸⁷⁹ (pEGFP-N1)
EGFP-wt-2	⁸⁷⁹ GTAGGTCAGGGTGGTCAC ⁸⁶² (pEGFP-N1)

3.1.9 Biologisches Material

3.1.9.1 Bakterienstämme

<i>E. coli DH 5α</i>	Genotyp: F'/endA1 hsdR17 (r _k -m _k +) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal ^r) relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR(φ80dlacΔ(lacZ)M15) (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
<i>E. coli SURE</i>	Genotyp: e14 ⁻ (McrA ⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 RelA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan ^r) uvrC [F' proAB lacI ^q ZΔ(M15Tn10(Tet ^r))] (Stratagene, Californien, USA)
<i>E. coli XL 10 Gold</i>	Genotyp: Tet ^r Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q ZΔM15Tn10 (Tet ^R) Amy Cam ^r] (Stratagene, Californien, USA)
<i>E. coli SCS 110</i>	Genotyp: rpsL (Str ^r) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI ^q ZΔM15] (Stratagene, Californien, USA)

3.1.9.2 Eukaryontische Zelllinien

GaMV5:	Amphotrope Helferzelllinie für die Produktion von rekombinanten Retroviren entstanden durch stabile Transfektion der Verpackungszelllinie GpENVAm12 mit dem Vektor <u>pMV-GalER-VP</u> . Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium DMEM 10/1 verwendet.
HL60:	Humane promyelozytäre Zelllinie mit p53 ^{-/-} -Genotyp (#ATCC CCL 240 American Type Cell Culture Collection). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI 10/1 verwendet. Die Zelllinie wurde von der Abt. von Prof. Dr. W. Ostertag, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, zur Verfügung gestellt.
K562:	Eine humane, chronisch myelozytäre Leukämie-Zelllinie mit p53 ^{-/-} -Genotyp (#ATCC CCL 243, American Type Cell Culture Collection). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI 10/1 verwendet. Die Zelllinie wurde von der

Abt. von Prof. Dr. W. Ostertag, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

- KMV5: K562-Derivat, welches den durch Östradiol regulierbaren Transaktivator GalERVP nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pMV-GalERVP exprimiert (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.
- KMV-ts4: KMV5-Derivat, welches nach stabiler Transfektion mit dem Vektor p53(138V) in pGC humanes p53(138V) in Gegenwart von Östradiol exprimiert (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.
- KMV-wt5: KMV5-Derivat, welches nach stabiler Transfektion mit dem Vektor wtp53 in pGC humanes wtp53 in Gegenwart von Östradiol exprimiert (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.
- MethA: Methylcholanthren transformierte Maus-Fibroblasten-Zelllinie mit endogenem Mutanten-p53 (132 Cys→Phe, 168 Glu→Gly, 234 Met→Ile). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium DMEM 5/1 verwendet (DeLeo *et al.*, 1977).
- MHEJ: KMV5-Derivat, welches mit dem Rekombinationsvektor p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-EJ stabil transfiziert wurde (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.
- MHHR: KMV5-Derivat, welches mit dem Rekombinationsvektor p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR stabil transfiziert wurde (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.
- MHHR-her: KMV5-Derivat, welches nach stabiler Transfektion mit dem Rekombinationsvektor p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR und dem Plasmid pSV53-her humanes wtp53 in Fusion mit einer Östradiolbindedomäne exprimiert (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.
- MHΔ: KMV5-Derivat, welches mit dem Rekombinationsvektor p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-Δ stabil transfiziert wurde (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.
- mkSA: Fibroblastenzelllinie aus der Maus (Kit *et al.*, 1969). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium DMEM 5/1 verwendet. Die Zelllinie wurde von Dr. C. Schulze-Garg, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

- mkSA-EGFP: mkSA-Zellen, die das *EGFP*-Gen nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pEGFP-N1 konstitutiv exprimieren. Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium DMEM 5/1 verwendet. Die Zelllinie wurde von Dr. C. Schulze-Garg, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, zur Verfügung gestellt.
- p53(138V)-Δ2: KMV5-Derivat, welches nach stabiler Transfektion mit dem Rekombinationsvektor p5xEh-I-SceIRESsp53(138V)Gal4nPuroΔ humanes p53(138V) in Gegenwart von Östradiol exprimiert (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.
- Sce-Δ3: KMV5-Derivat, welches nach stabiler Transfektion mit dem Rekombinationsvektor p5xEsGal4I-SceIbPuroΔ I-SceI in Gegenwart von Östradiol exprimiert (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.
- TK6: Humane Lymphoblastenzelllinie mit endogenem wtp53 (Xia *et al*, 1997). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI 10/1 verwendet. Die Zelllinie wurde von Herrn Dr. J. Dahm-Daphi, Abt. Strahlentherapie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg, zur Verfügung gestellt.
- TMV: TK6-Derivat, welches den durch Östradiol regulierbaren Transaktivator GalERVP nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pMV-GalERVP exprimiert (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.
- WMV: WTK1-Derivat, welches den durch Östradiol regulierbaren Transaktivator GalERVP nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pMV-GalERVP exprimiert (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.
- wt-HEJ: KMV-wt5-Derivat, welches mit dem retroviralen Rekombinationsvektor p5xEsSV40-HygbPuroCMV-EJ stabil transfiziert wurde (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.
- wt-HΔ: KMV-wt5-Derivat, welches mit dem retroviralen Rekombinationsvektor p5xEsSV40-HygbPuroCMV-Δ stabil transfiziert wurde (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.
- WTK1: Humane Lymphoblastenzelllinie mit endogenem Mutanten-p53 mit dem Aminosäureaustausch 237 Methionin zu Isoleucin (Xia *et al*, 1997). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI 10/1 verwendet. Die Zelllinie wurde

von Herrn Dr. J. Dahm-Daphi, Abt. Strahlentherapie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

wtp53-Δ9: KMV5-Derivat, welches nach stabiler Transfektion mit dem retroviralen Rekombinationsvektor p5x~~Eh~~-I-SceIRESswtp53Gal4n~~Puro~~Δ humanes wtp53 in Gegenwart von Östradiol exprimiert (diese Arbeit). Zur Erhaltung wurde das Kulturmedium RPMI Ø12/1 verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA wurde in einem Reaktionsgefäß (0,2 ml) folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

10-100 ng	DNA (10 ng Plasmid DNA bzw. 2 µl genomische DNA)
0,5 µl	Oligonukleotid 1 (100 pM/µl)
0,5 µl	Oligonukleotid 2 (100 pM/µl)
2 µl	dNTPs (10 mM)
10 µl	Taq-Puffer (10x)
20 µl	Q-Lösung (5x)
1 U	Taq-DNA-Polymerase
und mit ddH ₂ O auf 100 µl aufgefüllt.	

Der Ansatz wurde in einer auf 90 °C vorgeheizten PCR-Maschine unter folgender Standardeinstellung inkubiert:

Denaturierung	3 min 92 °C (Plasmid-DNA)
	oder
	5 min 94 °C (genomische DNA)

zur Amplifikation 35 Zyklen:

Denaturierung	1 min 92 °C
Hybridisierung	1 min T _m
Neustrangsynthese	2 min 72 °C

nach Ablauf der Zyklen

Neustrangsynthese 7 min 72 °C

Abkühlung auf 4 °C.

Die Schmelztemperatur T_m für die Oligonukleotide wurde nach der Formel

$$T_m = [4x \sum(G+C) + 2x \sum(A+T)] - 10 [^{\circ}\text{C}]$$

errechnet und die Hybridisierungstemperatur entsprechend gewählt.

3.2.1.2 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Klonierung, Charakterisierung, oder Orientierungsbestimmung eines DNA-Fragmentes wurde mit verschiedenen 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 eingesetzte DNA eingehalten. Für die Reaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer benutzt und zu jedem Ansatz BSA 10 mg/ml (100x) zugegeben. Die Enzyme wurden durch Hitze (10 min bei 75 °C oder 20 min bei 65 °C) oder durch Zugabe von 50 mM EDTA (10x) inaktiviert.

3.2.1.3 Isolierung der Restriktionsfragmente und PCR-Produkte

PCR-Produkte und die Restriktionsfragmente, welche zur Sequenzierung oder zur Klonierung eingesetzt wurden, wurden durch Agarosegelelektrophorese in TAE aufgetrennt. Die Isolierung der Banden aus dem Gel erfolgte über das QIAEX II-Kit nach Anleitung des Herstellers. Zur direkten Aufreinigung von DNA aus Reaktionsansätzen wurde das QIAEXII- oder das QIAquick PCR-Purification-Kit nach Angaben des Herstellers (QIAGEN) benutzt.

3.2.1.4 Kinasierung von PCR-Fragmenten

PCR-Fragmente wurden unter folgenden Bedingungen phosphoryliert:

15 μl	PCR-Ansatz
1 μl	dATP (100 mM)
5 μl	Kinase-Puffer (10x)
1 μl	T4-Polynukleotidkinase (U/ μl)
ad 50 μl mit ddH ₂ O.	

Die Reaktionsansätze wurden für 45 min bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.5 Herstellung von glatten DNA-Enden

Insert- und Vektor-DNAs ohne komplementäre DNA-Enden wurden durch Auffüll- (an 5'-überhängenden Enden) oder Abbaureaktionen (an 3'-überhängenden Enden) geglättet.

Das Auffüllen der 5'-Überhänge zur Erzeugung von dsDNA erfolgte durch Behandlung mit dem *Klenow-Fragment* der DNA-Polymerase I unter folgenden Bedingungen:

0,1-4 µg	DNA
1 µl	dNTPs (0,5 mM)
10 µl	Klenow-Puffer (10x)
1-5 U	Klenow-Fragment
ad 100 µl mit ddH ₂ O.	

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die Abbaureaktion von einzelsträngigen 3'-Überhängen wurde durch die Behandlung mit *T4-DNA-Polymerase* unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1 µg	DNA
1 µl	dNTPs (0,1 mM)
10 µl	T4-DNA-Polymerase Puffer (10x)
1-3 U	T4-DNA-Polymerase
ad 100 µl mit ddH ₂ O.	

Die Ansätze wurden 20 min bei 12 °C inkubiert.

3.2.1.6 Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Um Vektor-Religation zu verhindern, wurde vor der Ligation zwischen Fragment und Vektor die Vektor-DNA unter folgenden Bedingungen mit alkalischer Phosphatase (SAP) behandelt.

Nach Inaktivierung der Restriktionsendonuklease wurde direkt zum Reaktionsansatz

$\frac{1}{10}$ Volumen	SAP-Puffer (10x) und
2,5 U	SAP pro 1 µg eingesetzter DNA, zugegeben.

Die Inkubationsdauer bei 37°C betrug für Vektor-DNA mit überhängenden Enden 15 min und für Vektor-DNA mit stumpfen Enden 1 h.

3.2.1.7 Ligation

Die Ligationen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit Hilfe des *rapid-DNA-ligation-kit* nach Angaben des Herstellers (Roche) durchgeführt. Für jede Ligation wurde ein Insert-/Vektorverhältnis von 2:1 bis 9:1 eingehalten.

3.2.1.8 Phenol/Chloroform-Extraktion

Um DNA von Proteinen zu befreien, wurden die Proben entweder:

in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) mit PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol) versetzt, der Ansatz gut durchmischt, das Gemisch für 5 min bei 14000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert, die wäßrige Phase in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit Ethanol gefällt,

oder die Probe wurde hintereinander je einmal mit Phenol, Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform jeweils in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) versetzt und wie oben weiterverfahren.

3.2.1.9 Fällung der DNA mit Ethanol

Zur DNA-Fällung, wurden ein 2,5 faches Volumen Ethanol abs und $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat, pH 4,6, zum Reaktionsansatz gegeben. Der Ansatz wurde gut durchmischt und für mindestens 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde für 15-30 min bei 14000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das DNA-Pellet wurde mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet und in TE aufgenommen.

3.2.1.10 Einfrieren von Bakterienkulturen

Die Bakterienkultur (in LB-Medium) wurde entweder:

- a) mit Glyzerin (Endkonzentration 30-50 %), oder
- b) mit DMSO (Endkonzentration 10 %) versetzt.

Durch auf- und abpipettieren wurde eine homogene Mischung erzeugt und zügig bei -70°C eingefroren.

3.2.1.11 Herstellung von kompetenten Bakterien

Zur Herstellung von kompetenten Bakterien wurden alle Arbeitsschritte im Kühlraum auf Eis und alle Zentrifugationsschritte in einer auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Zentrifuge durchgeführt.

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde aus der eingefrorenen Bakterienstammkultur eine LB-Platte (je nach Bakterienstamm mit oder ohne Antibiotikum s. 3.1.9.1) ausgestrichen und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Mit einer Einzelkolonie von der Platte wurden 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 180 rpm inkubiert. Mit dieser Kultur wurde eine 50 ml Ψ -Broth (mit oder ohne Antibiotikum)

angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,22-0,3 in einem Schüttler bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 15 min auf Eis gestellt und bei 4 °C und 3000-4000 rpm für 15 min abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 12 ml eiskaltem TFB-I-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 45 min (DH5α für 15 min) auf Eis inkubiert und für 10 min bei 4 °C und 3000-4000 rpm abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge). Anschließend wurde das Pellet in 4 ml TFB-II-Puffer resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden je 100-200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu acht Wochen bei -80 °C gelagert.

Um die Transfektionseffizienz der kompetenten Zellen zu testen, wurde ein Aliquot mit 2 ng pUC18 transformiert und 10 % des Transformationsansatzes auf eine LB-Amp-Platte (je nach Bakterienstamm mit oder ohne zusätzliche Antibiotika) ausgestrichen. Nach Übernachtinkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die Kolonien gezählt. Bei einer guten Kompetenz betrug die Transfektionseffizienz etwa 10⁷ Kolonien/µg pUC18.

3.2.1.12 Transformation von Ligationsansätzen

Während die kompetenten Bakterien (s. 3.2.1.11) auf Eis aufgetaut wurden, wurden 5-10 µl des Ligationsansatzes (s. 3.2.1.7) mit 30 µl eiskaltem TCM-Puffer verdünnt und auf Eis gestellt. Das Gemisch wurde auf die kompetenten Bakterien gegeben und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gut durchmischt. Nach Inkubation auf Eis für 15-30 min wurde der Ansatz bei 42 °C für 90 s hitzegeschockt. Nach Abkühlen auf 4 °C für 5 min wurde 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika zum Ansatz gegeben und für 45-60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Ansatzes auf eine antibiotikumhaltige LB-Platte ausgestrichen. Der Rest wurde 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge) und der Überstand bis auf ca. 100 µl verworfen. Das Pellet wurde im verbliebenen Überstand resuspendiert und auf eine zweite antibiotikumhaltige LB-Platte ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.13 Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli*

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 Übernachtskultur wurden in einem Reaktionsgefäß bei 14000 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, aufgenommene Plasmid-DNA wurde durch Restriktion (s. 3.2.1.2) und analytische Agarosegelelektrophorese (s. 3.2.1.3) untersucht.

Für Maxi-Plasmidpräparation wurde eine Übernachtskultur von 200-400 ml in einem 2 l Kolben bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden bei 5000 rpm (Sorvall-Zentrifuge) für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus dieser Kultur wurde mit Hilfe des QIAGEN-Plasmid-Maxi-Kits nach Angaben des Herstellers (QIAGEN) durchgeführt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde durch Restriktion mit verschiedenen Endonukleasen (s. 3.2.1.2) und anschließender Agarosegelelektrophorese (s. 3.2.1.3) oder durch Sequenzierung (s. 3.2.1.15) charakterisiert.

3.2.1.14 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung der Plasmid-DNA

Die Konzentration von Nukleinsäurepräparationen wurde photometrisch bestimmt und das Ergebnis durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

Die DNA-Lösung wurde für die photometrische Analyse 1:200 mit 10 mM Tris, pH 8,5, verdünnt und die Extinktion dieser Verdünnung bei 260 nm und 280 nm (OD_{260} und OD_{280}) gegen 10 mM Tris, pH 8,5, als Referenz bestimmt.

Nach Sambrook *et al.* (1989) gilt folgender Richtwert:

Für dsDNA $OD_{260} \times 0,05 \times \text{Verdünnung}$ entspricht der DNA-Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Ein Quotient von OD_{260} zu OD_{280} von über 1,8 zeigt an, dass die DNA frei von Proteinen ist.

3.2.1.15 Sequenzanalyse der DNA

Zur Sequenzanalyse wurde der ABI-PRISM-Big-Dye-Ready-Reaction-Cycle-Sequencing-Kit verwendet. Der Kit enthält neben vier Didesoxyribonucleotiden, die jeweils mit einem Chromophor eines unterschiedlichen Absorptionsspektrums gekoppelt sind, eine Variante der DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus*, welche sich gegenüber modifizierten Didesoxyribonukleotiden toleranter als normale *Taq*-Polymerase verhält.

Zur Sequenzierung wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

200-500 ng	DNA
3 μl	BigDye TM Sequencing Reagent
1 μl	Oligonukleotid (100 pmol/ μl)
add 20 μl mit ddH ₂ O.	

Der Ansatz wurde in einer PCR-Maschine unter folgender Standardeinstellung inkubiert:

26 Zyklen:

Denaturierung	10 s	96 °C
Hybridisierung	5 s	50 °C oder T_m
Neustrangsynthese	4 min	60 °C

Anschließend wurde auf 4 °C gekühlt.

Der Ansatz wurde mit Ethanol gefällt (s. 3.2.1.9).

Die gelelektrophoretische Auftrennung und automatische Detektion der Lage und der Absorptionsmaxima der Banden erfolgte entweder im Heinrich-Pette-Institut (Abteilung Prof. Dr. J.-M. Buerstedde) oder in einem Servicelabor (Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie, Hamburg).

3.2.2 Zellkulturtechniken

3.2.2.1 Erhaltung und Kultur von eukaryontischen Zellen

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank (Heraeus) durchgeführt und alle Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur auf 37 °C vorgewärmt.

Auftauen von Zellen: In einem Polypropylenröhrchen wurden 20 ml Erhaltungsmedium vorgelegt und zügig die bei 37 °C aufgetauten Zellen dazugegeben. Nach Zentrifugation bei 250xg für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 10 ml frischem Erhaltungsmedium resuspendiert und in eine 9 cm-Schale/ 90 cm²-Flasche überführt. Die Zellen wurden zur Erholung 24-48 h inkubiert und danach für Versuche auf mehrere Platten/Flaschen expandiert.

Erhaltung von Zellen: Alle 2-3 Tage, nach dem Erreichen der 80-90%igen Konfluenz, wurden Suspensionskulturzellen durch auf- und abpipettieren gut durchmischt. Adhärent wachsende Zellen wurden durch Trypsinierung von der Platte abgelöst und durch auf- und abpipettieren im Kulturmedium vereinzelt. Nach Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in einer Konzentration von 10⁵ Zellen/ml auf einer neuen Platte ausgesät. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Thoma-Zählkammer nach Anleitung des Herstellers (NeoLab) bestimmt. Die Suspensionskulturzellen wurden entweder in unbeschichteten Schalen oder Flaschen und adhärent wachsende Zellen in beschichteten Schalen kultiviert.

Einfrieren von Zellen: Die Zellen aus einer konfluent bewachsenen Platte/Flasche wurden durch Zentrifugation bei 250xg für 5 min geerntet. Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium (90 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen

überführt. Zum langsamen Einfrieren wurden die Röhrchen in einem Styroporkasten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ vier Tage gelagert und danach in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.2.2 Bestrahlung von Zellen

Zur Erzeugung von Doppelstrangbrüchen und zur Initiation von Rekombination, wurden die Zellen in einer Bestrahlungsanlage (Cs^{137} -Quelle, LISA1) mit ionisierenden Strahlen behandelt. Bei einer Dosis von 500 Rad werden ca. 75 Doppelstrangbrüche im Genom erzeugt (El-Awady *et al.*, 2001). Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen als Monolayer auf der Platte wachsen. Nach Bestrahlung wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt, um freie Radikale, die bei der Bestrahlung gebildet werden, zu beseitigen.

3.2.2.3 Transfektion von eukaryontischen Zellen

Transfektion durch $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation: Bei der Kalziumphosphat-Technik 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	2xHeBS und
20 μg	DNA vorgelegt. Dazu wurden tropfenweise
500 μl	0,25 M CaCl_2 gegeben.

Um ein feines Präzipitat zu erhalten, wurden bei der Zugabe von CaCl_2 entweder gleichzeitig mit einer Pasteurpipette Luftblasen im Röhrchen erzeugt oder der Ansatz nach jedem Tropfen so lange geschüttelt, bis in der Lösung keine Schlieren mehr zu sehen waren. Das so erhaltene DNA-Kalziumphosphat-Präzipitat wurde 30 min bei Raumtemperatur 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.

Transfektion durch Elektroporation: Bei diesem Verfahren werden die Zellen kurz einem elektrischen Feld ausgesetzt. Diese Behandlung erzeugt für einige Millisunden 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 $0,1\text{-}1 \times 10^7$ Zellen für 5 min bei 250xg zentrifugiert und in 400 μl Kulturmedium resuspendiert. In einer Elektroporationskuvette 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 200-300 Volt und 1050µF. Die Zellen wurden nach der Elektroporation sofort in eine 9 cm-Platte mit Erhaltungsmedium aufgenommen und 24-96 h im Brutschrank inkubiert.

Transfektion durch Lipofektamin und DOTAP: Bei diesen Methoden wird die DNA in Liposomen eingepackt und wahrscheinlich durch Endozytose in die Zellen genommen. Ein Vorteil des DOTAP-Reagenz ist, dass mit und ohne Serum im Kulturmedium gearbeitet werden kann. Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers (Gibco bzw. Roche) durchgeführt.

3.2.2.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz und Reportergenassays

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienzen wurden eukaryontische Zellen mit dem Plasmid pEGFP-N1 (s. 3.1.7) transfiziert (s. 3.2.2.3). 4-96 h nach Transfektion wurde der prozentuale Anteil der grünfluoreszierenden Zellen entweder am Immunfluoreszenz-Mikroskop oder am Durchflußzytometer bestimmt.

Zur Bestimmung der transkriptionellen Aktivität von GalERVP wurden Zellen transient:

- a) mit einem der Plasmide pCAT-4 oder pSV2-CAT (s. 3.1.7) transfiziert. 24-96 h nach Transfektion wurde der CAT-ELISA nach Angaben des Herstellers durchgeführt.
- b) mit einem der Reporter-Plasmide EGFP in pGC, I-SceI in pGC, wtp53 in pGC (s. 4.1.1) oder einem der Kontrollplasmide pEGFP-N1, pCMV-I-SceI, pC53-wt₃ (s. 3.1.7) transfiziert. 6-72 h nach Transfektion wurden die Fluoreszenzen am Durchflußzytometer (s. 3.2.2.13) und die Proteinexpression im Western-Blot (s. 3.2.3.6) analysiert.

3.2.2.5 Retrovirale Infektion von eukaryontischen Zellen

Herstellung von Viren: Die virusproduzierende Helferzelllinie GaMV6 wurde vier Tage vor der Infektion in einer Konzentration von $1-5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät und bis zwei Tage vor Infektion täglich mit frischem Medium gefüttert. Am Tag der Infektion wurde der Virusüberstand der Helferzelllinie mit Hilfe einer Spritze abgesaugt und mit Hilfe eines Weißbrandfilters (0,45 µm Porendurchmesser) sterilfiltriert.

Für die Infektion von adhärent wachsenden Zellen wurden die Zellen einen Tag vor der Infektion in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml ausgesät und anschließend der sterilfiltrierte Virusüberstand auf die Zellen gegeben. Zur optimalen Infektion wurden die

Zellen der Reihenfolge nach 1 h bei 37 °C, 1 h bei 32 °C und ÜN bei 37 °C im Brutschrank mit Viren inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Virus-Überstand abgesaugt und die Zellen mit frischem Erhaltungsmedium versorgt.

Suspensionskulturzellen wurden bei 250xg für 5 min abzentrifugiert, das Zellpellet im Virusüberstand resuspendiert und in eine 25 cm²-Flasche überführt. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C wurden die Zellen in der Flasche bei 32 °C und 250xg für 1 h abzentrifugiert (Zentrifuge Rotanta, mit Mikrotiterplatten-Einsätzen) und ÜN unter gewohnten Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt.

Nach 48 h Erholungsphase wurden infizierte Zellen zur Isolierung der Klone mit stabil ins zelluläre Genom integrierter Virus-DNA für 14-16 Tage mit G418 selektioniert.

Bei niedrigem Virustiter wurden die Zellen zweimal hintereinander infiziert und Polybren (800 µg/ml) und/oder Lipofektamin (4µg/ml) zum Virusfiltrat hinzugegeben. Außerdem wurde die Helferzelllinie nicht länger als drei Wochen in Kultur gehalten werden. Auch die Unterlassung des täglichen Mediumwechsels der Helferzelllinie bis zur Infektion hatte eine Verbesserung der Infektionsrate zur Folge.

3.2.2.6 GTU- und MOI-Bestimmung

Zur Bestimmung der Infektionsrate der Viruspartikel, die von der Helferzelllinie GaMV6 produziert wurden, wurde die Zelllinie MethA in einer Konzentration von $2,5 \times 10^3$ Zellen/Loch in einer 24-Loch Platte ausgesät und infiziert (s. 3.2.2.5). Zur Infektion wurden verschiedene Verdünnungen des Virusüberstandes eingesetzt. Nach 14-16 Tagen Selektion mit G418 wurden die Kolonien ausgezählt und die GTU (*Geneticin Transfer Units*) nach folgender Formel ermittelt;

$$\text{GTU} = \text{Anzahl der Kolonien pro Loch} \times \text{Verdünnungsfaktor.}$$

Die MOI ergibt sich aus der Formel:

$$\text{MOI} = \frac{\text{GTU}}{\text{Anzahl der ausgesäten Zellen}}$$

3.2.2.7 Selektion und Klonierung von eukaryontischen Zellen

3.2.2.7.1 Selektion und Klonierung von adhärent wachsenden Zellen

Zur Isolierung von Klonen, die ein gewünschtes DNA-Fragment in ihr zelluläres Genom integriert haben, wurden die Zellen 48 h nach Transfektion oder retroviraler Infektion aus einer 9 cm-Platte auf fünf 9 cm-Platten verteilt. Nach Absetzen der Zellen (ca. 6 h) wurde das

Erhaltungsmedium abgesaugt und Selektionsmedium auf die Zellen gegeben. Nach 14-16 Tagen Selektion wurden die makroskopisch sichtbaren Klone mit Hilfe von Klonierungsringen (0,5-1 cm im Durchmesser) isoliert und in eine 96-Loch Platte überführt. Nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz wurden die Klone auf größere Platten überführt.

3.2.2.7.2 Selektion und Klonierung von Suspensionskultur-Zellen

Um einzelne Klone picken zu können, wurden die Suspensionskultur-Zellen 48 h nach Transfektion oder Infektion durch Einzelzellklonierung oder Weich-Agar-Klonierung vereinzelt:

Einzelzellklonierung: Die transfizierten oder infizierten Zellen wurden im Selektionsmedium auf eine Konzentration von 5 Zellen/ml gebracht. Es wurden je 100 µl dieser Suspension pro Loch (0,5 Zellen pro Loch) einer 96-Loch-Platte pipettiert und für 14-16 Tage unter gewohnten Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach Ablauf der Zeit im Selektionsmedium wurden die Klone aus den konfluent bewachsenen Löchern zum Einfrieren und zu weiteren Untersuchungen ohne Selektionsdruck auf größere Platten umgesetzt.

Weich-Agar Klonierung: In einer sterilen Schottflasche wurde folgender Ansatz vorbereitet:

10 ⁵ -10 ⁶	transfizierte oder infizierte Zellen
12 %	FCS
2 %	Glutamin (200 mM)
1 %	Natriumpyruvat
1 %	Penicillin/Streptomycin

add 90 ml mit Kulturmedium ohne Serum und Selektionsagens. Dazu wurden

10 ml	3,3 % Bacto-Agar (Endkonzentration 0,33%)
-------	---

gegeben und gut durchmischt. Jeweils 3 ml dieser Suspension wurde pro Loch einer 6-Loch Platte pipettiert, zur Festigung des Agars 15-20 min bei 4 °C gelagert und unter Standardbedingungen für 14-16 Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die makroskopisch sichtbaren Klone wurden nach Ablauf der Selektionszeit mit Hilfe einer 200 µl-Pipette unter einem Mikroskop gepickt und in eine 96-Loch-Platte überführt. Die Zellen wurden durch auf- und abpipetieren im Erhaltungsmedium ohne Selektionsagens gut resuspendiert. Bei Konfluenz wurden die Klone auf größere Platten expandiert.

3.2.2.8 Präparation von genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

$0,5-1 \times 10^7$ Zellen wurden bei 250xg für 5 min abzentrifugiert, in 1 ml PBS resuspendiert und erneut sedimentiert. Das Zellpellet wurde entweder in Stickstoff schockgefroren oder gleich zur Isolierung von genomischer DNA mit Hilfe des QIAmp Mini DNA Kits nach Angaben des Herstellers (QIAGEN) bearbeitet.

3.2.2.9 Präparation von episomaler DNA

Adhärent wachsende und Suspensionskultur-Zellen wurden wie folgt beschrieben lysiert:

Adhärent wachsende Zellen: Zellen in drei bis fünf konfluent bewachsenen Platten wurden von Medium befreit und 3mal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das PBS abgesaugt und 0,5 ml eiskaltes TES auf die Zellen gegeben. Mit einem Gummispatel wurden die Zellen von der Platte abgeschabt und an einer Pasteurpipette entlang gleitend in ein Polystyrolröhrchen überführt.

Suspensionskultur-Zellen: Zellen aus drei bis fünf konfluent bewachsenen Platten/Flaschen wurden bei 250xg für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde 2mal mit PBS gewaschen und erneut sedimentiert. Auf das Zellpellet wurde 0,5 ml eiskaltes TES gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken auf einem Roller bei 4 °C wurden die pelletierten Zellen resuspendiert.

Präparation von episomaler DNA: Nach der Zelllyse (s. oben) wurde zur Zellsuspension in TES $\frac{1}{4}$ des Volumens an 5 M NaCl (Endkonzentration 1 M) zugegeben. Der Ansatz wurde durch vorsichtiges Schwenken des Reaktionsgefäßes gemischt und über Nacht im Kühlraum auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) für 30 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von RNase-A (Endkonzentration 50 µg/ml) wurde das Lysat vorsichtig gemischt und für 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde Proteinase K (50 µg/ml) zugegeben und für mindestens 5 h (bis über Nacht) bei 37 °C inkubiert. Das Zelllysate wurde entweder durch PCI- oder Phenol/Chloroform-Behandlung (s. 3.2.1.8) extrahiert. Die wäßrige Phase wurde mit einem zweifachem Volumen Ethanol versetzt und 2 h bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) für 30 min wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und für ca. 30 min bei 37 °C getrocknet. Das Pellet (episomale DNA) wurde in 100 µl TE aufgenommen.

3.2.2.10 Propidiumiodid-Färbung

Zur Analyse verschiedener Zellzyklusstadien wurden die Zellen mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt und anschließend am Durchflußzytometer analysiert.

Dafür wurden 10^6 Zellen 5 min bei 250xg abzentrifugiert, in 1 ml PBS resuspendiert und erneut sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und in ein Polypropylenröhrchen überführt. Unter ständigem Vortexen wurde zu den Zellen 9 ml eines eiskalten Wasser/Methanol/Chloroform-Gemischs (in einem Verhältnis von 1:4:5) gegeben und für mindestens 15 min auf Eis inkubiert (die so fixierten Zellen können bis zu zwei Wochen bei -20°C gelagert und danach wie unten beschrieben weiter bearbeitet werden).

Die fixierten Zellen wurden bei 250xg für 6 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1-5 ml PBS resuspendiert und bei 250xg erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 μl PI-Lösung (PI (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und RNase-A (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in einem Verhältnis von 1:2) resuspendiert. Nach der Inkubation für 30 min auf Eis wurde 1 ml PBS dazugegeben und die Proben am Durchflußzytometer analysiert (s. 3.2.2.13).

Bei mehreren Proben (z.B. Zeitvergleichsexperimente) wurde das Verhältnis von 2,5 μg PI pro 10^6 Zellen eingehalten, um bei der FACS-Analyse mögliche Verschiebungen des typischen Zellzyklusbildes auf der X-Achse des Diagramms durch unterschiedliche Färbeintensitäten zu vermeiden.

3.2.2.11 Rekombinations-Messung

Zur Bestimmung der Rekombinationsraten wurden die Zellen sowohl transient als auch stabil mit den retroviralen Rekombinationsvektoren transfiziert:

Rekombinations-Messung nach transienter Transfektion: Die Zellen wurden entweder

1. mit 10-20 μg des retroviralen Rekombinationsvektors, welcher das *I-SceI*-Gen unter der Kontrolle des Gal4-Promotors als Abstandhalter beinhaltet, elektroporiert und die *I-SceI*-Expression und damit die gezielte Einführung eines Doppelstragbruchs durch Östradiol-Gabe induziert oder
2. mit 10 μg eines retroviralen Rekombinationsvektors, ohne *I-SceI*-Expressions-Kassette, und mit 10 μg des Plasmids pCMV-I-SceI oder 10 μg des Kontrollplasmids pBS zur Bestimmung der basalen Rekombinationsraten koelektroporiert.

Rekombinations-Messung in Klonen mit stabil integriertem Rekombinationsvektor: Klone, welche einen retroviralen Rekombinationsvektor ohne *I-SceI*-Expressions-Kassette stabil in ihr zelluläres Genom integriert tragen, wurden mit 10 μg des Plasmids pCMV-I-SceI zur

Initiation der Rekombination durch gezielten Schnitt oder mit 10 µg pBS zur Messung der basalen Rekombinationsraten elektroporiert.

24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Elektroporation oder Induktion wurden 1-2 ml-Aliquots aus den Ansätzen genommen und die Zellen bei 250xg für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1-5 ml PBS (mit 0,2 % EDTA versetzt) resuspendiert und erneut bei 250xg für 5 min zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge). Die Zellen wurde in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in PBS (mit 0,2 % EDTA versetzt) resuspendiert und am Durchflußzytometer in den FL1- und FL2-Kanälen gemessen. Pro Ansatz wurden 30000 Zellen analysiert und die Rekombinationsraten in transfizierten Zellen als grünfluoreszierende Zellen in der Gesamtzellpopulation errechnet. Unter Korrektur der Werte bezüglich der jeweiligen Transfektionseffizienzen wurden dann Rekombinationsraten bezogen auf transfizierte Zellen ermittelt (s. 3.2.2.13).

3.2.2.12 Durchflußzentrifugation (Elutriation)

Die Durchflußzentrifugation ermöglicht die Trennung von Zellpopulationen unterschiedlicher Zellzyklusstadien. Bei dieser Methode werden die Zellen in eine mit Flüssigkeit gefüllte Zentrifugationskammer gepumpt, die einen offenen Durchfluß besitzt. Durch entgegengesetzt wirkende Kräfte, Zentrifugalkraft und Durchflußkraft, bildet sich in der Kammer ein Gradient. Die Zellen orientieren sich nach ihrer Größe, Dichte und Sedimentationsrate innerhalb dieses Gradienten. Nach einer Equilibrierungsphase können Zellen gleicher Zellzyklusstadien in Fraktionen langsam hinausgespült und gesammelt werden.

10^8 Zellen wurden für 5 min bei 250xg zentrifugiert und in 1-5 ml Laufmedium (RPMI, 0,1 % FCS) resuspendiert. Mit Hilfe einer Spritze wurde die Zellsuspension in die Sammelröhrchen des Elutriators gespritzt. Bei der niedrigsten Stufe der Pumpe wurden die Zellen in die Durchflußzentrifugationskammer hineingepumpt. Die Trennung der Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen erfolgte bei entweder konstanter Rotorgeschwindigkeit von 2000 rpm durch langsame Erhöhung der Durchflußrate von 4 auf 30 ml/min, oder bei konstanter Durchflußrate von 16-26 ml/min durch langsames Verringern der Rotorgeschwindigkeit von 3500 auf 1000 rpm. Die hinausgespülten Zellen wurden in 50 ml-Fraktionen gesammelt und bei 250xg für 6 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert, wiederholt zentrifugiert und das Zellpellet wie unter 3.2.2.10 beschrieben mit Propidiumiodid gefärbt. Anschließend wurden die Zellen der einzelnen Fraktionen am Durchflußzytometer analysiert (s. 3.2.2.13).

3.2.2.13 Durchflußzytometrie

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 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 $0,1-1 \times 10^7$ Zellen bei 250xg für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und erneut sedimentiert. Die Zellen wurden in 1ml 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 oder die RFP exprimierenden Zellen 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.

3.2.3 Proteinchemische Techniken

3.2.3.1 Präparation von Zellhomogenaten

10^6 - 10^7 Zellen wurden für 5 min bei 250xg zentrifugiert und in einer Konzentration von $0,5$ - 1×10^4 Zellen/ μ l mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 100 °C aufgeköcht und bis zur Western-Blot-Analyse bei –20 °C aufbewahrt.

3.2.3.2 Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung wurde wie bei Molloy *et al.*, (1989) beschrieben durchgeführt. Dabei wurden die Zellen aus drei konfluent bewachsenen 9 cm-Platten bei 250xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Nach der Zentrifugation bei 250xg für 5 min wurde das Zellpellet auf Eis in 0,75 ml hypotonischem Lysis-Puffer vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde in einen Dounce-Homogenisator überführt und die Zellen durch Auf- und Abziehen (40x) des Pistills aufgeschlossen. Das Homogenat wurde 5 min bei 1000xg abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in Lysis-Puffer resuspendiert und erneut bei 1000xg abzentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde als Kernfraktion (P1) bezeichnet. Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes (Ü1) wurde aufbewahrt und ebenfalls analysiert. Der Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes wurde 45 min bei 100000xg in eine zytosolische (S100) und eine partikuläre (P100) Fraktion aufgetrennt. In den aufgetrennten Fraktionen wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt und nach entsprechender Verdünnung die Fraktionen mit gleicher Proteinkonzentration mit 2xSDS-Probenpuffer in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) versetzt und bis zur Western-Blot-Analyse bei –20 °C gelagert.

3.2.3.3 Immunpräzipitation

1 - 5×10^7 Zellen wurden für 5 min bei 250xg zentrifugiert, in 1 ml PBS resuspendiert und erneut sedimentiert. Das Zellpellet wurde entweder sofort für den Versuch verwendet oder nach Schockgefrieren in Stickstoff bis zur Immunpräzipitation bei –80 °C gelagert. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer auf 4 °C gekühlten Eppendorf-Tischzentrifuge durchgeführt.

3.2.3.3.1 Lyse

Das Zellpellet wurde in 200 μ l NP40-Lysispuffer (mit Proteasehemmern) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 20 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Nach der

Proteinkonzentrationsbestimmung wurden alle Proben auf eine Konzentration von 1 mg Protein pro 200 µl gebracht.

3.2.3.3.2 Immunpräzipitation mit ungekoppeltem Antikörper

100 µl PGS (Protein G-Sepharose, 10 % Sediment in Lysispuffer) wurden für 30 s bei 14000 rpm abzentrifugiert, je 3mal mit 300 µl Lysispuffer gewaschen und erneut sedimentiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die PGS in 300 µl Antikörperlösung/Hybridomaüberstand resuspendiert. Zur Antikörperbindung an Protein G wurden PGS und Hybridomaüberstand unter ständigem Schwenken für 1 h im Kühlraum inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 s wurde das Pellet 3mal mit NP40-Lysispuffer gewaschen und erneut sedimentiert. Das Pellet wurde in 200 µl Zelllysat (s. oben) resuspendiert und unter ständigem Schwenken für mindestens 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die gekoppelten Protein-Antikörper-PGS-Kügelchen 30 s bei 14000 rpm abzentrifugiert und 3mal mit Lysispuffer gewaschen. Das Pellet wurde in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 100 °C aufgeköcht. Die Proben wurden bis zur Western-Blot-Analyse bei –20 °C gelagert.

3.2.3.3.3 Immunpräzipitation mit gekoppeltem Antikörper

Zur Kopplung von Antikörper an PGS wurden 2-20 ml PGS 3mal mit 2-10 ml NP40-Lysispuffer gewaschen und bei 14000 rpm für 30 s zentrifugiert. Das Pellet wurde im Hybridomaüberstand in einem Verhältnis von 100 ml Überstand pro 1 ml PGS resuspendiert und über Nacht bei 4 °C auf einem Roller inkubiert. Die Antikörper(AK)-PGS-Komplexe wurden abzentrifugiert und zweimal mit zehnfachem Volumen 0,2 M Natriumtetraborat (pH 9,0) gewaschen. Die pelletierten AK-PGS-Kügelchen wurden in 0,2 M Natriumtetraborat (pH 9,0, 10faches Volumen) resuspendiert und mit Dimethylpimelimidat bis zu einer Endkonzentration von 20 mM versetzt. Das Gemisch wurde für 30 min bei RT auf einem Roller geschwenkt. Die Reaktion wurde durch Waschen mit 0,2 M Ethanolamin gestoppt. Anschließend wurde für zwei Stunden in 0,2 M Ethanolamin inkubiert. Die mit AK gebundenen PGS-Kügelchen wurden zweimal mit PBS und zweimal mit NP40-Lysispuffer gewaschen. Das Pellet wurde in NP40-Lysispuffer auf 10 % Suspension gebracht und bei 4°C gelagert.

Vor der Immunpräzipitation wurde zur Unterdrückung von unspezifischen Bindungen das Zelllysat mit 100 µl PGS (10 % Suspension) für 1 h auf einem Schüttler inkubiert. Die Suspension wurde für 30 s bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues

Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Die mit AK gebundene PGS (100 µl/Ansatz) wurde dreimal mit NP40-Lysispuffer gewaschen und im präinkubierten Lysat resuspendiert. Das Gemisch wurde für 3-4 h auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Protein-AK-PGS bei 14000 rpm für 30 s zentrifugiert und dreimal mit NP40- Lysispuffer gewaschen. Anschließend wurde das Präzipitat in 20-40 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, 10 min bei 100 °C gekocht und bis zur Western-Blot-Analyse bei –20 °C gelagert.

3.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen wurde nach Bradford, wie bei Sambrook *et al.*, (1989) beschrieben, bestimmt. Dafür wurde folgende Mischung angesetzt:

1 µl Zelllysate (ohne DTT und Bromphenolblau),
99 µl ddH₂O und
990 µl Bradford-Lösung.

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 5-20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde bei $\lambda=595\text{nm}$ die Extinktion der Proben und der BSA-Eichreihe gemessen und so die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt.

3.2.3.5 Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure

Zur Fällung von Proteinen wurde zur Probe eine 100%ige Trichloressigsäure-Lösung gegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 5-10 % ergab. Der Ansatz wurde 1 h auf Eis inkubiert und anschließend bei 14000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge). Der Überstand wurde vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen und das Pellet zuerst mit 300 µl eiskaltem 70%igen Ethanol und dann mit eiskaltem Aceton (300 µl) gewaschen. Das Proteinpellet wurde in 20 µl NP40-Lysispuffer resuspendiert. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert und bis zur Western-Blot Analyse bei –20 °C aufbewahrt.

3.2.3.6 Western-Blot-Analyse

Vor dem Gelauftrag wurden die Proben stets 5 min aufgekocht. Je $0,1-1 \times 10^6$ Zellen oder bis zu 1 mg Protein wurden pro Tasche geladen.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde entsprechend der von Laemmli (1970) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele ist in der Tabelle 2 zusammengefasst. Bei 25 mA pro Mini-Gel (Hoefer Apparatur, Pharmacia) wurden die Proteine für 60-90 min elektrophoretisch aufgetrennt.

zur Trennung der Proteine in Größe von:	60-200 kDa	16-70 kDa	16-70 kDa	12-45 kDa	
	Trenngel	Trenngel	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
	8 %ig	10 %ig	12 %ig	15 %ig	
Acrylamid 30%, 0,8 bisAA	12 ml	15 ml	18 ml	22,5 ml	3,9 ml
4x SDS/Tris pH 8,8	11,25 ml	11,25 ml	11,25 ml	11,25 ml	----
4x SDS/Tris pH 6,8	----	----	----	----	7,5 ml
H₂O	21,75 ml	18,75 ml	15,75 ml	11,25 ml	18,3 ml
10 % APS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Tabelle 2: Pipettierschema für SDS-PAGE Gele. Die Lösungen wurden mit Ausnahme von APS und TEMED in einen Erlenmeyer-Kolben pipettiert und fünf Minuten entgast (optional). APS und TEMED wurden dazugegeben und vorsichtig durchmischt. In der Gelgieß-Kammer (Hoefer Apparatur, Pharmacia) wurde das Trenngel zwischen einer Glas- und Aluminiumplatte (beide getrennt durch 0,1 cm Spacer) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde Isopropanol dekantiert, auf das Trenngel das Sammelgel gegossen und die Kämme (0,1 cm) eingesteckt.

Der Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde über eine Hoefer-Naßblotapparatur nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Geblottet wurde in Tris-Glycin-Puffer auf Eis bei 100 Volt für 1 h.

Zum immunchemischen Nachweis von Proteinbanden wurde der Blot 1-4 h in 5 % Magermilchpulver in TBS-T-Puffer geblockt und über Nacht mit dem primären Antikörper (in 5 % Magermilchpulver in TBS-T-Puffer) bei 4 °C geschwenkt. Danach wurde kurz mit TBS-T- Puffer gespült und dreimal 15 min mit TBS-T gewaschen. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper (in 5 % Magermilchpulver in TBS-T-Puffer) für 30 min bis zu 1 h bei Raumtemperatur wurde der Blot erneut mit TBS-T-Puffer gespült und viermal 15 min mit TBS-T- Puffer gewaschen.

Alternativ wurde die Membran mit einer schnelleren Methode nach dem Elektrotransfer der Proteine 15-30 min unter Rotlicht getrocknet (Blocken) und 15 min mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T-Puffer angefeuchtet. Anschließend wurde 1 h mit dem primären Antikörper und eine halbe Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Der Blot wurde nach Antikörper-Inkubation jeweils kurz gespült und 15 min mit TBS-T gewaschen.

Die Immundetektion erfolgte entweder mit dem kommerziell erhältlichen *Pierce-Super-Signal-Ultra-Chemilumineszenz*-Substrat oder mit selbst angesetzten Chemilumineszenz-Substrat-Lösungen (ECL-Lösung 1 und 2) wie folgt:

Nach dem letzten Waschschrift wurde der Blot abgetropft und in eine feuchte Wanne gelegt. Zügig wurde H_2O_2 und Luminol (Pierce- oder ECL-Lösung 1 und 2) gemischt und auf den Blot gegeben. Der Blot wurde 5 min (Pierce) oder 1 min (ECL-Lösungen) im Dunkeln mit dem Substrat bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blot wurde abgetropft und in eine lichtdichte Kassette gelegt. Die Proteinbanden wurden durch Auflegen und Entwickeln von Röntgen-Filmen sichtbar gemacht.

4. Ergebnisse

Um Rekombinationsereignisse im Kontext des zellulären Genoms untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein neues Test-System entwickelt, das auf der Rekonstitution des *EGFP*-Gens basiert. Eine schematische Darstellung des Prinzips des neu entwickelten Test-Systems ist in Abb. 2 gezeigt.

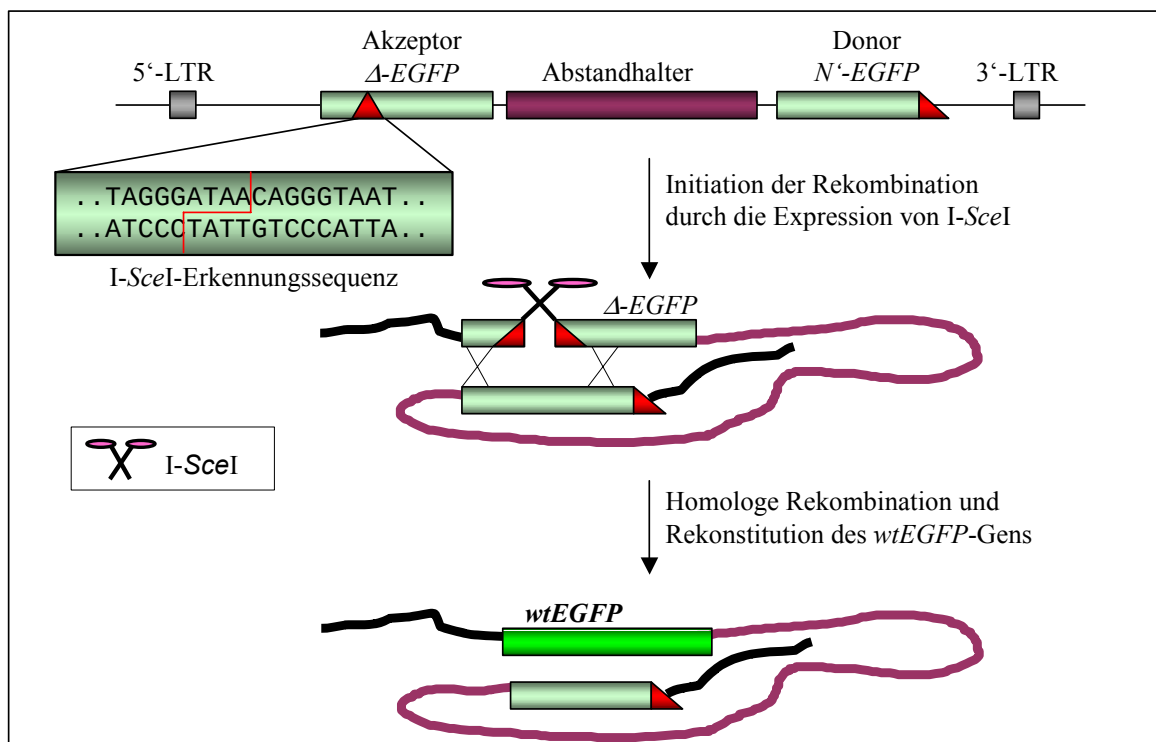


Abb. 2: Prinzip des neu entwickelten Test-Systems. Die Rekombinationssubstrate wurden in gleicher Orientierung auf dem retroviralen Vektor p5N-M kloniert. Nach Initiierung der Rekombination durch die Expression von I-SceI und Restriktion an der I-SceI-Erkennungssequenz im Rekombinationsakzeptor ($\Delta\text{-EGFP}$) kommt es zur Rekonstitution des *wtEGFP*-Gens durch homologe Rekombination und im Ergebnis fluoresziert die Zelle grün. Die Rekombinationsraten werden errechnet, indem die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen mit Hilfe des FACScan bestimmt werden.

Um die Rekombinationssubstrate linear und stabil ins zelluläre Genom inserieren zu können, wurden die Rekombinationsvektoren basierend auf dem 5,4 kBp langen retroviralen Vektor p5N-M (s. 3.1.7) kloniert. Grundsätzlich werden für die Analyse von homologen Rekombinationsprozessen zwei mutierte Formen eines *Reporter*-Gens benötigt. Für die Rekonstitution eines *Reporter*-Gens durch nicht-homologe Rekombination ist eine Genkopie ausreichend. In dieser Arbeit wurden in den ersten Ausführformen des Test-Systems zwei mutierte Formen des *EGFP*-Gens in gleicher Orientierung in p5N-M kloniert. Als Rekombinationsakzeptoren wurden drei an der Chromophor-Region (Aminosäuren 65-67) mutierte *EGFP*-Varianten (Δ -, *HR*-, *EJ-EGFP*, Abb. 3) erzeugt, welchen unterschiedlich große Bereiche in der Umgebung dieser Region fehlten (Δ - und *HR-EGFP*) und eine Variante, welche in dieser Region eine kurze Verdopplung aufweist (*EJ-EGFP*). Mittels PCR-Amplifikation wurde gleichzeitig die Chromophor-Region des *EGFP*-Gens durch die 18 Bp lange *I-SceI*-Erkennungssequenz ersetzt, um Rekombination durch Einführung eines DSBs zu initiieren. Zur Untersuchung von konservativen Reparaturereignissen wurde *N'-EGFP*, ein 446 Bp langes 5'-terminales *EGFP*-Fragment (Bp 1-446 kodierend für die Aminosäuren 1-148) und zur Untersuchung von nicht-konservativen Ereignissen *Stop-EGFP*, welches ein nicht translatierbares *EGFP*-Gen repräsentiert (Start-Methionin wurde durch zwei Stopkodons ersetzt), als Rekombinationsdonoren generiert. Als Abstandhalter wurde das *Hygromycin-Resistenz*-Gen unter der Kontrolle des CMV- oder SV40-Promotors, oder das *I-SceI*- und/oder *p53*-Gen unter der Kontrolle des Gal4-Promotors in den retroviralen Vektor p5N-M integriert.

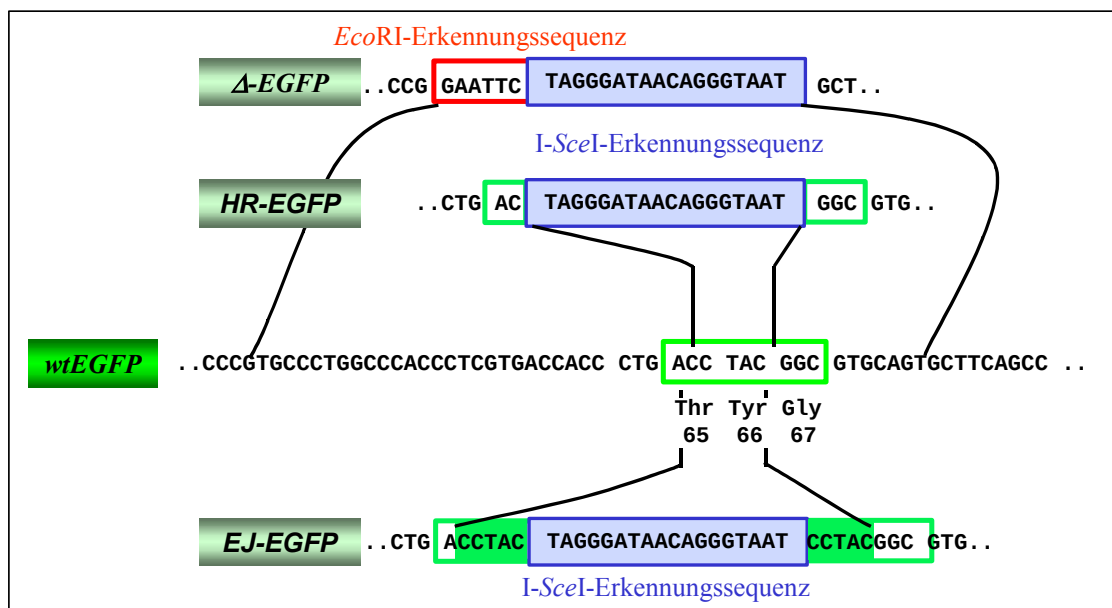


Abb. 3: Schematische Darstellung der Rekombinationsakzeptoren Δ -, *HR*- und *EJ-EGFP*. Die *wtEGFP* Sequenz wurde zur Orientierung zentral angeordnet und die drei Aminosäuren „T65-Y66-G67“, die die Chromophor-Region bilden, in einem grünen Kästchen hervorgehoben. Die *EcoRI*-Erkennungssequenz wurde durch einen roten und die *I-SceI*-Erkennungssequenz durch einen blauen Rahmen markiert und die deletierten bzw. inserierten Sequenzen im Vergleich zur *wtEGFP*-Sequenz durch grüne Umrahmung markiert.

Nach Inserierung der Donor-, Abstandhalter- und Akzeptor-Sequenzen in die retroviralen Rekombinationsvektoren wurden diese transient oder stabil in die gewünschte Zielzelllinien eingebracht und durch Koexpression des *I-SceI*-Gens unter der Kontrolle des Gal4- oder des CMV-Promotors DSB-Reparatur, also Rekombination, initiiert.

Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse in zwei Kapitel unterteilt: Im ersten wird die Erzeugung der verschiedenen retroviralen Rekombinations- und Kontrollvektoren in chronologischer Reihenfolge und im zweiten die Etablierung zellulärer Systeme zur Bestimmung von Rekombinationsraten beschrieben.

4.1 Klonierungsstufen bei der Erzeugung der Expressionsvektoren und retroviralen Rekombinationsvektoren

4.1.1 Klonierung unterschiedlicher Gene in den pGC-Vektor für von Östradiol abhängiger Expression

Die cDNA-Sequenzen für die *EGFP*-, *I-SceI*-, *wtp53*- und *p53(138V)*-Gene wurden in den pGC-Vektor unter der Kontrolle des Gal4-Promotors kloniert, um eine von Östradiol abhängige Expression dieser Gene in Abhängigkeit des GalERVP-Transkriptionsfaktors (s. 4.2.2) zu ermöglichen. Im folgenden Abschnitt werden die Klonierungsschritte zu den einzelnen Vektoren ausführlicher beschrieben.

4.1.1.1 Klonierung des Vektors EGFP in pGC

Das Plasmid pEGFP-N1 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *SalI* und *EagI* geschnitten und das resultierende 762 Bp lange *EGFP*-cDNA-Fragment mit dem pGC-Vektor nach Restriktionsverdau mit *SalI* und *EagI* zur Fertigstellung des *EGFP*-Expressionsvektors EGFP in pGC ligiert (zur Übersicht s. Abb. 4, A).

4.1.1.2 Klonierung des Vektors I-SceI in pGC

Der Vektor pCMV-I-SceI wurde mit den Restriktionsendonukleasen *AccI* und *SacI* verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt und das 855 Bp lange *I-SceI*-cDNA-Fragment mit dem *EcoRV* geschnittenen pGC-Vektor zur Fertigstellung des *I-SceI*-Expressionsvektors I-SceI in pGC in der gezeigten Orientierung inseriert (s. Abb. 4, B).

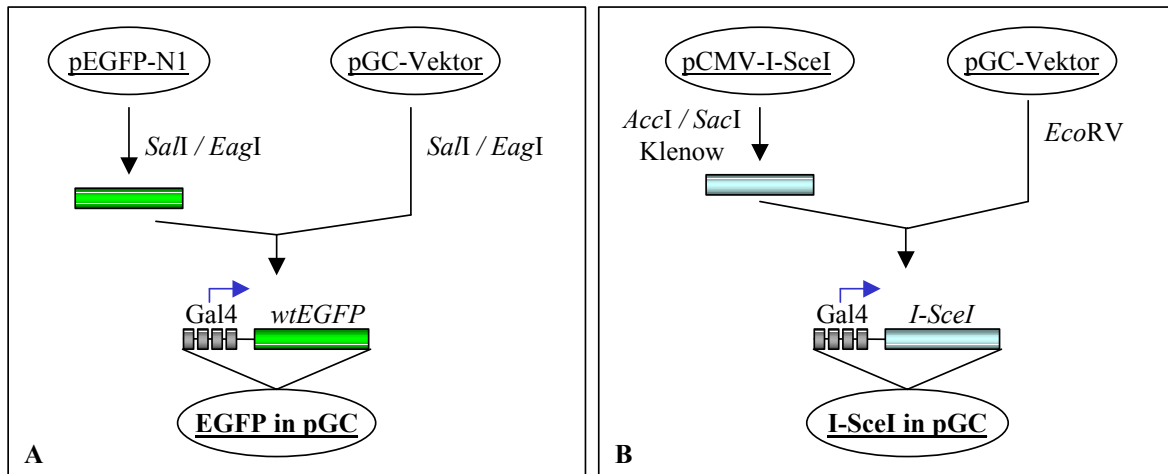


Abb.4: Klonierung der Vektoren EGFP in pGC (A) und I-SceI in pGC (B). Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen der Proteine in 5'→3' Richtung an.

4.1.1.3 Klonierung der Vektoren wtp53 in pGC und p53(138V) in pGC

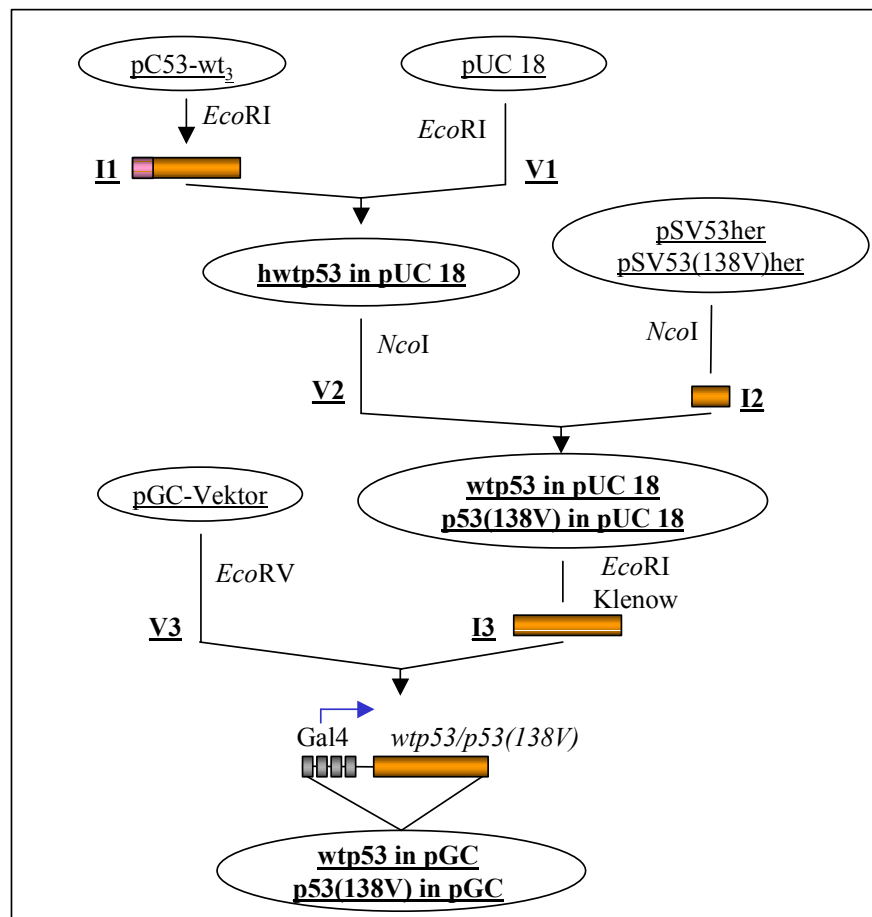


Abb. 5: Klonierung der Vektoren wtp53 in pGC und p53(138V) in pGC. Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtung in 5' zu 3' Richtung an. V1, V2, V3: Vektorfragmente; I1, I2, I3: Insert-Fragmente.

Der Vektor **pC53-wt₃** (s. 3.1.7) wurde mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* behandelt und die 1,8 kBp lange **wtp53**-cDNA (s. Abb. 5, I1) vom Menschen in das Plasmid **pUC-18** nach Linearisierung mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* (s. Abb. 5, V1) zur Fertigstellung des

wtp53 in pUC-18 inseriert (s. Abb. 5). Im nächsten Schritt wurden die Plasmide pSV53her und pSV53(138V)her mit der Restriktionsendonuklease *NcoI* verdaut und das 0,5 kBp lange *wtp53*- oder *p53(138V)*-cDNA-Fragment (s. Abb. 5, I2) mit dem Plasmid wtp53 in pUC-18 nach Verdau mit der *NcoI*-Restriktionsendonuklease (s. Abb. 5, V2) zur Fertigstellung der Vektoren hwtp53 in pUC-18 bzw. p53(138V) in pUC-18 ligiert. Anschließend wurden die Plasmide hwtp53 in pUC-18 und p53(138V) in pUC-18 mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt und die 1,8 kBp lange *wtp53*- oder *p53(138V)*-cDNA (s. Abb. 5, I3) mit dem pGC-Vektor nach Restriktionsverdau mit *EcoRV* (s. Abb. 5, V3) zur Klonierung der Expressionsvektoren hwtp53 in pGC bzw. p53(138V) in pGC ligiert. Nach der Fertigstellung der Vektoren wurden die *wtp53*- und *p53(138V)*-Gene mit den Oligonukleotiden hp531-1, -2-2, -3-1 und -4-2 (s. 3.1.8) sequenziert, um das Fehlen einer Mutation bzw. die Existenz der Mutation im Kodon 138 (Alanin zu Valin) zu überprüfen.

4.1.1.4 Klonierung der Vektoren wtp53-IRES-I-SceI in pGC und p53(138V)-IRES-I-SceI in pGC

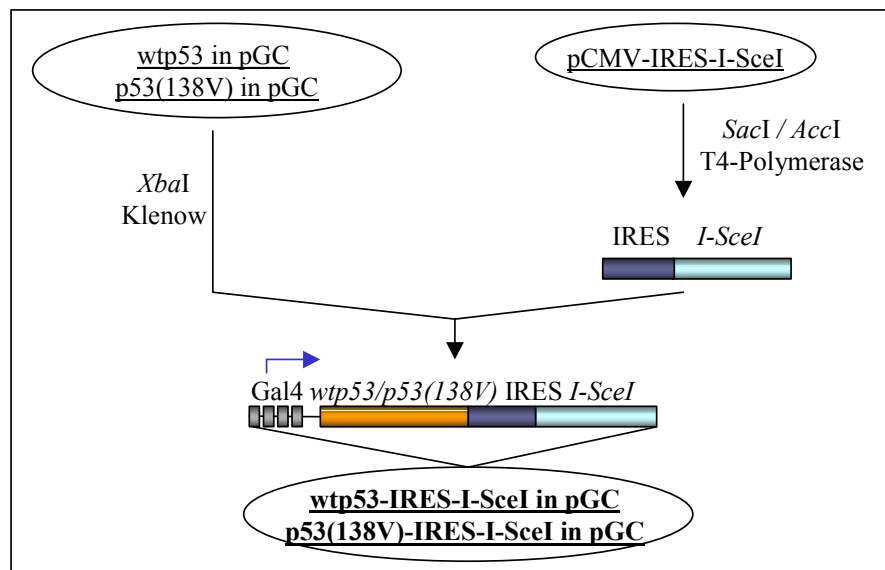


Abb. 6: Übersicht zur Klonierung der Vektoren wtp53-IRES-I-SceI in pGC und p53(138V)-IRES-I-SceI in pGC. Die blauen Pfeile geben die Expressionsrichtungen der Proteine an.

Um die synchrone Expression der beiden Proteine *I-SceI* und *p53* bicistronisch über ein einziges Transkript zu bewerkstelligen, wurden die beiden cDNAs über ein so genanntes IRES-Element verknüpft. Die IRES-Sequenz, ein 450-600 Bp langer Abschnitt des 600-1200 Bp langen 5'-UTR des Picornavirus-Genoms (Rees *et al.*, 1996), welches aus einer 7,5 kBp langen Plusstrang-mRNA besteht (Jang *et al.*, 1988), bildet Sekundärstrukturen und

ermöglicht dadurch das Andocken der Ribosomen über die 40S-Untereinheit, ohne die für die Translation zellulärer mRNAs essentielle 5'-CAP-Sequenz (Jackson *et al.*, 1990). Die Effizienz der IRES-Sequenz variiert von Zelle zu Zelle sehr stark (Borman *et al.*, 1997).

Das Plasmid pIRES-I-SceI (s. 4.1.2.2.3.2) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *AccI* und *SacI* verdaut, mit T4-DNA-Polymerase behandelt und das resultierende 1,4 kbp lange Fragment, bestehend aus der IRES-Sequenz und der *I-SceI*-cDNA, mit den Plasmiden wtp53 in pGC bzw. p53(138V) in pGC nach Verdau mit *XbaI* und Klenow-Fragment-Behandlung zur Generierung der Vektoren wtp53-IRES-I-SceI in pGC bzw. p53(138V)-IRES-I-SceI in pGC ligiert (s. Abb. 6).

4.1.2 Herstellung der Rekombinationsvektoren

Die Rekombinationsvektoren wurden durch sequenzielle Insertion des Donors, Abstandhalters und der Akzeptor-Kassette in den retroviralen Vektor p5N-M (s. 3.1.7) erzeugt. Da innerhalb von der multiplen Klonierungsstelle des p5N-M nur wenige einmalige Erkennungssequenzen zur Verfügung standen, wurden die einzelnen Elemente der Abstandhalter und Akzeptor-Kassetten, separat zusammengefügt und anschließend komplett in den retroviralen Vektor p5N-M inseriert. In dem folgenden Abschnitt werden die Klonierungsstufen zu den einzelnen retroviralen Rekombinationsvektoren ausführlicher beschrieben.

4.1.2.1 Insertion des Rekombinationsdonors in den retroviralen Vektor p5N-M

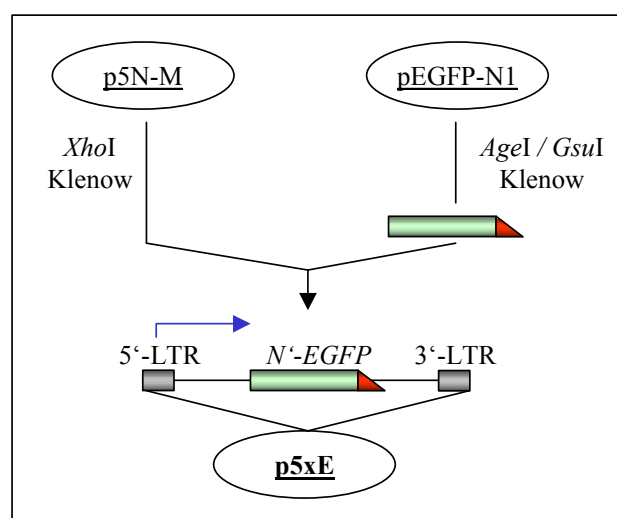


Abb. 7: Klonierung des Vektors p5xE. Der blaue Pfeil gibt die Orientierung der Transkriptionsrichtung in 5'→3' Richtung an.

Das kommerziell erhältliche Plasmid pEGFP-N1 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *AgeI* und *GsuI* verdaut, mit T4-DNA-Polymerase behandelt und anschließend das resultierende, am 3'-Ende trunkierte 457 Bp lange *EGFP*-cDNA-Fragment (*N'*-*EGFP*) mit dem 5,4 kbp langen retroviralen Expressionsvektor p5N-M nach *XhoI*-Restriktion und Klenow-Fragment-Behandlung zur Fertigstellung des Vektors p5xE ligiert (s. Abb. 7). Durch Sequenzierung des *N'*-*EGFP*-Gens mit den Oligonukleotiden EGFP-Seq1-1, -3 und -4 (s. 3.1.8) wurde die Integrität der *EGFP*-cDNA bis zur Deletion ab Bp 446 bestätigt.

4.1.2.2 Insertion der Abstandhalter und des Rekombinationsakzeptors

Als Abstandhalter zwischen den Rekombinationssubstraten wurde eine *Hygromycin-Resistenz*-Kassette, eine *I-SceI*- und/oder *wtp53*- bzw. *p53(138V)*-Expressionskassette eingesetzt. Die Akzeptorkassette, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz*-Gen und dem Rekombinationsakzeptor, wurde zuerst innerhalb des Plasmids pUC-Puro assembliert und dann in die jeweilige Rekombinationsvektorstufe mit Donor und Abstandhalter integriert.

4.1.2.2.1 Vorbereitung des Rekombinationsakzeptors (Δ -*EGFP*) in pUC-Puro

Mit Hilfe von PCR-Reaktionen wurden 46 Bp aus der Chromophor-Region des *EGFP*-Gens durch die *EcoRI* (6 Bp) und die *I-SceI*-Erkennungssequenz (18 Bp) ersetzt (s. Abb. 3). Um die Anzahl der Promotoren zwischen den 5'- und 3'-LTRs minimal zu halten, wurde die kodierende Sequenz des Rekombinationsakzeptors in den Leserahmen des *Puromycin-Resistenz*-Gens fusioniert. Bei der ersten PCR wurde mit Hilfe der Oligonukleotide EGFP-15 und -14 (s. 3.1.8) aus dem kommerziell erhältlichen Plasmid pEGFP-N1 ein 214 Bp langes 5'-*EGFP*-Fragment amplifiziert. Nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *SexAI* und *EcoRI* wurde das Fragment in das Plasmid pUC-Puro (s. 3.1.7) nach *SexAI*- und *EcoRI*-Restriktion zur Erzeugung des Vektors pUC-Puro- Δ a inseriert (s. Abb. 8).

Bei der zweiten PCR wurde mit Hilfe der Oligonukleotide EGFP-11 und -13 (s. 3.1.8) aus dem kommerziell erhältlichen Plasmid pEGFP-N1 ein 627 Bp langes 3'-*EGFP*-cDNA-Fragment (s. Abb. 8, PCR 2) amplifiziert. Das Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* verdaut und mit dem Plasmid pUC-Puro- Δ a nach Restriktion mit *EcoRI* zur Herstellung des Vektors pUC-Puro- Δ ligiert. Nach der Fertigstellung des Vektors wurde das Δ -*EGFP*-Gen mit den Oligonukleotiden EGFP-Seq1-1, -3 und -4 (s. 3.1.8) sequenziert und die Deletion der Chromophor-Region bzw. die Insertion der *EcoRI*- und *I-SceI*-Erkennungssequenzen bestätigt. An Position 487 in der *EGFP*-cDNA (Kodon 163

AAG zu AGG) wurde außerdem eine Transition von A nach G nachgewiesen. Der Vektor pUC-Puro-Δ wurde von Frau Dipl. Biol. Gisa S. Boehden hergestellt und anschließend die Mutation durch Sequenzierung nachgewiesen.

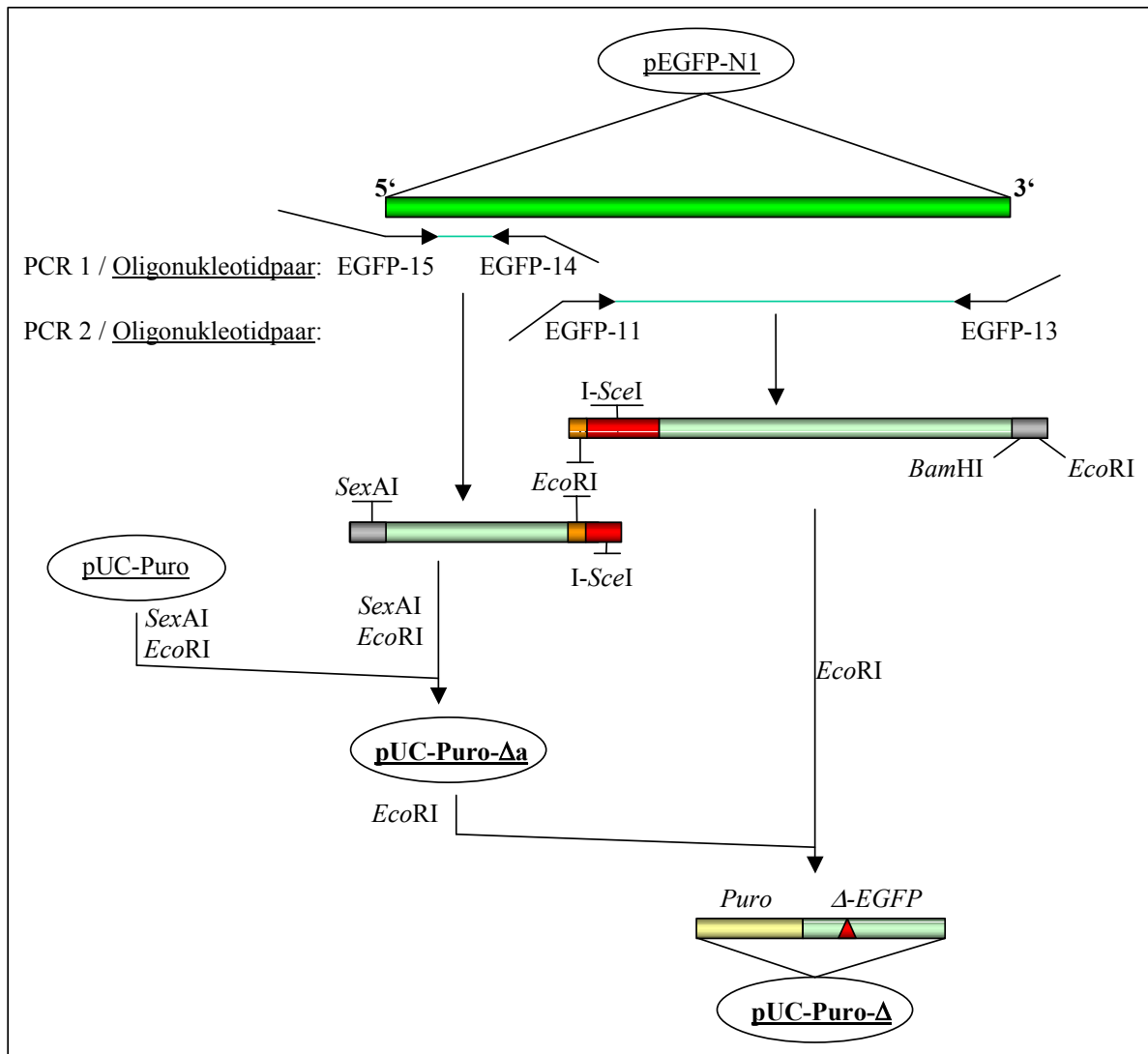


Abb. 8: Klonierung des Vektors pUC-Puro-Δ. Um die Fusion zwischen dem *EGFP*- und dem *Puromycin-Resistenz*-Gen zu ermöglichen, wurden die 5'-terminalen 36 Bp des Oligonukleotides *EGFP*-15 überlappend zu den 3'-terminalen 36 Bp des *Puromycin-Resistenz*-Gens gewählt. Gleichzeitig wurde dadurch das Stopkodon UGA des *Puromycin-Resistenz*-Gens deletiert und im Leseraster der Übergang zum *EGFP*-Gen ermöglicht. *EGFP*-14 und -11 wurden zur Deletion von 46 Bp aus der Chromophor-Region des *EGFP*-Gens (Bp 166-211 vom Startkodon) und zur Insertion der *EcoRI*- (6 Bp) und *I-SceI*-Erkennungssequenzen (18 Bp) eingesetzt. Das Oligonukleotid *EGFP*-13 diente auch zur Insertion von je einer *BamHI*- und *EcoRI*-Erkennungssequenz am 5'-Terminus der *EGFP*-cDNA.

4.1.2.2.2 Insertion des Hygromycin-Resistenz-Gens als Abstandhalter

Das *Hygromycin-Resistenz*-Gen wurde zuerst unter die Kontrolle des CMV-Promotors gebracht und anschließend die CMV-Hygromycin-Kassette in den retroviralen Vektor mit Rekombinationsdonor (p5xE, s. 4.1.2.1) kloniert. In einem letzten Klonierungsschritt wurde die Akzeptor-Kassette in den Vektor integriert.

Zur Erzeugung des Vektors pCMV-Hyg wurde das kommerziell erhältliche Plasmid pIRES-Hyg zur Entfernung des IRES-Elements mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* verdaut und religiert (s. Abb. 9, V1).

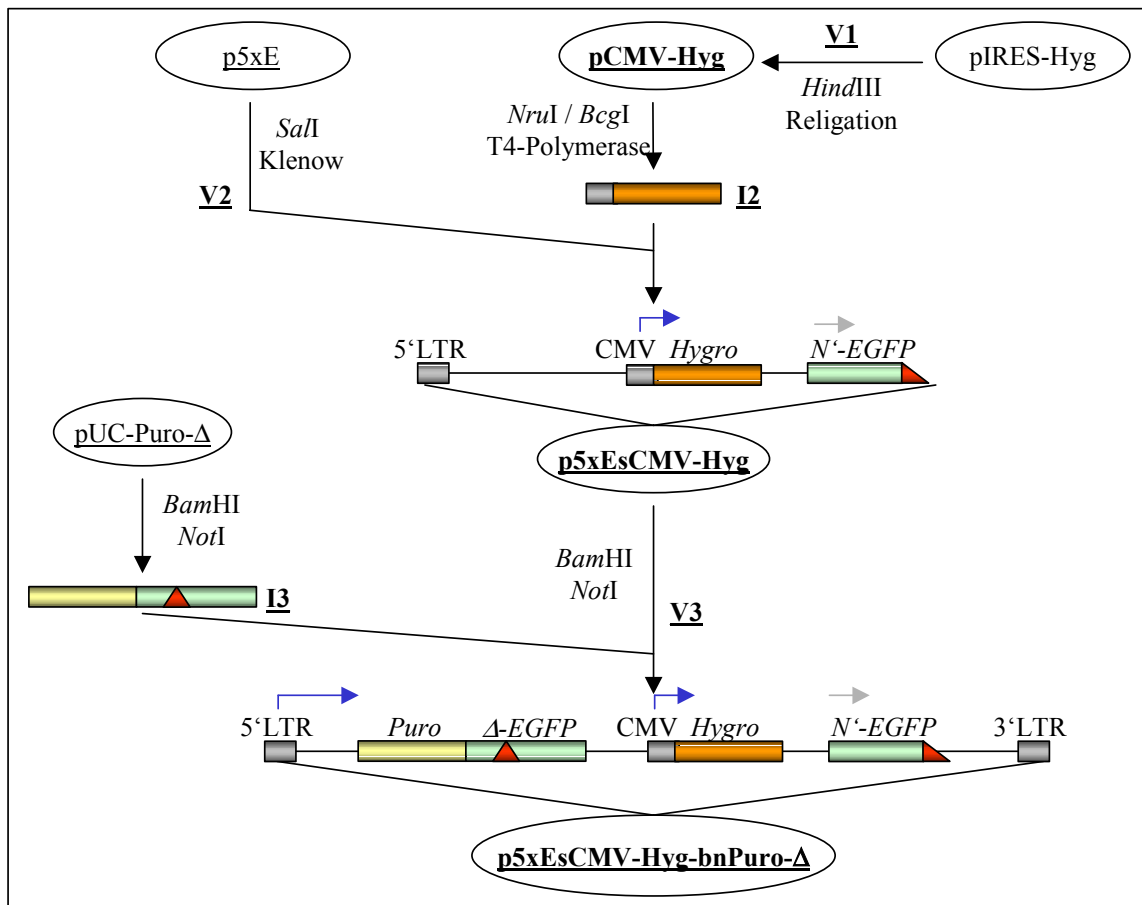


Abb. 9: Klonierung der Vektoren pCMV-Hyg, p5xEsCMV-Hyg und p5xEsCMV-HygbnPuro-Δ. I1-I3: Insert 1-3. V1-3: Vektor 1-3. Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an, der graue die Orientierung der kodierenden Sequenz für das *N'-EGFP*-Gen.

Das daraus resultierende Plasmid pCMV-Hyg wurde mit den Restriktionsendonukleasen *NruI* und *BcgI* verdaut, mit T4-DNA Polymerase behandelt und das 1,8 kbp lange Fragment (s. Abb. 9, I2), bestehend aus dem CMV-Promotor und dem *Hygromycin-Resistenz*-Gen, mit dem *SalI*-linearisierten und mit dem Klenow-Fragment behandelten Vektor p5xE (s. Abb. 9, V2) ligiert, so dass daraus die Rekombinationsvorstufe p5xEsCMV-Hyg resultierte.

Das Plasmid pUC-Puro-Δ wurde mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *NotI* verdaut und das 1,3 kbp lange Fragment (s. Abb. 9, I3), bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz*-Gen und der Δ -EGFP-cDNA, mit Vektor p5xEsCMV-Hyg (s. Abb. 9, V3) nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *NotI* ligiert, was in Rekombinationsvektor p5xEsCMV-Hyg-bnPuro-Δ resultierte.

4.1.2.2.3 Rekombinationsvektor-Varianten mit dem *I-SceI*-Gen als Abstandhalter

Um den jeweiligen retroviralen Rekombinationsvektor gleichzeitig für die induzierbare Expression von *I-SceI* zu nutzen, wurde das *I-SceI*-Gen unter der Kontrolle des Gal4-Promotors als Abstandhalter in die Vorstufe mit Rekombinationsdonor (p5xE, s. 4.1.2.1) inseriert, noch bevor die Rekombinationsakzeptor-Kassette integriert wurde.

4.1.2.2.3.1 Klonierung des retroviralen Rekombinationsvektors p5xEsGal4-I-SceI-bPuro-Δ

Zur Vorbereitung einer Drei-Fragment-Ligation wurde erstens pGC-Vektor (s. 3.1.7) mit der Restriktionsendonuklease *ClaI* verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt, mit der Restriktionsendonuklease *SalI* nachverdaut und das 200 Bp lange Gal4-Promotor-Fragment isoliert (s. Abb. 10, I1a).

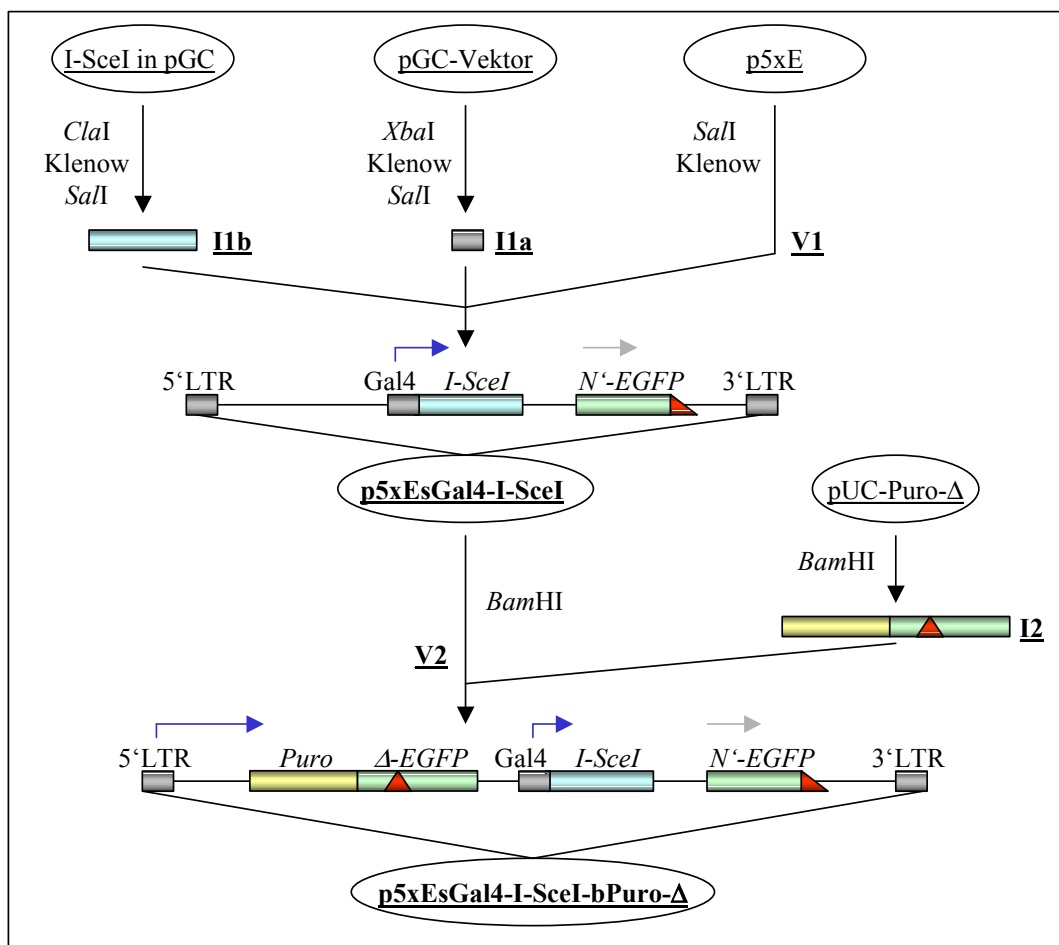


Abb. 10: Klonierung der retroviralen Vektoren p5xEsGal4-I-SceI und p5xEsGal4-I-SceI-bPuro-Δ. I1-2: Insert 1-2. V1-2: Vektor 1-2. Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen und die grauen die Leserichtung von *N'-EGFP* auf dem Vektor in 5' zu 3' Richtung an.

Zweitens wurde das Plasmid I-SceI in pGC (s. 4.1.1.2) mit der Restriktionsendonuklease *XbaI* linearisiert, mit dem Klenow-Fragment behandelt, mit der Restriktionsendonuklease *SalI* nachgeschnitten und ein 855 Bp langes *I-SceI*-cDNA-Fragment isoliert (s. Abb. 10, I1b). Drittens wurde der Vektor p5xE (s. 4.1.2.1) mit der Restriktionsendonuklease *SalI* verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt und der linearisierte Vektor isoliert (s. Abb. 10, V1). Zur Klonierung des Vektors p5xEsGal4-I-SceI wurden der Vektor-1 und die Inserts-1a und -1b miteinander ligiert.

Das Plasmid pUC-Puro-Δ wurde mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* verdaut und das 1,3 kBp lange Fragment (s. Abb. 10, I2), bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz-Gen* und der *Δ-EGFP*-cDNA, mit Vektor p5xEsGal4-I-SceI nach Linearisierung mit *BamHI* (s. Abb. 10, V2) zur Fertigstellung des Vektors p5xEsGal4-I-SceI-Bpuro-Δ ligiert.

4.1.2.2.3.2 Rekombinationsvektor-Varianten mit dem *p53*-Gen als Abstandhalter

Um die rekombinationsinhibierende Wirkung von *wtp53* untersuchen zu können, wurde beabsichtigt, sowohl das Rekombinationssubstrat als auch ein *p53*-Expressionskonstrukt in einem Schritt in die Zellen einzuführen. Zu diesem Zweck wurden die cDNAs für *wtp53* und *p53(138V)* in den retroviralen Rekombinationsvektor integriert. Dabei wurden die *p53*-Gene zuerst wie beschrieben unter die Kontrolle des Gal4-Promotors gebracht (s. 4.1.1.3). Um mit Hilfe eines einzigen von Östradiol abhängigen Promotors sowohl *p53* als auch die Meganuklease *I-SceI* in Zellen zu Expression zu bringen, wurde das *I-SceI*-Gen hinter das *p53*-Gen gesetzt und über ein IRES-Element für die Translationsinitiation verknüpft. Der Reihenfolge nach wurden die IRES-*I-SceI*-Kassette, *wtp53* oder *p53(138V)* unter der Kontrolle des Gal4-Promotors und anschließend die Akzeptorkassette in die Rekombinationsvektorstufe mit Donor (p5xE, s. 4.1.2.1) inseriert.

4.1.2.2.3.2.1 Klonierung des Plasmids pCMV-IRES-I-SceI

Das kommerziell erhältliche Plasmid pIRES-Hyg wurde mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BspEI* verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt und das 615 Bp lange IRES-Fragment isoliert. Der Vektor pCMV-I-SceI wurde mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt, dephosphoryliert und zur Generierung des Vektors pCMV-IRES-I-SceI mit dem IRES-Fragment ligiert (s. Abb. 11).

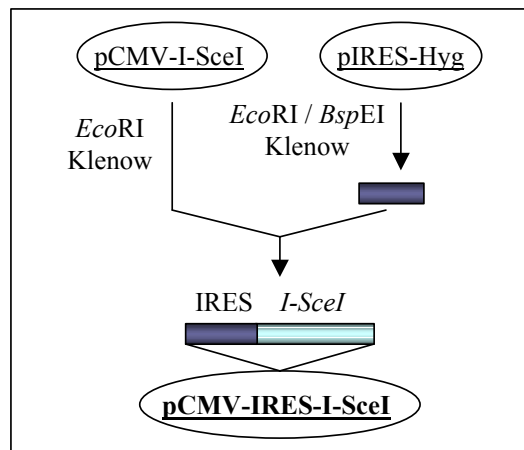


Abb. 11: Klonierung des Vektors pCMV-IRES-I-SceI.

4.1.2.2.3.2.2 Fertigstellung der Rekombinationsvektoren p5xEhSceI-IRESswtp53-Gal4nPuro-Δ und p5xEhSceI-IRESsp53(138V)-Gal4nPuro-Δ

Der Vektor pCMV-IRES-I-SceI (s. 4.1.2.2.3.2.1) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *AccI* und *SacI* verdaut, mit T4-DNA-Polymerase behandelt und das 1,4 kBp lange Fragment, bestehend aus der IRES-Sequenz und der *I-SceI*-cDNA (s. Abb. 12, I1) mit Vektor p5xE (s. 4.1.2.1) nach Restriktionsverdau mit *HindIII* und Klenow-Fragment-Behandlung (s. Abb. 12, V1) ligiert, um den Vektor p5xEhSceI-IRES zu erhalten. Die Plasmide wtp53 in pGC oder p53(138V) in pGC (s. 4.1.1.3) wurden mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *ClaI* verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt und jeweils das 2 kBp lange Fragment, bestehend aus der humanen *wtp53*- oder *p53(138.Val)*-cDNA und der Gal4-Promotor-Sequenz (s. Abb. 12, I2) mit dem Vektor p5xEhSceI-IRES nach *SalI*-Verdau und Klenow-Fragment-Behandlung (s. Abb. 12, V2) zur Fertigstellung der Vektoren p5xEhSceI-IRESswtp53.Gal4 bzw. p5xEhSceI-IRESsp53(138V)Gal4 ligiert.

Schließlich wurde das Plasmid pUC-Puro-Δ (s. 4.1.2.2.1) mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt und das 1,3 kBp lange Fragment (s. Abb. 12, I3), bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz-Gen* und der *Δ-EGFP*-cDNA, mit den Vektoren p5xEhSceI-IRESswtp53.Gal4 und p5xEhSceI-IRESsp53(138V)Gal4 nach *NotI*-Verdau und Klenow-Fragment-Behandlung (s. Abb. 12, V3) zur Fertigstellung der Vektoren p5xEhSceI-IRESswtp53Gal4nPuro-Δ und p5xEhSceI-IRESsp53(138V)Gal4nPuro-Δ ligiert.

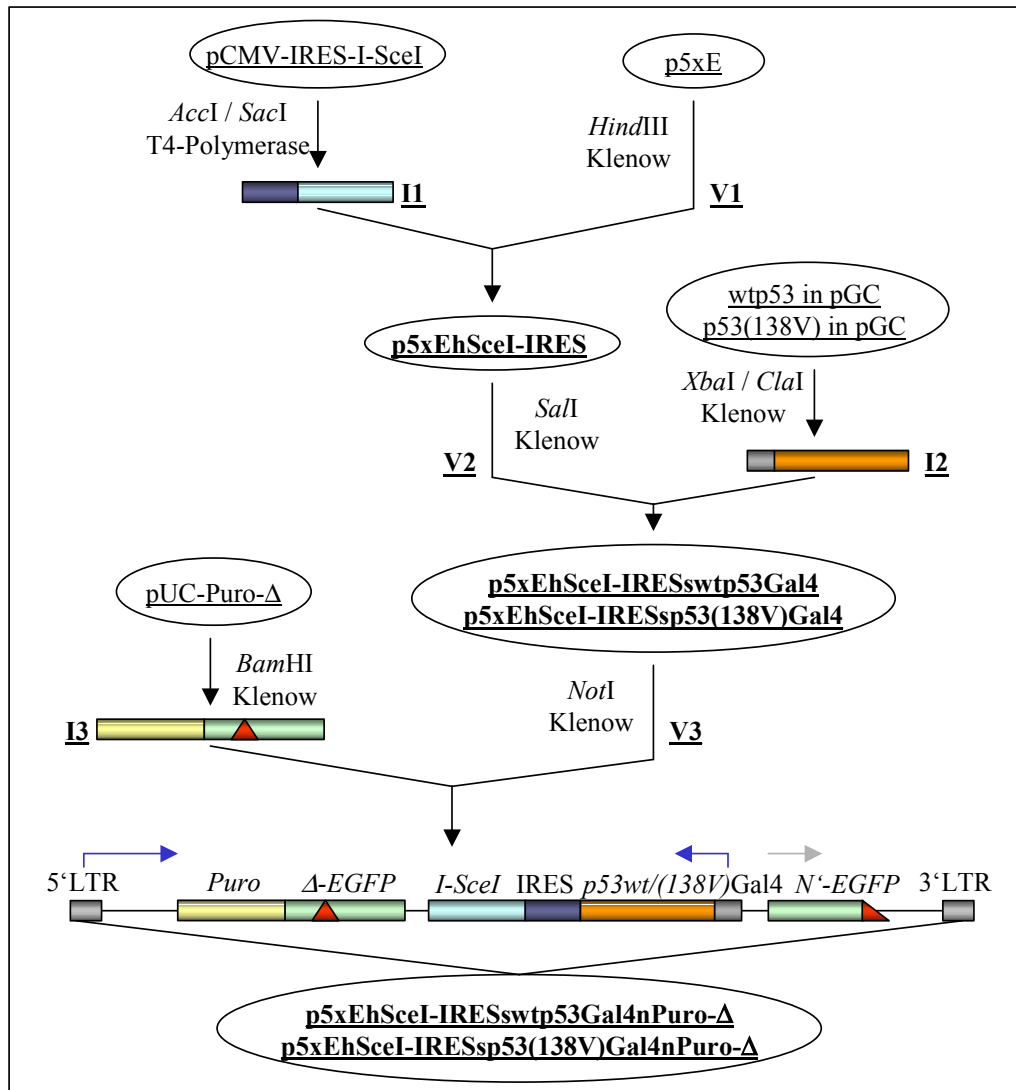


Abb. 12: Sequenzielle Herstellung der Vektoren p5xEhSceI-IRES, p5xEhSceI-IRESswtp53Gal4 bzw. p5xEhSceI-IRESsp53(138V)Gal4 und p5xEhSceI-IRESswtp53Gal4nPuro-Δ bzw. p5xEhSceI-IRESsp53(138V)Gal4nPuro-Δ. I1-3: Insert 1-3. V1-3: Vektor 1-3. Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an und der graue die Lesrichtung des EGFP-Donors in 5' zu 3' Richtung.

4.1.2.2.4 Rekombinationsvektor-Varianten mit dem *Hygromycin-Resistenz-* und dem *I-SceI*-Gen als Abstandhalter

Der Vektor p5xEsGal4-I-SceI (s. 4.1.2.2.3.1) wurde mit der Restriktionsendonuklease *NcoI* verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt, mit der Restriktionsendonuklease *NotI* nachverdaut und das 1,1 kbp lange Fragment, bestehend aus der *I-SceI*-cDNA und der Gal4-Promotor-Sequenz isoliert (s. Abb. 13, I1).

Der Vektor p5xEsCMV-Hyg (s. 4.1.2.2.2) wurde mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt, mit der Restriktionsendonuklease *NotI* nachverdaut (s. Abb. 13, V1) und zur Klonierung des Vektors p5xEsCMV-HygbnGal4-I-SceI mit dem Gal4-*I-SceI*-Fragment ligiert. Parallel dazu wurde das Plasmid pUC-Puro-Δ

(s. 4.1.2.2.1) mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt und das 1,3 kBp lange Fragment, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz-Gen* und der Δ -EGFP-cDNA isoliert (s. Abb. 13, I2) und mit dem Vektor p5xEsCMV-HygbnGal4-I-SceI nach *Not*I-Verdau und Klenow-Fragment-Behandlung (s. Abb. 13, V2) zur Fertigstellung des Vektors p5xEsCMV-HygbnGal4-I-SceInPuro- Δ ligiert.

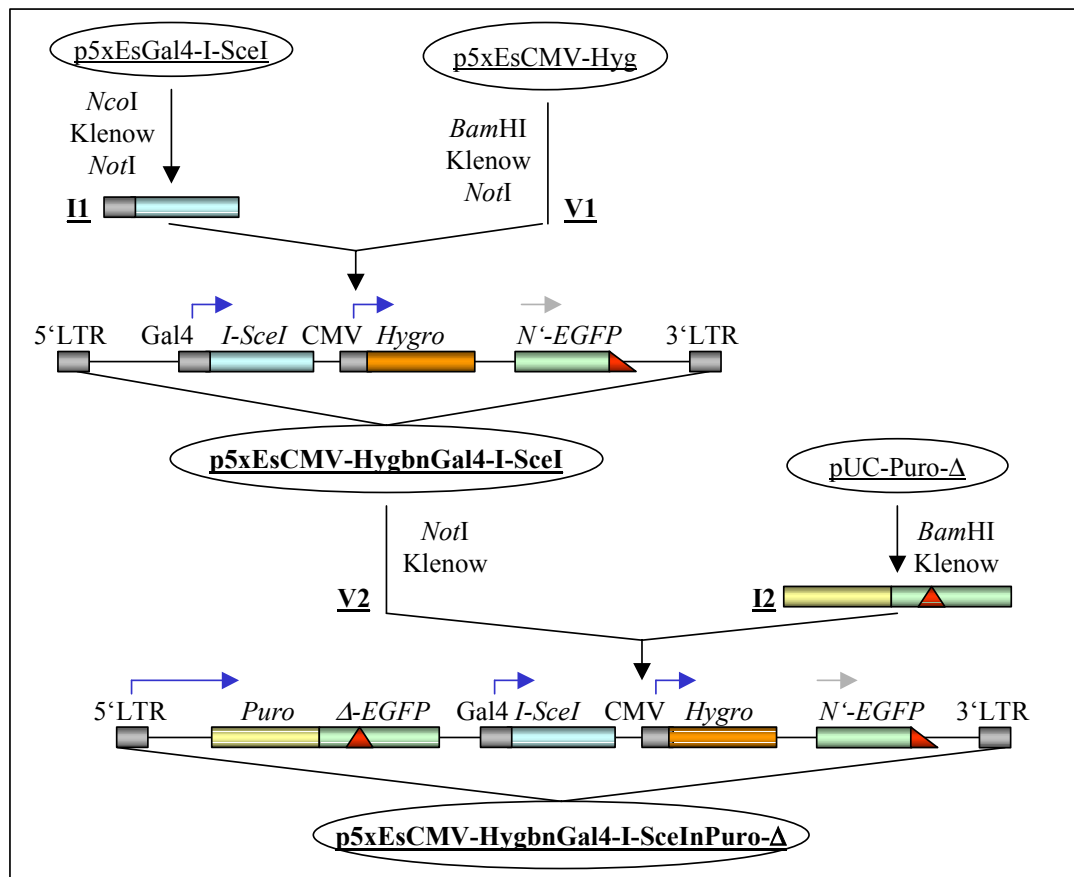


Abb. 13: Klonierung der Vektoren p5xEsCMV-HygbnGal4-I-SceI und p5xEsCMV-HygbnGal4-I-SceInPuro- Δ . Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen an und der graue die Lesrichtung des Donors auf dem retroviralen Vektor in 5' zu 3' Richtung.

4.1.2.2.5 Herstellung neuer Akzeptorgen-Varianten

Zusätzlich zu Δ -EGFP wurden zwei neue Rekombinationsakzeptoren *HR*- und *EJ*-EGFP kloniert, um die Homologien in Nachbarschaft des DSBs zu vergrößern (s. Abb. 3). Durch Klonierung von *HR*-EGFP wurde die Deletion an der Chromophor-Region des *EGFP*-Gens von 46 Bp auf 4 Bp reduziert. Bei der Klonierung von *EJ*-EGFP wurden 5 Bp der Chromophor-Region des *EGFP*-Gens dupliziert und dadurch Mikrohomologien flankierend zum DSB generiert. Die molekularbiologische Erzeugung der neuen Akzeptoren erfolgte über drei unabhängige PCR-Reaktionen. Die amplifizierten Fragmente wurden zuerst in pUC-18

anstelle von Δ -EGFP kloniert und anschließend in die Rekombinationsvektorstufe p5xEsGal4-I-SceI (s. 4.1.2.2.3.1) integriert.

4.1.2.2.5.1 Erzeugung neuer Akzeptorgene und Klonierung in pUC-Puro

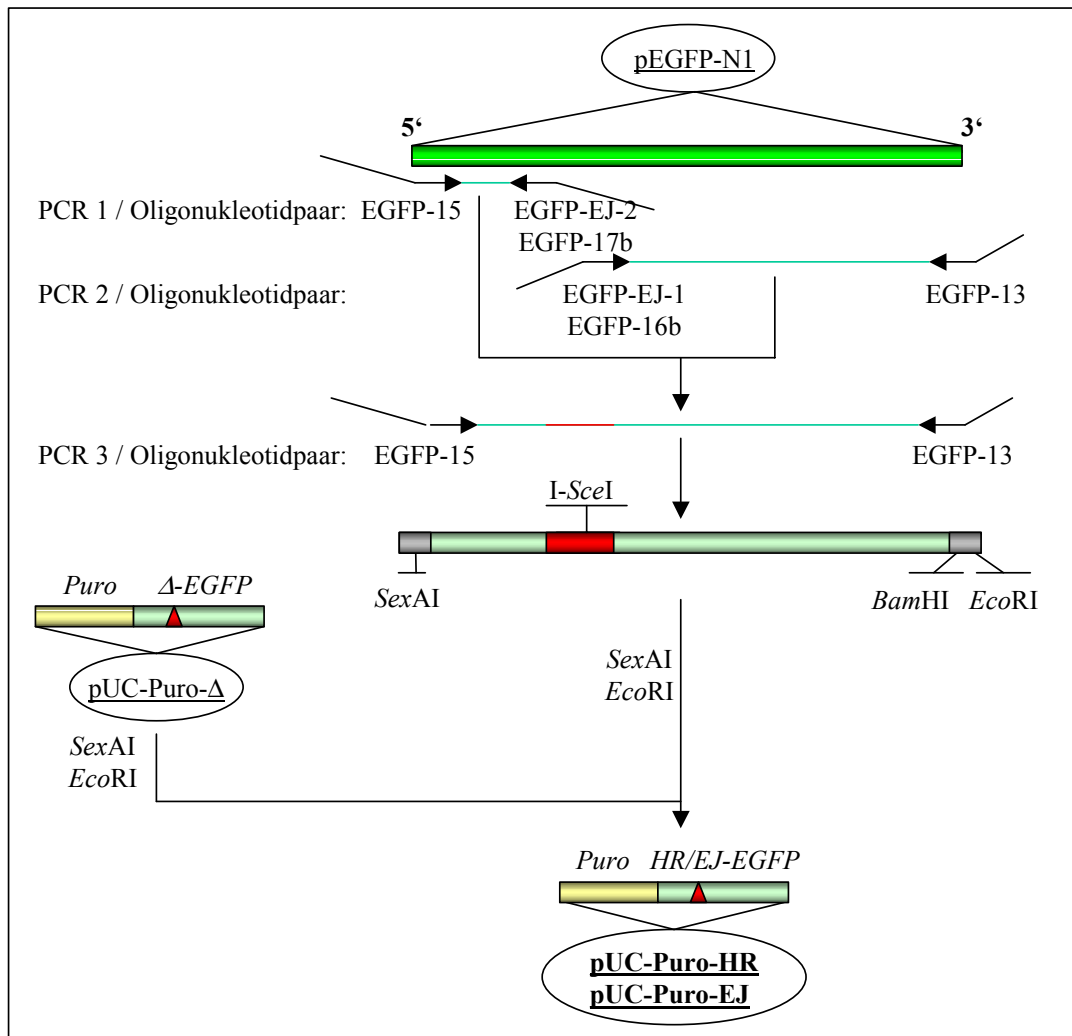


Abb. 14: Klonierung der Vektoren pUC-Puro-HR und pUC-Puro-EJ. Die Oligonukleotide EGFP-17b und -16b wurden zur PCR-Amplifikation von *HR-EGFP* benutzt und dadurch die Bp 188-201 aus der *EGFP*-cDNA durch die 18 Bp lange *I-SceI*-Erkennungssequenz ersetzt. Die Oligonukleotide EGFP-EJ-1 und -EJ-2 wurden zur PCR-Amplifikation von *EJ-EGFP* benutzt und dadurch die Bp 187-201 aus der *EGFP*-cDNA dupliziert und die 18 Bp lange *I-SceI*-Erkennungssequenz eingefügt.

Zur Generierung von *HR-EGFP* wurden wie zur Δ -EGFP-Herstellung zwei PCR-Reaktionen mit dem kommerziell erhältlichen Plasmid pEGFP-N1 (s. 3.1.7) als Matrize und den Oligonukleotiden EGFP-15 und -17b (s. 3.1.8) bzw. EGFP-13 und -16b (s. 3.1.8) durchgeführt. Zur Amplifikation von *EJ-EGFP* aus dem kommerziell erhältlichen Plasmid pEGFP-N1 wurden für die erste PCR die Oligonukleotide EGFP-15 und -EJ-2 (s. 3.1.8) und für die zweite PCR die Oligonukleotide EGFP-15 und -EJ-1 (s. 3.1.8) eingesetzt. Die in der ersten PCR amplifizierte 5'-EGFP-Bereiche (257 Bp für *HR-EGFP*, 266 Bp für *EJ-EGFP*)

und der 3'-Bereich aus der zweiten PCR (556 Bp für *HR-EGFP*, 565 Bp für *EJ-EGFP*) wurden isoliert und die *HR*- oder *EJ-EGFP*-Fragmente aus der ersten und zweiten PCR jeweils mit den Oligonukleotiden EGFP-15 und -13 (s. 3.1.8) in einer dritten PCR zum vollständigen 0,7 kBp langen *HR*- bzw. *EJ-EGFP*-Fragment fusioniert. Die PCR-Fragmente (*HR-EGFP* bzw. *EJ-EGFP*) wurden mit den Restriktionsendonukleasen *SexAI* und *EcoRI* verdaut und mit dem *SexAI*-und *EcoRI*-Vektorfragment von pUC-Puro-Δ (s. 4.1.2.2.1) durch Ligation zu den Plasmiden pUC-Puro-*HR* und pUC-Puro-*EJ* zusammengefügt (s. Abb. 14). Nach der Fertigstellung der pUC-Puro-Vektoren wurden die *HR*- und *EJ-EGFP*-Gene mit den Oligonukleotiden *EGFP*-Seq1-1, 3 und -4 (s. 3.1.8) sequenziert und jeweils die Deletion der Chromophor-Region und die Insertion der *I-SceI*-Erkennungssequenz bestätigt. Innerhalb der *HR-EGFP*-Sequenz wurde abweichend vom *wtEGFP*-Gen an Bp 193 eine Transversion von C nach A [Leu65 (CTG) zu Met (ATG)] und innerhalb der *EJ-EGFP*-Sequenz an Bp 366 eine Transition von C nach T [Asn122 (AAC) zu Asn (AAT)] festgestellt. Sowohl die Herstellung von diesen Vektoren als auch die anschließende Sequenzierungen wurden in Kooperation mit Frau Dipl. Biol. Gisa S. Boehden durchgeführt.

4.1.2.2.5.2 Fertigstellung der Rekombinationsvektoren mit *HR-EGFP* bzw. *EJ-EGFP* als Akzeptor und dem *I-SceI*-Gen als Abstandhalter

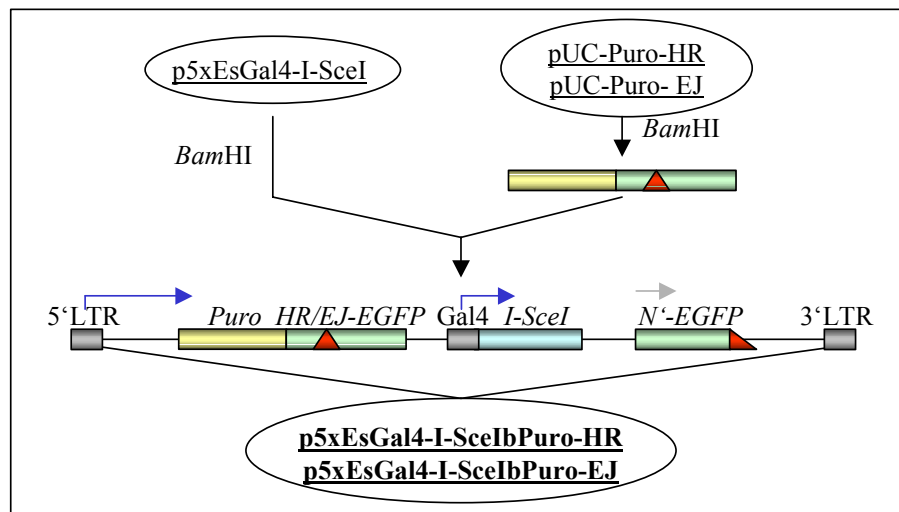


Abb. 15. Klonierung der Vektoren p5xEsGal4-I-SceI-bPuro-*HR* und -*EJ*. Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen an und der graue die Lesrichtung des Donors auf dem retroviralen Vektor in 5' zu 3' Richtung.

Die Plasmide pUC-Puro-*HR* bzw. pUC-Puro-*EJ* (s. 4.1.2.2.5.1) wurden mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* verdaut und die resultierenden 1,3 kBp langen Fragmente, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz*-Gen und je einem der Rekombinationsakzeptoregene *HR*- bzw.

EJ-EGFP, in die Rekombinationsvektorstufe p5xEsGal4-I-ISceI (s. 4.1.2.2.3.1) nach Linierasierung mit *Bam*HI kloniert, so dass die finalen Rekombinationsvektoren p5xEsGal4-I-ISceIBpuro-HR und p5xEsGal4-I-ISceIBpuro-EJ entstanden (s. Abb. 15).

4.1.3 Optimierung des Rekombinations-Test-Systems durch verbessertes Vektordesign

Nachdem in ersten Versuchen zur Rekombinationsanalyse mit den oben beschriebenen Rekombinationsvektoren gezeigt worden war, dass durch die Fusion zwischen den kodierenden Sequenzen des *Puromycin-Resistenz*-Gens und einer der *EGFP*-Akzeptorgen-Varianten die Grünfluoreszenz-Eigenschaft des *EGFP*s stark reduziert wird (s. 4.2.5.1), wurden die verschiedenen Akzeptoren (Δ -/*HR*-/*EJ-EGFP*) unter der Kontrolle des CMV-Promotors jeweils als separate Expressions-Kassetten integriert. Darüberhinaus wurde durch Erweiterung der homologen Sequenzen zwischen dem Akzeptor und dem Donor durch Verlängerung des Donors von 446 Bp (*N'-EGFP*) auf 720 Bp (*Stop-EGFP*) bzw. 721 Bp (*wtEGFP*) angestrebt, eine Erhöhung der Rekombinationsraten zu erzielen.

4.1.3.1 Generierung der Plasmide pUC-PuroCMV- Δ , pUC-PuroCMV-HR und pUC-PuroCMV-EJ

Die Plasmide pUC-PuroCMV- Δ , pUC-PuroCMV-HR und pUC-PuroCMV-EJ mit verbesserten Akzeptorgen-Kassetten wurden generiert, indem das jeweilige Akzeptorgen mit CMV-Promotor in Plasmid pUC-Puro hinter dem *Puromycin-Resistenz*-Gen angeordnet wurde.

4.1.3.1.1 Klonierung der Plasmide pCMV- Δ , pCMV-HR und pCMV-EJ

Im ersten Schritt wurden die Plasmide pUC-Puro- Δ (s. 4.1.2.2.1), pUC-Puro-HR- bzw. pUC-Puro-EJ-EGFP (s. 4.1.2.2.5.1) mit der Restriktionsendonuklease *SexAI* verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt, mit der Restriktionsendonuklease *NotI* nachverdaut und die 0,7 kBp langen Δ -, *HR*- bzw. *EJ-EGFP*-cDNA-Fragmente (s. Abb. 16, I1) mit dem kommerziell erhältlichen Plasmid pEGFP-N1 nach *Hind*III-Verdau, Klenow-Behandlung und *NotI*-Nachverdau (s. Abb. 16, V1) zur Erzeugung der Vektoren pCMV- Δ , pCMV-HR bzw. pCMV-EJ ligiert.

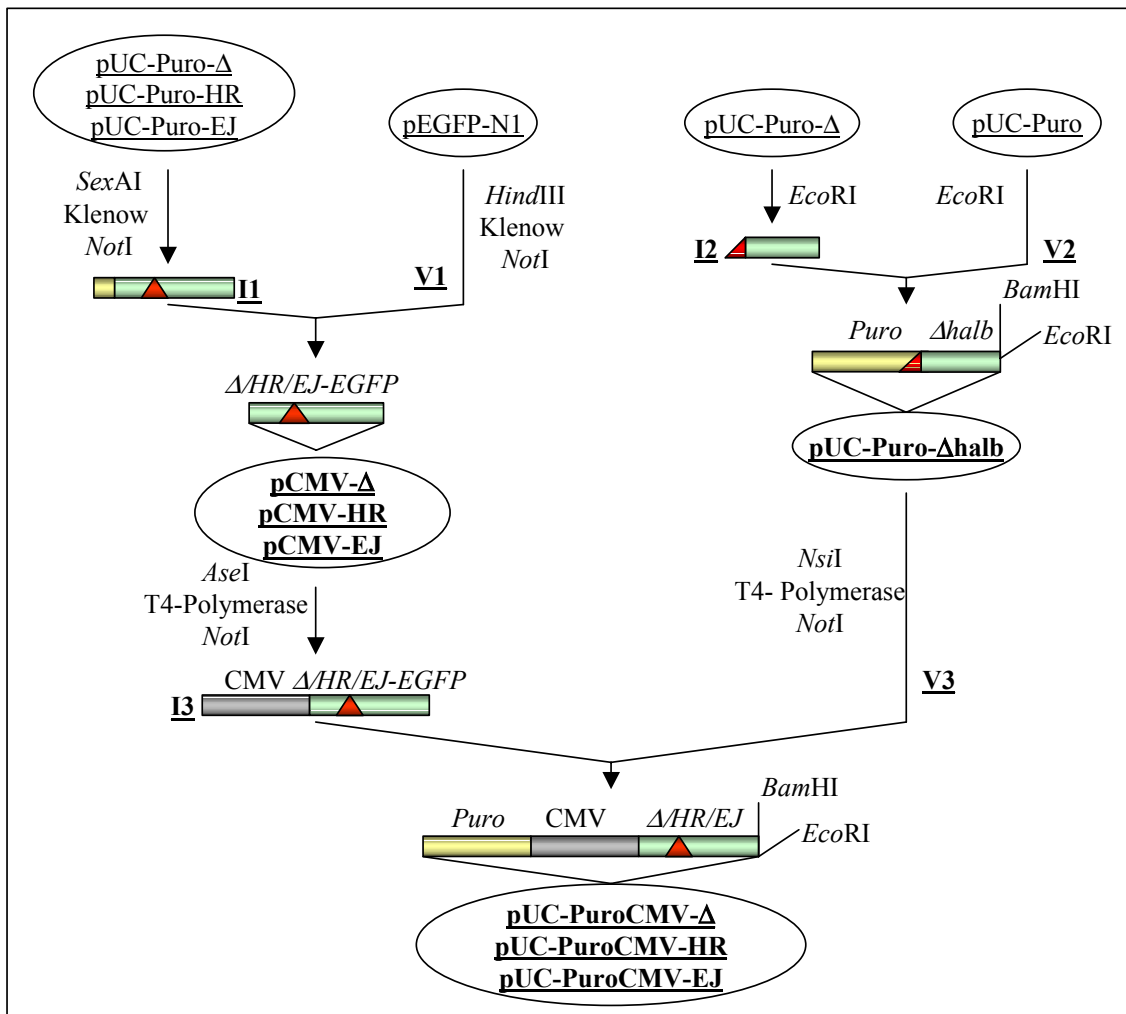


Abb. 16: Sequenzielle Klonierung der Vektoren pCMV-Δ, pCMV-HR, pCMV-EJ, pUC-Puro-Δhalb und pUC-PuroCMV-Δ, pUC-PuroCMV-HR bzw. pUC-PuroCMV-EJ.

4.1.3.1.2 Klonierung des Plasmids pUC-Puro-Δhalb

Um die durch die PCR am 3'-Terminus des $\Delta-EGFP$ -Gens inserierten *BamHI*- und *EcoRI*-Erkennungssequenzen auch für die Kassetten aus Akzeptorgen und CMV-Promotor nutzen zu können, wurde zunächst die 3'-Hälfte des $\Delta-EGFP$ -Gens (s. Abb. 16) mittels der umspannenden *EcoRI*-Schnittstellen im Plasmid pUC-Puro-Δhalb subkloniert. Dafür wurde das Plasmid pUC-Puro-Δ (s. 3.1.7) mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* verdaut und das 0,5 kbp lange 3'-terminale $\Delta-EGFP$ Fragment isoliert (s. Abb. 16, I2). Parallel dazu wurde das Plasmid pUC-Puro mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* verdaut (s. Abb. 16, V2) und der Vektor pUC-Puro-Δhalb durch Ligation hergestellt.

4.1.3.1.3 Fertigstellung der Plasmide pUC-Puro-CMV-Δ, pUC-Puro-CMV-HR und pUC-Puro-CMV-EJ

Die Plasmide pCMV-Δ, pCMV-HR und pCMV-EJ (s. 4.1.3.1.1) wurden mit der Restriktionsendonuklease *AseI* verdaut, mit T4-DNA-Polymerase behandelt, mit der Restriktionsendonuklease *NotI* nachverdaut und die 1,3 kbp langen Fragmente, bestehend aus dem CMV-Promotor und je einem der Rekombinationsakzeptoren Δ-, HR- oder EJ-EGFP, isoliert (s. Abb. 16, I3). Diese Fragmente wurden mit dem Vektoranteil von pUC-Puro-Δhalb (s. 4.1.3.1.2) ligiert, nachdem dieser mit der Restriktionsendonuklease *NsiI* geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase behandelt und mit der Restriktionsendonuklease *NotI* nachgeschnitten worden war (s. Abb. 16, V3), sodass die Plasmide pUC-Puro-CMV-Δ, pUC-Puro-CMV-HR bzw. pUC-Puro-CMV-EJ mit vollständiger Akzeptor-Kassette entstanden.

4.1.3.2 Fertigstellung der Rekombinationsvektoren p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ, p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-HR und p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-EJ

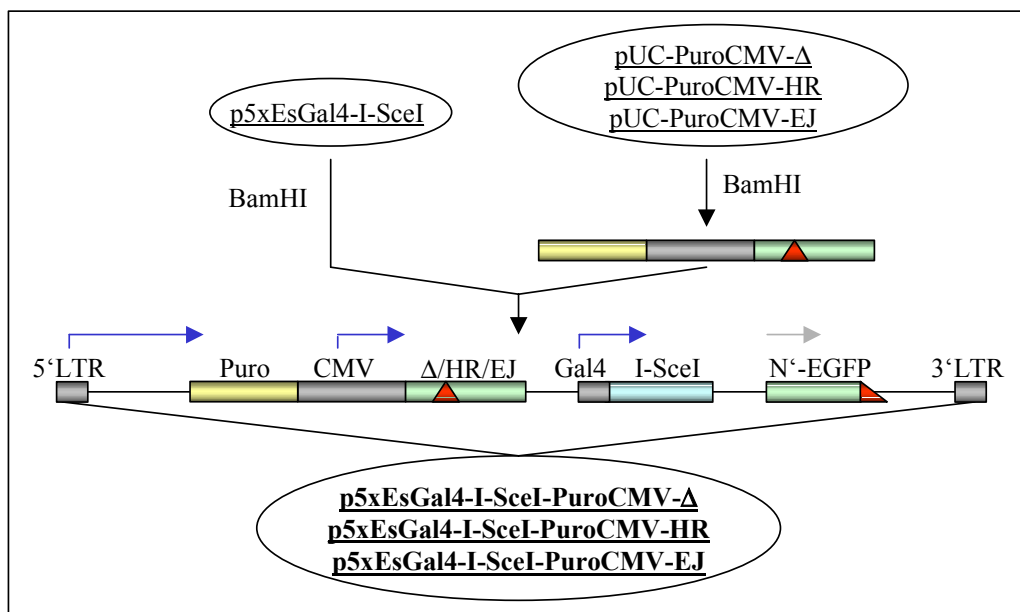


Abb. 17.: Klonierung der Rekombinationsvektoren p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ, p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-HR und p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-EJ. Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen an und der graue die Lesrichtung des Donors auf dem retroviralen Vektor in 5' zu 3' Richtung.

Die Plasmide pUC-PuroCMV-Δ/-HR/-EJ (s. 4.1.3.1.3) wurden mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* verdaut und die 2 kbp langen Fragmente, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz-Gen*, dem CMV-Promotor und je einem der Rekombinationsakzeptoren Δ-, HR- oder EJ-EGFP, jeweils mit der retroviralen Rekombinationsvektorstufe

p5xEsGal4-I-SceI (s. 4.1.2.2.3.1) nach Linearisierung mit *Bam*HI zur Generierung der finalen Rekombinationsvektoren p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV- Δ , p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-HR bzw. p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-EJ ligiert (s. Abb. 17).

4.1.3.3 Fertigstellung der retrovirenalen Rekombinationsvektoren p5xEsCMV-HygbPuroCMV- Δ , p5xEsCMV-HygbPuroCMV-HR und p5xEsCMV-HygbPuroCMV-EJ

Die Plasmide pUC-PuroCMV- Δ , pUC-PuroCMV-HR und pUC-PuroCMV-EJ wurden mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI verdaut und die 2 kbp langen Fragmente, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz-Gen*, dem CMV-Promotor und je einem der Rekombinationsakzeptoren Δ -, HR- oder EJ-EGFP mit der Rekombinations-Vektorvorstufe p5xEsCMV-Hyg (s. 4.1.2.2.2) nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI zur Fertigstellung des Rekombinationsvektors p5xEsCMV-HygbPuroCMV- Δ , p5xEsCMV-HygbPuroCMV-HR bzw. p5xEsCMV-HygbPuroCMV-EJ ligiert (s. Abb. 18).

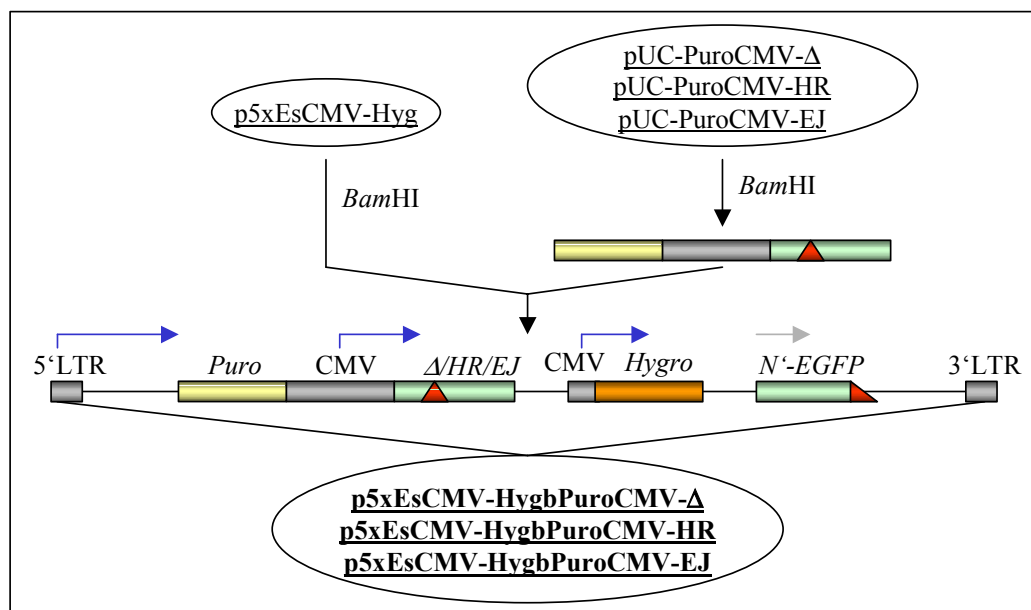


Abb. 18.: Übersicht über die Klonierung der retrovirenalen Rekombinationsvektoren p5xEsCMV-HygbPuroCMV- Δ , p5xEsCMV-HygbPuroCMV-HR und p5xEsCMV-HygbPuroCMV-EJ. Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen an und der graue die Orientierung des N'-EGFP Gens auf dem Rekombinationsvektor in 5' zu 3' Richtung.

4.1.3.4 Fertigstellung der retroviralen Rekombinationsvektoren p5xwtsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ, -HR und -EJ

Mit der Verwendung eines vollständigen *wtEGFP*-Gens als Rekombinationsdonor (ohne Promotor) sollte die Homologie zwischen Akzeptor- und Donor-Gen erweitert werden. Hierfür wurde die Vektorvorstufe p5xEsGal4-I-SceI (s. 4.1.2.2.3.1) mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nco*I verdaut und das 1,1 kbp lange Fragment, bestehend aus der Gal4-Promotor-Sequenz und der *I-SceI*-cDNA isoliert (s. Abb. 19, I1). Parallel dazu wurde der Vektor p5xwtEGFP (s. 4.1.4.2) mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nco*I verdaut (s. Abb. 19, V1) und für die Herstellung des Vektors p5xwtsGal4-I-SceI mit dem Gal4-Promotor-*I-SceI*-Fragment ligiert. Die Plasmide pUC-PuroCMV-Δ/-HR/-EJ (s. 4.1.3.1.3) wurden mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI verdaut und die 2 kbp langen Fragmente, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz-Gen*, dem CMV-Promotor und einem der Rekombinationsakzeptoren Δ-, *HR*- oder *EJ-EGFP* isoliert (s. Abb. 19, I2).

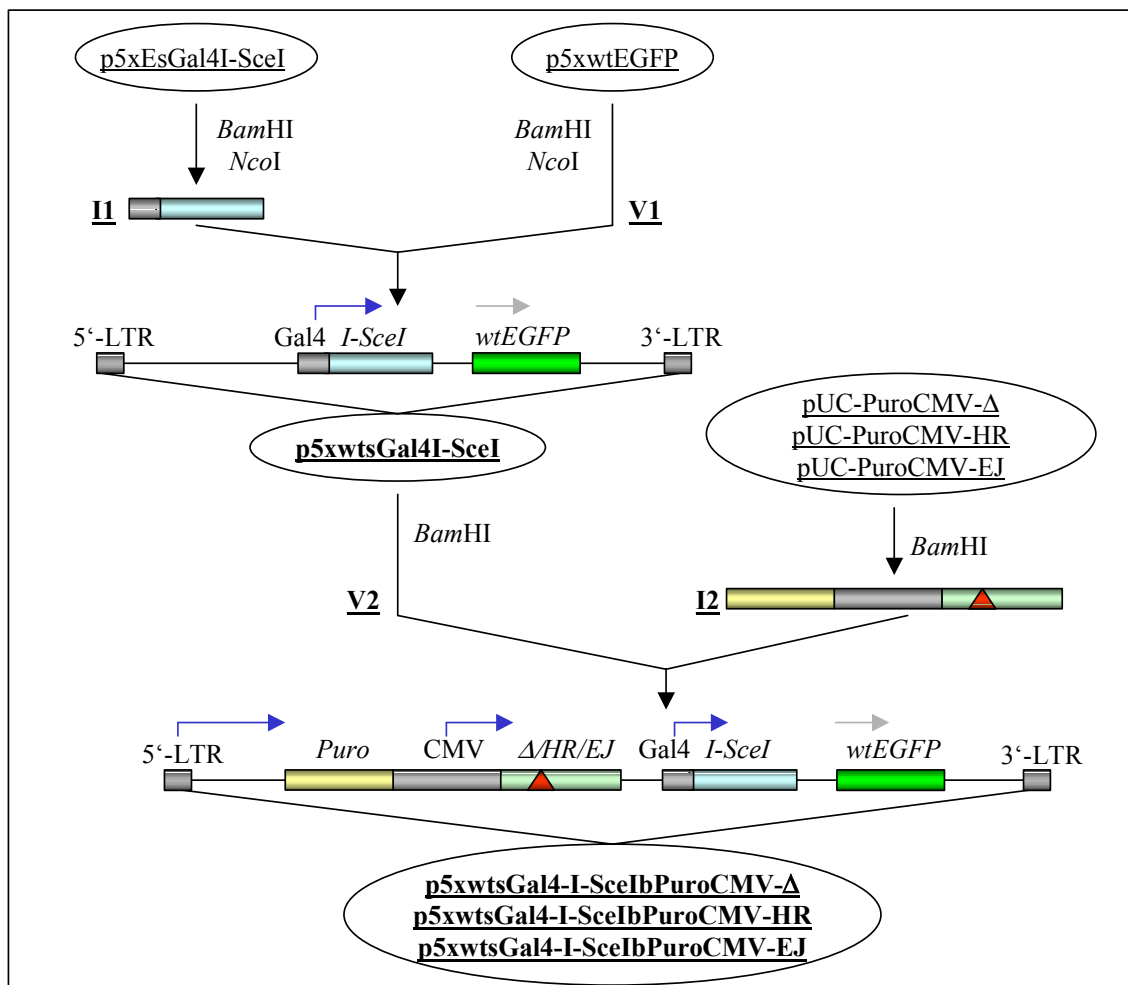


Abb. 19.: Klonierung der retroviralen Rekombinationsvektoren p5xwtsGal4I-SceIbPuroCMV-Δ, p5xwtsGal4I-SceIbPuroCMV-HR und p5xwtsGal4I-SceIbPuroCMV-EJ. Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen an und der graue die Lesrichtung des Donors auf dem retroviralen Vektor in 5' zu 3' Richtung.

Diese Fragmente wurden in den Vektor p5xwtsGal4-I-SceI durch Ligation inseriert, nachdem dieser mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI verdaut worden war (s. Abb. 19, V2), so dass die finalen Rekombinationsvektoren p5xwtsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ, p5xwtsGal4-I-SceIbPuroCMV-HR bzw. p5xwtsGal4-I-SceIbPuroCMV-EJ entstanden.

4.1.3.5 Generierung des *Stop-EGFP*-Gens als neuem Rekombinationsdonor

Da mit dem *wtEGFP*-Gen als Donor trotz des Fehlens eines unmittelbar vorgeschalteten Promotors in geringfügigem Maße Expression beobachtet wurde, wurde das Start-Methionin des *EGFP*-Gens über PCR durch zwei Stopkodons (TAG-TGA) ersetzt und damit die Expression auf der Ebene der Translation vermindert. Dafür wurde aus dem kommerziell erhältlichen Vektor pEGFP-N1 (s. 3.1.7) mit Hilfe der Oligonukleotide *trgEGFP*-1 und -2 (s. 3.1.8) ein entsprechend mutiertes 738 Bp langes *EGFP*-Fragment amplifiziert. Nach Restriktionsverdau mit *Xho*I wurde das PCR-Fragment in den Vektor p5N-M (s. 3.1.7) nach Ligation mit *Xho*I inseriert und so der Vektor p5xtrEGFP erzeugt (s. Abb. 20). Im Anschluss wurde das *Stop-EGFP*-Gen mit den Oligonukleotiden *EGFP*-Seq1-1, -3 und -4 (s. 3.1.8) sequenziert und die Deletion des Start-Methionins sowie die Insertion der zwei Stopkodons TAG-TGA bestätigt.

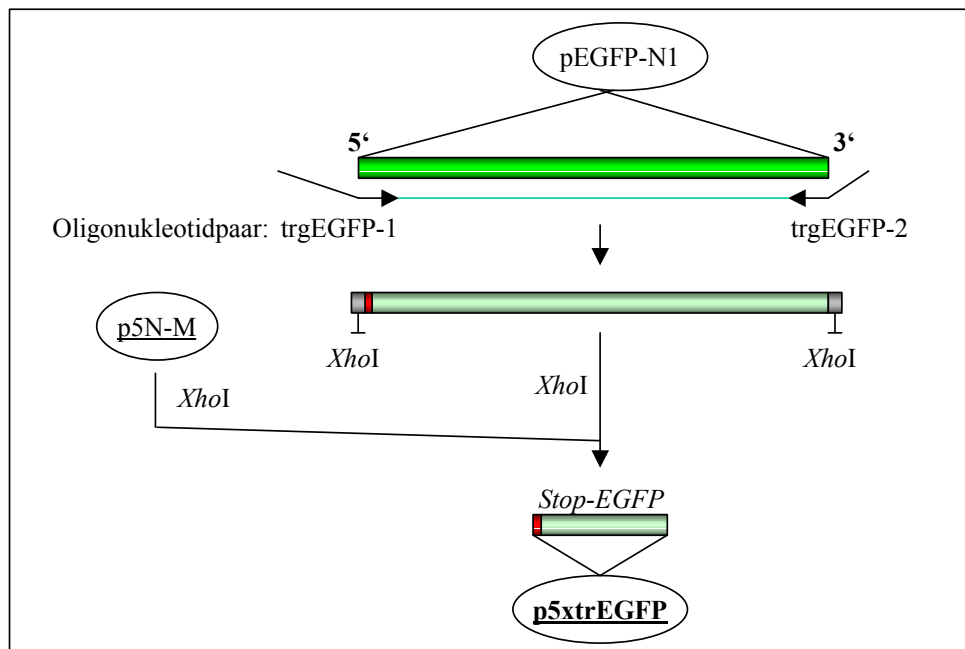


Abb. 20: Übersicht über die Klonierung des Vektors p5xtrEGFP. Durch die Oligonukleotide *trgEGFP*1 wurde das Start-Methionin vom *EGFP*-Gen durch zwei Stopkodons (TAG-TGA) ersetzt und am 5'- und am 3'-Terminus je eine *Xho*I-Erkennungssequenz während der PCR-Amplifikation inseriert.

4.1.3.6 Fertigstellung der retroviralen Rekombinationsvektoren p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-Δ, p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-HR und p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-EJ

Der Vektor p5xEsGal4I-SceI (s. 4.1.2.2.3.1) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nco*I verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt und das 1,1 kbp lange Fragment, bestehend aus der Gal4-Promotor-Sequenz und der *I-SceI*-cDNA isoliert (s. Abb. 21, I1).

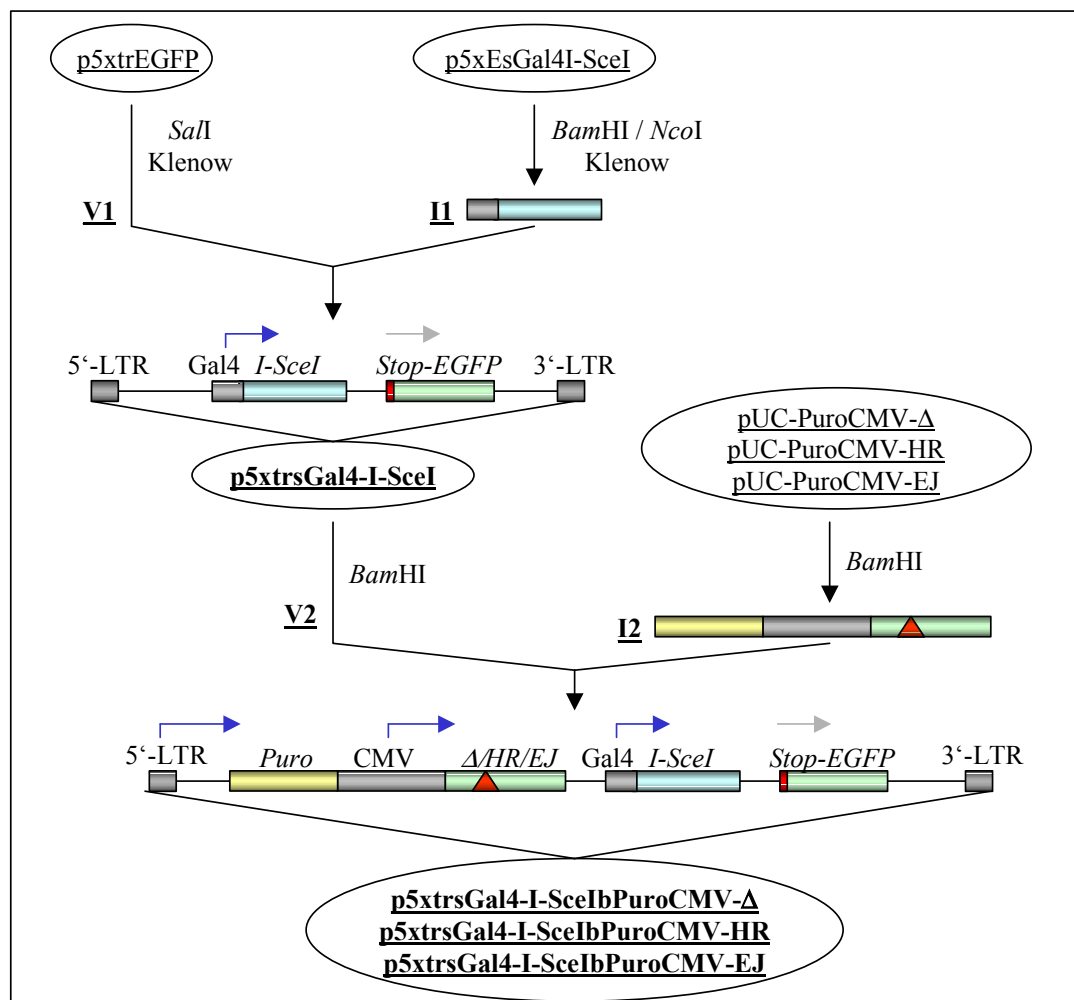


Abb. 21.: Klonierung der retroviralen Rekombinationsvektoren p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-Δ, p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-HR und p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-EJ. Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen an und der graue die Lesrichtung des Donors auf dem retroviralen Vektor in 5' zu 3' Richtung.

Der Vektor p5xtrEGFP (s. 4.1.3.5) wurde mit der Restriktionsendonuklease *Sal*I verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt (s. Abb. 21, V1) und zur Fertigstellung des Vektors p5xtrsGal4I-SceI mit dem Gal4-Promotor-*I-SceI*-cDNA-Fragment ligiert. Die Plasmide pUC-PuroCMV-Δ/-HR/-EJ (s. 4.1.3.1.3) wurden mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI verdaut und die 2 kbp langen Fragmente (s. Abb. 21, I2), bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz*-Gen, dem CMV-Promotor und je einem der Rekombinationsakzeptoren Δ-, HR- oder EJ-

EGFP, mit dem Vektor p5xtrsGal4I-SceI nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI (s. Abb. 21, V2) zur Fertigstellung der Vektoren p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-Δ, p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-HR bzw. p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-EJ ligiert.

4.1.3.7 Optimierte Rekombinationsvektor-Varianten mit einem *Hygromycin-Resistenz-Gen* im Abstandhalter-Bereich

4.1.3.7.1 Vorbereitung der Rekombinationsvektorstufe p5xtrsHyg

Der Vektor pCMV-Hyg (s. 4.1.2.2.2) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Nru*I und *Bcg*I verdaut, mit der T4-DNA-Polymerase behandelt und das 2 kBp lange Fragment, bestehend aus dem CMV-Promotor und dem *Hygromycin-Resistenz-Gen* isoliert (s. Abb. 22, I1). Das CMV-Promotor-*Hygromycin-Resistenz-Gen*-Fragment wurde weiter mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt und das 1,4 kBp lange *Hygromycin-Resistenz-Gen* isoliert (s. Abb. 22, I2). Dieses Fragment wurde mit dem Vektor p5xtrEGFP (s. 4.1.3.5) ligiert, nachdem dieser mit *Sal*I geschnitten und mit dem Klenow-Fragment behandelt worden war (s. Abb. 22, V2). Im Ergebnis wurde die Rekombinations-Vektorvorstufe p5xtrsHyg generiert.

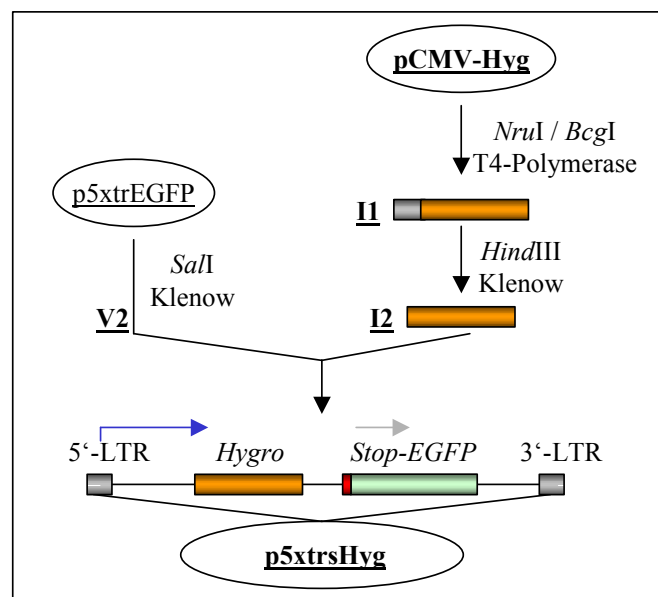


Abb. 22.: Klonierung des Vektors p5xtrsHyg.

4.1.3.7.2 Fertigstellung der retroviralen Rekombinationsvektoren p5xtrsSV40-HygBpuroCMV-Δ, -HR und -EJ

Das kommerziell erhältliche Plasmid pEGFP-N1 (s. 3.1.7) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *PvuII* und *ClaI* verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt und das resultierende 340 Bp lange SV40-Promotor-Fragment (s. Abb. 23, I1) mit dem *HindIII*-geschnittenen und mit Klenow-Fragment-behandelten Vektor p5xtrsHyg (s. Abb. 23, V1) zur Klonierung des Vektors p5xtrsSV40-Hyg ligiert.

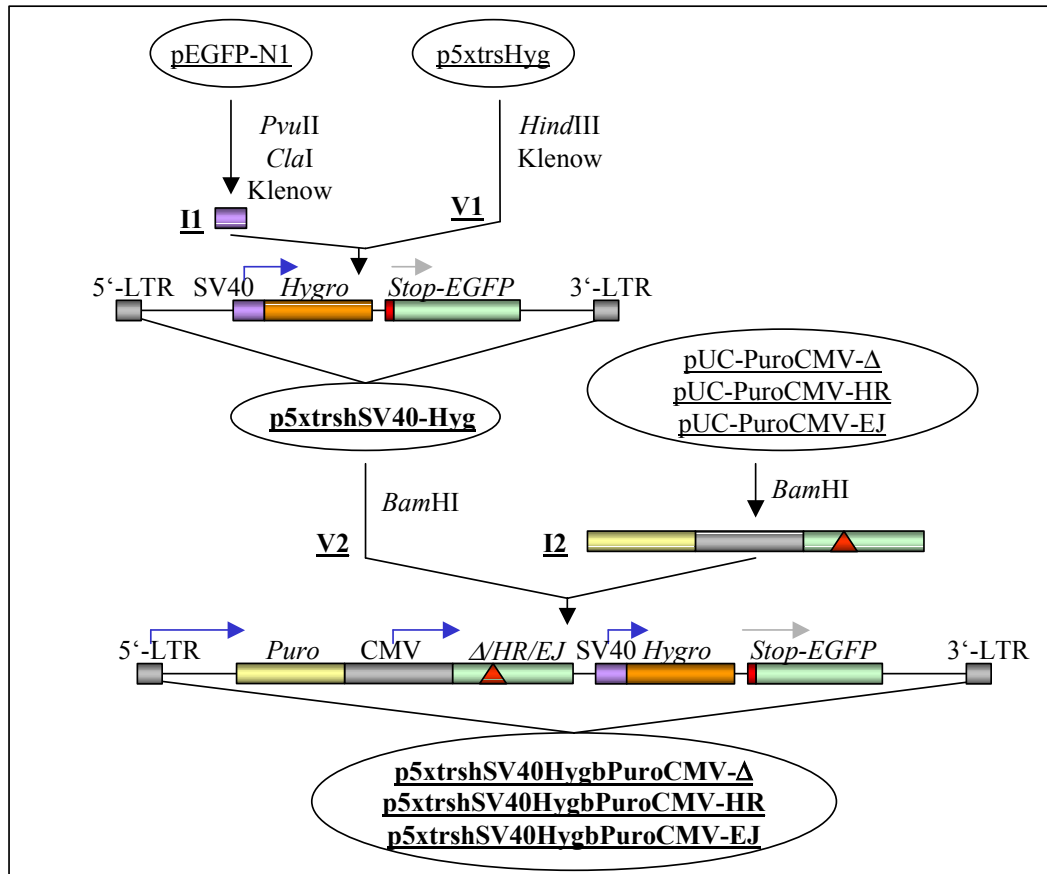


Abb. 23: Übersicht über die Klonierung der Vektoren p5xtrsSV40-Hyg und p5x.tr.sSV40-HygBpuroCMV-Δ/HR/EJ. Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen an und der graue die Lesrichtung im Donor-Gen in 5' zu 3' Richtung.

Anschließend wurden die drei Plasmide pUC-PuroCMV-Δ, -HR und -EJ (s. 4.1.3.1.3) mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* verdaut und die 2 kBp langen Fragmente, bestehend aus dem Puromycin-Resistenz-Gen, dem CMV-Promotor und einem der Rekombinationsakzeptoren Δ -, HR- oder EJ-EGFP isoliert (s. Abb. 23, I2). Parallel dazu wurde der Vektor p5xtrsSV40-Hyg mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* verdaut (s. Abb. 23, V2) und zur Klonierung der Vektoren p5xtrsSV40-HygBpuroCMV-Δ, p5xtrsSV40-HygBpuroCMV-HR bzw. p5xtrsSV40-HygBpuroCMV-EJ mit den oben beschriebenen 2 kBp langen Fragmenten ligiert.

4.1.4 Herstellung von Positiv-Kontrollplasmiden

Um Expression und Leuchtintensität von EGFP im Kontext der Rekombinationsvektoren zu testen und um Transfektionseffizienzen für Rekombinationsvektoren zu bestimmen, wurde das *wtEGFP*-Gen an Stelle des Rekombinationsakzeptors integriert. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen, dafür benötigten Klonierungsschritte erläutert.

4.1.4.1 Klonierung des Vektors p5bPuro-wtEGFP

Um die Leuchtstärke des EGFP-Proteins in Fusion mit der Puromycin-N-Acetyltransferase zu prüfen, wurde der Vektor pUC-Puro-wtEGFP hergestellt (s. Abb. 24). Hierfür wurde das kommerziell erhältliche Plasmid pEGFP-N1 (s. 3.1.7) mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* verdaut und das resultierende 725 Bp lange *EGFP*-cDNA-Fragment (s. Abb. 24, I1) mit dem Plasmid pUC-Puro-Δ (s. 4.1.2.2.1) nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* (s. Abb. 24, V1) ligiert.

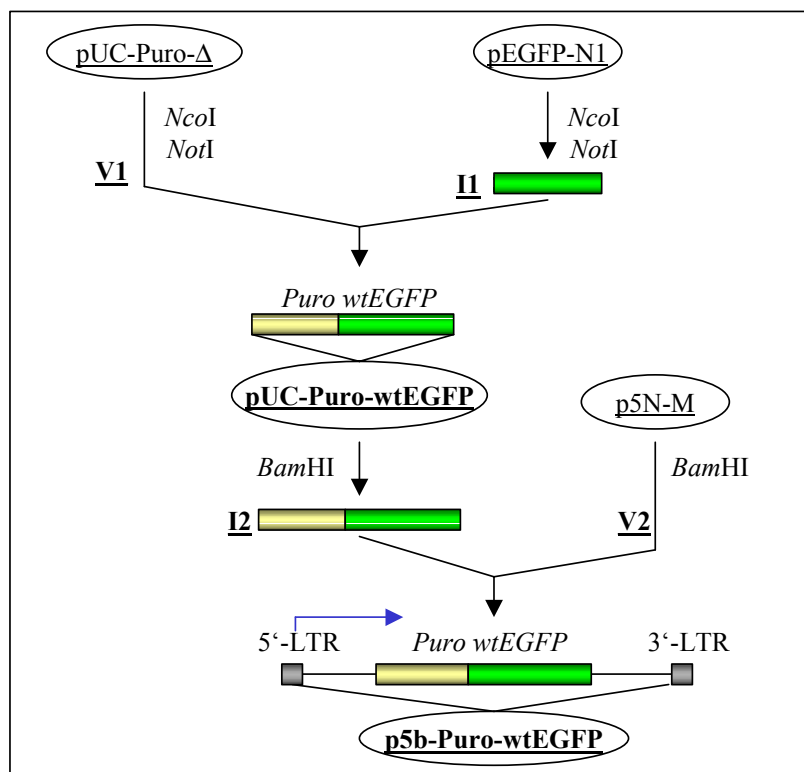


Abb. 24: Übersicht über die Klonierung des Vektors p5bPuro-wtEGFP. Der blaue Pfeil gibt die Transkriptionsrichtung in 5'- zu 3'-Richtung an.

Das Plasmid pUC-Puro-wtEGFP wurde mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* verdaut und das 1,3 kbp lange Fragment, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz-Gen* und der *wtEGFP*-cDNA (s. Abb. 24, I2) mit dem *BamHI* verdauten retroviralen Vektor p5N-M (s. Abb. 24, V2) ligiert, was in der Klonierung des Vektors p5bPuro-wtEGFP resultierte.

4.1.4.2 Klonierung der Vektoren p5xwtEGFP und p5nwtEGFP

Um die EGFP-Expression unter der Kontrolle des MPSV-5'-LTRs zu prüfen, wurden die Vektoren p5xwtEGFP und p5nwtEGFP erzeugt. Hierfür wurde das kommerziell erhältliche Plasmid pEGFP-N1 (s. 3.1.7) mit den Restriktionsendonukleasen *AgeI* und *NotI* verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt und das 0,7 kBp lange *wtEGFP*-cDNA-Fragment mit dem retroviralen Vektor p5N-M (s. 3.1.7) nach Restriktion mit *XhoI* (p5xwtEGFP) bzw. mit *NotI* (p5nwtEGFP) und nach Klenow-Fragment-Behandlung ligiert (s. Abb. 25).

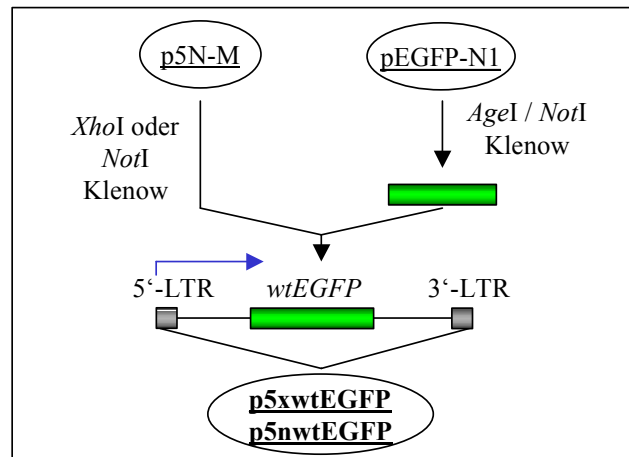


Abb. 25: Klonierung der Vektoren p5xwtEGFP und p5nwtEGFP. Der blaue Pfeil gibt die Transkriptionsrichtung an.

4.1.4.3 Klonierung des Vektors p5bPuro-CMV-wtEGFP

Um die *EGFP*-Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors im Kontext des retroviralen Vektors p5N-M (s. 3.1.7) zu prüfen, wurde der Vektor p5bPuro-CMVwtEGFP hergestellt (s. Abb. 26). Hierfür wurde das kommerziell erhältliche Plasmid pEGFP-N1 (s. 3.1.7) mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *NotI* verdaut und das 0,8 kBp lange *EGFP*-cDNA-Fragment (s. Abb. 26, I1) mit dem Plasmid pUC-PuroCMV-Δ (s. 4.1.3.1.3) nach Restriktion mit *XhoI* und *NotI* (s. Abb. 26, V1) ligiert, was in der Klonierung des Vektors pUC-PuroCMV-wtEGFP resultierte. Anschließend wurde das Plasmid pUC-PuroCMV-wtEGFP mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* verdaut und das 2 kBp lange Fragment, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz-Gen*, dem CMV-Promotor und der *wtEGFP*-cDNA (s. Abb. 26, I2) mit dem retroviralen Vektor p5N-M nach *BamHI*-Verdau (s. Abb. 26, V2) ligiert.

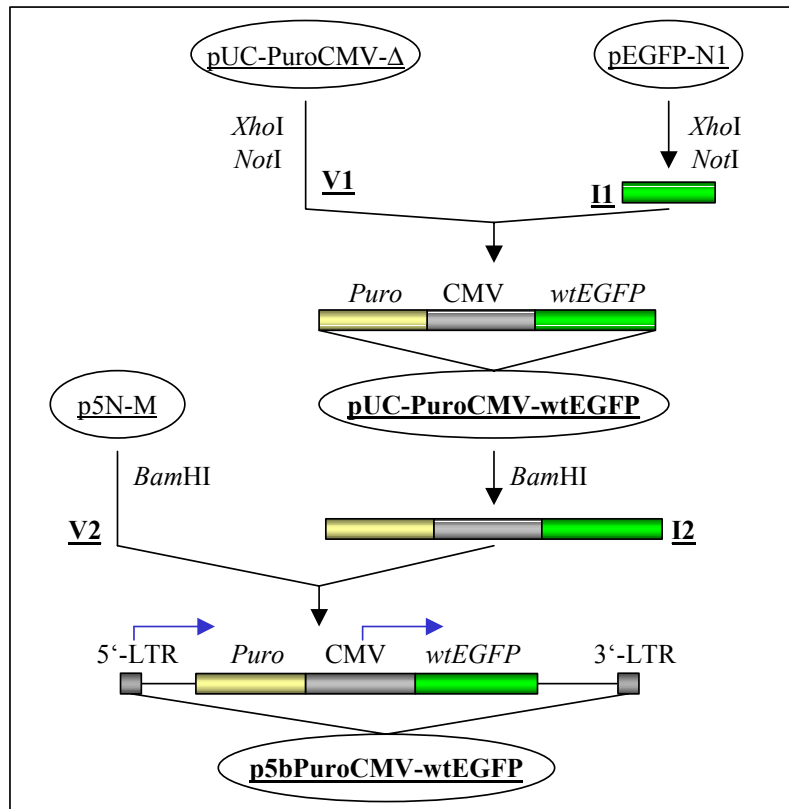


Abb. 26: Klonierung der Vektoren *pUC-PuroCMV-wtEGFP* und *p5bPuroCMV-wtEGFP*. Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen in 5'- zu 3'-Richtung an.

4.1.5 Herstellung von Negativ-Kontrollplasmiden und NHEJ-Plasmid

Rekombinationsvektoren mit nur einem der beiden mutierten *EGFP*-Gene als Rekombinationsakzeptor, also ohne Donor, wurden mit oder ohne Abstandhalter erzeugt, um sie für Negativ-Kontrollen bei der Rekombinationsratenbestimmung heranzuziehen. Für den Fall, dass an der Akzeptorposition das *EJ-EGFP*-Gen positioniert war, wurde der donorfreie Vektor nicht für Negativkontrollen sondern für NHEJ-Bestimmungen eingesetzt.

4.1.5.1 Klonierung der Negativ-Kontroll- bzw. NHEJ-Vektoren ohne Donor und ohne Abstandhalter

Die Plasmide *pUC-PuroCMV-Δ/-HR/-EJ* (s. 4.1.3.1.3) wurden mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* verdaut und die 2 kbp langen Fragmente, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz-Gen*, dem *CMV*-Promotor und einem der Rekombinationsakzeptoren *Δ*-, *HR*- oder *EJ-EGFP* mit dem *BamHI*-verdauten retroviralen Vektor *p5N-M* ligiert, sodass die Negativ-Kontrollvektoren *p5bPuroCMV-Δ* bzw. *p5bPuroCMV-HR* und der NHEJ-Vektor *p5bPuroCMV-EJ* generiert wurden (s. Abb. 27).

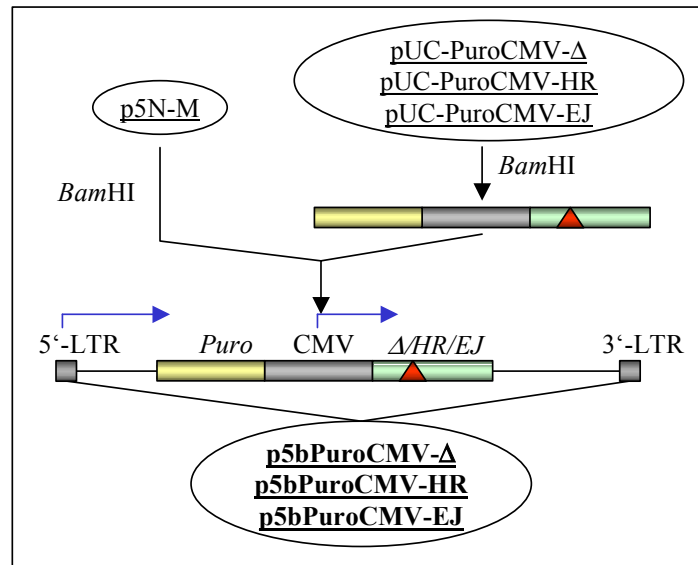


Abb. 27: Übersicht über die Klonierung der Vektoren p5bPuroCMV-Δ, p5bPuroCMV-HR und p5bPuroCMV-EJ. Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen der Proteine an.

4.1.5.2 Klonierung der Negativ-Kontroll- bzw. NHEJ-Vektoren ohne Donor und mit Abstandhalter

Der Vektor p5xEsGal4-I-SceI (s. 4.1.2.2.3.1) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nco*I verdaut, mit dem Klenow-Fragment behandelt und das 1,1 kBp lange Fragment, bestehend aus dem Gal4-Promotor und der *I-SceI*-cDNA (s. Abb. 28, I1) mit dem *Xho*I-verdauten und Klenow-Enzym-behandelten retroviralen Vektor p5N-M (s. Abb. 28, V1) ligiert, sodass der Vektor p5xGal4-I-SceI kreiert wurde. Parallel dazu wurden die Plasmide pUC-PuroCMV-Δ/-HR/-EJ (s. 4.1.3.1.3) mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI verdaut und die 2 kBp langen Fragmente, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz-Gen*, dem CMV-Promotor und einem der Rekombinationsakzeptoren Δ -, *HR*- oder *EJ-EGFP* (s. Abb. 28, I2) mit dem Vektor p5xGal4-I-SceI nach *Bam*HI-Verdau (s. Abb. 28, V2) ligiert. Auf diese Weise wurden die Rekombinationsvektor-Negativ-Kontrollplasmide p5xGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ bzw. p5xGal4-I-SceIbPuroCMV-HR und der NHEJ-Vektor p5xGal4-I-SceIbPuroCMV-EJ hergestellt. In diesen Vektoren verblieb *I-SceI*-Gen unter der Kontrolle des Gal4-Promotors an der Abstandhalterposition ohne nachfolgenden Donor.

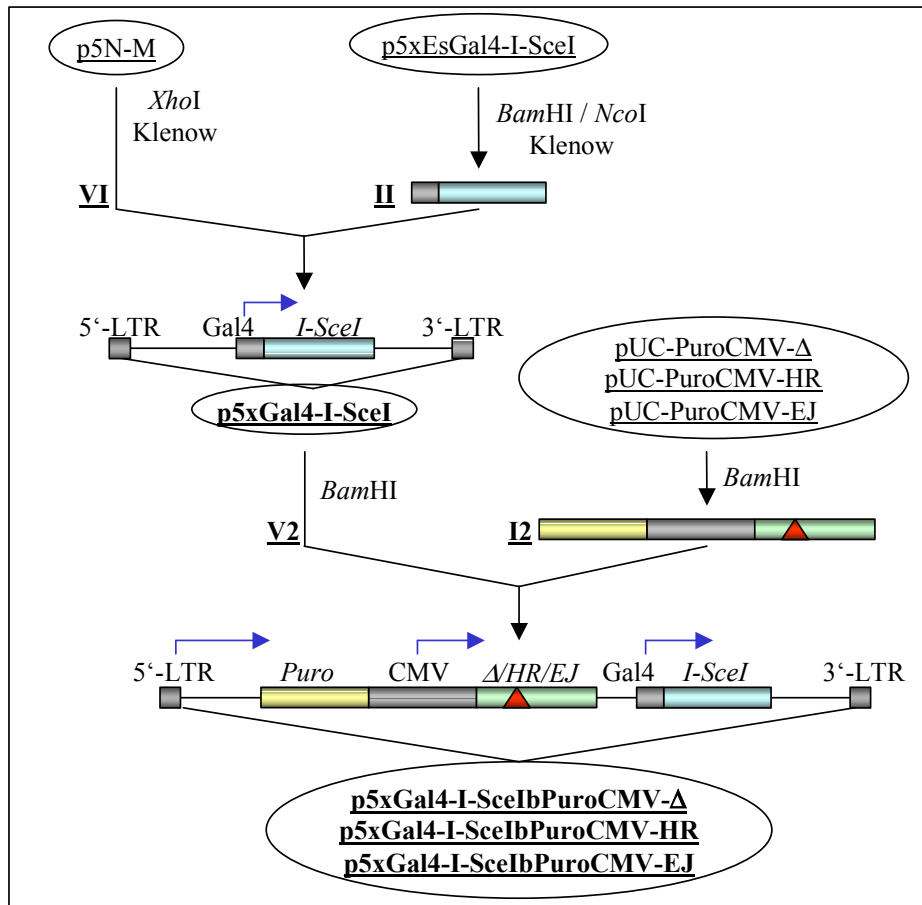


Abb. 28: Übersicht über die Klonierung der Vektoren p5xGal4-I-SceI und p5xGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ, p5xGal4-I-SceIbPuroCMV-HR und p5xGal4-I-SceIbPuroCMV-EJ. Die blauen Pfeile geben die Transkriptionsrichtungen in 5' zu 3' Richtung an.

4.2 Zellsysteme

4.2.1 Vorversuche

4.2.1.1 Feststellung der Selektionsbedingungen

Zur Isolierung von Klonen, die die transfizierte oder transduzierte DNA stabil in ihr zelluläres Genom integriert tragen, wurden in Vorversuchen die optimalen Selektionsbedingungen für die Zelllinien K562, TK6 und WTK1 ermittelt. Dafür wurden die drei Zelllinien mit G418, Hygromycin oder Puromycin in folgenden Konzentrationen in Weich-Agar kultiviert:

G418: 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 mg/ml,

Hygromycin: 0,6; 1,0; 5; 10; 20; 40 µg/ml,

Puromycin: 0,01; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 µg/ml.

Der Versuch wurde zweimal wiederholt und die Zellen jeweils zehn Tage lang beobachtet. Die Konzentrationen, bei denen die Zellen mindestens fünf bis sechs Tage überlebt und ein 16-32-Zellstadium (entsprechen 4-5 Zellteilungen) erreicht hatten, wurden als endgültige Selektionskonzentrationen gewählt. Die für K562, TK6 und WTK1 ermittelten Konzentrationen wurden in Tabelle 3 zusammengefasst.

Selektionsagens	Zelllinie		
	K562	TK6	WTK1
G418	1-1,2 mg/ml	0,4-0,5 mg/ml	0,6-0,8 mg/ml
Hygromycin	20 µg/ml	10-20 µg/ml	10-20 µg/ml
Puromycin	0,25 µg/ml	0,05 µg/ml	0,1 µg/ml

Tabelle 3: Konzentrationen von verschiedenen Selektionsagentien für die Zelllinien K562, TK6 und WTK1.

4.2.1.2 Auswahl der optimalen Transfektionsmethode

Um die optimale Transfektionsmethode zu ermitteln, wurden die Zelllinien HL60 und MethA in einem Vorversuch mit 10 µg pEGFP-N1 transfiziert bzw. ohne DNA gleichbehandelt. Die Transfektionseffizienz wurde 24 h nach Transfektion sowohl am Immunfluoreszenz-Mikroskop als auch am Durchflußzytometer ermittelt. Dabei wurde untersucht, welche der unter 3.2.2.3 (Material und Methoden) beschriebenen Transfektionsmethoden für die getesteten Zelllinien am effizientesten ist. Hierbei erwies sich die Elektroporationsmethode für Suspensionskultur-Zellen am geeignetsten, da durch alternative Methoden 0 % der Zellen transfiziert wurden. Zur Ermittlung der optimalen Elektroporationsbedingungen wurden die Zelllinien MethA, HL60, K562, TK6 und WTK1 bei 1050 µF und bei verschiedenen Stromstärken (200; 220; 240; 260; 280 und 300 V) elektroporiert. 24 h nach Elektroporation wurden die Transfektionseffizienzen am Durchflußzytometer (FACS-Calibur) im FL1-Kanal analysiert. Bei der Auswertung der Daten wurden die FL1-Histogramme der Zellen, die ohne DNA (Negativkontrolle) elektroporiert wurden, von denen, die mit dem Plasmid pEGFP-N1 transfiziert wurden, abgezogen und damit die Transfektionseffizienzen als relative Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen ermittelt. Die für die verschiedenen Zelllinien bei unterschiedlichen Stromstärken ermittelten Transfektionseffizienzen wurden in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Spannung (V)	Transfektionseffizienz (%)				
	MethA	HL60	K562	TK6	WTK1
200	2,67	2,93	34,21	41,43	49,98
220	5,45	8,7	39,79	43,59	59,81
240	11,27	15,67	53,83	52,72	66,81
260	16,1	41,26	51,92	53,17	74,58
280	25,75	41,57	48,97	61,26	72,43
300	18,98	31,29	28,79	51,56	64,33

Tabelle 4: Transfektionseffizienzen bei verschiedenen Spannungen. Pro Ansatz wurden 10000 elektroporierte Zellen im FL1-Kanal am FACS-Calibur analysiert. Die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen wurde mit Hilfe des Programms CellQuest ermittelt und in Prozent angegeben. Die Spannung, bei der für die jeweilige Zelllinie hohe Transfektionseffizienzen bei gleichzeitig hoher Vitalität gewährleistet wurde, wurde als optimale Elektroporationsbedingung gewählt und ist jeweils in der Tabelle als graues Feld hervorgehoben.

Als optimale Spannung für die Elektroporation wurde diejenige gewählt, bei der die transfizierten Zellen im Vergleich zu den nicht transfizierten sich morphologisch am wenigsten verändert hatten. Unter diesen Bedingungen starben ca. die Hälfte der transfizierten Zellen ab. Für weitere Versuche wurden die Zelllinien MethA und HL60 bei 260 Volt, K562 bei 240 Volt, TK6 und WTK1 bei 220 Volt und einer Kapazität von 1050 µF elektroporiert.

4.2.1.3 Bestimmung der Messsensitivität am Durchflußzytometer

Es wurde beschrieben, dass spontane Rekombinationsraten (10^{-5} - 10^{-8}) in embryonalen Stammzellen aus der Maus durch die Einführung eines DSBes infolge von I-SceI-Expression bis zu 120fach erhöht werden können (Donoho *et. al.*, 1998). In einem Vorversuch wurde hier getestet, ob entsprechende Rekombinationsraten als einzelne grünfluoreszierende Zellen innerhalb einer Population von nicht fluoreszierenden Zellen am Durchflußzytometer erfasst werden können. Zu diesem Zweck wurden die isogenen Zelllinien mkSA und mkSA-EGFP durch Trypsinierung geerntet und in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen bis zu 1:100000 (mkSA-EGFP:mkSA) verdünnt. Der Anteil an grünfluoreszierenden mkSA-EGFP-Zellen wurde anschließend am FACS-Calibur im FL1-Kanal (Filter für FITC) gemessen, wie in ausgewählten FL1-Histogrammen in Abb. 29 zu sehen ist. Bei der Analyse am Durchflußzytometer wurde zuerst die Zelllinie mkSA als Negativ-Kontrolle gemessen und die resultierende Gausskurve repräsentativ für die Eigenfluoreszenz der Zellen auf dem FL1-Histogramm ganz nach links gezogen. Zur Quantifizierung wurde auf dem FL1-Histogramm hinter der Eigenfluoreszenz-Gausskurve ein Marker (M1) gesetzt (s. Abb. 29) und die Daten durch das Programm CellQuest ausgewertet (s. Tab. 5).

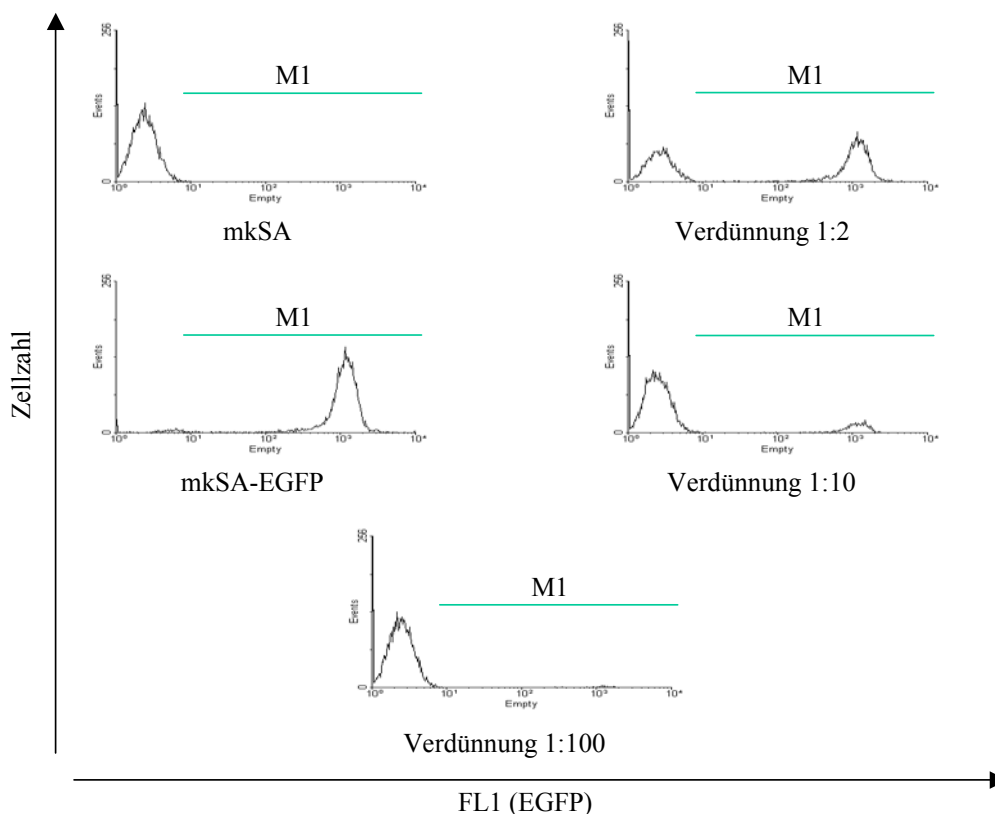


Abb. 29: FL1-Histogramme zur Verdünnungsreihe. Auf dieser Abbildung wurden FL1-Histogramme zu mkSA-, mkSA-EGFP-Zellen und drei Verdünnungen dargestellt. Auf der X-Achse der Diagramme wurden die FL1-Kanal-Werte (Fluoreszenzintensitäten) und auf der Y-Achse die Anzahl der Zellen aufgetragen. Grünleuchtende Zellen wurden über einen Markerbereich (M1) erfasst.

Zelltyp/Verdünnung	mkSA-EGFP-Anteil am FACS (%)
mkSA-EGFP	99,3
mkSA	0,1
1:2	55,4
1:10	11,44
1:30	4,21
1:100	1,08
1:300	0,41
1:1000	0,11
1:3000	0,05
1:10000	0,008
1:30000	0,006
1:100000	0,002

Tabelle 5: Bestimmung der Sensitivität am FACScan. mkSA- und mkSA-EGFP-Zellen wurden als Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle gemessen. Bei der Messung am Durchflußzytometer wurden bis zur Verdünnung von 1:3000 10000 Zellen und bei höheren Verdünnungen 50000 Zellen analysiert. In der rechten Spalte wurde die Anzahl der grünfluoreszierenden mkSA-EGFP-Zellen in Prozent (%) angegeben.

Die Auswertung der Daten zeigte, dass Rekombinationsraten mindestens bis zu einem Verhältnis von 10^{-5} in Form von grünfluoreszierenden Zellen am Durchflußzytometer analysiert werden können.

4.2.1.4 Etablierung der Elutriation von Leukämiezellen

Um Rekombinationsereignisse in Abhängigkeit vom Zellzyklusstadium in lebenden Zellen analysieren zu können, wurde die Trennung zyklisierender Zellen in Populationen unterschiedlicher Zellzyklusphasen mit Hilfe der Elutriationsmethode im Vorfeld etabliert.

Für diesen Versuch wurde die Leukämiezelllinie-HL60 in 500 ml-Spinner-Flaschen kultiviert und in einem Vorversuch 10^8 Zellen i) bei konstanter Rotor-Geschwindigkeit von 2000 rpm und einer Durchflußgeschwindigkeit von 4-20 ml/min und ii) bei konstanter Durchflußgeschwindigkeit von 35 ml/min und durch die schrittweise Erniedrigung der Rotor-Geschwindigkeit von 3000 rpm auf 1000 rpm elutriert. Anschließende PI-Färbung der Zellen (s. 3.2.2.10) und die durchflußzytometrische Analyse (s. 3.2.2.13) zeigten, dass die G1/G0- und die S-Phase Zellen bei konstanter Rotor-Geschwindigkeit von 2000 rpm besser getrennt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Um auch S- und G2/M-Phase-Zellen klar separieren zu können, wurde in einem weiteren Versuch das Elutriationsprotokoll verfeinert. Dafür wurden 10^8 HL60-Zellen bei der konstanten Rotor-Geschwindigkeit von 2000 rpm und einer Durchflußgeschwindigkeit von 2-4 ml/min in die Elutriationskammer gepumpt. Nach 10-15 min Ruhepause wurden die Zellen durch die schrittweise Erhöhung der Durchflusgeschwindigkeit von 8 ml/min auf 30 ml/min langsam aus der Kammer hinausgespült. Es wurden 21 Fraktionen mit jeweils

50 ml Zellsuspension gesammelt und die Zellen nach PI-Färbung am Durchflußzytometer analysiert. Zur Standardisierung diente das Zellzyklusphasen-Profil von zyklisierenden HL60-Zellen und das Profil von HL60-Zellen 24 h nach Bestrahlung mit 100 Rad, da diese in G2/M akkumulieren (s. Abb. 30).

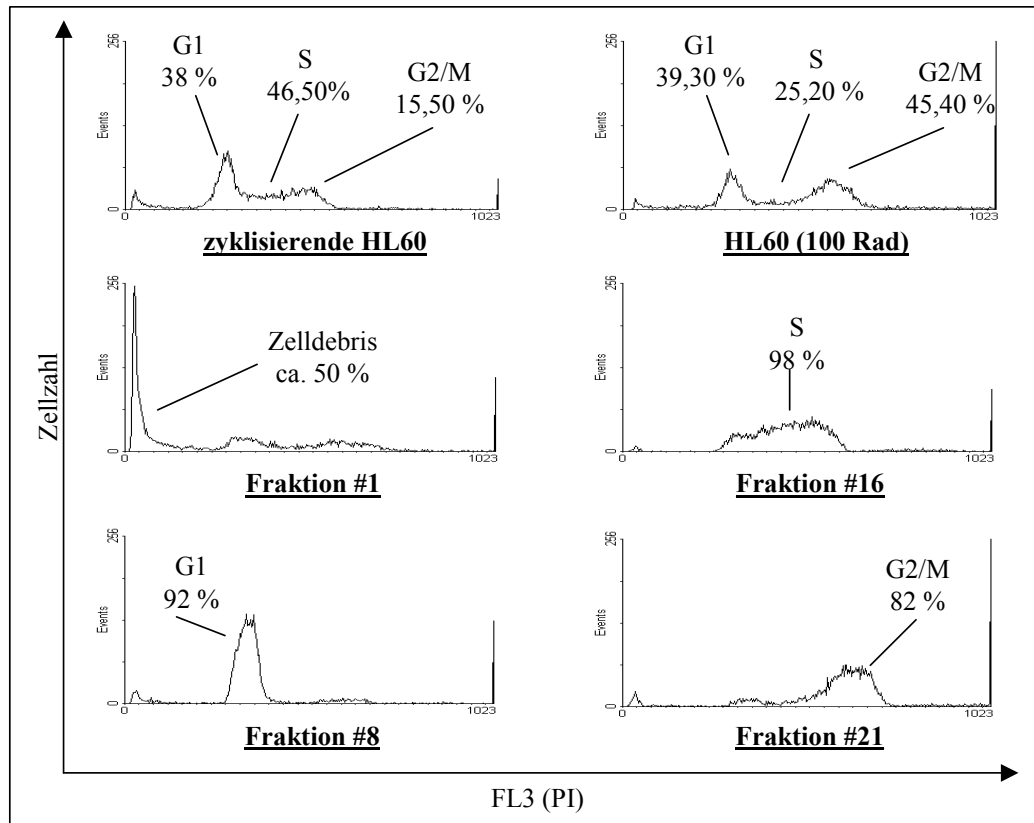


Abb. 30: FL1-Histogramme zu den elutrierten HL60-Zellen. Unbestrahlte und bestrahlte HL60-Zellen wurden nach PI-Färbung als Standards zur Zuordnung der Zellzyklusphasenpeaks gemessen. Gezeigt sind die Fraktionen, bei denen die jeweilige Zellzyklusphase am stärksten angereichert war. Bei der Analyse wurde der erste Peak als G1 und der zweite als G2/M identifiziert und der Bereich zwischen den beiden Peaks als S-Phase ausgewertet. Auf der X-Achse der Diagramme wurden die FL3-Werte (Fluoreszenzintensität) und auf der Y-Achse die Zellzahlen angegeben.

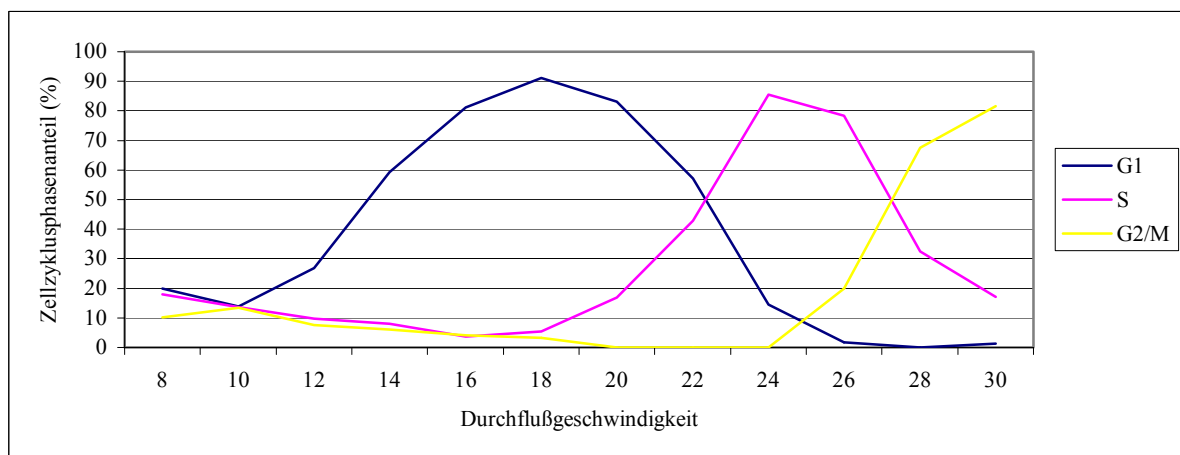


Abb. 31: Übersichtsdiagramm zu den elutrierten HL60-Zellen. Die Zellzyklusphasenanteile der HL60, die bei den unterschiedlichen Durchflußraten gesammelt wurden, wurden auf der X-Achse aufgetragen. Zwischen Durchflußgeschwindigkeiten von 14 ml/min und 30 ml/min wurden je zwei 50 ml Fraktionen gesammelt und diese getrennt analysiert. Die durch das Programm „ModFit“ errechneten Zellzyklusphasenanteile (G1, S, G2/M) wurden in Prozent angegeben.

Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen mit PI gefärbt und pro Ansatz 10000 Zellen in den FL2- (logarithmisch) und FL3-Kanälen (linear) des FACS-Calibur analysiert. Zuerst wurden als Standard zyklisierende Zellen gemessen und die resultierenden Verteilungsmuster in die Mitte der FL2- bzw. FL3-Histogramme gezogen. Anschließend wurden bestrahlte Zellen und elutrierte Zellpopulationen unter Beibehaltung dieses Auswertefensters gemessen und Zellzyklusphasenanteile mit Hilfe der Software „ModFit“ errechnet (s. Abb. 30).

In Abb. 31 ist die Anreicherung der Zellpopulationen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen sehr gut nachvollziehbar. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass für die Zelllinie HL60 eine saubere Trennung in verschiedene Zellzyklusphasen durch Elutriation möglich ist.

4.2.1.5 Verbesserung der retroviralen Transduktionseffizienz

Um die Transduktionseffizienz der rekombinanten Retroviren, die von der Helferzelllinie-GaMV6 produziert und in das Medium abgegeben werden, zu steigern, wurde die adhärent wachsende Standardzelllinie MethA mit dem Retrovirus enthaltenden Überstand der GaMV6-Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen behandelt, und die Transduktionseffizienzen als G418 Transfer Units (GTU) bestimmt. Hierfür wurde 14 Tage mit G418 selektioniert und anschließend die Anzahl der Kolonien in den einzelnen Löchern der 24-Loch Platte ausgezählt.

GTU/ml	6 Wochen	3 Wochen
Überstand	0	263
Lipofektamin	20	1153
Polybren	0	130
Lipo+Polybren	5	0

Tabelle 6: Bestimmung der GTU-Werte für Retroviren-Überstände. Die Anzahl der Kolonien pro Loch und Verdünnung aus den Infektionen mit Virusüberständen aus sechs bzw. drei Wochen passagierten Helferzellen GaMV6 wurden ausgezählt. Die GTU-Werte zu den infektiösen Überständen wurden errechnet und die Ergebnisse zusammengefasst. Lipo: Lipofektamin.

Um die optimalen Produktionsbedingungen zu ermitteln, wurden drei und sechs Wochen alte GaMV6-Zellen miteinander verglichen. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Zugabe von Lipofektamin (4 µg/ml) und/oder Polybren (8 µg/ml) eine Veränderung der Transduktionseffizienz zur Folge hat. In Tabelle 6 wurden die errechneten GTU-Werte zusammengefasst.

Zusammenfassend liess sich beobachten, dass die Transduktionseffizienz, ausgedrückt in GTU/ml, der GaMV6-Zell-Überstände höher lag, wenn die Helferzelllinie frisch aufgetaut

war. Die Zugabe von Lipofektamin hatte eine vierfache Erhöhung, jedoch die Zugabe von Polybren eine Verringerung zur Folge.

4.2.2 Etablierung eines Zellsystems zur Expression von Proteinen in Abhängigkeit von Östradiol

Um die Möglichkeit zu schaffen, dass bestimmte Proteine zu einem gewünschten Zeitpunkt, also induzierbar, exprimiert werden, wurde ein von Östradiol abhängiges Expressions-System ausgenutzt. Dies erschien wichtig für die Expression der Meganuklease *I-SceI* um Rekombination gezielt initiieren zu können, und für die Expression von p53, um Wachstumshemmung bis zur Analyse zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurden die kodierenden Gene für *I-SceI*, humanes *wtp53*, *p53(138V)* und *EGFP* in den pGC-Vektor hinter den Gal4-Promotor kloniert (s. 4.1.1, Braselmann *et al.*, 1993). Parallel dazu wurde ein Expressionsplasmid (pMV-GalERVP) für den östradiol-abhängigen Transkriptionsfaktor GalERVP (Braselmann *et al.*, 1993) stabil ins Genom verschiedener Zelllinien integriert und dadurch die konstitutive GalERVP-Expression ermöglicht. Im folgenden Abschnitt wird die Etablierung entsprechender Zelllinien ausführlicher beschrieben.

4.2.2.1 Zelllinien zur konstitutiven Expression des Transkriptionsfaktors GalERVP

Zur konstitutiven Expression des Transkriptionsfaktors GalERVP wurden die Zelllinien K562, TK6 und WTK1 zunächst mit dem retroviralen Virusüberstand der Helferzelllinie GaMV6 infiziert. Da trotz dreifachen Versuchs nach 14tägiger Selektion in G418 weder bei Weich-Agar- (s. 3.2.2.7.2) noch bei Einzelzellklonierung (s. 3.2.2.7.2) klonales Wachstum beobachtet werden konnte, wurden die Zelllinien mit dem retroviralen Vektor pMV-GalERVP direkt elektroporiert. So konnten Klone der Zelllinien K562, TK6 und WTK1 isoliert werden, in welchen der GalERVP-Expressionsvektor ins Genom integriert worden war. Es wurden:

- 19 **KMV** Klone (K562 transfiziert mit pMV-GalERVP) mittels Weich-Agar-Klonierung (s. 3.2.2.7.2) und
- 35 **TMV** Klone (TK6 transfiziert mit pMV-GalERVP) bzw.
- 32 **WMV** Klone (WTK1 transfiziert mit pMV-GalERVP) mittels Einzelzellklonierung (s. 3.2.2.7.2) isoliert.

Um zu verifizieren, dass die G418-resistenten Klone auch den Transkriptionsfaktor GalERVP exprimieren, wurden die Klone in transienten Reporter-Gen-Assays getestet, indem sie mit einem der Plasmide, welche ein *CAT*-, *p53*- oder *EGFP*-Gen unter der Kontrolle des Gal4-

Promotors beinhalten, transfiziert und die Expression der entsprechenden Proteine nachgewiesen wurden.

4.2.2.1.1 Nachweis der GalERVP-Aktivität über Western-Blot-Analyse

Um die transkriptionelle Aktivität von GalERVP in den isolierten Klonen nachzuweisen, wurden Zellen der Einzelzellklone zunächst mit pCAT-4 (erlaubt die CAT-Expression unter der Kontrolle des Gal4-Promotors) elektroporiert und anschließend das *Reporter*-Molekül CAT im CAT-ELISA (s. 3.2.2.4) nachgewiesen. Da jedoch im Vergleich zur elterlichen Zelllinie keine bis sehr geringe Unterschiede in der CAT-Expression beobachtet werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurden im nächsten Schritt Reporter-Moleküle im Western-Blot nachgewiesen.

So wurden KMV-Klone (p53^{-/-}) und die elterliche Zelllinie K562 (p53^{-/-}, GalERVP-Negativ-Kontrolle) mit je 10 µg des Plasmids wtp53 in pGC (s. 4.1.1.3) elektroporiert. Die Elektroporationsansätze wurden auf zwei 6 cm-Platten verteilt, sodass in jeweils der Hälfte jedes Ansatzes nach Elektroporation durch die Zugabe von 2 µM Östradiol GalERVP aktiviert werden konnte. Die induzierten und uninduzierten Zellen wurden anschließend geerntet und die östradiol-abhängige Expression des Proteins p53 durch Western-Blot-Analyse getestet (s. 3.2.3.6, s. Abb. 32).

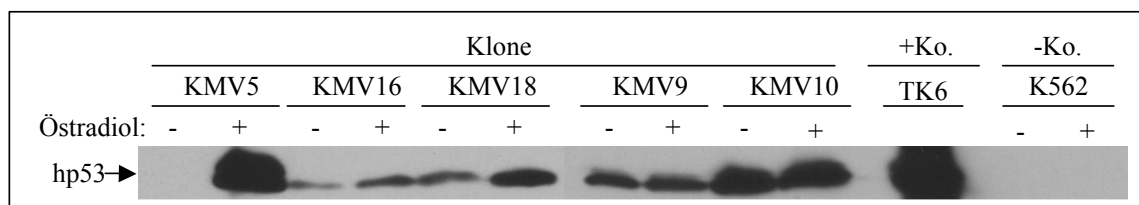


Abb.32: Western-Blot-Analyse zum Nachweis der stabilen Expression des Transkriptionsfaktors GalERVP. Die für 24 h mit Östradiol induzierten (+) und uninduzierten (-) Proben wurden im 10%igen SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt, elektrotransferiert und die p53-Banden mit dem primären Antikörper DO1 detektiert. TK6-Totallysat wurde als Positiv-Kontrolle (+Ko.) und mit wtp53 in pGC transfizierte K562-Zellen als Negativ-Kontrolle (-Ko.) für die p53-Expression aufgetragen.

Im Gegensatz zum kommerziell erhältlichen CAT-ELISA wurde durch Western-Blot-Analyse eindeutig gezeigt, dass p53 nur in den isolierten Klonen exprimiert wird und dass der Klon KMV5 eine sehr hohe Expression nach Induktion und extrem geringe Expression in Abwesenheit von Östradiol erlaubt. Darüberhinaus bewahrte Klon KMV5 seine Induzierbarkeit über Monate in Kultur, weshalb er für die weiteren Versuche ausgewählt wurde.

4.2.2.1.3 Nachweis der GalERVP-Aktivität über EGFP-Fluoreszenz

Da TK6 und WTK1-Zellen endogen wtp53 bzw. p53(273I) exprimieren, wurde der Nachweis der GalERVP-Aktivität in den TMV- und WMV-Klonen über EGFP-Expression am FACScan bestimmt. Dafür wurden die Zelllinien K562, TK6, WTK1, der Klon KMV5, und unterschiedliche TMV- bzw. WMV-Klone mit je 10 µg des Plasmids EGFP in pGC (Klonierung s. 4.1.1.1) elektroporiert. Die Ansätze wurden auf zwei Platten verteilt und 24 h nach Transfektion die Hälfte durch Zugabe von 2 µM Östradiol induziert. 24 h nach der Induktion wurde die EGFP-Expression in induzierten und uninduzierten Zellen am FACS-Durchflußzytometer gemessen. Dabei wurden die elterlichen Zelllinien K562, TK6 und WTK1 als Negativ-Kontrollen und der Klon KMV5 als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Die Transfektionseffizienz wurde parallel dazu durch Elektroporation der elterlichen Zelllinien mit 10 µg des kommerziell erhältlichen Plasmids pEGFP-N1 ermittelt.

Zu Beginn der Analyse am FACS-Calibur wurde mit Hilfe der Negativ-Kontrollen die Eigenfluoreszenz der Zellen in Form einer Gausskurve im FL1-Histogramm identifiziert und diese Kurve ganz nach links auf der X-Achse gezogen. Ab der abfallenden Schulter der Gausskurve wurde dann der Intensitätsbereich für grünfluoreszierende Zellen per Marker (M1) definiert und für die weiteren Analyse der Proben angewandt. Pro Ansatz wurden 10000 Zellen untersucht und der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen mit Hilfe des Programms CellQuest oder WinMDI 2,8 automatisch errechnet. In Abb. 33 sind die FL1-Histogramme zu repräsentativen Klonen mit den dazugehörigen Kontrollen gezeigt. Die Kontrollen wurden repräsentativ nur für WTK1 gezeigt (Transfektion ohne DNA oder mit pEGFP-N1), weil für TK6 vergleichbare Expression des Reporter-Gens nachgewiesen wurde.

Mit dieser Methode wurde bestätigt, dass der Klon KMV5 die Expression unter der Kontrolle eines Gal4-Promotors mit deutlichem Induktionseffekt (vierfach) unterstützt. Leider zeigte keiner der getesteten TMV-Klone von GalERVP abhängige Expression des Transgens. WMV-Klone zeigten im Durchschnitt nur eine 1,4fache Expressionssteigerung in Abhängigkeit von Östradiol, wobei die elterliche Zelllinie WTK1 im Grünfluoreszenz-Bereich Fluoreszenz aufwies und somit ein ungünstiges Signal/Rausch-Verhältnis vorlag. Aus diesen Gründen wurden TMV- und WMV Klone nicht für weitere Bestrebungen zur Etablierung induzierbarer Zellklone verwendet.

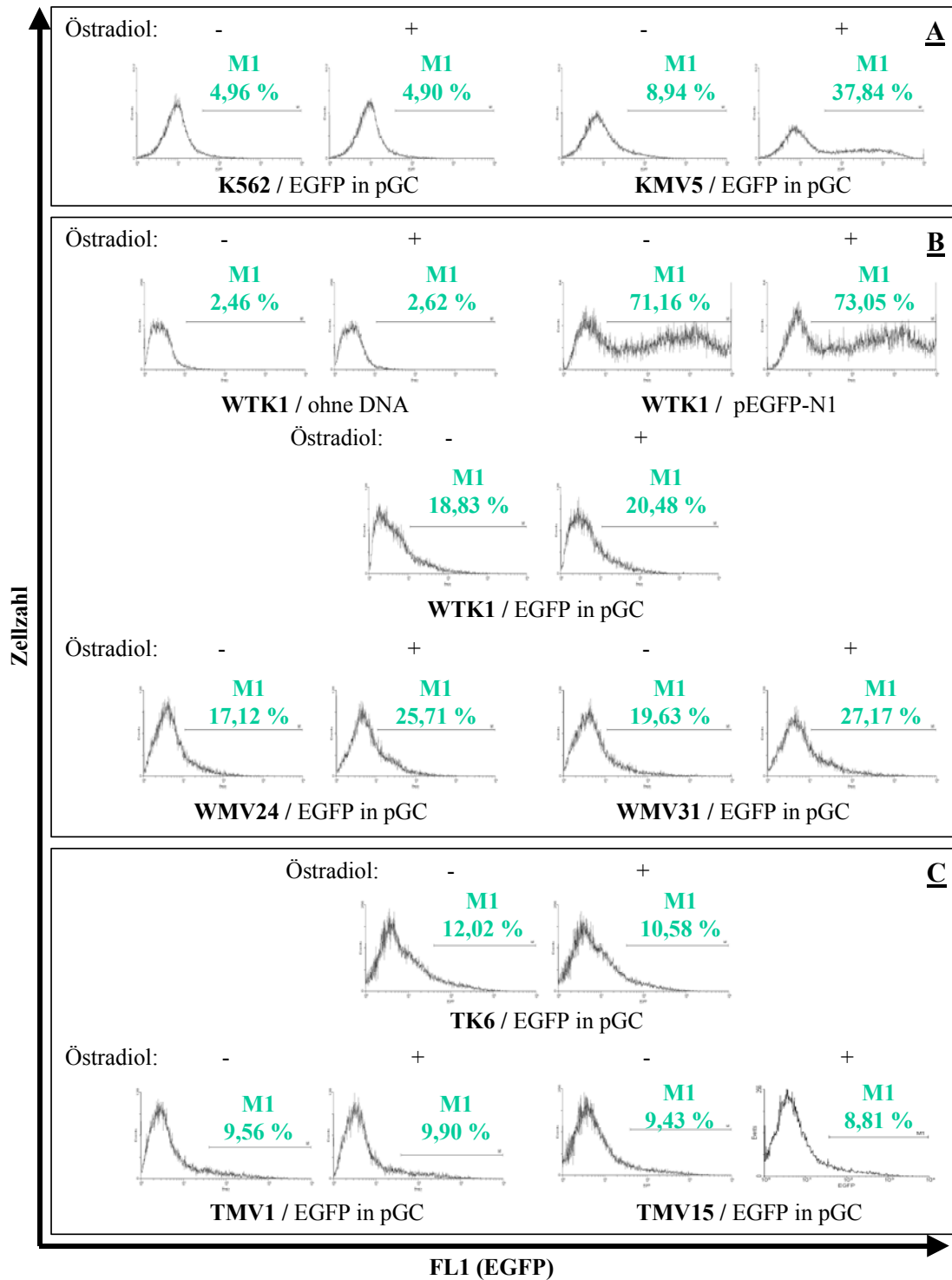


Abb. 33: FL1-Histogramme zu den verschiedenen Zelllinien. A: K562 und KMV5, B: TK6, TMV1 und TMV15 und C: WTK1, WMV24 und WMV31, die nach Elektroporation mit dem Plasmid EGFP in pGC mit (+) oder ohne (-) Östradiol inkubiert wurden. Zusätzlich gezeigt sind FL1-Histogramme zu WTK1-Zellen, die ohne DNA (Negativ-Kontrolle) bzw. mit pEGFP-N1 (Positiv-Kontrolle) behandelt wurden (B). Im M1-Bereich wurden grünfluoreszierende Zellen quantifiziert und als prozentuale Anteile der Gesamtzellzahl angegeben. Auf der X-Achse der Diagramme sind FL1-Werte und auf der Y-Achse die Zellzahlen eingetragen.

4.2.3 Zelluläre Verteilung von ektopisch exprimierter Meganuklease I-SceI

Um sicherzustellen, dass I-SceI nach Expression in den von uns eingesetzten menschlichen Zellen in den Kern importiert wird, wurde die Zelllinie K562 mit 10 µg des Plasmids pCMV-I-SceI bzw. ohne DNA elektroporiert. Nach Inkubation bei 37 °C für 24 h und anschließender Zellfraktionierung (s. 3.2.3.2) wurden die Zellen für die Western-Blot-Analyse geerntet (s. 3.2.3.6). Die Proteine wurden im 15%igen SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und I-SceI mit Hilfe des Primär-Antikörpers antiHA-tag detektiert. In Abb. 34 wurde die dazu-gehörige Western-Blot-Analyse gezeigt.

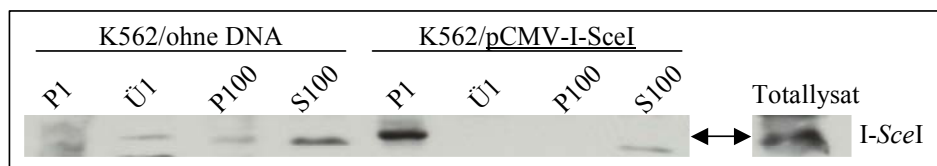


Abb. 34.: Western-Blot-Analyse zur I-SceI-Verteilung in K562-Zellen. Totallysat von mit pCMV-I-SceI transfizierten K562-Zellen wurden als Kontrolle aufgetragen. P1: Kernfraktion, Ü1: Überstand des zweiten Waschschrittes zur Kernfraktion, P100: Partikuläre zytoplasmatische Fraktion, S100: Lösliche zytoplasmatische Fraktion. Als Größenstandard wurde der Marker 7B benutzt.

Durch dieses Fraktionierungsexperiment und anschließende Western-Blot-Analyse wurde eindeutig gezeigt, dass das Protein I-SceI in K562-Zellen ausschließlich im Kern zu finden ist.

4.2.4 Etablierung eines zellulären Test-Systems zur Bestimmung von Rekombinationsraten

Um Rekombinationsereignisse an den unter 4.1 generierten Substraten im chromosomalen Kontext untersuchen zu können, wurden K562-Zellen in drei getrennten Ansätzen mit je 10 µg der retroviralen Rekombinationsvektoren (s. Abb. 35):

p5xEsGal4-I-SceIbPuro-Δ,

p5xEhI-SceIRESwtp53Gal4bPuro-Δ und

p5xEhI-SceIRESp53(138V)Gal4bPuro-Δ elektroporiert.

14 Tage nach Selektion mit Puromycin (s. Tab. 3) in Weich-Agar (s. 3.2.2.7.2) wurden pro Transfektionsansatz 10 Klone isoliert. Die östradiol-abhängige Expression der Proteine I-SceI, wtp53 oder p53(138V) und damit die Integration des transfizierten Rekombinationsvektors wurde durch die Western-Blot-Analyse nachgewiesen.

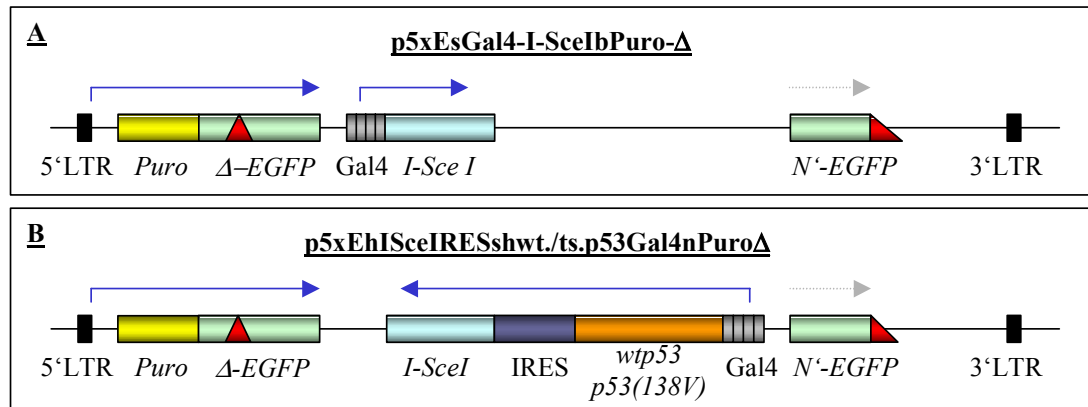


Abb. 35.: Schematische Darstellung der retroviralen Rekombinationsvektoren. A: p5xEsGal4-I-SceIbPuro-Δ. B: p5xEhI-SceIRESshwt./ts.p53Gal4nPuroΔ und p5xEhI-SceIRESsp53(138V)Gal4-bPuro-Δ. Blaue Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung an, der graue gestrichelte Pfeil die Orientierung der N'-EGFP-cDNA in 5' zu 3' Richtung. Puro: Puromycin-Resistenz-Gen. Δ-EGFP: Rekombinationsakzeptor. Gal4: Gal4-Promotor. IRES: internal ribosomal entry site. N'-EGFP: Rekombinationsdonor.

4.2.4.1 Nachweis der Transgen-Expression nach genomischer Integration des retroviralen Rekombinationsvektors

Um die Funktionalität der Expressionskassetten von stabil ins Genom integrierten Rekombinationsvektoren in isolierten Klone nachzuweisen, wurde die GalERVP-Aktivität in den Klonen mit Östradiol induziert und die Expression der nachgeschalteten Proteine I-SceI, des humanen wtp53 bzw. p53(138V) durch Western-Blot-Analyse (s. 3.2.3.6) bestätigt.

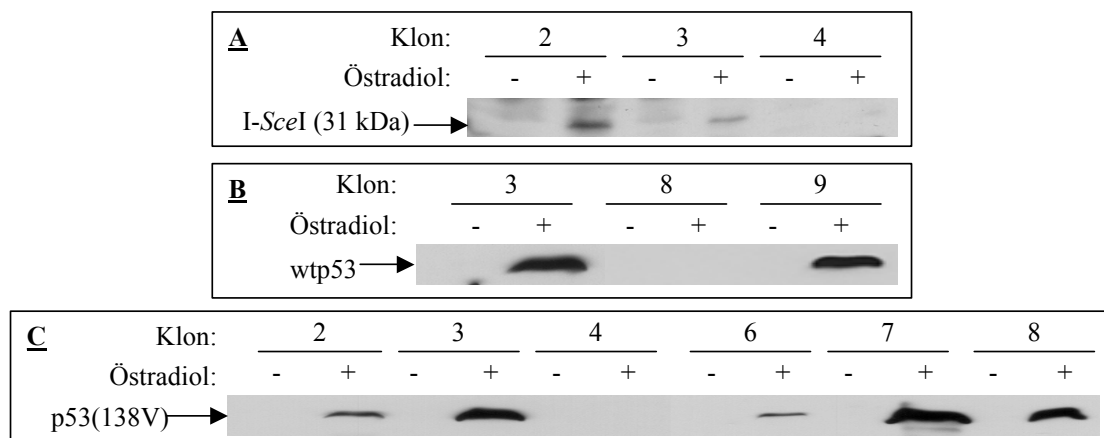


Abb. 36.: Western-Blot-Analyse der KLV5-Klone mit stabil integriertem Rekombinationsvektor. Gezeigt sind in A: die positiven Klone I-SceI-Δ2 und -Δ3 und der negative Klon -Δ4, die nach Transfektion mit dem Plasmid p5xEsGal4-I-SceIbPuro-Δ isoliert wurden, B: die positiven Klone hwtp53-Δ3 und -Δ9 und der negative Klon -Δ8, die nach Transfektion mit dem Plasmid p5xEhI-SceIRESshwt./ts.p53Gal4nPuroΔ isoliert wurden, C: die positiven Klone p53(138V)-Δ2, -Δ3, -Δ7 und -Δ8 und der negative Klon -Δ4, die nach Transfektion mit dem Plasmid p5xEhI-SceIRESsp53(138V)Gal4bPuro-Δ isoliert wurden.

Zur Detektion von I-SceI, von wtp53 und von p53(138V) wurden die Klone mit bzw. ohne Östradiol (2 μM) für 24 h inkubiert und anschließend für die Western-Blot-Analyse geerntet. Nach elektrophoretischer Trennung der Proteine in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel und

Membrantransfer wurde die Lage des wtp53 bzw. p53(138V) mit Hilfe des Primär-Antikörpers DO1 und die des I-SceI mit antiHA-tag detektiert (s. Abb. 36).

In den mit den Vektoren p5xEhI-SceIRESswtp53Gal4bPuro-Δ und p5xEhI-SceIRESsp53(138V)Gal4bPuro-Δ (s. 4.1.2.2.3.2.2) transfizierten Klonen (wtp53-Δ9 und p53(138V)-Δ3) wurde trotz klarer wtp53- bzw. p53(138V)-Expression keine I-SceI-Expression nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Auch nach Immunpräzipitation (s. 3.2.3.2) mit ungekoppelter oder mit antiHA-tag gekoppelter Affinitätsmatrix und Western-Blot-Analyse konnte keine I-SceI-Expression demonstriert werden. Da auch in KMV5-Zellen, die mit den Plasmiden wtp53IRES-I-SceI in pGC und p53(138V)IRES-I-SceI in pGC (s. 4.1.1.4) transient transfiziert und für 24 h mit und ohne Östradiol (2 μM) inkubiert worden waren, I-SceI nicht nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), muss davon ausgegangen werden, dass beim hier angewandten Vektordesign eine effiziente Translationsinitiation im IRES-Element nicht möglich war.

Insgesamt wurden durch die Klonierung zwei I-SceI, zwei wtp53 und fünf p53(138V) exprimierende und durch Östradiol in der Expression induzierbare Klone gesichert.

4.2.4.1.1 Transkriptionelle Transaktivierung durch p53

Zur näheren Charakterisierung der unter 4.2.4.1 als p53-positiv identifizierten Klone wurde das ektopisch exprimierte wtp53 auf seine Transaktivierungsfunktion gegenüber den klassischen Zielgenen *p21* und *MDM2* (Levine, 1997) hin untersucht. Für dieses Experiment wurden die Zelllinie K562, der GalERVP-exprimierende Klon KMV5 und die davon abgeleiteten Klone I-SceI-Δ2, wtp53-Δ9 und p53(138V)-Δ3 jeweils mit und ohne Östradiol (2 μM) behandelt und für 24 h bei 30 °C bzw. 39 °C inkubiert.

Die Western-Blot-Analyse bestätigte, dass die p53-Expression von Östradiol abhängig ist (s. Abb. 37). In Übereinstimmung mit publizierten Daten ließ sich außerdem ablesen, dass die Expressionsraten von MDM2 und p21 bei 30 °C in KMV5-Zellen und abgeleiteten Klonen unabhängig von p53 sind, also MDM2 und p21 bereits durch die Zugabe von Östradiol hochreguliert wurden (Karlson *et al.*, 1997). Bei 39 °C konnte hingegen eine von wtp53 abhängige Expression des Proteins p21 eindeutig nachgewiesen werden. Eine von wtp53 abhängige MDM2-Expression bei 39 °C war demgegenüber weniger eindeutig nachweisbar.

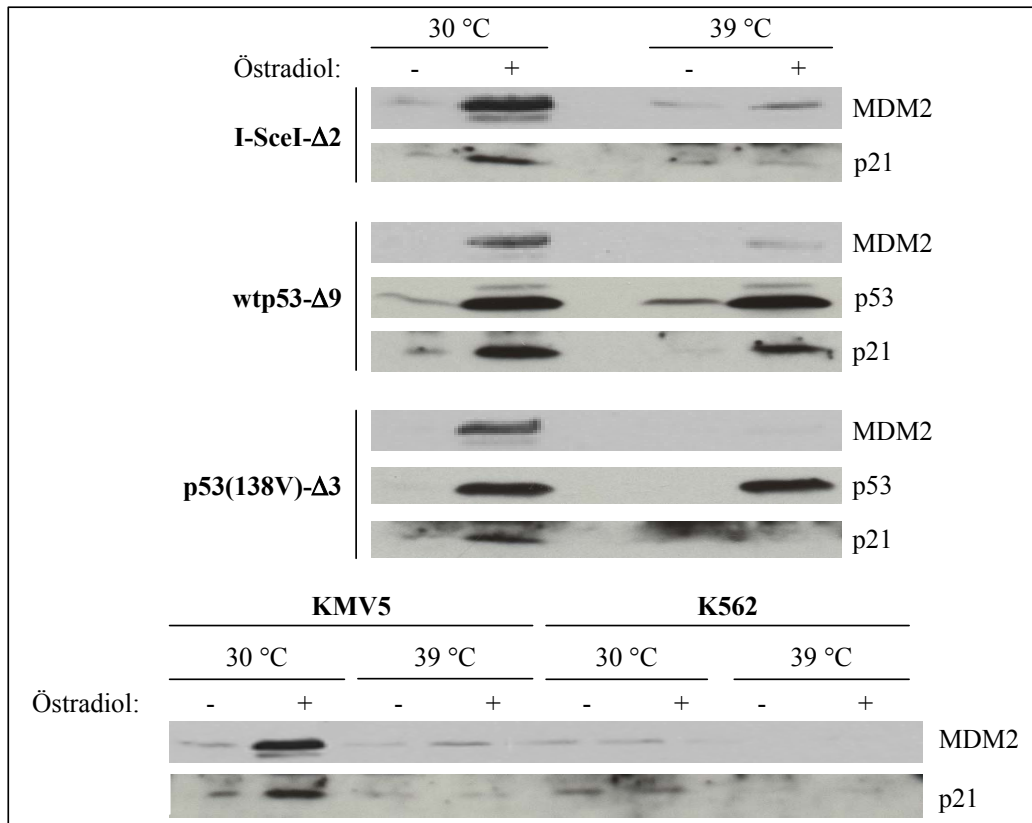


Abb. 37: Western-Blot-Analyse zu den Klonen I-SceI-Δ2, wtp53-Δ9 und p53(138V)-Δ3 nach Kultivierung mit (+) oder ohne (-) Östradiol bei der entsprechenden Temperatur. Nach elektrophoretischer Trennung der Proteine in einem 15%igen SDS-PAGE-Gel und Membrantransfer wurde jeder Blot in drei horizontale Teile geschnitten, so dass die MDM2- (110 kDa), p21- (21 kDa) und p53-Banden (53 kDa) getrennt wurden (Orientierung nach Proteinmarker 7B). Zum Nachweis von MDM2, p21 bzw. p53 wurden die Blot-Streifen mit den Primär-Antikörpern anti-hMDM2, anti-hp21(WAF-1) bzw. DO1 (s. 3.1.6) inkubiert.

4.2.4.1.2 Bestimmung der minimalen Östradiol-Konzentration für die GalERVP-Aktivität

Für einige Zellen wurde beschrieben, dass die Zugabe von Östradiol in mikromolaren Konzentrationen zum Zellzyklusarrest führen kann (Karlson *et al.*, 1997). Obwohl für die Zelllinie K562 und den Klon KMV5 im Rahmen dieses Projekts keine Wachstumsveränderungen nach der Zugabe von Östradiol nachgewiesen wurden, sollte diese Gefahr minimiert werden, indem für Analysen mit den Klonen I-SceI-Δ2, wtp53-Δ9 und p53(138V)-Δ3 die minimalen Östradiol-Konzentrationen bestimmt wurden.

Für diesen Versuch wurden pro Klon jeweils 10^6 Zellen/Platte mit 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 und 0,05 μ M Östradiol behandelt und je ein Ansatz als Negativ-Kontrolle unbehandelt belassen. Die Zellen wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert und die Expression der Proteine I-SceI bzw. p53 durch Western-Blot-Analyse wie oben beschrieben geprüft (s. Abb. 38).

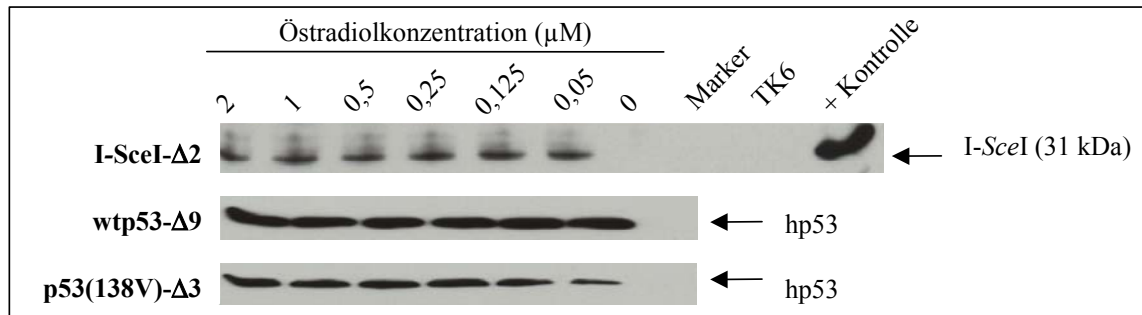


Abb. 38: Western-Blot Analyse zur Bestimmung der minimalen Östradiol-Konzentration. Gezeigt sind die I-SceI- und p53-Expressionsmuster für die Klone I-SceI-Δ2, hwt.p53-Δ9 und hts-p53(138.Val)-Δ3. TK6-Totallysat wurde als Negativ-Kontrolle und Lysat aus mit pCMV-I-SceI transfizierten K562-Zellen als Positiv-Kontrolle für die I-SceI-Expression aufgetragen.

Im Ergebnis zeigte sich, dass die Zugabe von 50 nM bis 2 μM Östradiol eine in der Menge vergleichbare Expression der Proteine I-SceI und wtp53 unter der Kontrolle des Gal4-Promotors bewirkt. Für Klon p53(138V)-Δ3 wurde erst zwischen 0,125-0,25 μM maximale Expression von p53(138V) sichtbar. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Experimenten 200 nM Östradiol als Induktions-Konzentration gewählt.

4.2.4.1.3 Charakterisierung der Proteinakkumulation nach Östradiol-Induktion

Um für die anschließenden Rekombinationsversuche den Expressionsverlauf der bei der Rekombination involvierten Proteine p53 und I-SceI zu beschreiben, wurden mittels Western-Blot-Analyse (s. 3.2.3.6) und Durchflußzytometrie (s. 3.2.2.13) die Zeitverläufe der Protein-Expression nach Östradiol-Gabe untersucht.

4.2.4.1.3.1 Zeitverläufe der Protein-Expression nach Östradiol-Gabe in der Western-Blot-Analyse

Zur Beschreibung der Expressionsverläufe wurde der Klon KMV5 mit je 10 μg der Plasmide pGC (Negativ-Kontrolle, s. 3.1.7), wtp53 in pGC (p53-Expressionsvektor in Abhängigkeit von GalERVP, s. 4.1.1.3) und pC53-wt₃ (Vektor für konstitutive p53-Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors, s. 3.1.7) elektroporiert. Pro Plasmid wurden sechs voneinander unabhängige Ansätze hergestellt und zur Hälfte je 200 nM Östradiol zugegeben. Nach Inkubation bei 37 °C für 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden die Ansätze im Western-Blot auf p53-Expression geprüft (s. Abb. 39).

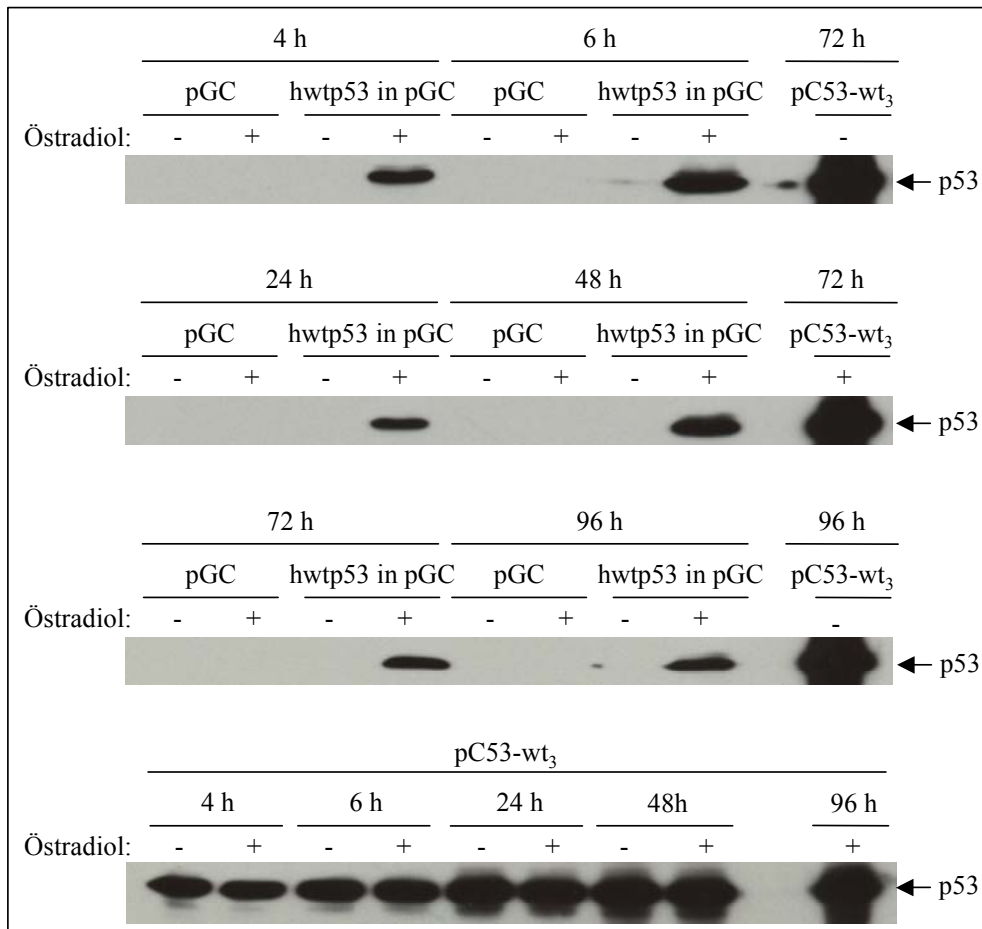


Abb. 39: p53-Expressionsverlauf. KMV5-Zellen wurden mit den Plasmiden pGC, hwt53 in pGC und mit pC53-wt₃ elektroporiert und mit (+) und ohne (-) Östradiol inkubiert. p53-Expression nach 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurde wie in Abb. 32 beschrieben dargestellt.

Durch die Western-Blot-Analyse konnte eindeutig gezeigt werden, dass schon 4 h nach der Elektroporation und Östradiol-Induktion Expression des humanen p53 sowohl unter der Kontrolle des CMV- als auch des Gal4-Promotors erreicht wurde und die Expressionsmuster eine Zunahme bis ca. 48 h (hwt53 in pGC) bzw. 96 h (pC53-wt₃) zeigten. Die Expression des humanen hwt53 in Abhängigkeit vom Gal4-Promotor erwies sich zu jedem Zeitpunkt als streng von Östradiol abhängig.

4.2.4.1.3.2 Zeitverlauf der Protein-Expression nach Östradiol-Gabe gemäß FACS-Analyse

Für die Darstellung des Expressionsverlaufs im durch Östradiol anschaltbaren System wurde Klon KMV5 mit je 10 µg der Plasmide pGC (s. 3.1.7), EGFP in pGC (s. 4.1.1.1) und pEGFP-N1 (s. 3.1.7) wie unter 4.2.6.1 elektroporiert und mit Östradiol (200 nM) behandelt. Nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden jeweils 30000 Zellen pro Ansatz am FACScan (Coulter XL-MCL) analysiert. Die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen aus

den drei voneinander unabhängigen Transfektionsansätzen (für 4 h, n=6) wurden gemittelt und die Ergebnisse in Abb. 40 zusammengefasst.

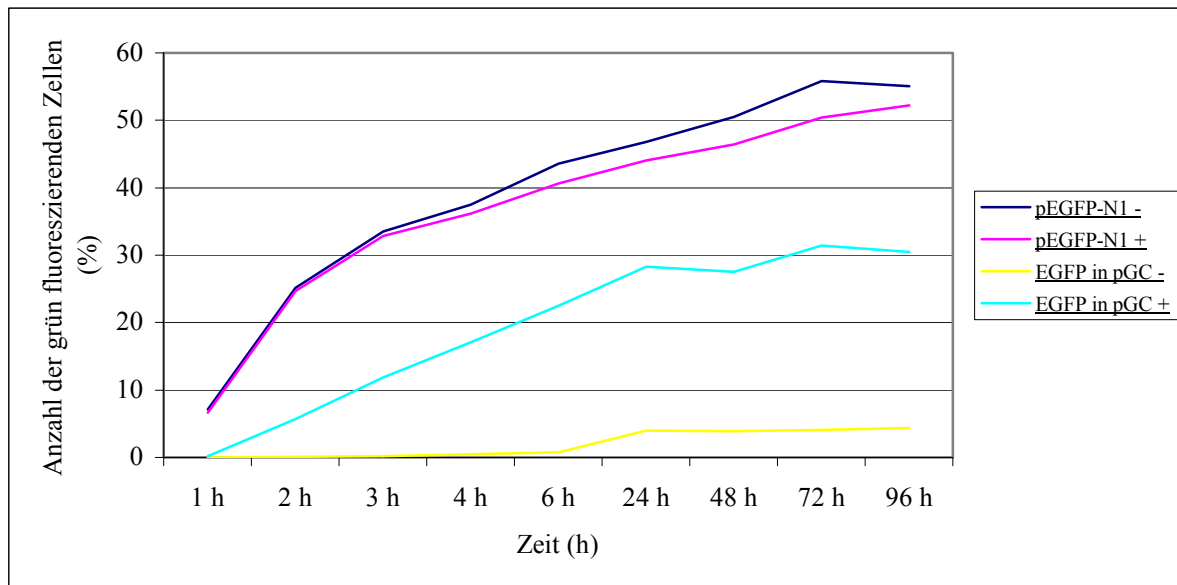


Abb. 40: Übersichtsdiagramm zur zeitlichen EGFP-Akkumulation nach Expression unter der Kontrolle des Gal4- oder CMV-Promotors. Das Diagramm wurde aus Mittelwerten zu KMV5-Zellen, die mit pEGFP-N1 oder EGFP im pGC transfiziert und mit (+) bzw. ohne (-) 200 nM Östradiol inkubiert wurden, zusammengestellt (n=3).

Durch dieses Experiment wurde gezeigt, dass die EGFP-Expression unter der Kontrolle des CMV- und des Gal4-Promotors nach ca. 72 h ein Maximum erreicht, und dass unter der Kontrolle des Gal4-Promotors im Vergleich zum CMV-Promotor nur maximal 60 % der EGFP-Expression erreicht wird. 24-96 h nach Elektroporation wird jedoch auch in Abwesenheit von Östradiol EGFP-Expression in ca. 4 % der Zellen gemessen, was die Basalaktivität des Gal4-Promotors ohne GalERVP-Aktivität in transienten Experimenten widerspiegelt, da auch in K562-Zellen ohne GalERVP ähnliche Basalaktivitäten festgestellt wurden (s. 4.2.2.1.3).

4.2.4.1.4 Rekombinationsmessung in I-SceI-Δ2-Zellen

Zur Rekombinationsmessung nach I-SceI-vermittelter Einführung eines DSBs in genomisch integrierte Substrate (s. 4.2.4) wurde der Klon I-SceI-Δ2 im Vergleich zu K562 und KMV5 uninduziert und induziert (200 nM Östradiol) bei 39 °C inkubiert. 24 h, 48 h und 96 h nach Induktion wurden pro Ansatz 30000 Zellen am Durchflußzytometer analysiert. Um die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen nach rekombinativer *wtEGFP*-Rekonstitution bestimmen zu können, wurde wie in 4.2.2.1.3 ein Messbereich (Marker M1) definiert. Die theoretischen Rekombinationsraten wurden als prozentuale Anteile grünfluoreszierender unter

nicht leuchtenden Zellen mit Hilfe des Programms Expo-2 errechnet. Die Mittelwerte aus je zwei Messungen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen K562 und KMV5 wurde für I-SceI- Δ 2 in dieser und weiteren nicht gezeigten Messungen keine Zunahme der grünfluoreszierenden Zellen beobachtet. Tatsächlich waren die M1-Werte für den elterlichen Klon KMV5 (enthält nur den Transaktivator GalERVP und keine Rekombinationssubstrate) höher als für den Klon I-SceI- Δ 2 mit eindeutig nachgewiesener I-SceI-Expression. Auch die transiente Expression von I-SceI nach Elektroporation der Klone mit dem Plasmid pCMV-I-SceI (s. 3.1.7) bewirkte keine Zunahme des Anteils grünfluoreszierender Zellen durch Rekombination, sodass offensichtlich die Austauschraten unter der Nachweisgrenze lagen.

Zelllinie	Östradiol	24 h	48 h	96 h
K562	-	3,51	0,85	0,20
	+	3,66	0,84	0,72
KMV5	-	4,86	1,48	0,57
	+	4,98	1,76	1,92
I-SceI-Δ2	-	4,24	0,95	0,29
	+	4,18	1,26	1,11

Tabelle 7: Anteil an grünfluoreszierenden Zellen nach Östradiol-Behandlung. Angegeben sind Mittelwerte für K562, KMV5 und I-SceI- Δ 2 aus zwei voneinander unabhängigen Messungen.

4.2.5 Optimierung des Test-Systems zur Messung von Rekombinationsraten

Da weder die Expression des *I-SceI*-Gens unter der Kontrolle des Gal4-Promotors, noch dessen konstitutive Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors eine Erhöhung der grünfluoreszierenden Zellen nach sich zog, obwohl die Sequenz der Rekombinationssubstrate vor Klonierung in den Rekombinationsvektor verifiziert worden war und die Erkennung und Restriktion der I-SceI-Erkennungssequenz im Rekombinationssubstrat durch das kommerziell erhältliche Enzym Meganuklease (I-SceI) überprüft worden war, wurden die EGFP-Expression und -Leuchtintensität als mögliche Limitationen des Nachweises überprüft (s. 4.2.5.1, 4.2.5.3 und 4.2.5.4).

4.2.5.1 Fluoreszenzauswertung über Dot-Plot-Darstellung

Um die optimale Trennung zwischen zellulärer Eigen- und EGFP-Fluoreszenz zu ermöglichen, wurde die Datenauswertung geändert, indem die Fluoreszenz der Zellen nicht als FL1-Histogramm, sondern als Dot-Plot dargestellt wurde. Hierbei wurden die FL1-Werte (für Grünfluoreszenz) gegen die FL2-Werte (für orange Eigenfluoreszenz) aufgetragen. 48 h nachdem KMV5-Zellen mit je 10 µg der Plasmide p5N-M (Negativ-Kontrolle, s. 3.1.7) und p5xwtEGFP (s. 4.1.4.2) elektroporiert worden waren, wurden je 10000 Zellen aus den Elektroporationsansätzen am Durchflußzytometer analysiert.

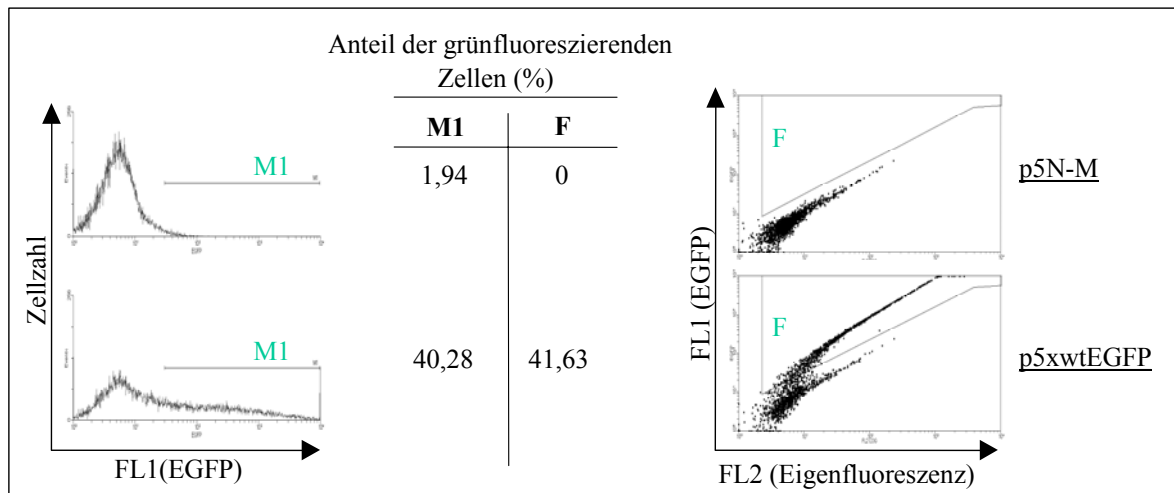


Abb. 41.: Vergleich der Fluoreszenzanalyse mittels Histogramm und Dot-Plot. Die Fluoreszenzsignale der mit p5N-M (obere Abbildungen) oder p5xwtEGFP (untere Abbildungen) elektroporierten KMV5-Zellen sind auf der linken Hälfte der Abbildung durch die bisherige Darstellungsart als FL1-Histogramm und auf der rechten Hälfte als Dot-Plot Histogramm angezeigt. Die Auswertung der M1- und F-Bereiche wurde als Tabelle in die Mitte der Abbildung eingefügt. M1: Marker eins, F: Region F. Die errechneten Werte (M1 oder F) für die relative Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen sind in Prozent angegeben. Auf der linken Seite wurden auf der X-Achse der Diagramme die FL1-Werte und auf der Y-Achse die Zellzahl und auf der rechten Seite auf der X-Achse der Diagramme die FL2-Werte und auf der Y-Achse die FL1-Werte für jede Zelle aufgetragen.

Bei der Messung wurden die fluoreszierenden Zellen entweder wie bisher im FL1-Histogramm innerhalb eines Markerbereichs erfasst (M1) oder über Region F auf dem FL1-FL2-Dot-Plot-Histogramm errechnet (s. Abb. 41). So konnte in der Dot-Plot-Darstellungsweise die Eigenfluoreszenz der Zellen als Wolke unter der diagonalen Achse der Region F ausgeklammert werden.

Der Vergleich der Werte ermittelt in FL1-Histogramm versus FL1-FL2-Dot-Plot ergab, dass durch die Dot-Plot-Darstellungsweise die grünfluoreszierenden Zellen klar von den nicht fluoreszierenden getrennt werden konnten, so dass das Signal/Rausch-Verhältnis extrem verbessert werden konnte.

4.2.5.2 Rekombinationsratenmessung per FACS-Dot-Plot

Nachdem die Fluoreszenz-Auswertung durch die Dot-Plot-Darstellungsweise verfeinert worden war (s. 4.2.5.1), wurde erneut versucht Rekombinationsraten über die Detektion grünfluoreszierender Zellen zu bestimmen, nun per Dot-Plot (FL1 gegen FL2). Dafür wurden KMV5-Zellen transient mit je 10 µg der folgenden retroviralen Rekombinationsvektoren und den entsprechenden Kontrollen elektroporiert:

1. Negativ-Kontrollen:

p5N-M (s. 3.1.7),

p5xE (s. 4.1.2.1),

p5xEsGal4SceI (s. 4.1.2.2.3.1),

p5xEh-I-SceIRESswtp53Gal4 (s. 4.1.2.2.3.2.2),

p5xEh-I-SceIRESsp53(138V)Gal4 (s. 4.1.2.2.3.2.2),

*p5xEsCMV-Hyg (s. 4.1.2.2.2) und

p5xEsCMV-HygbnGal4-I-SceI (s. 4.1.2.2.4).

2. Die Rekombinationsvektoren :

p5xEsGal4SceIbPuro-Δ/-HR/-EJ (s. 4.1.2.2.3.2 und 4.1.2.2.6.2),

p5xEh-I-SceIRESswtp53Gal4nPuro-Δ (s. 4.1.2.2.3.2.2),

p5xEh-I-SceIRESsp53(138V)Gal4nPuro-Δ (s. 4.1.2.2.3.2.2),

*p5xEsCMV-HygbPuro-Δ (s. 4.1.2.2.2) und

p5xEsCMV-HygbnGal4-I-SceInPuro-Δ (s. 4.1.2.2.4).

Pro Ansatz wurden drei voneinander unabhängige Elektroporationen durchgeführt und I-SceI durch die Zugabe von 200 nM Östradiol induziert. Für die mit „*“ gekennzeichneten Vektoren wurde zur Initiation der Rekombination mit pCMV-I-SceI (s. 3.1.7) koelektroporiert und kein Östradiol zum Kulturmedium zugegeben. Nach Inkubation der Ansätze für 72 h bei 37 °C wurden 30000 Zellen am FACS-Scan (Coulter XL-MCL) analysiert (s. Abb. 42).

Mit dieser Auswertemethode betrug der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen sowohl für Ansätze mit Rekombinationsvektoren als auch für die Negativ-Kontrollen 0,00 %. Dies bedeutete, dass die Rekombinationsrate unter der Nachweisgrenze und damit in diesen Experimenten $<10^{-4}$ lag. Dies bedeutete auch, dass die per FL1-Histogramm quantifizierten Anteile an grünfluoreszierenden Zellen (s. 4.2.4.1.4) innerhalb des Rauschens lagen, was die Notwendigkeit der Verfahrensoptimierung an allen Punkte sehr deutlich veranschaulichte.

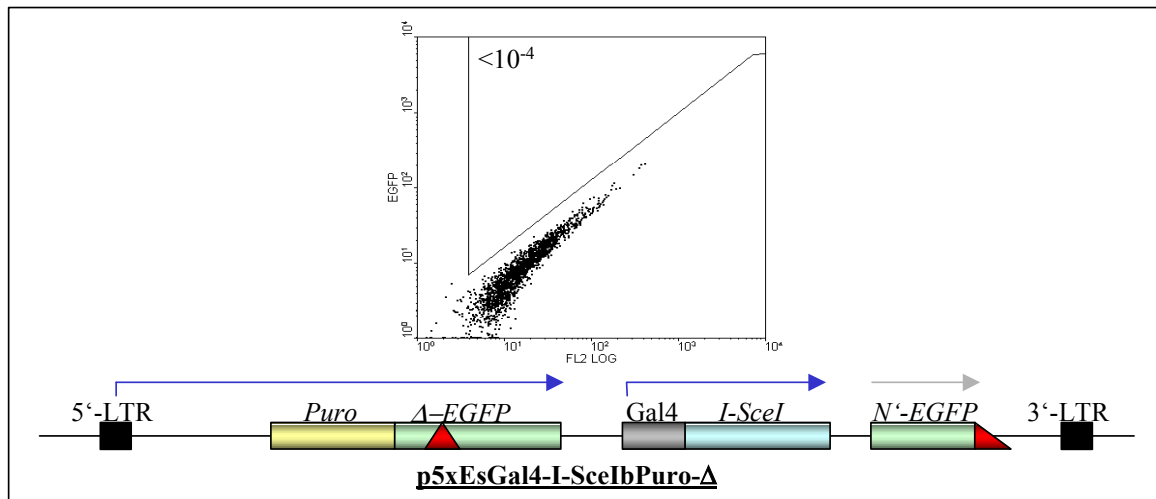


Abb. 42: Quantifizierung grünfluoreszierender Zellen im Dot-Plot nach Elektroporation mit dem Rekombinationsvektor p5xEsGal4-I-SceIbPuro- Δ . Der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen nach Elektroporation und Kultivierung in Medium mit Östradiol ist angegeben. Der in die KMV5-Zellen transfizierte Vektor ist unter dem Dot-Plot schematisch dargestellt.

Insgesamt wurde also durch die Dot-Plot-Darstellungsweise eine saubere Trennung der grünfluoreszierenden und nicht grünfluoreszierenden Zellen erreicht, jedoch waren Rekombinationsraten mit den bislang generierten Rekombinations-Plasmiden am FACSscan nicht quantifizierbar.

4.2.5.3 Vergleich der EGFP-Expression unter der Kontrolle des 5'-LTRs und des CMV-Promotors

Um auszuschließen, dass die Expression eines über Rekombination rekonstituierten *EGFP*-Akzeptorgens durch den 5'-LTR des retroviralen Vektors nicht ausreichend für die Detektion seltener Ereignisse ist, wurden die Fluoreszenzintensitäten nach Expression des *EGFP*-Gens unter der Kontrolle des 5'-LTRs und des CMV-Promotors verglichen.

Hierfür wurde der Vektor p5xwtEGFP kreiert (s. 4.1.4.2), in welchem das *wtEGFP*-Gen hinter dem 5'-LTR positioniert wurde.

Die Zelllinie K562 wurde dann mit den Plasmiden pEGFP-N1 (s. 3.1.7) und p5xwtEGFP (s. 4.1.4.2) elektroporiert, wobei diese in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und grünfluoreszierende Zellen am Durchflußzytometer (FACS-Calibur) zu verschiedenen Zeiten nach Elektroporation (24 h, 48 h, 72 h, 96 h) analysiert wurden (s. Abb. 43).

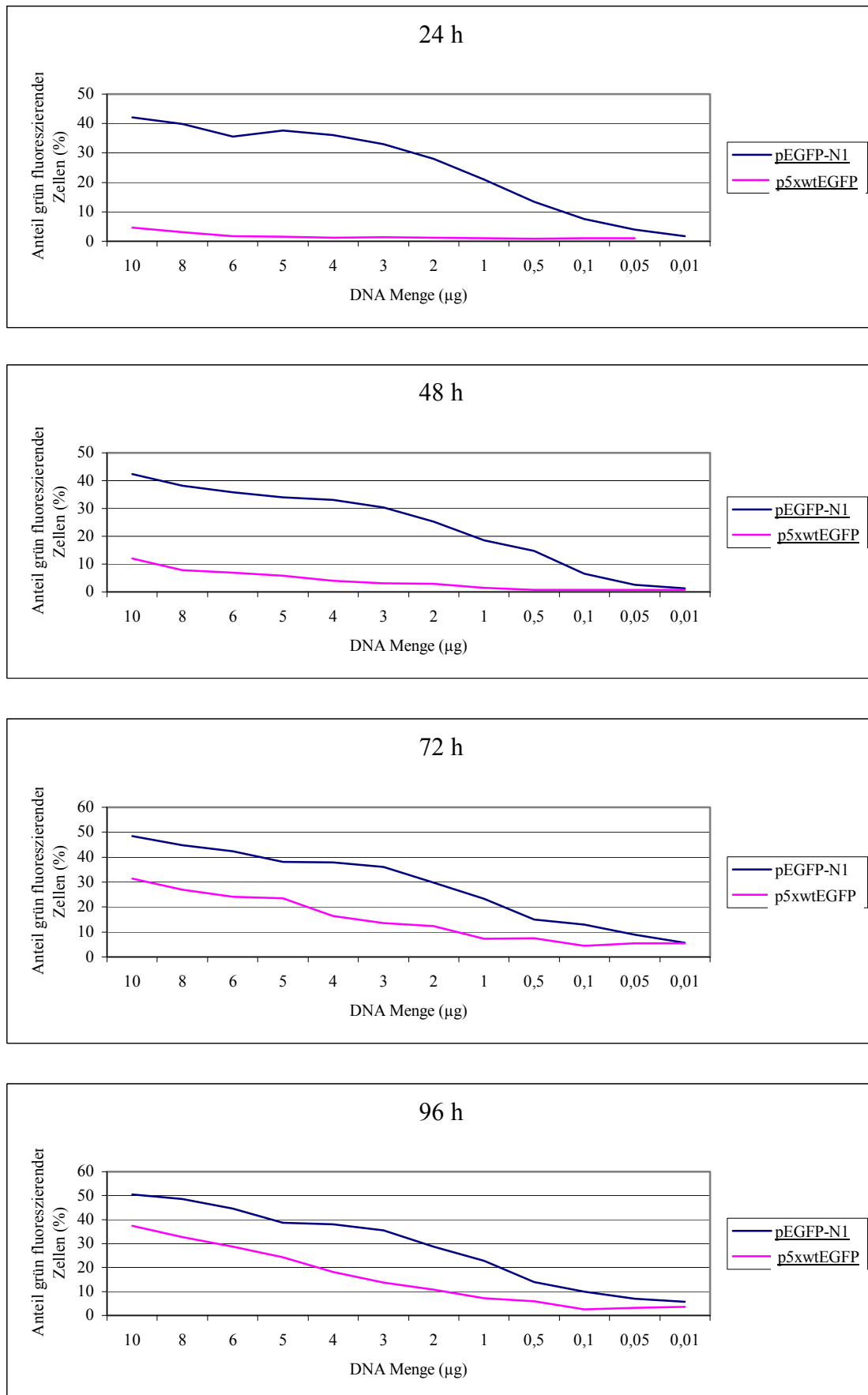


Abb. 43: Vergleich der EGFP Expression unter der Kontrolle des 5'-LTRs und des CMV-Promotors 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Elektroporation der Zelllinie-K562 mit den Plasmiden p5xwtEGFP bzw. pEGFP-N1. Pro Ansatz wurden 10000 Zellen analysiert.

Es zeigte sich, dass EGFP-Expression unter der Kontrolle des 5'-LTR grundsätzlich gut als Grünfluoreszenz der Zellen am Durchflußzytometer erfasst werden kann. Während jedoch EGFP-Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors bereits nach 24 h maximal war, erreichte diese für den 5'-LTR erst nach 72 h ein Plateau. Zu diesem Zeitpunkt entsprach die Expression des *EGFP*-Gens unter der Kontrolle des 5'-LTRs, ca. 64 % der unter der Kontrolle des CMV-Promotors, während nach 24 h ein zehnfacher Unterschied vorlag.

4.2.5.4 Bestimmung der EGFP-Leuchtintensitäten für unterschiedliche Expressionskonstrukte

Um zu klären, ob möglicherweise eine zu geringe EGFP-Leuchtintensität für das Fehlen grünleuchtender Zellen in den Rekombinationsansätzen verantwortlich war, wurde untersucht, ob die Fusion zwischen dem *Puromycin-Resistenz*-Gen und dem mutierten *EGFP*-Gen als Rekombinationsakzeptor die Fluoreszenzeigenschaften von EGFP beeinflusst. Hierfür wurden die retroviralen Vektoren p5bPuro-wtEGFP (s. 4.1.4.1) und p5bPuro-CMV-wtEGFP (s. 4.1.4.3) generiert, um die EGFP-Expression im Fusionsprotein versus mit zwischengeschaltetem CMV-Promotor zu vergleichen. Anschließend wurden je 20 µg der Vektoren p5N-M (s. 3.1.7), pEGFP-N1 (s. 3.1.7), p5xwtEGFP (s. 4.1.4.2), p5bPuro-wtEGFP (s. 4.1.4.1) und p5bPuro-CMV-wtEGFP (s. 4.1.4.3) in KMV5-Zellen elektroporiert und jeweils die Hälfte der Ansätze mit 200 nM Östradiol versetzt, um einen möglichen Einfluss der Hormonbehandlung mitzuberücksichtigen. Nach Inkubation für 48 h bei 37 °C wurden jeweils grünfluoreszierende Zellen am Durchflußzytometer Coulter XL-MCL in 30000 Zellen pro Ansatz gezählt (s. Abb. 44).

Der Vergleich der EGFP-Fluoreszenzen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Expressionsprinzipien zeigte, dass die Fusion von *EGFP* mit dem *Puromycin-Resistenz*-Gen die Fluoreszenzeigenschaften des EGFP-Proteins stark reduzierte und dass dieser Effekt durch isolierte Expression via CMV-Promotor zum größten Teil aufgehoben werden konnte. Diese Beobachtung wurde gleichermaßen in Zellen mit oder ohne Östradiol-Behandlung gemacht. Aus diesem Grund wurden alle auf *EGFP* basierenden Rekombinationsakzeptoren (*Δ*-, *HR*- und *EJ-EGFP*) hinter einen CMV-Promotor geschaltet (s. 4.1.3.1.1).

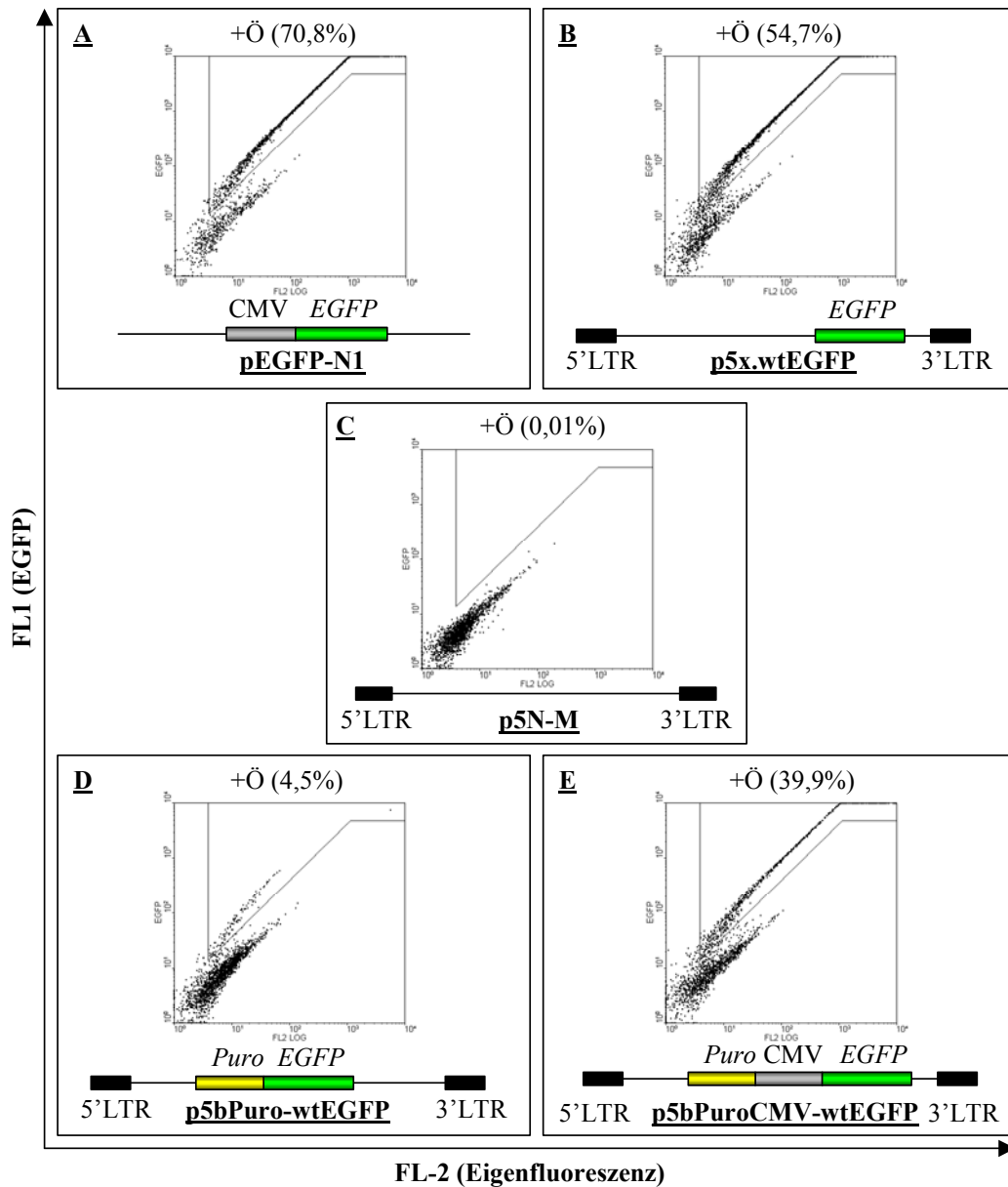


Abb. 44.: Vergleich der EGFP-Fluoreszenzen unter verschiedenen Transkriptions- und Translationsbedingungen. Gezeigt sind Dot-Plots zu KMV5-Zellen, die mit den folgenden Plasmiden elektroporiert wurden: A. *pEGFP-N1*. B. *p5xwtEGFP*. C. *p5N-M*. D. *p5bPuro-wtEGFP*. E. *p5bPuroCMV-wtEGFP*. Die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen mit Östradiol (+Ö) sind in Prozent oberhalb und die schematische Darstellung des Testkonstruktes unterhalb des jeweiligen Dot-Plots angezeigt. Die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen wurde über Region F errechnet. Auf der X-Achse der Diagramme wurden die FL2-Werte und auf der Y-Achse die FL1-Werte eingetragen.

4.2.6 Rekombinationsratenbestimmung in KMV5-Leukämiezellen

Nachdem Fluoreszenzauswertung, Promotorauswahl und Proteintranslation für *EGFP*-basierte Rekombinationsakzeptoren optimiert worden waren, wurde weiterhin versucht die Sensitivität des Systems durch Erfassung von nicht nur konservativer (kHR), sondern auch nicht-konservativer homologer Rekombination (nkHR) zu erweitern. Hierzu wurden neue Donor-Sequenzen (*wtEGFP* bzw. *Stop-EGFP*) in die Rekombinationsvektoren inseriert (s. 4.1.3.4, 4.1.3.6 und 4.1.3.7). Zur Bestimmung der Rekombinationsraten wurden diese

Vektoren in unterschiedliche Zelllinien transfiziert und mittels *I-SceI*-Expression die Rekombination initiiert. Anschließend wurden die Rekombinationsraten nach FACS-Analyse aus der Anzahl grünfluoreszierender Zellen errechnet.

4.2.6.1 Initiation der Rekombination durch *I-SceI*-Expression nach Östradiol-Induktion

Um Rekombinationsereignisse an episomalen DNA-Substraten untersuchen zu können, wurden KMV5-Leukämiezellen mit je 10 µg der folgenden Vektoren (s. 4.1.2) elektroporiert:

1. Negativ-Kontrollvektoren mit dem jeweiligen Rekombinationsdonor und dem *I-SceI*-Gen: p5xEsGal4-I-SceI, p5xwtsGal4-I-SceI und p5xtrsGal4-I-SceI,
2. Negativ-Kontrollvektoren mit dem jeweiligen Rekombinationsakzeptor und dem *I-SceI*-Gen: p5xGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ und -HR,
3. Rekombinationsvektoren für NHEJ mit dem *EJ-EGFP*-Gen an der Akzeptorposition und dem *I-SceI*-Gen: p5xGal4-I-SceIbPuroCMV-EJ,
4. Retrovirale Rekombinationsvektoren mit der jeweiligen Donor-Akzeptor-Kombination und dem *I-SceI*-Gen: p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ/-HR/-EJ, p5xwtsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ/-HR/-EJ und p5xtrsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ/-HR/-EJ,
5. Positiv-Kontrollvektor mit *wtEGFP*-Gen an der Akzeptorposition: p5bPuroCMV-wtEGFP.

24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion und Induktion der Hälfte der Ansätze mit 200 nM Östradiol zur Rekombinations-Initiation mittels *I-SceI*-Expression wurden die Rekombinationsraten am Durchflußzytometer (Coulter XL-MCL) bestimmt (s. Abb. 45).

Die Anteile der grünfluoreszierenden Zellen aus mehreren Messungen wurden gemittelt und die Mittelwerte in Tabelle 8 zusammengefasst. Um Rekombinationsraten bezogen auf transfizierte Zellen zu erhalten, wurden diese Werte gegen die Positiv-Kontrolle korrigiert und in Abb. 46 dargestellt. In dieser Abbildung wurden im zeitlichen Verlauf die Raten für die kHR (*N'-EGFP*) denen für die kHR/nkHR (*Stop-EGFP*) für jeweils unterschiedliche Akzeptorgene (Δ -, *HR*- und *EJ-EGFP*) gegenübergestellt.

Da der Rekombinationsdonor im vorliegenden Vektordesign keinem Promotor nachgeschaltet ist, wurde versucht *wtEGFP* als Rekombinationsdonor einzusetzen. Wie die Ergebnisse in Tabelle 8, #5 und Abb. 47 zeigen, erwies sich jedoch *wtEGFP* hierfür als ungeeignet, da auch in Abwesenheit eines Rekombinationsakzeptors grünleuchtende Zellen von bis zu 2 % beobachtet wurden. Da diese vor allem nach Östradiol-Gabe auftauchten, scheinen sie auf die Gal4-Promotor-Aktivität innerhalb der Abstandhalter-Region zurückzuführen sein.

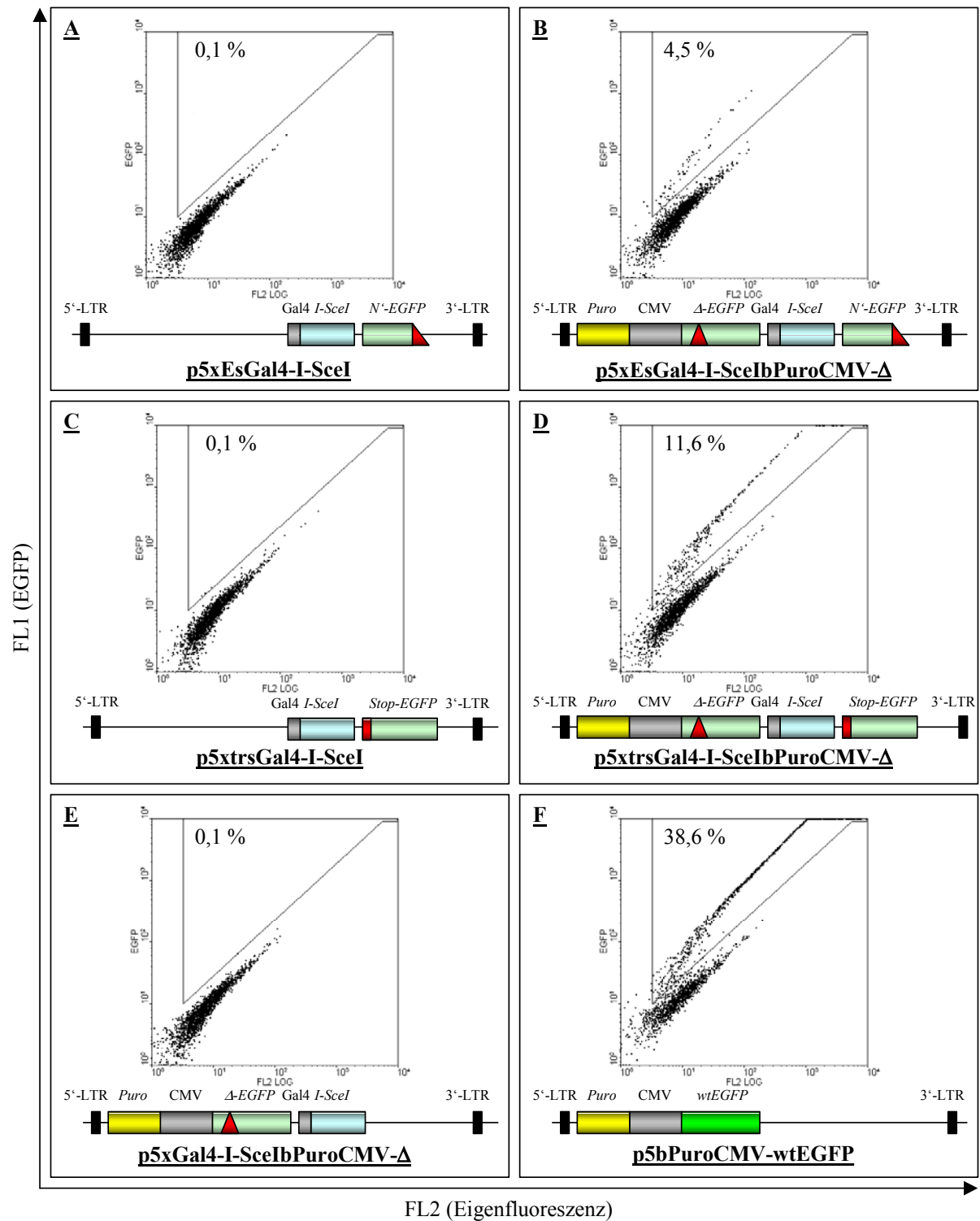


Abb. 45: Dot-Plots (FL1 gegen FL2) der KMV5-Zellen nach Elektroporation mit Rekombinationsvektoren. Die hier gezeigten beispielhaften FACS-Analysen wurden 72 h nach Transfektion und Östradiol-Gabe durchgeführt. Die in diesem Experiment verwendeten Vektoren mit Δ -EGFP als Akzeptor sind unter jedem Dot-Plot schematisch dargestellt und die für transfizierte Zellen ermittelten Rekombinationsraten jeweils oberhalb angegeben. A: Negativ-Kontrollvektor mit N'-EGFP. B: Vektor mit N'-EGFP als Rekombinationsdonor und Δ -EGFP als Akzeptor. C: Negativ-Kontrollvektor mit dem Rekombinationsdonor Stop-EGFP. D: Vektor mit Stop-EGFP als Rekombinationsdonor und Δ -EGFP als Akzeptor. E: Negativ-Kontrollvektor mit dem Rekombinationsakzeptor Δ -EGFP. F: Positiv-Kontroll-Plasmid mit dem wtEGFP-Gen an der Akzeptorposition. Die im oberen Dreieck-Bereich der Dot-Plots gezählten Anteile grünfluoreszierender Zellen sind in Prozent angegeben.

Nummer	Plasmid	Östradiol	Rekombinationsrate (%)			
			24h	48h	72h	96h
1	<u>p5N-M</u>	-	k. D.	0,0	0,0	k. D.
		+	k. D.	0,0	0,0	k. D.
2	<u>p5xE(N')</u>	-	k. D.	k. D.	0,2	k. D.
		+	k. D.	k. D.	0,2	k. D.
3	<u>p5xtrEGFP</u>	-	k. D.	k. D.	0,0	k. D.
		+	k. D.	k. D.	0,0	k. D.
4	<u>p5xEsGal4-I-SceI</u>	-	0,0	0,0	0,0	0,0
		+	0,0	0,0	0,0	0,0
5	<u>p5xwtsGal4-I-SceI</u>	-	0,2	1,3	1,8	0,6
		+	2,4	5,7	6,8	2,2
6	<u>p5xtrsGal4-I-SceI</u>	-	0,0	0,0	0,0	0,0
		+	0,0	0,1	0,1	0,0
7	<u>p5bPuro-CMV-EJ</u>	-	0,0	0,0	0,0	0,0
		+	0,0	0,0	0,0	0,0
8	<u>p5xGal4-I-SceIbPuro-CMV-Δ</u>	-	0,0	0,0	0,0	0,0
		+	0,0	0,0	0,0	0,0
9	<u>p5xGal4-I-SceIbPuro-CMV-HR</u>	-	0,1	0,0	0,0	0,0
		+	0,1	0,0	0,0	0,0
10	<u>p5xGal4-I-SceIbPuro-CMV-EJ</u>	-	0,0	0,1	0,2	0,1
		+	0,0	0,1	0,2	0,2
11	<u>p5xEsGal4-I-SceIbPuro-CMV-Δ</u>	-	0,6	1,4	2,2	1,6
		+	0,7	1,7	3,1	2,9
12	<u>p5xEsGal4-I-SceIbPuro-CMV-HR</u>	-	0,7	2,3	1,9	1,1
		+	0,8	2,7	2,8	2,1
13	<u>p5xEsGal4-I-SceIbPuro-CMV-EJ</u>	-	0,1	1,0	1,4	0,5
		+	0,1	1,2	2,1	1,0
14	<u>p5xtrsGal4-I-SceIbPuro-CMV-Δ</u>	-	3,8	6,6	6,1	5,3
		+	4,6	7,6	7,4	7,6
15	<u>p5xtrsGal4-I-SceIbPuro-CMV-HR</u>	-	2,2	3,8	5,9	3,0
		+	2,9	4,5	7,3	4,3
16	<u>p5xtrsGal4-I-SceIbPuro-CMV-EJ</u>	-	0,9	2,9	5,6	2,6
		+	1,1	3,7	7,2	4,0
17	<u>p5bPuro-CMV-EGFP</u>	-	31,0	26,7	25,8	26,2
		+	30,9	26,3	25,5	24,1

Tabelle 8: Rekombinationsraten in transient transfizierten KMV5-Zellen 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Elektroporation mit Rekombinationsplasmiden. Die angegebenen Raten repräsentieren die Mittelwerte aus den Anteilen grünfluoreszierender Zellen in bis zu vier unabhängigen Messungen. Die verwendeten Plasmide gruppieren sich wie folgt: #1: Basis-Vektor. #2-3: Vektoren mit Rekombinationsdonor (Negativ-Kontrolle). #4-6: Vektoren mit Rekombinationsdonor und dem *I-SceI*-Gen (Negativ-Kontrolle). #7: Negativ-Kontrollvektor für NHEJ ohne *I-SceI*-Expression. #8-9: Negativ-Kontrollvektoren mit Rekombinationsakzeptor und *I-SceI*-Gen. #10: NHEJ-Vektor mit Rekombinationsakzeptor *EJ-EGFP* und dem *I-SceI*-Gen. #11-16: Vektoren mit Rekombinationsdonor, Akzeptor und dem *I-SceI*-Gen. #17 Positiv-Kontrolle. Die Rekombinationsvektoren #2 und #11-13 enthalten *N'-EGFP* und #3 und #14-16 *Stop-EGFP* als Donorsequenzen. Die Vektoren #8, #11, #14 enthalten Δ -*EGFP*, #9, #12, #15 *HR-EGFP* und #7, #10, #13, #16 *EJ-EGFP* an der Akzeptorposition. k. D.: keine Daten.

Aus diesem Grunde wurde konsequenterweise ausschließlich *Stop-EGFP* als Rekombinationsdonor für die Bestimmung von nkHR verwendet. In *Stop-EGFP* ist das Start-Methionin des *wtEGFP*-Gens durch zwei Stop-Kodons ersetzt (s. 4.1.3.5), sodass aufgrund

der fehlenden Proteintranslation der Grünfluoreszenzanteil im Bereich der Nachweisgrenze lag (s. Abb. 45 und Tab. 8, Plasmid #3 und #6).

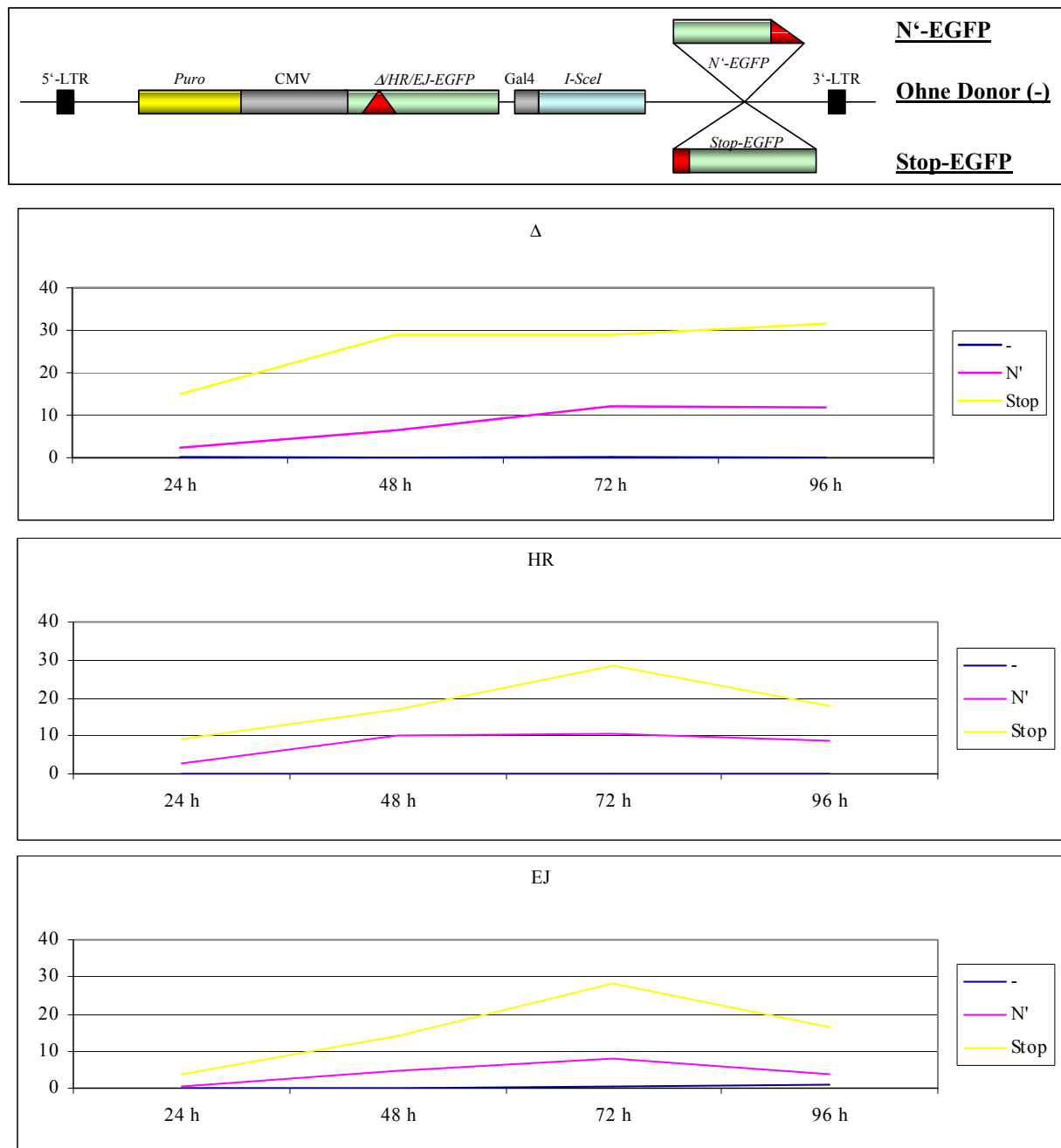


Abb. 46.: Zeitlicher Verlauf der rekombinativen *wtEGFP*-Rekonstitution nach Östradiol-Gabe in KMV5-Leukämiezellen. Die Rekonstitution der *wtEGFP*-Sequenz wurde für unterschiedliche Akzeptoren Δ -, HR- und EJ-EGFP in getrennten Diagrammen dargestellt und die Rekombinationsraten in Prozent angegeben. Die Rekombinationsvektoren, die in KMV5-Zellen transfiziert wurden, sind über den Diagrammen schematisch dargestellt. -: Vektor ohne Rekombinationsdonor (s. Tab. 9, #8-10). N': Vektor mit N'-EGFP als Rekombinationsdonor (s. Tab. 9, #11-13). Stop: Vektor mit Stop-EGFP als Rekombinationsdonor (s. Tab. 9, #14-16).

In den Rekombinationsexperimenten mit N'-EGFP oder Stop-EGFP als Donoren betrug schon 24 h nach Initiation der Rekombination die Akkumulation an EGFP-positiven Zellen unter den erfolgreich transfizierten 3-15 %. Die Werte erreichten mit 30 %

grünfluoreszierender unter transfizierten Zellen 48-72 h ein Maximum (s. Abb. 46). In den Negativ-Kontrollen mit donorlosen Δ - und *HR-EGFP*-Substraten lag erwartungsgemäß der Anteil der grünfluoreszierenden Zellen im Bereich der Nachweisgrenze, während infolge von NHEJ im donorlosen *EJ-EGFP*-Substrat 72 h nach Transfektion ein Maximum von 1 % erreicht wurde (s. Abb. 46).

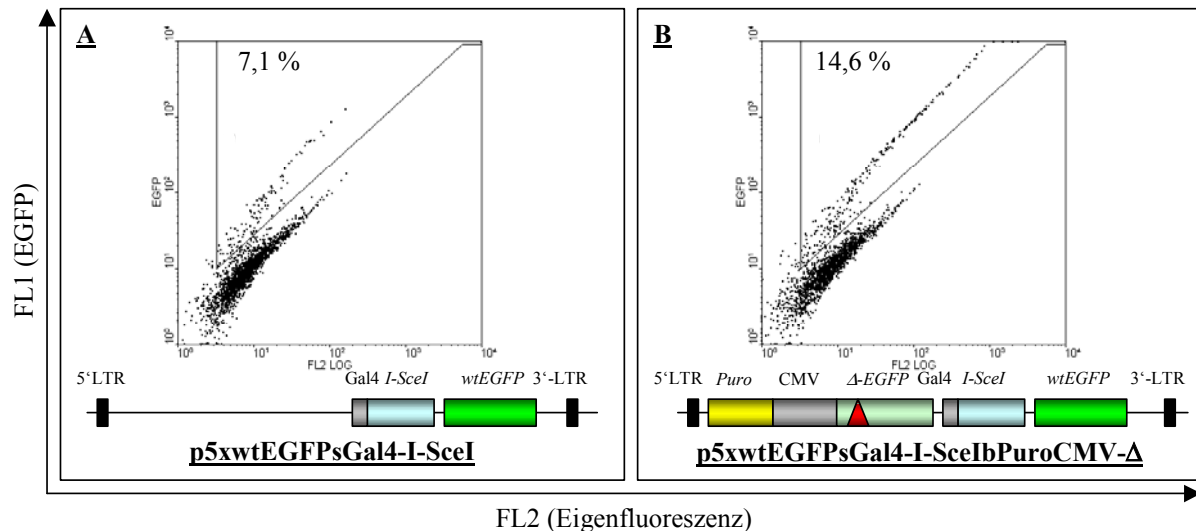


Abb. 47: Dot-Plots (FL1 gegen FL2) zur Elektroporation von KMV5-Zellen mit *wtEGFP*-Donor-Vektoren. Die Ansätze wurden 72 h nach Transfektion am Coulter XL-MCL analysiert. Die schematische Darstellung der transfizierten Vektoren ist unterhalb und die nach Östradiol-Gabe ermittelten Anteile fluoreszierender Zellen oberhalb der Dot-Plots gezeigt. A: Vektor mit dem *wtEGFP*-Gen als Rekombinationsdonor und mit dem *I-SceI*-Gen. B: Vektor mit dem *wtEGFP*-Gen als Rekombinationsdonor, dem *I-SceI*-Gen und Δ -*EGFP*-Gen als Akzeptor.

In Rekombinationsexperimenten mit Rekombinationsvektoren, welche entweder das Δ -, *HR*- oder das *EJ-EGFP*-Gen als Rekombinationsakzeptor enthielten, wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Die Rekonstitution des *wtEGFP*-Gens betrug 48-72 h nach Transfektion der KMV5-Zellen mit *N'-EGFP*-Donor 8-12 % und mit *Stop-EGFP*-Donor 28-30 %. Dies bedeutet, dass durch die Detektion von kHR und nkHR mit *Stop-EGFP* gegenüber der Detektion von nur kHR mit *N'-EGFP* in diesen humanen Leukämiezellen eine dreifache Steigerung der Rekombinationsraten festzustellen war.

In den hier beschriebenen transienten Rekombinationsexperimenten wurde nach Östradiol-Zugabe und *I-SceI*-Expression nur eine maximal zweifache Steigerung der Rekombinationsraten im Vergleich zu den östradiol-freien Ansätzen gemessen. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass nach Elektroporation *I-SceI* auch basal exprimiert wird (s. Abb. 40), und zum anderen repräsentieren nackte Plasmid-DNAs im Gegensatz zu chromatinverpackten genomischen DNAs hochrekombinogene Strukturen dar.

4.2.6.2 Initiation der Rekombination nach Konstitutiver I-SceI-Expression

Da mit transient elektroporierten Rekombinationsvektoren eine Basalaktivität des Gal4-Promotors in Abwesenheit des induzierenden Agens Östradiol beobachtet worden war, war zu erwarten, dass auch nach stabiler Integration der Konstrukte ins Genom eine geringe Basalaktivität des Promotors und damit I-SceI-Expression vorliegen sollte. Um die damit verbundene genomdestabilisierende Rekombinations-Aktivität in Abwesenheit von Östradiol zu vermeiden, wurde statt dem I-SceI-Gen das *Hygromycin-Resistenz*-Gen als Abstandhalter in die retroviralen Rekombinationsvektoren kloniert (s. 4.1.2). Zur Erprobung wurden KMV5-Zellen mit je 10 µg der unter 1.-5. beschriebenen Vektoren (s. unten) und mit 10 µg pCMV-I-SceI (Initiation der Rekombination durch DSB) bzw. mit 10 µg pBS (spontane Rekombination) koelektroporiert:

1. Negativ-Kontrollvektoren mit Donor und dem *Hygromycin-Resistenz*-Gen: p5xEsCMV-Hyg und p5xtrsSV40-Hyg.
2. Negativ-Kontrollvektoren mit Akzeptor: p5bPuroCMV-Δ/-HR.
3. NHEJ-Vektor mit *EJ-EGFP*-Akzeptor: p5bPuroCMV-EJ.
4. Rekombinationsvektoren mit Donor, Akzeptor und dem *Hygromycin-Resistenz*-Gen: p5xEsCMV-HygbPuroCMV-Δ/-HR/-EJ und p5xtrsSV40-Hyg bPuroCMV-Δ/-HR/-EJ.
5. Positiv-Kontrollvektor: p5bPuroCMV-wtEGFP.

Da bei den transienten Rekombinations-Experimenten bisher (s. 4.2.6.1) 72 h nach Elektroporation maximale Akkumulation an EGFP-positiven Zellen beobachtet wurde, wurden in diesem Versuch die Rekombinations-Messungen am Durchflußzytometer (Coulter XL-MCL) auf diesen Zeitpunkt beschränkt.

Der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen aus drei voneinander unabhängigen Messungen wurde gemittelt und die Mittelwerte gegen die der Positiv-Kontrolle korrigiert, um Rekombinationsraten bezogen auf transfizierte Zellen zu erhalten (s. Tab. 9 und Abb. 48).

Im Ergebnis wurden mit Rekombinationsvektoren, welche das *Hygromycin-Resistenz*-Gen statt dem *I-SceI*-Gen als Abstandhalter tragen, sieben bis neunfach reduzierte Basalraten gemessen (zum Vergleich s. Werte a und b in der Tab. 9). 72 h nach Transfektion lag der Grünfluoreszenzanteil für die donorlosen Negativ-Kontrollen mit Δ - und *HR-EGFP* unter der Nachweisgrenze von $<10^{-4}$, während die Raten mit dem donorlosen *EJ-EGFP* durch NHEJ bei über 3 % lagen.

Für Rekombinationsplasmide mit *N'-EGFP*-Donor (s. Tab. 9, #6-8a) wurde ohne I-SceI-Expression ein Grünfluoreszenzanteil von bis zu 0,6 % und mit dem Stop-EGFP-Gen (s. Tab. 9, #9-11a) von bis zu 4,4 % gemessen. Nach Einführung eines DSBs durch I-SceI-

Expression via pCMV-I-SceI-Koelektroporation betrug die Rekonstitution des *wtEGFP*-Gens in KMV5-Zellen für *N'-EGFP* als Donor 3-6 % und für *Stop-EGFP* als Donor 24-28 % (Tab. 9, #9-11a). Auch hier wurden, wie mit Rekombinationsvektoren, welche die *I-SceI*-Expressionskassette als Abstandhalter tragen (s. 4.2.6.1), keine signifikanten Unterschiede zwischen den Akzeptoren Δ -, *HR*- und *EJ-EGFP* beobachtet.

Nummer	koelektroporierte Plasmide		Rekombinationsraten (%)
1a	<u>p5xEsCMV-Hyg</u>	<u>pBS</u>	0,0 $\pm$ 0,0
2a	<u>p5xtrsSV40-Hyg</u>	<u>pBS</u>	0,0 $\pm$ 0,0
3a	<u>p5bPuroCMV-Δ</u>	<u>pBS</u>	0,0 $\pm$ 0,0
4a	<u>p5bPuroCMV-HR</u>	<u>pBS</u>	0,0 $\pm$ 0,0
5a	<u>p5bPuroCMV-EJ</u>	<u>pBS</u>	0,0 $\pm$ 0,0
6a	<u>p5xEsCMV-HygbPuroCMV-Δ</u>	<u>pBS</u>	0,2 $\pm$ 0,1
7a	<u>p5xEsCMV-HygbPuroCMV-HR</u>	<u>pBS</u>	0,6 $\pm$ 0,2
8a	<u>p5xEsCMV-HygbPuroCMV-EJ</u>	<u>pBS</u>	0,2 $\pm$ 0,0
9a	<u>p5xtrsCMV-HygbPuroCMV-Δ</u>	<u>pBS</u>	4,4 $\pm$ 0,2
10a	<u>p5xtrsCMV-HygbPuroCMV-HR</u>	<u>pBS</u>	3,2 $\pm$ 0,0
11a	<u>p5xtrsCMV-HygbPuroCMV-EJ</u>	<u>pBS</u>	2,2 $\pm$ 0,1
12a	<u>p5bPuroCMV-wtEGFP</u>	<u>pBS</u>	100,0 $\pm$ 8,0
1b	<u>p5xEsCMV-Hyg</u>	<u>pCMV-I-SceI</u>	0,0 $\pm$ 0,0
2b	<u>p5xtrsSV40-Hyg</u>	<u>pCMV-I-SceI</u>	0,0 $\pm$ 0,0
3b	<u>p5bPuroCMV-Δ</u>	<u>pCMV-I-SceI</u>	0,0 $\pm$ 0,0
4b	<u>p5bPuroCMV-HR</u>	<u>pCMV-I-SceI</u>	0,0 $\pm$ 0,0
5b	<u>p5bPuroCMV-EJ</u>	<u>pCMV-I-SceI</u>	3,3 $\pm$ 1,5
6b	<u>p5xEsCMV-HygbPuroCMV-Δ</u>	<u>pCMV-I-SceI</u>	3,3 $\pm$ 0,4
7b	<u>p5xEsCMV-HygbPuroCMV-HR</u>	<u>pCMV-I-SceI</u>	3,0 $\pm$ 0,3
8b	<u>p5xEsCMV-HygbPuroCMV-EJ</u>	<u>pCMV-I-SceI</u>	5,5 $\pm$ 0,3
9b	<u>p5xtrsCMV-HygbPuroCMV-Δ</u>	<u>pCMV-I-SceI</u>	23,9 $\pm$ 1,4
10b	<u>p5xtrsCMV-HygbPuroCMV-HR</u>	<u>pCMV-I-SceI</u>	25,2 $\pm$ 2,0
11b	<u>p5xtrsCMV-HygbPuroCMV-EJ</u>	<u>pCMV-I-SceI</u>	28,0 $\pm$ 2,1
12b	<u>p5bPuroCMV-wtEGFP</u>	<u>pCMV-I-SceI</u>	100,0 $\pm$ 1,6

Tabelle 9: Rekombinationsraten bezogen auf transfizierte Zellen. Mittelwerte der Rekombinationsraten in transfizierten Zellen aus drei voneinander unabhängigen Messungen, die 72 h nach der Transfektion am Coulter XL-MCL bestimmt worden waren, wurden gegen die Positiv-Kontrolle korrigiert und in Prozent angegeben. #1-2: Vektor mit Rekombinationsdonor (Negativ-Kontrolle). #3-5: Vektor mit Rekombinationsakzeptor (Negativ-Kontrolle). #6-11: Vektor mit Rekombinationsdonor, und Akzeptor. Die Vektoren #1 und #6-8: tragen *N'-EGFP* und die Vektoren #2 und #9-11 *Stop-EGFP* als Donorsequenz. Die Vektoren #3, #6, #9 tragen Δ -, #4, #7, #10 *HR*- und #5, #8, #11 *EJ-EGFP* als Akzeptor-Sequenz. Der Vektor #12 ist die Positiv-Kontrolle mit *wtEGFP*. Unter a) wurde mit pBS und unter b) mit pCMV-I-SceI (unterer Abschnitt der Tabelle) koelektroporiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das neu entwickelte auf der Rekonstitution des *wtEGFP*-Gens basierende Test-System die Bestimmung von Rekombinationsraten als Anteil grünfluoreszierender Zellen innerhalb von 24-72 h ermöglicht. Während der Grünfluoreszenzanteil mit episomal vorliegenden Substraten nach NHEJ 1-3 % betrug, wurden nach homologer Rekombination Maximalraten von 30 % erreicht. Während keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Rekombinationsakzeptoren Δ -,

HR- und EJ-EGFP nachgewiesen werden konnten, betrug die Häufigkeit der kHR plus nkHR (*Stop-EGFP*) das drei- bis achtfache im Vergleich zur kHR alleine (*N'-EGFP*).

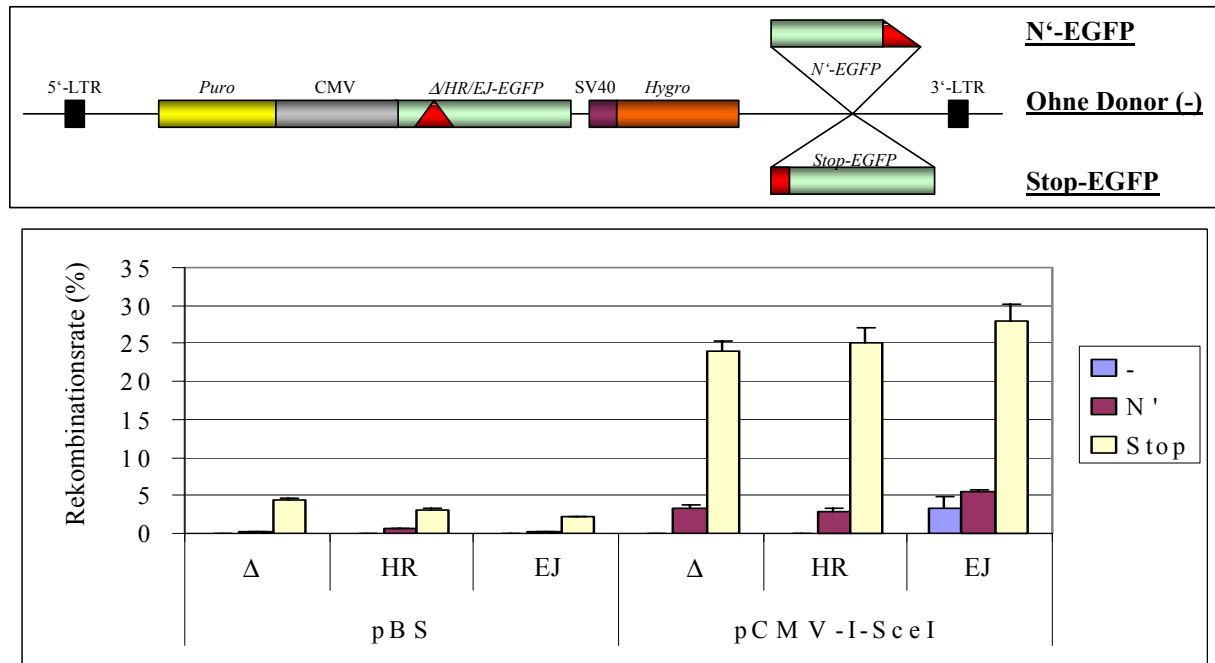


Abb. 48: Rekombinationsraten bezogen auf transfizierte KMV5-Zellen für Δ -, HR- oder EJ-EGFP-Akzeptor und N'-EGFP- (N') oder Stop-EGFP-Donor (Stop) oder ohne Donorsequenz (-). Rekombinationsraten mit pBS-Kontrollvektor oder pCMV-I-SceI-Meganuklease-Expressionsvektor wurden wie in Tabelle 9 bestimmt. Die verwendeten Rekombinationsvektoren sind schematisch dargestellt.

4.2.7 Etablierung eines Zellsystems zur Messung von Rekombination im chromosomalen Kontext

Um Rekombinationsereignisse im chromosomalen Genom-Kontext untersuchen zu können, wurden die retroviralen Rekombinationsvektoren p5xtrsSV40-HygbPuroCMV- Δ , -HR und -EJ mittels Elektroporation in KMV5-Zellen eingebracht und Einzellzellklone durch Selektion auf Puromycin-Resistenz isoliert (s. Tab. 10).

Klongruppen-Bezeichnung	elterliche Zelllinie	Retroviraler Rekombinationsvektor	Isolierte Klone	PCR-getestete Klone	PCR-positive Klone
MHA	KMV5	p5xtrsSV40-HygbPuro-CMV- Δ	über 20	7	7
MHHR		p5xtrsSV40-HygbPuro-CMV-HR	über 20	10	8
MHEJ		p5xtrsSV40-HygbPuro-CMV-EJ	über 20	7	4

Tabelle 10: Klonierungsstatistik zur Etablierung von Zelllinien mit stabil ins Genom integrierten Rekombinationssubstraten.

Die Integrität des jeweiligen retroviralen Rekombinationsvektors nach Insertion ins Genom des jeweiligen puromycinresistenten Klons wurde an genomischer DNA mittels PCR-Analyse bestätigt (s. 4.2.10).

4.2.8 Rekombinationsratenbestimmung im chromosomalen Kontext

Nachdem die vollständige Integration des jeweiligen Rekombinationsvektors mittels PCR-Analyse nachgewiesen worden war (s. 4.2.10), wurde mittels I-SceI-Expression Rekombination initiiert und die Rekonstitution von wtEGFP am FACScan bestimmt. Dafür wurden die folgenden Klone:

1. **M-HA2/5/6** (KMV5-Derivate mit p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-Δ),
2. **M-HHR1/2/3/4** (KMV5-Derivate mit p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR) und
3. **M-HEJ2/3/5/12** (KMV5-Derivate mit p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-EJ) zur Bestimmung der I-SceI-unabhängigen Rekombinationsraten mit 20 µg pBS und zur Messung der Rekombination nach DSB-Erzeugung mit 20 µg pCMV-I-SceI elektroporiert. Die Ansätze wurden mit und ohne Östradiol (200 nM) inkubiert und nach 48 h, 72 h und 96 h die Fluoreszenzen der Zellen am Durchflußzytometer (Coulter XL-MCL) analysiert. In Abb. 49 sind repräsentative FL1/FL2-Dot-Plots gezeigt.

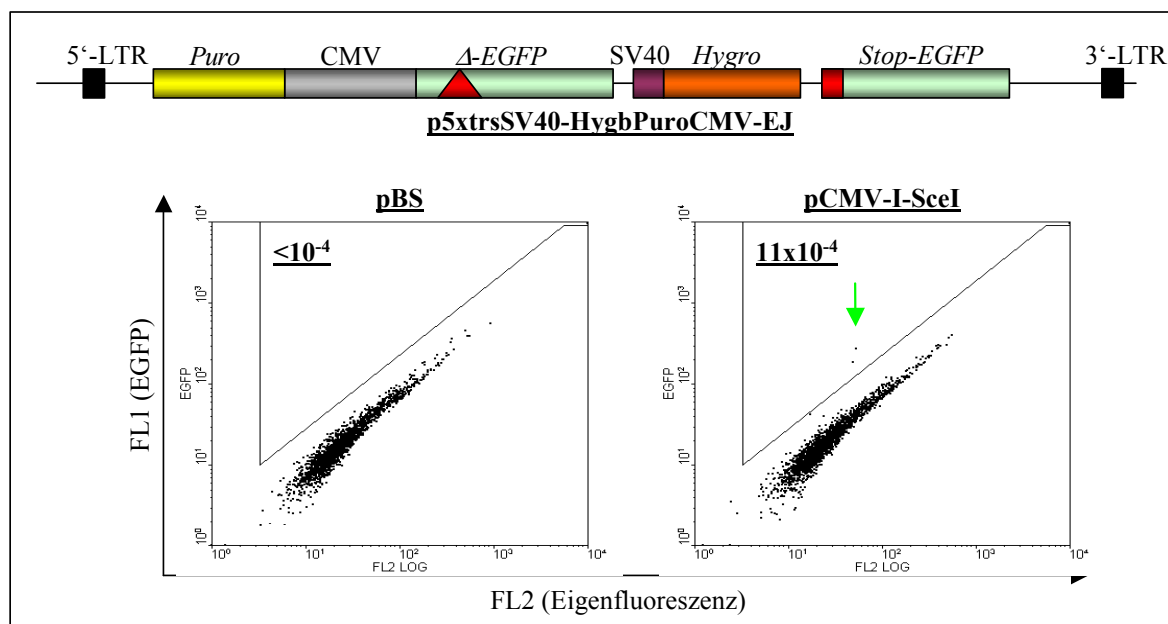


Abb. 49: Detektion grünfluoreszierender Zellen in MHEJ12-Zellen nach Transfektion mit pBS oder pCMV-I-SceI im Dot-Plot. Das in MHEJ12-Zellen stabil ins Genom integrierte Rekombinationsplasmid ist oberhalb der Dot-Plots schematisch dargestellt. Der grüne Pfeil deutet auf grünfluoreszierende Zellen hin.

Zur Bestimmung der Rekombinationsraten für die unterschiedlichen Akzeptoren wurde der Grünfluoreszenzanteil in je 2-4 PCR-positiven Klone pro Δ-, HR- und EJ-Konstrukt (je Dreifach-Bestimmungen) gemittelt und in Abb. 50 die nach Östradiol-Gabe ermittelten Werte in Abhängigkeit von der Zeit zusammengefasst.

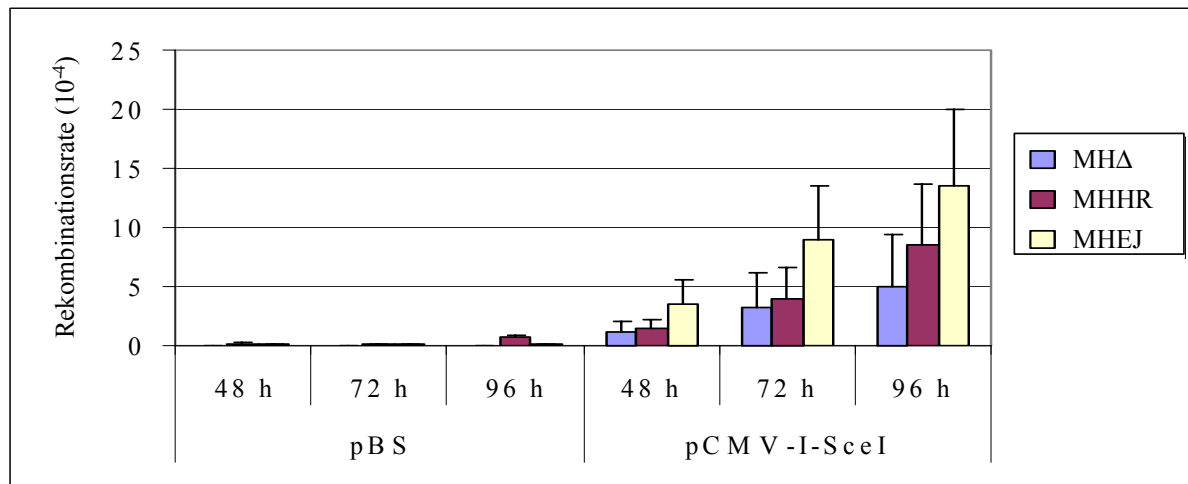


Abb. 50: Rekombinationsraten in den Klonen MHA, MHHR und MHEJ. Auf der linken Seite wurden Rekombinationsraten zu verschiedenen Zeiten nach Elektroporation der Klone mit pBS und auf der rechten nach Elektroporation mit pCMV-I-SceI angegeben. Da 24 h nach Initiation der Rekombination die Rekombinationsraten unterhalb des Detektionslimits von 10^{-4} lagen, wurden sie nicht in die Darstellung mit einbezogen.

Zusammenfassend wurden mit Hilfe des neuentwickelten Test-Systems basierend auf der Rekonstitution des *wtEGFP*-Gens im chromosomalen Genom-Kontext DNA-Austauschereignisse für alle Akzeptor-Donor-Kombinationen quantitativ erfasst. 96 h nach Initiation der Rekombination wurde durchschnittlich ein Grünfluoreszenzanteil in Höhe von 5×10^{-4} (Δ), 9×10^{-4} (HR) und 14×10^{-4} (EJ) beobachtet. Zum gleichen Zeitpunkt lag die Rekombinationsrate ohne spezifische DSB-Erzeugung im Durchschnitt bei maximal 4×10^{-5} (HR-EGFP). Dies bedeutet, dass in diesem System nach I-SceI-Expression mindestens 12fach höhere Rekombinationsraten zu beobachten waren. Diese Rekombinations-Eigenschaften waren nicht spezifisch für KMV5, sondern wurden ähnlich auch mit den Parentalzellen K562 beobachtet. Nach Elektroporation der K562-Zellen mit p5xtrsSV40HygbPuro-CMV- Δ bzw. -EJ wurden fünf bzw. neun Klone isoliert und die Integrität der genomisch inserierten Konstrukte mittels PCR mit den Oligonukleotiden Pur1-1 und EGFP20-2 verifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Rekombinationsanalyse der zwei PCR-positiven Δ -Klone und der sieben PCR-positiven EJ-Klone ergab ein Maximum von 5×10^{-4} nach I-SceI-Expression.

4.2.9 Die Rolle von p53 bei der homologen Rekombination von chromosomal integrierten Substraten

Da die Inaktivierung von wtp53 zu einer Erhöhung der spontanen homologen Rekombination führt (Bertrand *et al.*, 1997, Mekeel *et al.*, 1997, Meyn *et al.*, 1994, Wiesmüller *et al.*, 1996) und DNA-Strangbrüche mit einer extrem raschen p53-Akkumulation einhergehen (Nelson und Kastan, 1994), sollte in dieser Arbeit die Rolle von wtp53 erstmalig bei durch gezielte DSBs induzierter rekombinativer Reparatur analysiert werden. Dabei wurde die Wirkung von sowohl endogen (s. 4.2.12) als auch exogen exprimiertem p53 (s. 4.2.13) mittels episomalen oder chromosomal integrierten Rekombinationsvektoren untersucht.

Zur Änderung des p53-Status für anschließende Rekombinations-Untersuchungen mit chromosomal integrierten Substraten wurde ein Fusionsprotein aus wtp53 und der Östradiolbindedomäne des humanen Östrogen-Rezeptors zur Expression gebracht, da so Wachstumsinhibition durch wtp53 während der Zellzucht minimiert werden konnte, wenn Östradiol im Wachstumsmedium fehlte (Roemer und Friedman, 1993). In diesem System kann die volle Aktivierung des wtp53-Anteils durch Östradiol-Gabe erreicht werden. KMV5-Zellen (p53^{-/-}) wurden mit je 10 µg pSV53-her und p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR koelektroporiert und mittels Puromycin-Selektion zehn Einzelzell-Klone isoliert. Die konstitutive Expression von wtp53her in zwei der 10 isolierten Klone wurde mittels Western-Blot-Analyse bestätigt (s. Abb. 51).

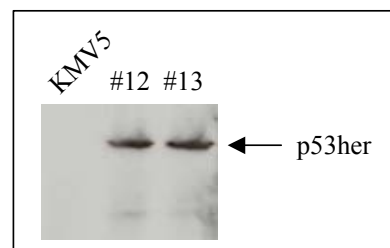


Abb. 51: Western-Blot-Analyse der Klone MHHR-her5-12 (#12) und -13 (#13). Nach elektrophoretischer Trennung der Proteine in einem 10%igen SDS-PAGE-Gel und Membran-Transfer wurde die Lage von p53her (90 kDa) mit Hilfe des Primär-Antikörpers DO1 nachgewiesen. Die p53-negative KMV5-Parentalzelllinie diente als Negativ-Kontrolle.

Nach Isolierung von genomischer DNA und PCR-Analyse wurde auch für diese beiden p53her-positiven Klone (#12 und #13) die Integration des retroviralen Rekombinationsvektors in das zelluläre Genom bestätigt (s. 4.2.10).

Zur Analyse der Rolle von wtp53 bei der rekombinativen DSB-Reparatur wurden die Klone MHHR-her5-12 und -13 (KMV5-Derivate mit den Vektoren p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-HR und pSV53her) mit 20 µg pBS bzw. pCMV-I-SceI elektroporiert und das Auftauchen grünfluoreszierenden Zellen mittels FACS-Analyse festgestellt (s. Abb. 52).

Der Vergleich der Rekombinationsraten zwischen den isogenen Klonen MHHR ($p53^{-/-}$) und MHHR-her (hwt $p53$) zeigte, daß durch die Expression des humanen wtp53 in Fusion mit der Östradiol-Bindedomäne des Östrogen-Rezeptors die Raten von 9×10^{-4} auf $0,3 \times 10^{-4}$ reduziert wurden (96 h). Im Ergebnis wurde also für das chromosomal integrierte Rekombinationssubstrat mit *HR-EGFP*-Akzeptor durch wtp53her-Expression mittels genomisch integriertem Expressions-Vektor eine 30fache Inhibition der homologen Rekombination nachgewiesen.

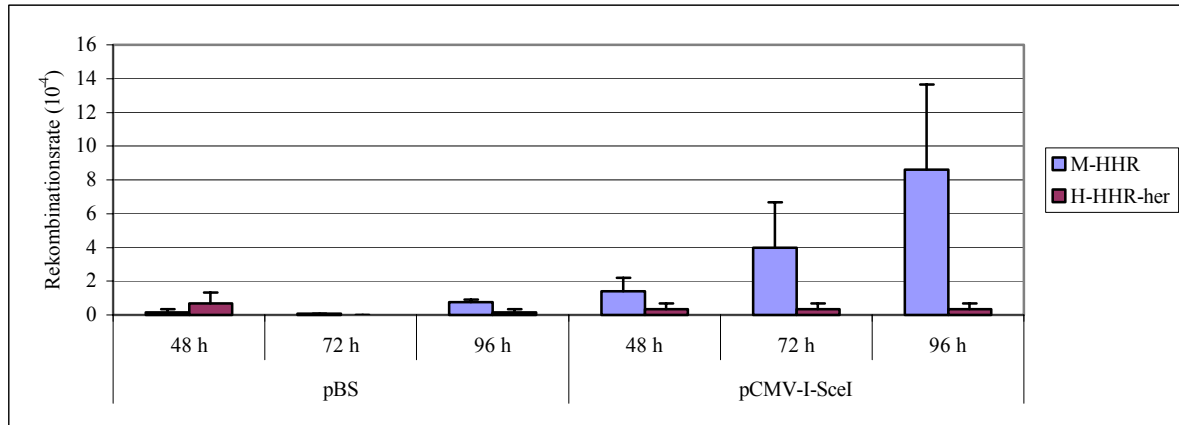


Abb. 52: Vergleich der Rekombinationsraten in MHHR- und MHHR-her-Klonen. Rekombinationsraten für 4 MHHR-Klone und 2 MHHR-her-Klone in Gegenwart von Östradiol wurden festgestellt und gemittelt. Auf der linken Seite sind die Raten nach Elektroporation mit Kontrollplasmid pBS und auf der rechten nach Elektroporation mit pCMV-I-SceI dargestellt.

4.2.10 Nachweis der Integrität des Rekombinationsvektors nach Insertion ins zelluläre Genom

Um die Integrität des Rekombinationsvektors ins zelluläre Genom zu überprüfen, wurde der für die Rekombination relevante Bereich zwischen den 5'- und 3'-LTRs mittels vier überlappender PCR-Amplifikationen durchgemustert. Die Ergebnisse der genomischen PCR-Analyse nach elektrophoretischer Trennung der Fragmente in einem Agarosegel ist in Abb. 53 und 54 gezeigt.

In all den Klonen wurde die korrekte Integration des Rekombinationsvektors nachgewiesen. Bei Klon MHHR-her5-12 mit Oligonukleotidpaar A und den Klonen MHHR-1 und -2 bzw. MHEJ-5 mit Oligonukleotidpaar B waren die PCR-Fragmente sehr schwach, trotzdem aber eindeutig zu erkennen. Mit Ausnahme von der PCR-Reaktion mit dem Oligonukleotidpaar D waren in den Negativ-Kontrollen mit genomischen DNAs aus K562-, KMV5- und KMV-wt5-Zellen keinerlei schwache Fragmentbanden auf der Höhe der zu erwartenden PCR-Produktbanden zu sehen (s. Abb. 53).

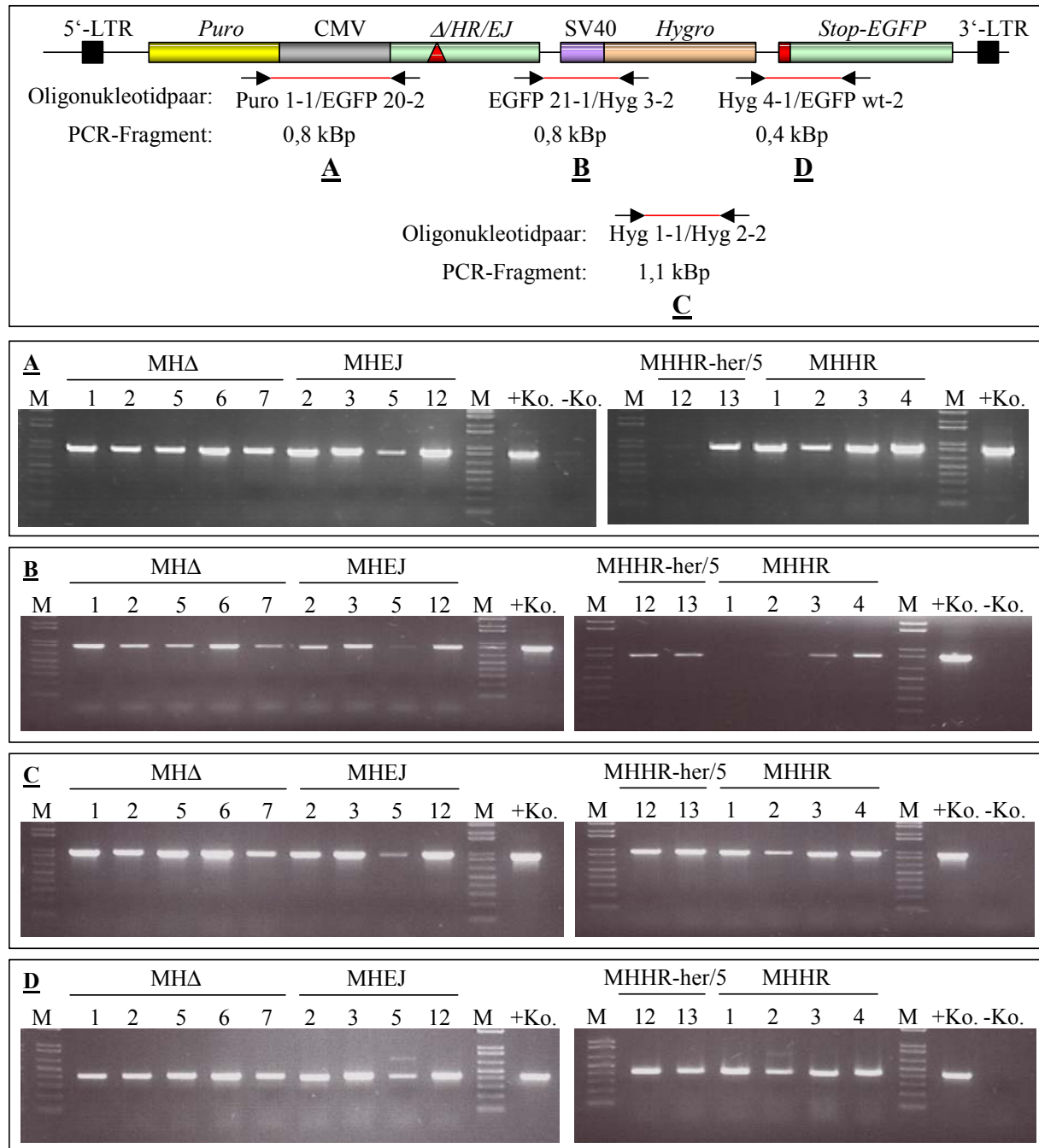


Abb. 53.: Genomische PCR-Analyse der chromosomal integrierten Rekombinations-Substrate. Zur Amplifikation der genomischen DNA wurden Oligonukleotidpaare (A: Puro1-1 und EGFP20-2, B: EGFP21-1 und Hyg3-2, C: Hyg1-1 und Hyg2-2 und D: Hyg4-1 und EGFPwt-2) eingesetzt, deren Positionen auf dem Rekombinationsvektor mit erwarteter Fragmentgröße nach PCR-Amplifikation im oberen Teil dargestellt sind. PCR-Produkte aus Reaktionen mit genomischen DNAs der Klone MHAΔ-1/-2/-5/-6/-7, MHEJ-2/-3/-5/-12, MHHR-her/5-12/-13 und MHHR1-4 und den Oligonukleotidpaaren A-D wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Als Positiv-Kontrolle (+Ko.) wurde eine PCR-Reaktion mit dem Plasmid *p5xtrsSV40-Hyg bPuroCMV-EJ* und als Negativ-Kontrolle (-Ko.) eine Reaktion ohne DNA angesetzt. M: DNA-Längen-Marker 1kb-Plus.

Zusammenfassend kann ich sagen, dass in den getesteten Klone der retrovirale Rekombinationsvektor zwischen den 5'- und 3'-LTR's ohne nachweisbare Deletionen oder Insertionen in den getesteten Bereichen in das zelluläre Genom integriert worden war. Darüberhinausgehend konnte auch für alle analysierten Klone mit einer Ausnahme zum

Zeitpunkt der ersten Rekombinations-Messungen ausgeschlossen werden, dass bereits während der Klon-Etablierung EGFP-Rekonstitution durch kHR stattgefunden hatte, da außer beim Klon MHA1 keinerlei grünleuchtende Zellen feststellbar waren.

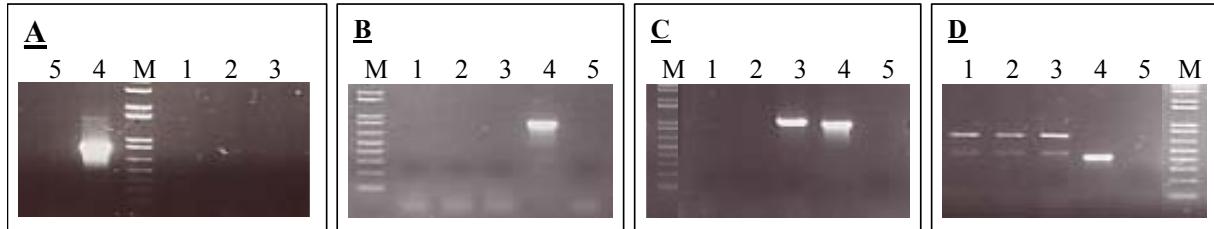


Abb. 54.: Kontrollreaktionen zur genomischen PCR-Analyse. Die Oligonukleotidpaare A-D wurden wie in Abb. 53 in PCR-Reaktionen mit genomischen DNAs aus den Negativ-Kontrollzellen K562 (1), KMV5 (2) und KMV/wt-5 (3) eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle (4) wurde eine PCR-Reaktion mit dem Plasmid p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-EJ und als weitere Negativ-Kontrolle (5) eine Reaktion ohne DNA angesetzt. M: DNA-Längen-Marker 1kb-Plus.

4.2.11 Rolle von p53 bei der HR mit unterschiedlichen Substrattypen und beim NHEJ

Für eine erfolgreiche HR ist eine Mindestlänge von 200 Bp 100%iger Homologie innerhalb der zu rekombinierenden Substrate essentiell (Elliot *et al.*, 1998, Rubnitz and Subramani, 1984). Durch die Generierung von Rekombinationsplasmiden mit Δ - und *HR-EGFP*-Akzeptoren wurden im Rahmen dieser Arbeit 5' zum DSB 194 Bp bzw. 168 Bp lange 100%ige Homologien generiert. In den vorangegangenen Experimenten mit KMV5-Zellen wurden beim direkten Vergleich mittels episomaler Substrate keine signifikanten Unterschiede für Rekombinationsplasmide mit Δ - und *HR-EGFP* nachgewiesen (s. 4.2.6). Da aber in unserer Arbeitsgruppe Hinweise dafür gesammelt worden waren, dass p53 die Genauigkeit von Rekombinationsprozessen kontrolliert (Dudenhöffer *et al.*, 1998), wurde ein möglicher Effekt von wtp53 bei der HR mit limitierten homologen Sequenzen untersucht. Gleichzeitig wurde eine mögliche Beteiligung von wtp53 beim NHEJ mit episomal vorliegenden Substraten untersucht. Untersuchungen im chromosomalen Kontext waren in diesem Zusammenhang nicht sinnvoll, da in transienten Experimenten sowohl für Rekombinationsvektoren mit *N'-EGFP*-Donor als auch für das NHEJ-Testplasmid ohne Donor maximale Raten von 4-12 % bzw. 1-3 % beobachtet worden waren (s. 4.2.6), so dass für chromosomal integrierte Substrate mit 100fach geringeren Rekombinationsraten (s. 4.2.7) ein Absinken unter die Nachweisgrenze vorhergesagt wurde.

Für die Analyse wurden jeweils 10 µg des jeweiligen Rekombinations- oder Kontroll-Plasmids (1.-6., s. Abb. 55) und der wtp53-Expressionsvektor pC53-wt₃ koelektroporiert. Alternativ zu pC53-wt₃ wurden KMV5-Zellen mit pBS koelektroporiert.

1. Negativ-Kontrollvektoren mit dem Rekombinationsdonor und dem *I-SceI*-Gen: p5xEsGal4-I-SceI und p5xtrsGal4-I-SceI,
2. Negativ-Kontrollvektoren mit dem Rekombinationsakzeptor und dem *I-SceI*-Gen: p5xGal4SceIbPuroCMV-Δ und -HR und,
3. NHEJ-Vektor mit *EJ-EGFP* an der Akzeptorposition und dem *I-SceI*-Gen: p5xGal4SceIbPuroCMV-EJ
4. Rekombinationsvektoren mit *N'-EGFP* als Donor, dem *I-SceI*-Gen und dem Akzeptor: p5xEsGal4SceIbPuroCMV-Δ, -HR und -EJ,
5. Rekombinationsvektoren mit *Stop-EGFP* als Donor, dem *I-SceI*-Gen und dem Akzeptor: p5xtrsGal4SceIbPuroCMV-Δ, -HR und -EJ und
6. Positiv-Kontrollvektor mit dem *wtEGFP*-Gen an der Akzeptorposition: p5bPuroCMVwtEGFP.

Die transfizierten Zellen wurden zur Initiation der Rekombination mittels *I-SceI*-Expression in Gegenwart von Östradiol (200 nM) kultiviert und nach 72 h 30000 Zellen pro Ansatz am FACS-Durchflußzytometer (Coulter XL-MCL) analysiert. Die Rekombinationsraten aus drei voneinander unabhängigen Messungen wurden gemittelt und die Mittelwerte gegen die der Positiv-Kontrolle korrigiert (s. Tab. 11).

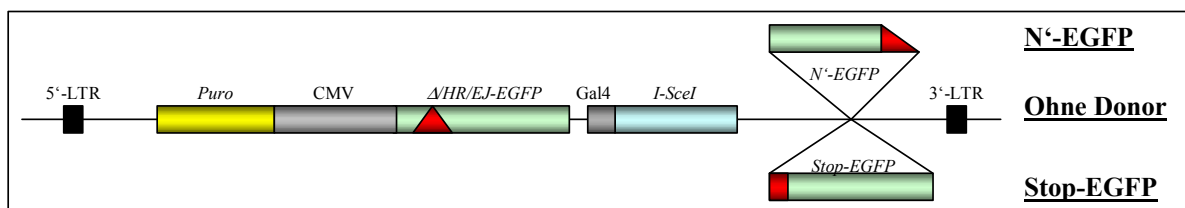


Abb. 55: Schematische Darstellung der in KMV5-Zellen transfizierten Vektoren. *N'*- oder *Stop-EGFP* wurden als Donorsequenzen und Δ -, *HR*- und *EJ-EGFP* als Akzeptorsequenzen eingesetzt (s. 4.1).

In KMV5-Zellen, die mit akzeptorlosen Kontrollvektoren transfiziert worden waren, lag die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen im Bereich der Nachweisgrenze von 10^{-4} . Auch mit den donorlosen Substraten Δ - und *HR-EGFP* lag die Grünfluoreszenz der Zellen im Bereich der Nachweisgrenze. Infolge von NHEJ wurden mit dem donorlosen *EJ-EGFP*-Vektor Rekombinationsraten in Höhe von 73×10^{-4} gemessen. Diese wurden nach wtp53-Expression bis zur Nachweisgrenze gesenkt.

Für die Rekombination mit *N'*- bzw. *Stop-EGFP*-Gen als Donorsequenz wurde ein Maximalwert von 12 % bzw. 22 % beobachtet. Nach wtp53-Expression wurden die

Rekombinationsraten mit Δ -EGFP infolge von kHR (Vektor mit N' -EGFP-Gen als Donor) 20fach und infolge von kHR und nkHR (Vektor mit *Stop*-EGFP-Gen als Donor) fünffach inhibiert, während die Raten mit HR- und EJ-EGFP infolge von kHR siebenfach und infolge von kHR und nkHR vierfach reprimiert wurden.

Donor	Akzeptor	pBS	wt 53
-	Δ	0,0 % $\pm$ 0,0	0,0 % $\pm$ 0,0
	HR	0,0 % $\pm$ 0,0	0,0 % $\pm$ 0,0
	EJ	0,7 % $\pm$ 0,0	0,0 % $\pm$ 0,0
N'-EGFP	Δ	3,8 % $\pm$ 0,5	0,2 % $\pm$ 0,1
	HR	12,4 % $\pm$ 1,0	1,7 % $\pm$ 0,2
	EJ	9,1 % $\pm$ 0,8	1,3 % $\pm$ 0,0
Stop-EGFP	Δ	22,5 % $\pm$ 2,2	4,9 % $\pm$ 1,8
	HR	20,5 % $\pm$ 0,8	5,1 % $\pm$ 0,5
	EJ	19,3 % $\pm$ 0,9	5,0 % $\pm$ 0,3

Tab. 11: Rekombinationsraten in KMV5-Zellen, die mit verschiedenen Rekombinationsvektoren (s. Abb. 55) und pC53-wt₃ zur wtp53-Expression oder alternativ mit pBS koelektroporiert wurden.

4.2.12 Untersuchungen mit endogen exprimiertem p53 und episomal vorliegenden Rekombinationssubstraten

Nachdem in der p53-negativen Zelllinie KMV5 mit transient exprimiertem p53 gezeigt werden konnte, dass das neu entwickelte Test-System geeignet für die Rekombinationsratenbestimmung in Abhängigkeit von p53 ist (s. 4.2.9 und 4.2.11), wurden Zelllinien mit unterschiedlichem endogenen p53-Status auf Unterschiede in den Rekombinationsraten mit episomal oder chromosomal vorliegenden Substraten analysiert.

Die humanen Zelllinien K562 (p53^{-/-}), TK6 (wt

53

) und WTK1 [p53(273I)] wurden mit je 10 μ g der folgenden Vektoren elektroporiert:

1. Negativ-Kontrollvektoren mit Donor und dem *I-SceI*-Gen: p5xEsGal4-I-SceI und p5xtrsGal4-I-SceI,
2. Rekombinationsvektoren mit Donor, dem *I-SceI*-Gen und Akzeptor: p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV- Δ /HR (N' -EGFP als Donor), p5xtrsGal4-I-SceIPuroCMV- Δ /HR (*Stop*-EGFP als Donor) und
3. Positiv-Kontrollvektor mit dem *wtEGFP*-Gen : p5bPuroCMV-wtEGFP.

24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Elektroporation wurden die Fluoreszenzen in 30000 Zellen pro Ansatz am Durchflußzytometer (Coulter XL-MCL) analysiert. Rekombinationsraten aus zwei voneinander unabhängigen Messungen wurden gemittelt und die Mittelwerte gegen die der

Positiv-Kontrolle korrigiert, um Raten bezogen auf transfizierte Zellen zu erhalten (s. Abb. 56).

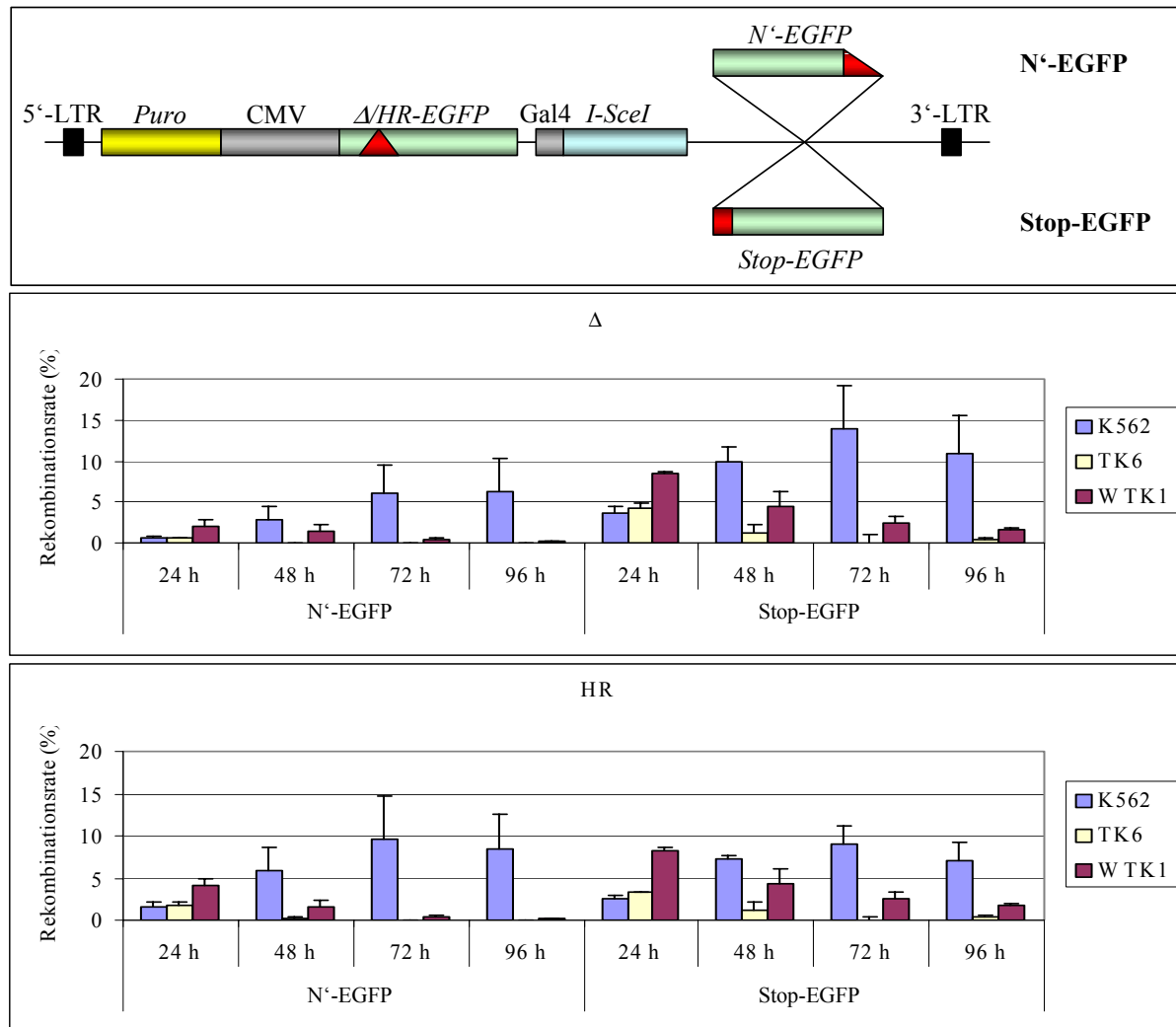


Abb. 56: Rekombinationsraten in den Zelllinien K562, TK6 und WTK1. Nach Transfektion mit unterschiedlichen Rekombinationsvektoren, welche die Akzeptoren Δ - und HR-EGFP (jeweils mit N'- oder Stop-EGFP als Donor) beinhalten, wurden Rekombinationsraten am FACScan bestimmt und für jeden Akzeptor getrennt dargestellt. Die elektroporierten Vektoren wurden oberhalb der Diagramme schematisch dargestellt.

Durch dieses Zeitvergleichsexperiment wurde gezeigt, dass mit episomal vorliegenden Rekombinationssubstraten der Grünfluoreszenzanteil in der Leukämiezelllinie K562 72 h und in den isogenen Lymphoblastenzelllinien TK6 und WTK1 24 h nach Elektroporation einen Höchstwert erreicht. Als mögliche Erklärung hierfür können die Unterschiede in den Generationszeiten, mit 14-16 h für TK6 und WTK1 bzw. mit 24 h für K562 herangezogen werden. Konsequenterweise wurden die Rekombinationsraten von K562 nach 72 h oder 48 h mit denen von TK6 und WTK1 nach 48 h oder 24 h verglichen (s. Tab. 12). Zu diesen Zeitpunkten lag die Rekonstitution des *wtEGFP*-Gens in Zellen, die mit akzeptorlosen Vektoren transfiziert wurden, unter dem Detektionslimit von 10^{-4} .

Mit episomal vorliegenden Rekombinationsplasmiden, die zur Untersuchung von kHR-Ereignissen kloniert worden waren (*N'*-*EGFP* als Donor), wurden im Vergleich zu denen, die zur Untersuchung von kHR- und nkHR-Ereignissen (*Stop-EGFP* als Donor) erzeugt wurden, zwei bis dreifach niedrigere Rekombinationsraten beobachtet.

Plasmid mit Rekombinations-		Rekombinationsrate (%)		
		24 h		48 h
-Donor	-Akzeptor	TK6	WTK1	K562
N'	Δ	1 % $\pm$ 0	2 % $\pm$ 1	3 % $\pm$ 2
	HR	2 % $\pm$ 1	4 % $\pm$ 1	6 % $\pm$ 3
Stop	Δ	4 % $\pm$ 1	9 % $\pm$	10 % $\pm$ 2
	HR	3 % $\pm$ 0	8 % $\pm$ 0	7 % $\pm$ 1

Tab. 12: Rekombinationsraten in K562 (48 h), TK6 und WTK1 (24 h) mit episomal vorliegenden Rekombinationsvektoren.

Der Vergleich der Zelllinien untereinander zeigte, dass nach 48 h die Rekombinationsraten in den K562-Zellen mit denen, die 24 h nach Elektroporation in WTK1-Zellen gemessen wurden, vergleichbar waren, während in TK6-Zellen bis zu dreifach niedrigere Rekombinationsraten gemessen wurden. Beim Vergleich der Rekombinationsraten von TK6- und WTK1-Zellen 48 h und 72 h nach Elektroporation bestätigte sich die bereits in Kapitel 4.2.11 gemachte Beobachtung, nämlich, dass in Gegenwart von wtp53 (TK6) kHR mit limitierenden Homologien wesentlich stärker unterdrückt wird als mit ausreichender Homologie. So lagen die Verhältnisse der Raten nach 48 h in TK6 zu denen in WTK1 bei 44facher (*N'*-*EGFP* –Donor und Δ -*EGFP*-Akzeptor) versus 6facher Inhibition (*N'*-*EGFP*-Donor und *HR-EGFP*-Akzeptor).

4.2.13 Untersuchungen mit exogen exprimiertem p53

Vor kurzem wurde gezeigt, dass in Säugerzellen die Kopplung von homologer und nicht homologer Rekombination bei der Reparatur von DSBen der Erhaltung der genomischen Integrität dient (Richardson and Jasin, 2000). Die Generierung der Rekombinationsvektoren mit dem *EJ-EGFP*-Gen als Rekombinationsakzeptor und einem der Donorgene (*N'*- oder *Stop-EGFP*) erlaubte uns die Messung von homologen und nicht homologen Reparaturereignissen auch in der gekoppelten Form. Um die mögliche Involvierung von p53 bei der gekoppelten Reparatur im Vergleich zur homologen Rekombination ohne NHEJ im chromosomalen Kontext zu untersuchen, wurde die wtEGFP-Rekonstitution in MHA, MHHR und MHEJ-Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von wtp53 miteinander verglichen. Diese

Zelltypen tragen Rekombinationsvektoren, welche neben dem *Stop-EGFP*-Gen eines der Akzeptorgene Δ -, *HR*- oder *EJ-EGFP* enthalten (s. Abb. 57).

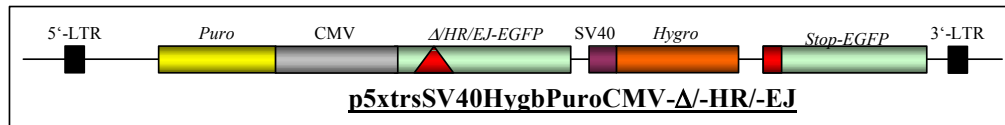


Abb. 57: Schematische Darstellung der chromosomal integrierten Rekombinationsvektoren p5xtrsSV40-HygbPuroCMV- Δ -HR/-EJ (s. 4.1).

4.2.13.1 Untersuchungen zur Rolle von Krebsrelevanten p53-Mutanten bei der Rekombination

In Experimenten, in welchen wtp53 transient unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wurde, konnte eine eindeutige Inhibition der Rekombination bestätigt werden (s. 4.2.9 und 4.2.11). Neben wtp53 sollte vor allem aber auch die Wirkung krebsrelevanter p53-Mutanten bei der Rekombination untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden die Klone MH Δ 3/-6, MHHR1/-4 und MHEJ3/-12 mit je 10 μ g der unten beschriebene Plasmide und 10 μ g pBS (I-*Sce*I-freie Kontrolle), pCMV-I-*Sce*I (zur Initiation der Rekombination mittels DSB) oder pEGFP-N1 (zur Bestimmung der Transfektionseffizienzen) koelektroporiert:

1. pBS (p53-Negativ-Kontrolle),
2. pC53-wt₃ (Vektor zur Expression von humanem wtp53),
3. pC53.Cx3₃ [Vektor zur Expression der humanen Konformationsmutante p53(143A)],
4. pC53.Cx22AN₃ [Vektor zur Expression der humanen Konformationsmutante p53(175H)],
5. pC53.248₃ [Vektor zur Expression der humanen Kontakt-Mutante p53(248W)],
6. pC53.4.2N₃ [Vektor zur Expression der humanen Kontakt-Mutante p53(273H)],
7. pC53.Cx7AN₃ [Vektor zur Expression der humanen *gain-of-function*-Mutante p53(281G)],
8. pKEX-wt (Vektor zur Expression von wtp53 aus der Ratte) und
9. pKEX-174Y (Vektor zur Expression der *gain-of-function*-Mutante p53(174Y) aus der Ratte).

72 h nach Elektroporation wurden pro Ansatz 30000 Zellen am FACS-Durchflußzytometer (Coulter XL-MCL) analysiert. Die Rekombinationsraten wurden pro Konstrukt aus Dreifachmessungen in je zwei Rekombinations-Testlinien (für Ratten-p53 je eine Linie) gemittelt und diese Mittelwerte wie bisher gegen die Transfektionseffizienzen aus der Positiv-Kontrolle korrigiert (s. Tab. 13).

Zur Bestimmung von Rekombinationsraten nach p53(143A)-Expression wurden die transfizierten Zellen jeweils bei 30 °C bzw. 39 °C für 72 h inkubiert, da p53(143A) Temperatursensitivität aufweist. In Tab. 13 sind nur die Ergebnisse nach Inkubation bei 39 °C angegeben, da die Zellen bei 30 °C abstarben.

Inkubation bei:	Protein	MHΔ	MHHR	MHEJ
37 °C	-	$15,6 \cdot 10^{-4} \pm 5,0$	$7,3 \cdot 10^{-4} \pm 1,8$	$7,5 \cdot 10^{-4} \pm 0,9$
	hwtp53	$0,2 \cdot 10^{-4} \pm 0,2$	$0,2 \cdot 10^{-4} \pm 0,2$	$1,7 \cdot 10^{-4} \pm 0,6$
	hp53(175H)	$3,5 \cdot 10^{-4} \pm 0,7$	$2,4 \cdot 10^{-4} \pm 0,8$	$3,3 \cdot 10^{-4} \pm 0,6$
	hp53(248W)	$3,8 \cdot 10^{-4} \pm 0,9$	$1,7 \cdot 10^{-4} \pm 0,7$	$3,4 \cdot 10^{-4} \pm 0,0$
	hp53(273H)	$7,3 \cdot 10^{-4} \pm 2,0$	$3,4 \cdot 10^{-4} \pm 1,1$	$2,1 \cdot 10^{-4} \pm 0,6$
	hp53(281G)	$5,2 \cdot 10^{-4} \pm 1,1$	$1,9 \cdot 10^{-4} \pm 0,6$	$0,9 \cdot 10^{-4} \pm 0,5$
39 °C	-	$20,8 \cdot 10^{-4} \pm 6,2$	$3,1 \cdot 10^{-4} \pm 1,4$	$6,7 \cdot 10^{-4} \pm 0,7$
	hwtp53	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-4} \pm 0,8$
	hp53(143A)	$9,4 \cdot 10^{-4} \pm 3,5$	$0,4 \cdot 10^{-4} \pm 0,4$	$1,9 \cdot 10^{-4} \pm 0,5$
37 °C	-	$35,6 \cdot 10^{-4} \pm 6,3$	$65,6 \cdot 10^{-4} \pm 5,0$	$27,3 \cdot 10^{-4} \pm 3,0$
	rwtp53	$6,1 \cdot 10^{-4} \pm 1,4$	$3,8 \cdot 10^{-4} \pm 0,8$	$1,4 \cdot 10^{-4} \pm 0,5$
	rp53(174Y)	$19,1 \cdot 10^{-4} \pm 5,1$	$42,1 \cdot 10^{-4} \pm 1,6$	$12,6 \cdot 10^{-4} \pm 2,2$

Tab. 13: Rekombinationsraten für chromosomal integrierte Substrate nach I-SceI-Expression. Rekombinationsraten nach I-SceI-Expression in den Klonen MHΔ-3 und -6, MHHR-1 und -4 und MHEJ-3 und -12 (für p53 aus der Ratte nur in den Klonen MHΔ6, MHHR4 und MHEJ12), die zur Untersuchung von wtp53- bzw. Mutanten-p53-Effekten mit den beschriebenen Expressionsvektoren transfiziert und bei 37 °C bzw. 39 °C inkubiert wurden. -: Kein p53-Protein, da hier die Zellen mit pBS transfiziert wurden. hp53: p53 aus dem Menschen, rp53: p53 aus der Ratte.

Um auszuschließen, dass mögliche Effekte auf unterschiedliche Expressions-Niveaus zurückzuführen waren, wurden MHΔ6- und KMV5-Zellen mit je 10 µg der Plasmide zur Expression unterschiedlicher p53-Varianten bzw. als Negativ-Kontrolle mit pBS elektroporiert und die p53-Expression 72 h nach Transfektion mittels Western-Blot-Analyse untersucht (s. Abb. 58). Hierbei wurden keine signifikanten Expressionsunterschiede für die verschiedenen p53-Formen (aus Mensch oder Ratte) beobachtet, wenn alle unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wurden.

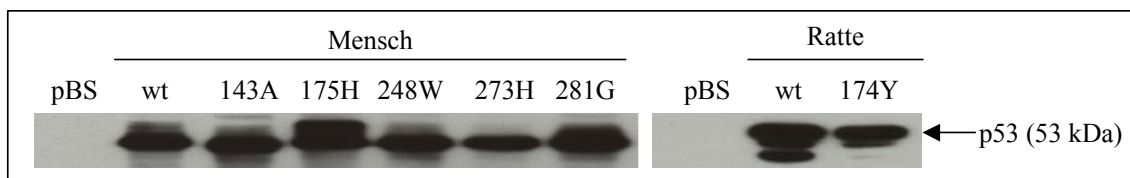


Abb. 58: Expressionsmuster der Proteine wtp53 und p53(174Y) aus der Ratte in MHΔ-Zellen und wtp53, p53(143A), p53(175H), p53(248W), p53(273H) und p53(281G) in KMV5-Zellen 72 h nach Elektroporation mit den Expressionsvektoren. Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch getrennt und nach Membran-Transfer die Lage von p53 aus der Ratte mit dem Primär-Antikörper Pab421 bzw. von humanem p53 mit DO1 detektiert. Die mit pBS statt Expressionsvektor transfizierten Zellen wurden als Negativ-Kontrolle eingesetzt.

Die Bestimmung der Rekombinationsraten bei dieser Serie von Experimenten ergab für alle Vektorkombinationen in Abwesenheit von der Meganuklease I-SceI, dass keine Signale oberhalb der Nachweisgrenze von 10^{-4} detektiert wurden. Demgegenüber lagen die maximalen Rekombinationsraten nach Koelektroporation von pBS und pCMV-I-SceI in MHA Δ -Zellen bei 16×10^{-4} , in MHHR-Zellen bei 7×10^{-4} bzw. in MHEJ-Zellen bei 8×10^{-4} (bei 37 °C). Nach Expression von humanem wtp53 wurde die Rekombination in MHA Δ -Zellen 82fach, in MHHR-Zellen 43fach und in MHEJ-Zellen vierfach inhibiert. Mit der Konformationsmutante p53(175H) wurde nur vierfache (MHA Δ) bzw. dreifache (MHHR, MHEJ) Inhibition beobachtet. Nach Expression der Kontaktmutante p53(248W) wurden die Rekombinationsraten in den MHA Δ - und MHHR-Klonen vierfach und in MHEJ-Klonen zweifach inhibiert, während mit der Kontaktmutante p53(273H) die Raten zweifach (MHA Δ , MHHR) bzw. vierfach (MHEJ) supprimiert wurden. Die Expression der *Gain-of-Function*-Mutante p53(281G) führte in MHA Δ -Zellen zur dreifachen Inhibition der Rekombination, während in MHHR-Zellen vierfache und in MHEJ-Zellen neunfache Suppression beobachtet wurde.

Die Inkubation bei 39 °C hatte ähnliche Rekombinationsraten wie bei 37 °C ohne oder mit wtp53 zur Folge. Die Expression der temperatursensitiven Mutante p53(143A) hatte in MHA Δ -Zellen eine nur zweifache, in MHHR-Zellen eine achtfache und in MHEJ-Zellen eine vierfache Unterdrückung zur Folge.

Die Bestimmung der Rekombinationsraten nach Expression von p53-Formen aus der Ratte ergab für wtp53 im MHA Δ 6-Zellen eine sechsfache, in MHHR4-Zellen eine 17fache und in MHEJ12-Zellen eine 20fache Inhibition der Rekombination. Mit der *Gain-of-Function*-Mutante p53(174Y) wurden dagegen die Raten in MHA Δ 6-Zellen um 18 %, in MHHR4-Zellen um 35 % und in MHEJ12-Zellen um 54 % gesenkt.

Zusammenfassend konnte für humanes wtp53 sowohl bei 37 °C als auch bei 39 °C eine mindestens 43fache Unterdrückung der Rekombinationsereignisse an chromosomal integrierten Substraten mit sowohl Δ - als auch *HR-EGFP*-Akzeptoren beobachtet werden. Für die besonders häufig bei Krebspatienten vorkommenden p53-Mutanten p53(175H), p53(273H) und p53(248W) betrug diese maximal vierfach. Die Kombination aus *EJ-EGFP*-Akzeptor und *Stop-EGFP*-Donor (MHEJ-Zellen) und damit die Möglichkeit zur Detektion von gekoppelten Ereignissen aus Genkonversion und NHEJ löste eine vergleichsweise geringe Rekombinations-Unterdrückung durch wtp53 aus. Auch p53 aus der Ratte zeigte eine deutliche Unterdrückung der homologen Rekombination im heterologen System der

menschlichen KMV5-Zellderivate. Jedoch wurde die für humanes p53 beobachtete geringere Beeinflussung der Rekombination in MHEJ-Zellen für p53 aus der Ratte nicht deutlich.

4.2.13.2 Analyse von spezifisch inaktivierten p53-Mutanten bei der Rekombination

Nachdem mit wtp53 eine Inhibition der Rekombination sowohl mit episomalen als auch chromosomal integrierten Substraten nachgewiesen worden war (s. 4.2.9 und 4.2.11), wurden mögliche Verbindungen zu anderen Aktivitäten, insbesondere der Transaktivierungsfunktion von wtp53 untersucht. Hierfür wurde die temperatursensitive Konformationsmutante p53(138V), welche das humane Homolog der *Separation-of-Function*-Mutante von Maus-p53(135V) repräsentiert und welche keine transkriptionelle Transaktivierungsfunktion ausüben kann, aber rekombinations-regulatorische Funktionen beherbergt (Willers *et al.*, 2000), und zwei Mutanten p53(1-333) und p53(1-363), bei denen die Oligomerisierungs- bzw. die negative regulatorische Domäne deletiert worden waren (Dudenhöffer *et al.*, 1999, Janz *et al.*, 2001; Pellegata *et al.*, 1995) exprimiert und die Veränderungen der Rekombinationsraten analysiert.

Zur Bestimmung der Rekombinationsraten nach Expression der temperatursensitiven Variante p53(138V) im Vergleich zu wtp53 unter der Kontrolle des Gal4-Promotors wurden die Klone MHA-3 und -6, MHHR-1 und -4 bzw. MHEJ-3 und -12 mit je 10 µg der unten stehenden Plasmide und Kontrollplasmid pBS, mit pCMV-I-SceI zur DSB-Erzeugung oder mit pEGFP-N1 zur Bestimmung der Transfektionseffizienzen koelektroporiert:

1. pGC-Vektor (p53-negative Kontrolle),
2. wtp53 in pGC (Vektor zur Expression des humanen wtp53) und
3. p53(138V) in pGC [Vektor zur Expression des humanen p53(138V)].

Die Ansätze wurden mit oder ohne Östradiol (200 nM) bei 30 °C und 39 °C inkubiert. Die Anzahl grünfluoreszierender Zellen unter 30000 Zellen wurde 72 h nach Elektroporation bestimmt. Die Rekombinationsraten wurden aus Dreifachmessungen von je zwei Klonen pro Konstrukt gemittelt und die Mittelwerte gegen die der Positiv-Kontrolle korrigiert. Die Raten, die nach Koelektroporation der Klone mit den Plasmiden pBS und pCMV-I-SceI ermittelt worden waren, wurden als 100%ige Rekombinationsraten definiert und für die restlichen Proben relative Rekombinationsraten errechnet (s. Abb. 59).

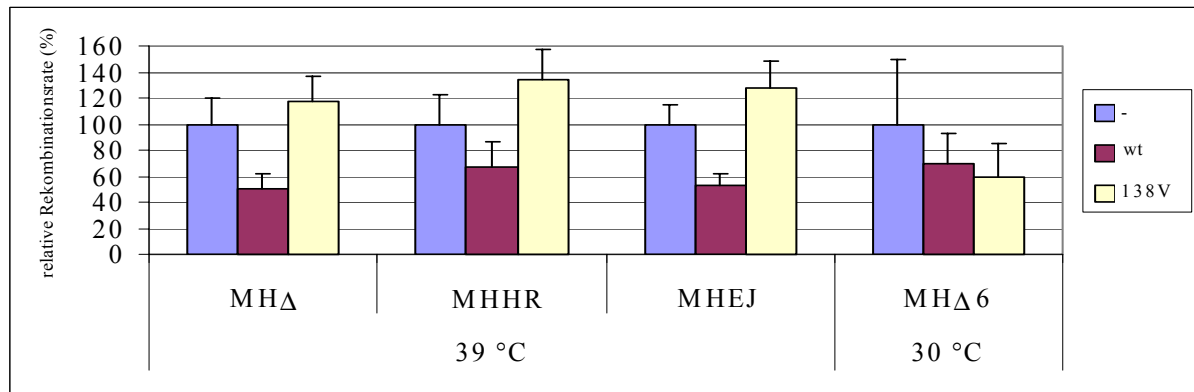


Abb. 59: Relative Rekombinationsraten in Zelllinien mit chromosomal integrierten Rekombinationsvektoren nach Expression von wtp53 oder p53(138V) bei 30 °C oder 39 °C in Gegenwart von 200 nM Östradiol. Raten nach Transfektion der Zellen mit dem pGC-Vektor wurden als 100 % definiert und relative Raten inklusive Standardfehler errechnet.

Um auszuschließen, dass mögliche Effekte auf unterschiedliche Expressions-Niveaus zurückzuführen sind, wurden KMV5-Zellen mit je 10 µg der Plasmide pGC-Vektor, wtp53 in pGC und p53(138V) in pGC elektroporiert, mit 200 nM Östradiol die p53-Expression induziert und für 72 h bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden wtp53 und p53(138V) mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen (s. Abb. 60). Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Expression von wtp53 und p53(138V) beobachtet. Weitere hier nicht gezeigten Western-Blot-Analysen ergaben, dass unter der Kontrolle des Gal4-Promotors im Vergleich zum CMV-Promotor 10-100fach niedrigere p53-Expression erreicht wurde.

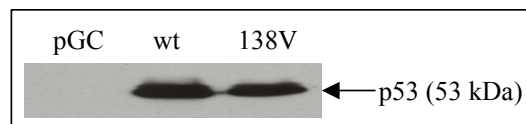


Abb. 60: Expressionsmuster des transient in KMV5-Zellen eingebrachten wtp53 und p53(138V) nach Elektroporation der Zellen mit wtp53 in pGC und p53(138V) in pGC im Vergleich zu pGC und Induktion der Zellen mit 200 nM Östradiol bei 37 °C für 72h. Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch getrennt und nach Membran-Transfer die Lage von p53 mit dem Primär-Antikörper DO1 detektiert. Die mit pBS transfizierten MHHR4-Zellen wurden als Negativ-Kontrolle für die p53-Expression eingesetzt.

Bei 39 °C wurden 72 h nach Initiation der Rekombination durch I-SceI in MHΔ-Zellen Raten von 11×10^{-4} , in MHHR von 3×10^{-4} und in MHEJ von 10×10^{-4} gemessen. Bei dieser Temperatur wurde nach Expression von p53(138V) (Mutanten-Konformation) in keinem der Klone eine signifikante Veränderung der Rekombinationsraten beobachtet (s. Abb. 59). Nach wtp53-Expression wurde die Rekombination in allen getesteten Klonen bis maximal zweifach inhibiert. Durch die hohe Mortalitätsrate der transfizierten Zellen bei 30 °C konnten die Rekombinationsraten bei dieser Temperatur nur für den Klon MHΔ6 bestimmt werden. Bei 30 °C betrugen die Rekombinationsraten im MHΔ6 6×10^{-4} . Bei dieser Temperatur wurde die

Rekombination nach Expression von sowohl wtp53 als auch p53(138V) (wt-Konformation) zweifach unterdrückt.

4.2.13.3 Spezifisch inaktivierte p53-Mutanten und episomale Rekombinationssubstrate

Um die Rekonstitution von *wtEGFP* nach Expression verschiedener spezifisch inaktiverter p53-Mutanten untersuchen zu können, wurden je 10 µg der Plasmide pBS, pSV53her, pSV53(138V)her, pSV53(1-333)her bzw. pSV53(1-363)her gemeinsam mit je 10 µg p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ (zur Bestimmung der kHR), p5xtrsGal4-I-SceIb-PuroCMV-Δ (zur Bestimmung der kHR und nkHR) und p5bPuroCMV-wtEGFP (zur Bestimmung der Transfektionseffizienzen) in KMV5-Zellen koelektroporiert. Die transfizierten Zellen wurden zur Initiation der Rekombination und Aktivierung der p53-Fusionsproteine mit Östradiolbindedomäne durch die Zugabe von 200 nM Östradiol induziert und die Fluoreszenzen von 30000 Zellen pro Ansatz 48 h und 72 h danach am FACScan analysiert. Die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen aus drei voneinander unabhängigen Messungen wurden gemittelt und die Mittelwerte gegen die der Positiv-Kontrolle korrigiert. Die Rekombinationsraten nach Koelektroporation mit pBS wurden ermittelt, als 100 % definiert und die relativen Rekombinationsraten für die restlichen Proben errechnet (s. Abb. 61).

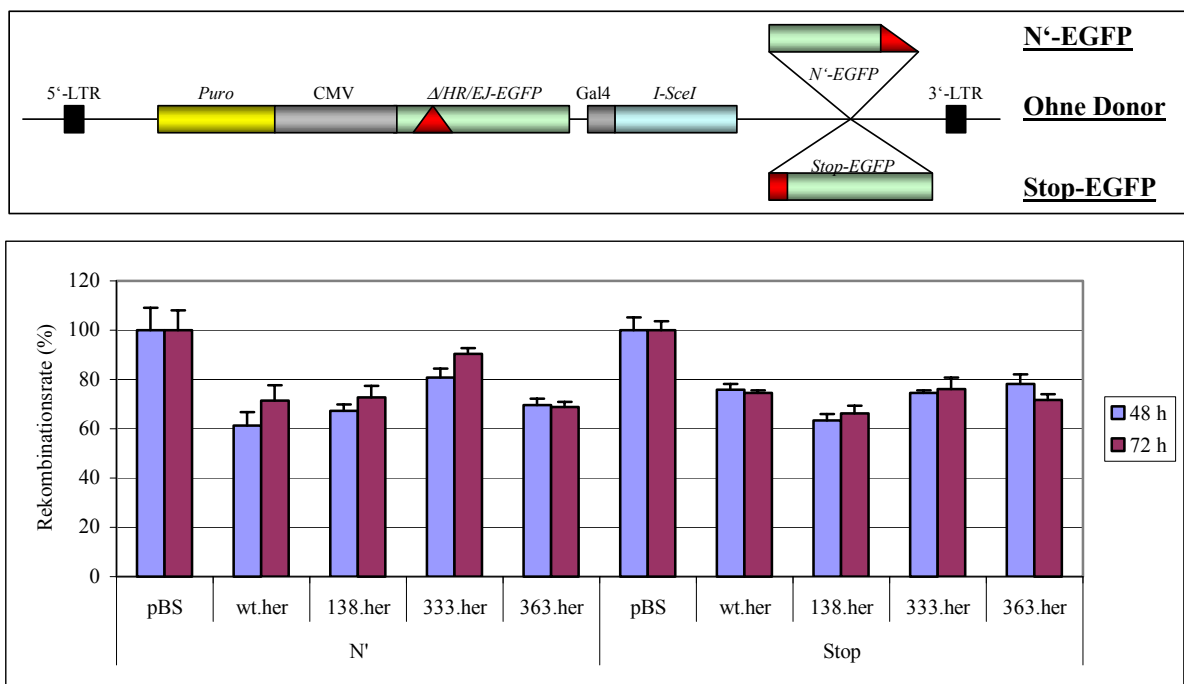


Abb. 61: Relative Rekombinationsraten in KMV5-Zellen, die mit Rekombinationsvektoren mit *N'*- (*N'*) oder *Stop-EGFP* (*Stop*) als Donor und verschiedenen Vektoren zur Expression der p53her-Varianten wtp53her (wt.her), p53(138V)her (138.her), p53(1-333)her (333.her) oder p53(1-363)her (363.her) koelektroporiert wurden. Gemittelte Werte und Standardfehler sind gezeigt. Auf dem oberen Teil der Abbildung wurden die transfizierten Vektoren schematisch dargestellt.

In KMV5-Zellen, die mit dem donorlosen Kontrollvektor p5xGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ transfiziert worden waren, lag der Anteil grünfluoreszierender Zellen erwartungsgemäß im Bereich der Nachweisgrenze von 10^{-4} . 48 h nach Initiation der Rekombination durch Elektroporation und Östradiol-Gabe betrug die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen infolge von kHR (*N'-EGFP* als Donor) 10 % und nach 72h 13 %, während durch zusätzliches nkHR (*Stop-EGFP* als Donor) Werte im Bereich von 28 % (48 h) und 33 % (72 h) beobachtet wurden.

Durch die Expression von wtp53her und p53(1-363)her wurde die kHR um 29-39 % und kHR sowie nkHR um 24-25 % inhibiert. Mit p53(138V) wurden für beide Reparaturarten ähnliche Inhibitionsraten bei der Rekombination nachgewiesen. Für p53(1-333)her war diese für Rekombination mit dem *N'-EGFP*-Donor (kHR) deutlich geringer.

4.2.13.4 Spezifisch inaktivierte p53-Mutanten und chromosomal integrierte Rekombinationssubstrate

Um die Effekte der Mutanten p53(138V), p53(1-333) und p53(1-363) im Vergleich zu wtp53 bei der Rekombination mit chromosomal integrierten Substraten untersuchen zu können, wurden die Klone MHA-6, MHHR-4 und MHEJ-12 mit den Rekombinationsvektoren p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-Δ, -HR oder -EJ mit je 10 µg der unten beschriebenen Plasmide und mit pBS, mit pCMV-I-SceI oder mit pEGFP-N1 koelektroporiert.

1. pBS (p53-Negativ-Kontrolle),
2. pSV53-her (Vektor zur Expression von humanem wtp53 in Fusion mit der Östradiolbinde-Domäne),
3. pSV53(138V)her (Vektor zur Expression von humanem p53(138V) in Fusion mit der Östradiolbinde-Domäne),
4. pSV53(1-333)her (Vektor zur Expression von am C-Terminus um 60 Aminosäuren verkürztem humanem p53 in Fusion mit der Östradiolbinde-Domäne),
5. pSV53(1-363)her (Vektor zur Expression von am C-Terminus um 30 Aminosäuren verkürztem humanem p53 in Fusion mit der Östradiolbinde-Domäne) und
6. pSV53(174Y)her (Vektor zur Expression der Mutante p53(174Y) aus der Ratte in Fusion mit der Östradiolbinde-Domäne).

Die Ansätze wurden durch die Zugabe von 200 nM Östradiol induziert und 30000 Zellen pro Ansatz 72 h nach Elektroporation am FACScan analysiert. Die Rekombinationsraten aus drei unabhängigen Messungen wurden pro Klon gemittelt und die Mittelwerte gegen die der Positiv-Kontrolle korrigiert. Die Raten, die nach Koelektroporation der Klone mit den

Plasmiden pBS und pCMV-I-SceI ermittelt worden waren, wurden als 100 % definiert und die relativen Rekombinationsraten für die restlichen Proben errechnet (s. Abb. 62).

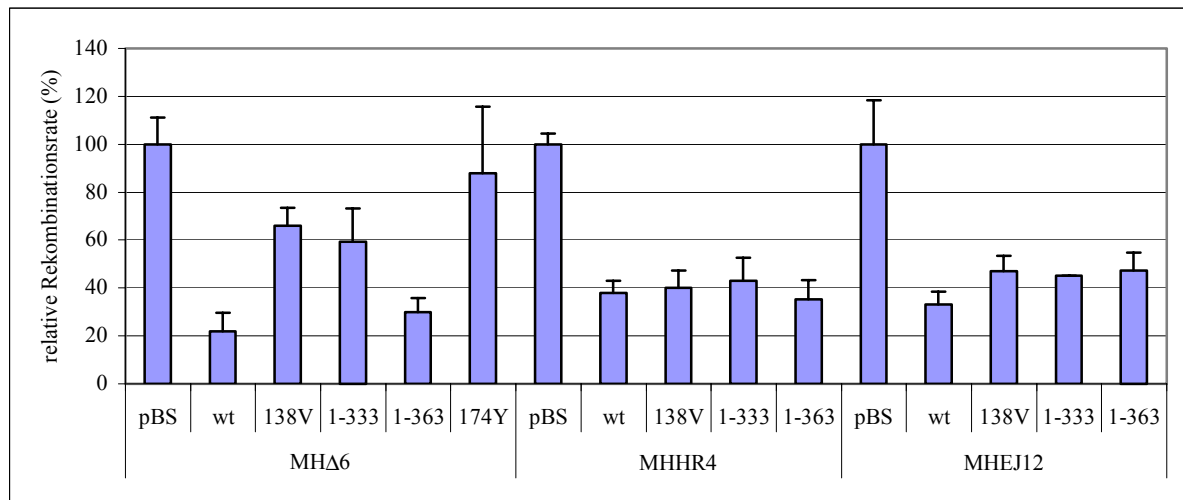


Abb. 62: Relative Rekombinationsraten nach Koexpression von I-SceI und wtp53her (wt), p53(138V)her (138V), p53(1-333)her (1-333), p53(1-363)her (1-363) bzw. p53(174Y)her (174Y) in MHΔ6, MHHR4 und MHEJ12. Die Rekombinationsraten, die nach Koelektroporation der Klone mit den Plasmiden pBS und pCMV-I-SceI ermittelt wurden, wurden als 100 % angenommen und relative Raten inklusive Standardfehler errechnet.

Um auszuschließen, dass Effekte bei der Rekombination mit unterschiedlichen Expressionsraten der Proteine einhergehen, wurden Western-Blot-Analysen in MHHR4-Zellen durchgeführt (s. Abb. 63).

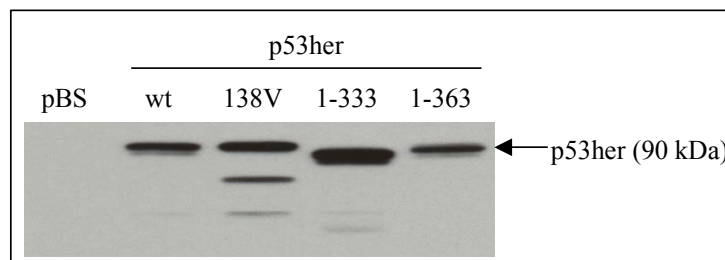


Abb. 63: Expressionsmuster von wtp53her (wt), p53(138V)her (138V), p53(1-333)her (333) und p53(1-363)her (363) in MHHR4-Zellen 72h nach Elektroporation und Kultivierung in 200 nM Östradiol. Die Proteine wurden in einem 10%igen SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch getrennt und nach Membran-Transfer die Lage des 90 kDa-Proteins mit dem Primär-Antikörper DO1 detektiert. Die mit pBS transfizierten MHHR4-Zellen wurden als Negativ-Kontrolle mitanalysiert.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den Proteinmengen von wtp53 und Mutanten-p53, die unter der Kontrolle des SV40-Promotors exprimiert wurden, nachgewiesen. In einer weiteren Western-Blot-Analyse konnten wir zeigen, dass im Vergleich zur Expression unter der Kontrolle eines CMV-Promotors mit dem SV40-Promotor (pSV53her-Konstrukte) 10-100fach niedrigere p53-Expression erreicht wurde (Daten nicht gezeigt).

Nach Koelektroporation der Plasmide pBS und pCMV-I-SceI betrug der Grünfluoreszenzanteil unter MHΔ6-Zellen 39×10^{-4} , in MHHR4-Zellen 90×10^{-4} und in MHEJ12-Zellen 35×10^{-4} . Nach wtp53her-Expression wurden die Rekombinationsraten für das Δ-Konstrukt

fünffach und für das HR- bzw. EJ-Konstrukt dreifach inhibiert. Während mit der um 60 Aminosäuren am C-Terminus verkürzten Variante p53(1-333)her in den drei Klonen höchstens zweifache Unterdrückung nachgewiesen werden konnte, wurde nach Expression der am C-Terminus um 30 Aminosäuren verkürzten Variante p53(1-363)her in MHΔ6- bzw. MHHR4-Zellen dreifache und in MHEJ12-Zellen zweifache Inhibition beobachtet. Die Expression von p53(138V)her führte nach Inkubation der Ansätze bei 37 °C in MHΔ6- bzw. MHEJ12-Zellen zur zweifachen und in MHHR4 zur dreifachen Unterdrückung der Rekombinationsraten. Mit der in der Rekombinationsunterdrückung defekten Mutante p53(174Y)her aus der Ratte in Fusion mit der Östradiolbinde-Domäne wurde in MHΔ6-Zellen nur 12%ige Unterdrückung der Rekombination beobachtet.

4.2.14 Dosisabhängigkeit der Rekombinationsinhibition durch p53

Bei den beschriebenen Versuchen (s. 4.2.9, 4.2.11-13) wurde nach wtp53-Expression durchgehend Rekombinationsinhibition beobachtet, jedoch je nach Expressionsvektor in unterschiedlicher Höhe. Der Vergleich der Proteinmengen unter der Kontrolle des Gal4-, SV40- oder CMV-Promotors zeigte, dass mit dem CMV-Promotor 10-100fach höhere Proteinniveaus erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Parallel dazu wurde eine ca. 10fach höhere Rekombinationsunterdrückung nach Expression von p53 mittels CMV-Promotor festgestellt. Um zu klären, ob die inhibitorische Wirkung von wtp53 auf die Rekombination dosisabhängig ist, wurde sowohl mit episomalen als auch chromosomal integrierten Rekombinationssubstraten der inhibitorische Effekt von p53 untersucht. Darüber hinaus wurde bei konstanter p53-Menge die Konzentration des Rekombinationssubstrates variiert. Da in den bisherigen Versuchen maximale Inhibition mit Rekombinationsvektoren, welche das Δ -EGFP-Gen als Akzeptor enthalten, beobachtet wurde, wurden für diese Untersuchungen der Klon MHΔ6 bzw. die Vektoren p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ und p5xtrsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ eingesetzt.

4.2.14.1 Dosisabhängigkeit der Rekombinationsinhibition durch p53 mit chromosomal integrierten Rekombinationssubstraten

Je 10 µg, 1 µg, 0,1 µg, 0,01 µg und 0,001 µg der Plasmide pC53-wt₃ (zur Expression von wtp53) bzw. pC53.4.2N₃ [zur Expression von p53(273H)] wurden mit pGC-Vektor auf jeweils 10 µg Gesamtplasmidmenge addiert. Diese und 10 µg pGC-Vektor wurden mit je 10 µg pCMV-I-SceI bzw. pEGFP-N1 in MHΔ6-Zellen koelektroporiert. Um die basalen

Rekombinationsraten bestimmen zu können, wurde der Klon MHΔ6 mit nur 20 µg pGC-Vektor elektroporiert. Fluoreszierende Zellen wurden nach 72 h am Durchflußzytometer gemessen und pro Ansatz 30000 Zellen analysiert. Die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen aus drei unabhängigen Messungen, wurden gemittelt und die Mittelwerte gegen die der Positiv-Kontrolle korrigiert. Die Raten, welche nach Koelektroporation mit den Plasmiden pGC und pCMV-I-SceI ermittelt wurden, wurden als 100 % definiert und dazu die relativen Rekombinationsraten für die Proben mit wtp53 und p53(273H) errechnet (s. Abb. 64).

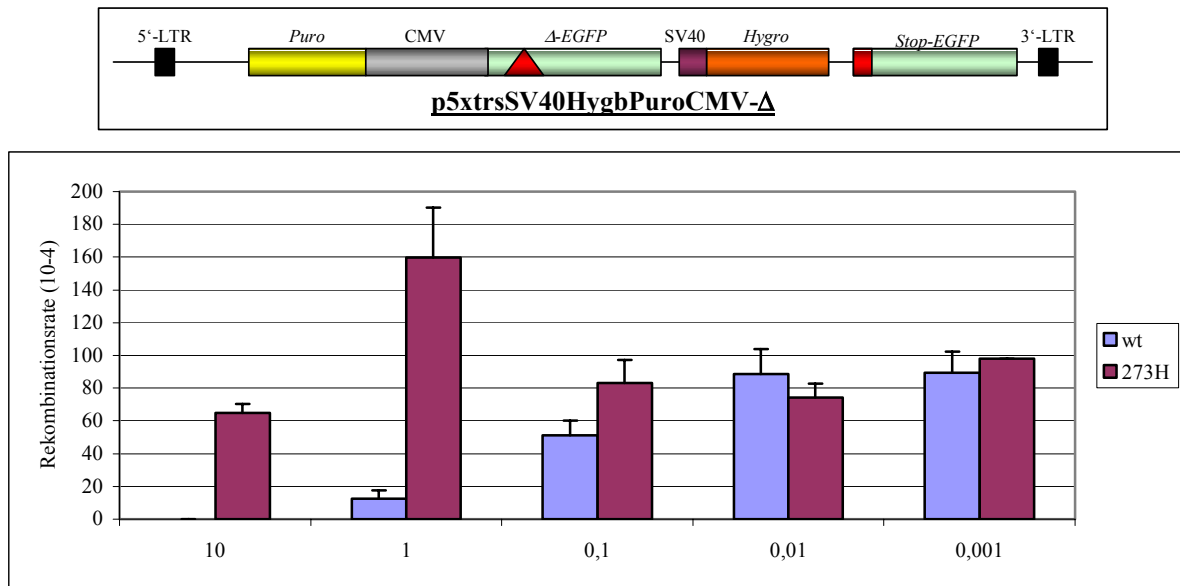


Abb. 64: Vergleich der relativen Rekombinationsraten, die nach Expression von wtp53 (wt) und p53(273H) (273H) in MHΔ6-Zellen ermittelt wurden. Raten in Abwesenheit von p53 wurden als 100 % definiert und auf dem Diagramm nicht angegeben. Relative Raten inklusive Standardfehler sind gezeigt. Der chromosomal integrierte Rekombinationsvektor p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-Δ ist schematisch dargestellt.

Um die p53-Proteinmenge in Abhängigkeit von der eingesetzten Expressionsplasmidmenge festzustellen wurde ein Aliquot aus jedem Rekombinationsansatz entnommen und die p53-Proteine mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen (s. Abb. 65).

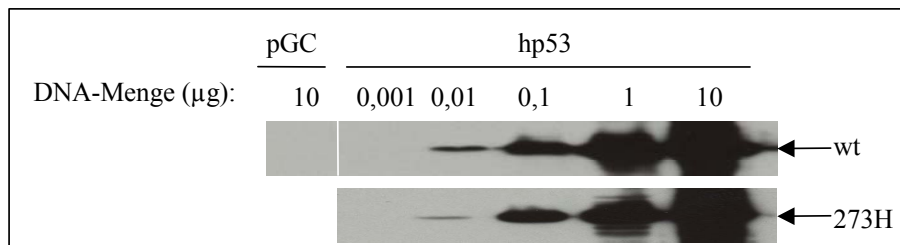


Abb. 65: wtp53- und p53(273H)-Expressionsvergleich nach Transfektion des Klons MHΔ6 mit unterschiedlichen Mengen an Expressionsplasmiden (10 µg, 1 µg, 100 ng, 10 ng und 1 ng). Mit 10 µg pGC-Vektor transient transfizierte MHΔ6-Zellen wurden als Negativ-Kontrolle für die p53-Expression eingesetzt. Die Lage der p53-Banden wurde nach elektrophoretischer Trennung der Proteine im 10%igen SDS-PAGE-Gel und Membran-Transfer mit Hilfe des Primär-Antikörpers DO1 nachgewiesen.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den Expressionsniveaus von wtp53 und Mutanten p53(273H) in den entsprechenden Ansätzen festgestellt. Die in Abb. 65 dargestellte

Autoradiographie lässt die p53(273H)-Menge für 10 ng transfiziertes Plasmid als geringer erscheinen. In einem weiteren nicht gezeigten Western-Blot bestätigte sich dieser Unterschied jedoch nicht.

Nach Initiation der Rekombination mittels I-SceI-Expression wurden Raten in Höhe von 28×10^{-4} gemessen. wtp53-Expression nach Transfektion der Zellen mit 10 μ g Plasmid pC53-wt₃ führte zur vollständigen Inhibition der Rekombination. Mit 1 μ g Plasmid waren die Raten achtfach und mit 100 ng zweifach gesenkt. Die Supression betrug mit 10 ng bzw. 1 ng Plasmid nur 10-11 %. Dagegen wurde mit der Mutante p53(273H) maximal 35%ige (10 μ g) und minimal 2%ige (1 ng) Inhibition beobachtet.

4.2.14.2 Dosisabhängigkeit der Rekombinationsinhibition durch p53 mit episomalen Rekombinationssubstraten

Nachdem klar war, dass die inhibitorische Wirkung von wtp53 bei der Rekombination an chromosomal integrierten Substraten von der p53-Dosis abhängig ist (s. 4.2.14.1), wurde die Dosisabhängigkeit mit episomalen Substraten für die kHR und nkHR untersucht. Dafür wurde zunächst in einer Substrat-Titration geprüft, ob Sättigungseffekte im gewählten Konzentrations-Bereich auftreten.

4.2.14.2.1 Abhängigkeit der Rekombinationsraten von der DNA-Substrat-Dosis

Nach Transfektion durch z. B. Elektroporation können mehrere Plasmid-Kopien in die Zielzelle eingebracht werden. Um zu verstehen, ob die DNA-Reparaturmaschinerie zum limitierenden Faktor wird, wurden Rekombinationssubstrate in unterschiedlichen Kopienzahlen in die Zellen eingebracht und Rekombinationsraten bestimmt. Hierfür wurden KMV5-Zellen mit je 2 μ g, 4 μ g, 6 μ g, 8 μ g und 10 μ g Rekombinationsvektor (s. unten) und mit je 10 μ g pBS oder wtp53-Expressionsvektor pC53-wt₃ koelektroporiert:

1. Vektor zur Bestimmung von kHR: p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV- Δ (*N'-EGFP* als Donor),
2. Vektor zur Bestimmung von kHR und nkHR. p5xtrsGal4-I-SceIbPuroCMV- Δ (*Stop-EGFP* als Donor) und
3. Vektor zur Bestimmung von Transfektionseffizienzen: p5bPuroCMV-wtEGFP (Positiv-Kontrolle).

Um Rekombination durch I-SceI-Expression zu initiieren, wurden die Zellen mit 200 nM Östradiol kultiviert und nach 72 h grünfluoreszierende Zellen unter insgesamt 30000 Zellen

pro Ansatz gezählt. Die resultierenden Rekombinationsraten aus zwei unabhängigen Messungen, wurden gemittelt und die Mittelwerte gegen die der Positiv-Kontrolle korrigiert (s. Tab. 14).

Donor	Substratmenge (μg)	-	wtp53
<i>N'-EGFP</i>	2 μg	0,32 % $\pm$ 0,03	0,02 % $\pm$ 0,02
	4 μg	0,86 % $\pm$ 0,06	0,02 % $\pm$ 0,02
	6 μg	1,96 % $\pm$ 0,11	0,00 % $\pm$ 0,00
	8 μg	2,37 % $\pm$ 0,25	0,04 % $\pm$ 0,04
	10 μg	3,02 % $\pm$ 0,22	0,04 % $\pm$ 0,01
<i>Stop-EGFP</i>	2 μg	3,56 % $\pm$ 0,07	0,24 % $\pm$ 0,08
	4 μg	7,03 % $\pm$ 0,20	0,36 % $\pm$ 0,00
	6 μg	12,59 % $\pm$ 0,15	0,45 % $\pm$ 0,00
	8 μg	13,05 % $\pm$ 0,23	0,60 % $\pm$ 0,07
	10 μg	15,71 % $\pm$ 0,29	0,86 % $\pm$ 0,08

Tab. 14: Rekombinationsraten nach Koelektroporation von KMV5-Zellen mit pBS (-) bzw. pC53-wt₃ (wtp53) und p5xtrsGal4-I-SceIbPuroCMV- Δ (*Stop-EGFP*) bzw. p5xtrsGal4-I-SceIbPuroCMV- Δ (*N'-EGFP*). Gemittelte Daten inklusive Standardfehler sind angegeben.

Nach Koelektroporation der Substrate mit pBS wurden Rekombinationsraten von 0,3 % bis 3 % (*N'-EGFP*) und von 4 % bis 16 % (*Stop-EGFP*) mit steigender Substratkonzentration gemessen. Da der Anstieg der Rekombinationsraten mit der Plasmidmenge linear war, waren Reparaturenzyme in diesem Bereich nicht limitierend. Nach wtp53-Expression wurde für das Rekombinationsplasmid mit *N'-EGFP*-Donor ein Grünfluoreszenzanteil von $2\text{-}4 \times 10^{-4}$ und mit *Stop-EGFP*-Donor von $2\text{-}9 \times 10^{-3}$ gemessen, d. h. dass wtp53 über den ganzen Substratkonzentrationsbereich kHR 20-80fach und kHR und nkHR 10-30fach inhibiert hat.

4.2.14.2.2 Rekombinationsraten in Abhängigkeit von der p53-Dosis

Nachdem geklärt war, dass die Rekombinationsmaschinerie in Bezug auf die Anzahl der DSBe in den Rekombinationssubstraten nicht limitierend war, wurde unter diesen Bedingungen p53 austitriert, um eine Korrelation zwischen dem Inhibitionsgrad und der p53-Menge herzustellen. Die KMV5-Zellen wurden mit je 10 μg des Rekombinationssubstrates (s. unten) und mit entweder 2 μg , 5 μg und 10 μg der Plasmide pBS, pC53-wt₃ (wtp53-Expression) oder pC53.4.2N₃ (p53(273H)-Expression) koelektroporiert:

1. p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV- Δ (*N'-EGFP* als Donor),
2. p5xtrsGal4-I-SceIbPuroCMV- Δ (*Stop-EGFP* als Donor) und
3. p5bPuroCMV-wtEGFP (Positiv-Kontrolle).

Die Zellen wurden mit 200 nM Östradiol kultiviert und nach 72 h grünfluoreszierende unter 30000 Zellen pro Ansatz am Durchflußzytometer gezählt. Die Rekombinationsraten aus zwei

unabhängigen Messungen, wurden gemittelt und die Mittelwerte gegen die der Positiv-Kontrolle korrigiert (s. Tab. 15).

Protein	Plasmidmenge	N'-EGFP	Stop-EGFP
-	2 µg	0,80 % ± 0,06	7,35 % ± 1,79
	5 µg	3,48 % ± 0,44	11,62 % ± 0,88
	10 µg	5,91 % ± 1,26	18,80 % ± 1,24
wtp53	2 µg	0,05 % ± 0,00	0,44 % ± 0,03
	5 µg	0,07 % ± 0,02	0,65 % ± 0,11
	10 µg	0,05 % ± 0,02	1,52 % ± 0,25
p53(273H)	2 µg	0,08 % ± 0,05	1,93 % ± 0,07
	5 µg	0,18 % ± 0,04	5,01 % ± 1,08
	10 µg	0,55 % ± 0,03	9,05 % ± 0,03

Tab. 15: Rekombinationsraten nach Koelektroporation von KMV5 mit den Substraten [p5xtrsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ (*Stop-EGFP*) und p5xtrsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ (*N'-EGFP*)] und pBS, pC53-wt₃ (wtp53) und pC53.4.2N₃ [p53(273H)]. Raten bezogen auf transfizierte Zellen wurden gemittelt und Standardfehler errechnet.

Nach Koelektroporation der KMV5-Zellen mit Rekombinationsvektoren wurden kHR-Raten (*N'-EGFP*) in Höhe von 1-6 % und Raten für kHR und nkHR (*Stop-EGFP*) von 7-19 % gemessen. Nach wtp53-Expression wurden für kHR eine 20-120fache und für kHR und nkHR 10-20fache Inhibition nachgewiesen, während mit der Kontaktmutante p53(273H) für kHR 10-20fache und für kHR und nkHR zwei bis vierfache Herabregulierung beobachtet wurden.

4.2.15 Unterscheidung von rekonstituierender und inaktivierender Rekombination durch Zwei-Fluoreszenzfarben-Analyse

Zusätzlich zu den Rekombinationsvektoren, die im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung von Rekombinationsraten unter Rekonstitution eines *wtEGFP*-Gens generiert wurden, wurden die in Abb. 66 schematisch dargestellten neuartigen Plasmide für die Analyse eingesetzt. Das besondere an diesen Vektoren ist, dass hier als Abstandhalter ein *RFP*-Gen kloniert wurde, und dass die Positionen von *N'-EGFP* und *HR*- bzw. *EJ-EGFP* vertauscht wurden. Damit ermöglichen diese Vektoren neben der Bestimmung von nkHR-Ereignissen durch Rekonstitution eines *wtEGFP*-Gens und damit die Zunahme des Grünfluoreszenzanteils auch die Bestimmung von nkHR-Ereignisse und anderen inaktivierenden Prozessen durch den Verlust/die Mutation des Abstandhalters und damit durch die Abnahme des Rotfluoreszenzanteils.

Zur Bestimmung der Rekombinationsraten wurden je 10 µg der Vektoren (s. 3.1.7) pEGFP-N1, pdsRed-N1, p5CMV-RFP-HR/-EJ, p5Puro-CMV-N'-CMV-RFP-HR/-EJ und p5Puro-CMV-wtEGFP-CMV-RFP-HR/-EJ mit je 10 µg pBS oder pCMV-I-SceI in KMV5-

Zellen koelektroporiert. Die Fluoreszenzen von EGFP und von RFP in KMV5-Zellen wurden 72 h nach Initiation der Rekombination am FACScan (DAKO-Galaxy) bestimmt (s. Abb. 67). Die Fluoreszenzanteile für EGFP wurden für dieses Experiment über den Bereich im Dot-Plot-Quadrat Q1 und für RFP über Q4 bestimmt. Gleichmaßen wurden im FL1-Histogramm EGFP-Anteile über den Markerbereich RN1 und für RFP-Anteile über RN2 errechnet. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Messungen wurden gemittelt und gegen die der Positiv-Kontrolle korrigiert (Tab. 16).

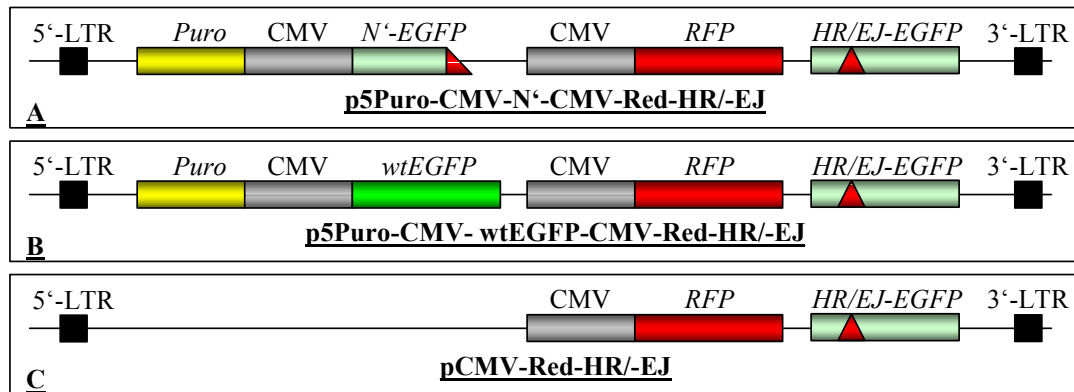


Abb. 66: Schematische Darstellung der in KMV5-Zellen transfizierten Vektoren, die Rekombination durch *wtEGFP*-Rekonstitution und durch Verlust des Abstandhalter-Gens *RFP* anzeigen. A: Rekombinationsvektor mit Donor und Akzeptor. B: Positiv-Kontrollvektoren. C: Negativ-Kontrollvektoren.

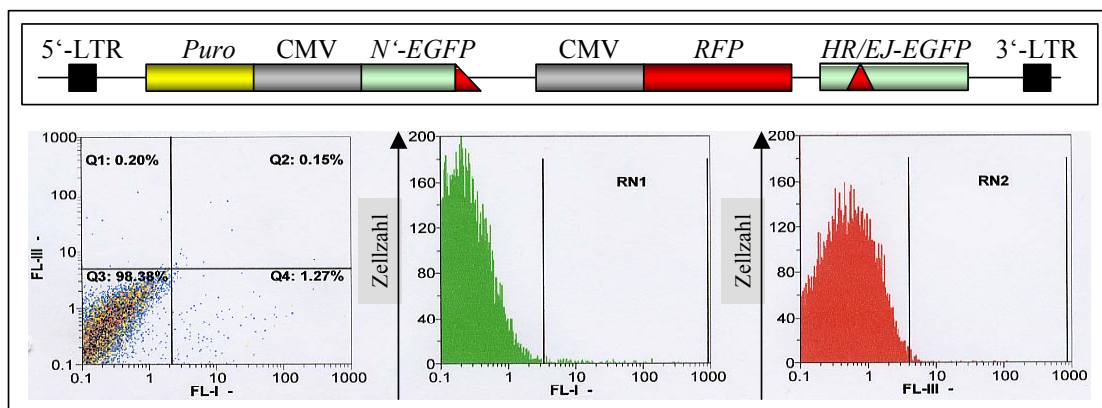


Abb. 67: Darstellung der Fluoreszenzanteile in KMV5-Zellen als FL1- (FLI) und FL3-Histogramme (FLIII) bzw. als Dot-Plot (FL1 gegen FL3). Der in die Zellen transfizierte Rekombinationsvektor ist oberhalb schematisch dargestellt.

Fluoreszenztyp	Konstrukt	pBS	pCMV-I-SceI
EGFP	HR	$4 \times 10^{-2} \pm 0,2$	$13 \times 10^{-2} \pm 1$
	EJ	$7 \times 10^{-2} \pm 0,3$	$15 \times 10^{-2} \pm 1$
RFP	HR	$44 \times 10^{-2} \pm 4$	$24 \times 10^{-2} \pm 1$
	EJ	$86 \times 10^{-2} \pm 11$	$76 \times 10^{-2} \pm 2$

Tab. 16: Bestimmung der Fluoreszenzanteile nach Koelektroporation der KMV5-Zellen mit den Rekombinationsvektoren, die in der Abb. 66 schematisch dargestellt wurden, gemeinsam mit pBS oder pCMV-I-SceI.

Nach Induktion eines DSBs infolge von I-SceI-Expression wurde die Rekonstitution des *wtEGFP*-Gens im HR-Konstrukt dreifach und im EJ-Konstrukt zweifach ausgehend von 4 % bzw. 7 % erhöht, während die RFP-Expression mit dem HR-Konstrukt um 56 % bzw. 76 % reduziert wurde und mit dem EJ-Konstrukt um 14 % bzw. 24 % gesenkt wurde. Dies bedeutet, dass deletierende Rekombinationsereignisse vor allem für das HR-Konstrukt deutlich häufiger auftreten als Rekonstitutionsereignisse.

4.2.16 Rekombination nach Bestrahlung oder Etoposid-Behandlung

Sowohl ionisierende Bestrahlung wie auch Behandlung mit dem TopoisomeraseII-Inhibitor Etoposid können DSBs auslösen. Es sollte geprüft werden, ob die infolge dieser Behandlungen entstandenen Schäden in Form von Rekombination repariert werden und als solche in dem hier entwickelten System detektiert werden können.

Die Klone (KMV5, MHA-3 und -6, MHHR-1 und -4, MHEJ-3 und -12, MHHRher5-12) wurden mit 500 Rad bestrahlt und die Fluoreszenzen von je 30000 Zellen 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen am Durchflußzytometer (Coulter XL-MCL) analysiert. Die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen aus drei unabhängigen Messungen, wurde gemittelt und für interessante Zelllinien in Tab. 17 zusammengefasst.

Für die Klone KMV5, MHHR4 und MHA6 wurden keine Fluoreszenz-Signale nachgewiesen, d.h. alle Werte lagen unter dem Detektionslimit von 10^{-4} . Für den Klon MHHR1 wurden bei Messung nach 96 h ohne Bestrahlung und für MHEJ3 und MHA3 nach Bestrahlung Rekombinationsraten von $0,3 \times 10^{-4}$ gemessen. Für Klon MHEJ12 wurde bereits 24 h nach Bestrahlung wie auch zu späteren Zeiten nach Bestrahlung Rekombination zu $0,3 \times 10^{-4}$ festgestellt. Die höchsten Rekombinationsraten, von 1×10^{-4} 96 h nach Bestrahlung wurden mit Klon MHHR-her5-12 gemessen.

Zelllinie	Bestrahlung	Rekombinationsrate ($\times 10^{-4}$)		
		24 h	48 h	96 h
KMV5	-	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
	+	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
MHHR-her5-12	-	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
	+	$0,0 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,3$	$1,0 \pm 1,0$
MHEJ 12	-	$0,0 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,3$	$0,0 \pm 0,0$
	+	$0,3 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,3$

Tab. 17: Mittelwerte und Standardfehler der Rekombinationsraten für ausgewählte Test-Zelllinien nach ionisierender Bestrahlung in Abhängigkeit von der Zeit. Die Messungen, bei denen ein höherer Wert als 10^{-4} gemessen wurde, sind in grau hervorgehoben.

Alternativ zur Bestrahlung wurde der Klon MHEJ12 mit 1 μM , 10 μM und 100 μM Etoposid behandelt. Nach 2 h wurde das Etoposid-haltige Medium von den Zellen entfernt und die Zellen mit frischem Medium versorgt. Die Fluoreszenzen in 30000 Zellen pro Ansatz wurden 72 h nach Mediumwechsel am Durchflußzytometer (Coulter XL-MCL) analysiert. Die Anzahl der grünfluoreszierenden Zellen aus drei voneinander unabhängigen Messungen, wurden gemittelt und in Tab. 18 zusammengefasst.

Etoposid Konzentration	Rekombinationsrate
0	$0,0 \cdot 10^{-4} \pm 0,0$
1 μM	$0,0 \cdot 10^{-4} \pm 0,0$
10 μM	$0,0 \cdot 10^{-4} \pm 0,0$
100 μM	$0,3 \cdot 10^{-4} \pm 0,3$

Tab. 18: Rekombinationsraten in MHEJ12-Zellen nach Behandlung mit Etoposid für 2 h.

Nur in Zellen, die mit 100 μM Etoposid behandelt wurden, wurde eine Rekombinationsrate in Höhe von $0,3 \cdot 10^{-4}$ gemessen. Gleichzeitig veränderte sich auch die Granularität und Größe der Zellen enorm (Daten nicht gezeigt), vermutlich aufgrund von Änderungen der Mikrotubuli in den K562-Zellderivaten (Grzanka, 2001).

Zusammenfassend konnte in der Tat Rekombination infolg von Bestrahlung oder Etoposid-Behandlung mit Hilfe des in dieser Doktorarbeit erzeugten Test-Systems basierend auf EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden.

5. Diskussion

5.1 Entwicklung eines reaktionsschnellen Test-Systems zur Bestimmung von DSB-Reparatur-Ereignissen

DSBe, die spontan während zellulärer Prozesse oder infolge von äußeren Einflüssen auftreten können, stellen für sich mitotisch teilende Zellen eine Bedrohung der genomischen Integrität dar. Aus diesem Grunde repräsentieren rekombinative Reparatur-Prozesse eine der wichtigsten und vor allem auf unterschiedlichste DNA-Schädigungen reagierende DNA-Reparatur-Form. Dies macht den Nachweis von Rekombinations-Prozessen auch interessant als Indikator für DNA-Schädigungen nach Einwirkung unterschiedlicher genotoxischer Agenzien oder Bestrahlung. Bisher wurden Rekombinationsereignisse überwiegend mit Hilfe von Nachweis-Systemen, die auf der Rekonstitution eines Selektionsmarkers oder eines intakten SV40-Genoms basierten, bestimmt. Beide Nachweis-Prinzipien sind jedoch durch eine lange Reaktionszeit gekennzeichnet, so dass die Wirkung von transienten Prozessen, wie z. B. innerhalb des Zellzyklus, bis zur Etablierung resistenter Zellklone oder viraler Plaques verwischt werden kann. Um Rekombinationsereignisse im Kontext des zellulären Genoms innerhalb eines kurzen Zeitraumes bestimmen zu können, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein neues Test-System etabliert, das auf der Rekonstitution des *wtEGFP*-Gens basiert. Kürzlich wurden ähnliche Test-Systeme auch von Pierce *et al.*, 1999 und von Slebos und Taylor, 2001 für die Bestimmung von Rekombinationsereignissen beschrieben. Wie in dieser Arbeit dargelegt wurde, kann die Autofluoreszenz des EGFP in lebenden Zellen ab dem Zeitpunkt der Promotor-Aktivierung innerhalb von 2 h bereits halbmaximal detektiert werden, so dass EGFP als Signal für erfolgreiche Rekombination als besonders gut geeignet erschien. Um Rekombinationsstudien im Zellzyklus mit dem hier beschriebenen Test-System

zu ermöglichen, wurde ein Elutriationsprotokoll für die saubere Trennung von Zell- Populationen in der Zellzyklusphase G1-, G2- oder S-Phase etabliert. Auf diese Weise wurde die Basis geschaffen, um zu definierten Zeitpunkten im Zellzyklus, d. h. an sortierten Zellpopulationen, mit Hilfe der reaktionsschnellen, fluoreszenzbasierten Methode Rekombinationsprozesse zu analysieren.

DSBe werden experimentell häufig durch ionisierende Strahlung oder durch den Einsatz von Restriktionsendonukleasen erzeugt. Während durch ionisierende Strahlung neben DSBen vor allem Einzellstrangbrüche und Basenschäden ungerichtet im Genom entstehen, so dass neben der DSB-Reparatur- auch BER- und/oder NER-Wege aktiviert werden, ist der Einsatz von Restriktionsendonukleasen auf eine bestimmte Zielsequenz gerichtet. Um die Anzahl der DSBe möglichst niedrig zu halten, also nur in einem der beiden homologen Rekombinationssubstrate, dem sogenannten Akzeptor-Gen, einen Schnitt zu setzen, wurde die o-Meganuklease *I-SceI* eingesetzt. *I-SceI* ist eine hochspezifische Endonuklease, die eine 18 Bp lange Erkennungssequenz besitzt und deswegen rein statistisch nur einmal in 20 menschlichen Genomkopien schneiden sollte. Die Überexpression der Meganuklease erwies sich für die Säugerzellen als nicht toxisch, was damit zu erklären ist, dass im Säugerzellgenom keine Erkennungssequenzen für *I-SceI* natürlich vorkommen. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten konnte *I-SceI* nach Überexpression auch hier erfolgreich zur Initiation der Rekombination eingesetzt werden, wobei eine 20-80fache Steigerung der spontanen Rekombinationsraten in menschlichen Zellen erreicht wurde. Im Vergleich dazu führte *I-SceI*-Überexpression in Maus-Stammzellen bis zu 120facher Erhöhung der spontanen Rekombinationsraten, welche im Bereich von 10^{-5} - 10^{-8} lagen (Donoho *et al.*, 1998). Durch diese Maßnahme konnten in den von uns verwendeten menschlichen Zellsystemen Rekombinations-Ereignisse im chromosomalen Kontext erfasst werden, indem deren Frequenzen über die Nachweisgrenze unseres Test-Systems angehoben worden waren.

Da das neu entwickelte Test-System auf Grünfluoreszenz-Detektion basiert und grünfluoreszierende Zellen am FACScan analysiert werden sollten, war die Sensitivität der Nachweismethode durch Mischungsexperimente mit grünfluoreszierenden Zellen am Durchflußzytometer im Vorfeld bestimmt worden. Hierbei stellte ich fest, dass 10^{-5} die Nachweisgrenze der gängigen FACS-Zytometer darstellt. In den von uns vornehmlich zur Analyse verwendeten Leukämiezellen entsprach dies etwa den spontanen Rekombinationsraten an zellulären Chromosomen, wohingegen nach *I-SceI*-Expression Raten in der Größenordnung von 10^{-4} bis 10^{-3} beobachtet wurden. Insgesamt war es uns mit Hilfe

des Einsatzes der I-SceI-Meganuklease nicht nur gelungen DSB-Reparatur mit Hilfe unseres reaktionsschnellen Test-Systems messbar zu machen, sondern darüber hinaus wurden die Voraussetzungen erfüllt, um Rekombination zu bestimmten Zeitpunkten im Zellzyklus, also z. B. an elutrierten Zellpopulationen, zu initiieren. Als wichtige technische Beobachtung, welche ich im Rahmen der Vorversuche mit den K562-Leukämiezellen machte, erwies sich die Tatsache, dass sich diese und andere Suspensions-Kulturzellen mit Substanzen, die durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, nicht transfizieren lassen. Dies ist damit zu erklären, dass Suspensionskultur-Zellen keinen Monolayer am Boden der Zellkulturflasche bilden und dadurch keine Oberfläche für Agentien wie DOTAP, Lipofektamin oder $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitate und damit für endozytotische Aufnahme anbieten. Aus diesem Grunde wurden alle für die Rekombinations-Studien verwendeten DNA-Vektoren durch Elektroporation in die Zielzellen eingeführt. Auch die Infektion dieser Suspensionskultur-Zellen mit Retrovirus-Überstand aus rekombinanten GaMV6-Zellen erwies sich zunächst als schwierig. Spätere Optimierungs-Versuche, welche u. a. auf dem Einsatz einer alternativen amphotropen Helfer-Zelllinie mit verbesserten Transduktionseigenschaften beruhten, führten jedoch auch für die Leukämiezelllinie K562 zum Erfolg. Im Rahmen einer von mir experimentell angeleiteten Diplomarbeit (Hinsch, 2000) wurden die von mir kreierten Rekombinationsplasmide auf der Basis retroviraler Vektoren in die Helferzelllinie PA317 eingebracht und die anschließende Freisetzung infektiöser Retrovirenpartikel über die Transduktion von K562-Leukämiezellen und anderen Zelltypen festgestellt. Genomische PCR-Analysen zeigten darüber hinaus, dass die Integrität und Anordnung der für die Rekombination benötigten Gene nach retroviraler Transduktion aufrechterhalten blieb, also keine hochfrequenten Austauschprozesse im Verlaufe des retroviralen Lebenszyklus die spätere Messung der Rekombination unmöglich machten. Da bei niedrigem Virus-Titer die Wahrscheinlichkeit der Doppelinfektion einer Zelle und damit eine Mehrfach-Integration des transduzierten Rekombinationsvektors in das zelluläre Genom sehr niedrig ist, können nun mit Hilfe dieser rekombinanten Retroviren Rekombinationssubstrate nicht nur linear, sondern auch einmalig pro zellulärem Genom integriert werden. Auf diese Weise können Unsicherheiten, wie sie nach chemischer oder physikalischer Transfektion bezüglich der Kopienzahl der genomisch integrierten Substraten auftauchen, vermieden werden.

Während des Aufbaus des Rekombinations-Test-Systems, wurden zunächst verschiedene Rekombinationsvektoren hergestellt, die auf dem retroviralen Vektor p5N-M basierten, welcher, wie oben angesprochen, eine lineare Insertion der Rekombinationssubstrate in das zelluläre Genom ermöglichen sollte. In dieses p5N-M-Vektorrückgrat wurden zwei deletierte

Varianten des *EGFP*-Gens als Rekombinationssubstrate (Δ -*EGFP* als Akzeptor und *N'*-*EGFP* als Donor) in gleicher Orientierung inseriert, um eine mögliche Haarnadelstruktur-Bildung der zum größten Teil komplementären Substrate bei Klonierung in entgegengesetzter Orientierung zu unterdrücken. Es ist bekannt, dass solche Strukturen in *E. coli* und Hefe DSBs induzieren (Gebow *et al.*, 2000), so dass bei der Klonierung unerwünschte Rearrangements zu erwarten gewesen wären. Um die Promotorenanzahl zwischen den 5'- und 3'-LTRs minimal zu halten und um Promotorinterferenzen zu vermeiden, wurde an das *Puromycin-Resistenz-Gen* unter Aufrechterhaltung des Leserahmens das Δ -*EGFP*-Akzeptorgen fusioniert und die *p53*- und *I-SceI*-Gene in der Abstandhalter-Region über ein IRES-Element miteinander verbunden, um monocistronische Transkription der beiden Genprodukte zu ermöglichen. Weder in Rekombinationsanalysen noch bei Positiv-Kontroll-Messungen mit wtEGFP an der Akzeptor-Position konnten grünfluoreszierende Zellen mit diesen Vektoren entdeckt werden. Da für die maximale Grünfluoreszenz-Emission durch GFPs eine vollständige Chromophor-Region und eine perfekte Faltung der Chromophor-Region nötig ist (Cubitt *et al.*, 1995; Tsien, 1998), kann vermutet werden, dass durch die Polypeptidkette der Puromycin-N-Acetyl-Transferase bei direkter Fusion mit *EGFP* ohne flexible *Linker*-Region die Faltung von EGFP gestört wurde. Interessanterweise führte in Übereinstimmung mit publizierten Daten, auch die Kopplung von *p53* und *I-SceI* über ein IRES-Element nicht zum Erfolg. Es wurde beschrieben, dass Picornavirus-IRES-Elemente in ihrer Effizienz zur internen Rekrutierung von Ribosomen an mRNA von Zelle zu Zelle stark variieren (Borman *et al.*, 1997). Dies könnte die Erklärung dafür liefern, weshalb trotz des Nachweises der Protein-Expression von *p53* das nachgeschaltete Translationsprodukt *I-SceI* nach Transfektion von K562-Zellen mit den korrespondierenden Vektoren mit IRES-Verknüpfung undetektierbar blieb. Demgegenüber war der *I-SceI*-Proteinnachweis eindeutig positiv, wenn die Expression ohne IRES-Element und vorgeschaltetes *p53*-Gen bewerkstelligt wurde. Eine Verbesserungsmöglichkeit für die von IRES abhängige Expression wäre, dass wie im kommerziell erhältlichen Plasmid pIRES-Hyg (Clontech), 5' zum IRES eine IVS (*Intervening Sequence*) eingeführt würde. Es ist nachgewiesen, dass Vektoren mit IVS höchstwahrscheinlich durch *alternativ-splicing* in 6-50fach erhöhter Protein-Expression resultieren (Huang und Gorman, 1990).

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten wurden neue Ausführformen des ursprünglichen Rekombinationsplasmids geschaffen, bei dem Verknüpfungen von kodierenden Sequenzen über IRES-Elemente unterlassen wurden und das Δ -*EGFP*-Akzeptor-Gen separat hinter einen CMV-Promotor geschaltet wurde. Zusätzlich wurde durch spezielles Design in

unterschiedlichen Plasmid-Varianten die Unterscheidung von Reparaturereignissen infolge von Genkonversion (Vektor mit *N'-EGFP* als Donor), Genkonversion und SSA (Vektor mit *Stop-EGFP* als Donor) bzw. NHEJ (Vektor mit nur *EJ-EGFP*) möglich gemacht. Weiterhin wurde das Δ -*EGFP*-Akzeptor-Gen verändert, so dass zum Donor unterschiedlich lange Homologie-Bereiche 5' zum DSB nach *I-SceI*-Restriktion erzeugt wurden, nämlich statt 168 Bp (Δ -*EGFP*) 194 Bp (*HR-EGFP*) und 203 Bp (*EJ-EGFP*). Auf diese Weise konnten Rekombinationsfrequenzen in Abhängigkeit von der Länge der Sequenzhomologie gemessen werden. Gebow *et al.*, (2000) hatte für den effizienten Ablauf der HR eine Sequenzhomologie von 120 Bp als ausreichend befunden, andere Gruppen verlangen hierfür eine mindestens 200 Bp lange Homologie (Elliott *et al.*, 1998; Rubnitz und Subramani, 1984). Durch die Klonierung von *EJ-EGFP* als Rekombinationsakzeptor wurden zum einen durch die Verdopplung von 5 Bp auf beiden Seiten der *I-SceI*-Erkennungssequenz Mikrohomologien erzeugt, die NHEJ begünstigen, und zum anderen durch die Kombination mit einem Donor-Gen die Reparatur durch gekoppelte Wege aus Genkonversion und NHEJ ermöglicht (Richardson und Jasin, 2000). Insgesamt konnte durch die Summe der Optimierungsschritte DNA-Austausch und damit das Auftauchen grünfluoreszierender unter nichtfluoreszierenden Zellen eindeutig nachgewiesen werden und darüberhinaus unterschiedliche Reparaturformen unterschieden werden. Der Einsatz von EGFP als Rekombinationssignal repräsentierte die Grundlage für die sehr schnelle Methode zur Bestimmung von Rekombinationsraten. Da EGFP keine Modifikation oder Multimer-Bildung für die Ausübung der Autofluoreszenz benötigt (Cubitt *et al.*, 1995; Tsien, 1998), konnte nach Einbringung von *wtEGFP* in die Leukämie-Zelllinie K562 am FACScan innerhalb von 4-6 h maximales Leuchten beobachtet werden bzw. Rekonstitution von *wtEGFP* durch Rekombination innerhalb von 24 h nach Initiation durch *I-SceI* detektiert werden. Nachdem die Expression der Meganuklease *I-SceI* über ein IRES-Element sich als unbrauchbar erwiesen hatte, versuchte ich im nächsten Schritt *I-SceI* konditional über eine durch Östradiol induzierbare Expressionskassette in der Abstandhalterregion zwischen Akzeptor und Donor zu exprimieren. Diese Strategie resultierte in der Tat in *I-SceI*-Expression, jedoch zumindest in transienten Experimenten als nicht strikt regulierbar. Auch in Abwesenheit von Östradiol wurde *I-SceI* exprimiert, was nach Elektroporation mit den Rekombinationsplasmiden vor allem auf die hohe Kopienzahl und vermutlich auch auf die fehlende Chromatinverpackung zurückzuführen war. Aufgrund dieser Beobachtung wurden neue Rekombinationsplasmide kreiert, welche keine *I-SceI*-Expressionskassette, dafür aber eine Hygromycin-Expressionskassette in der Abstandhalterregion trugen. Diese Konstrukte konnten nun für die Etablierung von Zelllinien

mit stabil ins Genom integrierten Rekombinationsplasmiden verwendet werden, ohne dass die Gefahr der Erzeugung eines DSBes an der I-SceI-Erkennungssequenz vor Beginn der Rekombinationsmessung bestand. Für die Initiation der Rekombination in diesen genomisch integrierten Rekombinationssubstraten wurde ein I-SceI-Expressionsplasmid zum gewünschten Zeitpunkt in die Zellen elektroporiert.

In der Leukämie-Zelllinie K562 und der davon abgeleiteten KMV5-Zelllinie wurden nach transienter Elektroporation mit Rekombinationsvektoren aufgrund der hohen Kopienzahl Rekombinationsraten im Bereich von 10^{-2} beobachtet, wohingegen nach stabiler Integration der Vektoren ins Genom diese im Bereich von 10^{-4} lagen. Im Rahmen dieser Experimente wurde durch die Überexpression von I-SceI Rekombination 20-80fach erhöht. In transienten Experimenten entsprach ein Viertel bis ein Drittel der beobachteten Ereignisse der konservativen HR (kHR), also vor allem der Genkonversion (Vektor mit *N'-EGFP* als Donor). Da nach Einbringung von Vektoren mit *Stop-EGFP*-Donor die Rekonstitution des *wtEGFP*-Gens über sowohl kHR (vor allem Genkonversion) als auch nkHR (vor allem SSA) ablaufen kann, konnte anhand dieser 3-4fach höheren Raten ein Anteil von zwei Drittel bis drei Viertel für die nkHR ausgemacht werden.

Die Rekonstitution eines *wtEGFP*-Gens durch NHEJ im *EJ-EGFP*-Gen ohne Donor wurde in diesem System mit einer Häufigkeit von ca. 50 % der Genkonversionsereignisse, nämlich mit 1-3 % gemessen. Dies erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich gegenüber den publizierten Werten, die besagen, dass ca. die Hälfte aller DSBes über NHEJ repariert werden. Jedoch muss hier betont werden, dass aufgrund des besonderen Vektordesigns nur solche NHEJ-Ereignisse erfasst werden können, die auch mit einer Prozessierung des DSBes einhergehen, da nach I-SceI-Restriktionsverdau die der I-SceI-Erkennungssequenz benachbarten Sequenzen nukleolytisch entfernt werden müssen, so dass die flankierenden 5 bp langen Mikrohologien rehybridisieren können, um den *EGFP*-Leserahmen wiederherzustellen. Eine einfache Religation der Enden über die 4 Bp langen Überhänge, die nach Schnittsetzung durch I-SceI an dessen Erkennungssequenz generiert werden (Plessis *et al.*, 1992), würde nicht in der Rekonstitution des *EGFP*-Leserahmens und damit nicht in Fluoreszenz resultieren, weshalb diese Ereignisse in diesem Test-System nicht erfasst werden können. Demzufolge muss die Summe der NHEJ-Ereignisse als höher betrachtet werden, als durch Fluoreszenzmessung bestimmt.

Da mit den Vektoren, welche die Bestimmung von ausschließlich NHEJ oder Genkonversion erlaubten, in transienten Experimenten 3-20fach niedrigere Rekombinationsraten gemessen

wurden als mit Vektoren für die Erfassung von Genkonversion und SSA (*Stop-EGFP-Donor*), wurden nur diese Vektoren für die stabile Integration ins Genom ausgewählt. Die Bestimmung von Rekombinationsraten mit stabil ins Genom integrierten Substraten zeigte, dass diese um zwei Größenordnungen unter denen in transienten Experimenten lagen, was für die Bestimmung von Genkonversion oder NHEJ nach Extrapolation bedeutet hätte, dass Raten im Bereich der Nachweisgrenze zu erwarten gewesen wären und damit Herabregulierung durch z. B. p53 nur schwer darstellbar gewesen wäre.

Während bei transienten Experimenten für die verschiedenen Akzeptoren (Δ -, *HR*- oder *EJ-EGFP*) keine signifikanten Unterschiede in der HR nachgewiesen werden konnten, wurden mit chromosomal integrierten Substraten für Δ -*EGFP* die niedrigsten Rekombinationsraten gemessen, während die Raten für *HR-EGFP* zweifach und für *EJ-EGFP* dreifach über den Raten für Δ -*EGFP* lagen. Es ist bekannt, dass Integrationsort und die Kopienzahl der Rekombinationssubstrate Unterschiede in der Häufigkeit der Ereignisse verursachen können. Um solche Effekte ausschließen zu können, wurden pro Konstrukt vier unterschiedliche Klone analysiert und die Ergebnisse gemittelt. Daher kann man annehmen, dass die Unterschiede zwischen den Raten für Δ -*EGFP* und *HR-EGFP* darin zu suchen sind, dass es Unterschiede in der Länge der Homologien zum Donor-Gen 5' zum DSB nach *I-SceI*-Schnitt gibt. Diese Homologien liegen für Δ -*EGFP* bei nur 168 Bp im Vergleich zu 195 Bp bei *HR-EGFP*. *EJ-EGFP* weist eine Homologie von 203 Bp auf, wobei jedoch bei Konstrukten mit *EJ-EGFP*- und Donor-Gen eine Kopplung von Genkonversion und NHEJ zusätzlich zur Steigerung der Rekombinationsraten beitragen könnte (Richardson und Jasin, 2000). Im Gegensatz zu den Homologien im 5'-Bereich des DSBes erscheinen die Homologien 3' zum DSB als unkritisch, da diese zwischen Δ -*EGFP*, *HR-EGFP* bzw. *EJ-EGFP* und *Stop-EGFP* bei 519 Bp, 528 Bp bzw. 533 Bp liegen, und damit weit über der Grenze von 200 Bp, welche für die effiziente Ausübung der HR benötigt werden (Elliott *et al.*, 1998; Rubnitz und Subramani, 1984).

Nachdem das neu entwickelte Test-System über die beschriebenen Maßnahmen verbessert worden war, wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Dipl. Biol. Karen Hinsch (Hinsch, 2000) eine weitere Variante erzeugt, welche nach Zweifarbenfluoreszenzmessungen nicht nur rekonstituierende sondern auch deletierende Rekombinations-Ereignisse anzeigen sollte. Die zugrunde liegenden Konstrukte unterschieden sich von den bisherigen insofern als hier als Abstandhalter das *RFP*-Gen eingesetzt wurde, um die Deletion des Abstandhalters im Falle von nkHR, vor allem dem SSA, nachweisen zu können, da diese Ereignisse mit dem Verlust

von Zwischensequenzen einhergehen (Dronkert *et al.*, 2000). Darüberhinaus wurden die Positionen von *N'*- und *HR*- bzw. *EJ-EGFP* an der Akzeptor- und Donorposition ausgetauscht, wodurch die Bestimmung von sowohl SSA als auch von Genkonversion möglich wurde. Während für das *HR-EGFP*-Substrat, mit einer 4 Bp langen Deletion in der durch die *I-SceI*-Erkennungssequenz ersetzten Chromophor-Region, nach Initiation der Rekombination durch *I-SceI*-Expression die Anzahl der rotfluoreszierenden Zellen um drei Viertel sank, wurden für das *EJ-EGFP*-Substrat mit einer 5 Bp langen Duplikation an der Chromophor-Region die rotfluoreszierenden Zellen nur um ein Viertel reduziert. Da es parallel zur Reduktion der rotfluoreszierenden Zellen zu einer Zunahme der grünfluoreszierenden Zellen kam, konnte davon ausgegangen werden, dass diese Fluoreszenzunterschiede tatsächlich RFP deletierende oder EGFP rekonstituierende Rekombinationsereignisse reflektierten. Der tatsächliche Beweis dieser Ereignisse muss jedoch in der Zukunft mittels Southern-Blot- oder PCR-Analysen erbracht werden. Auch in Abwesenheit von *I-SceI* wurden tendenziell vergleichbare Unterschiede für *HR*- und *EJ-EGFP*-Konstrukte beobachtet. Die für das *HR-EGFP*- im Vergleich zum *EJ-EGFP*-Substrat beobachteten Unterschiede könnten darauf hindeuten, dass die kurze 5 Bp Duplikation beim *EJ-EGFP* gekoppelte Ereignisse aus Genkonversion und NHEJ gegenüber Deletionen begünstigt (Richardson und Jasin, 2000).

Für diese Zweifarbenanalysen wurden EGFP und RFP ausgewählt, da diese beiden Proteine die einzigen AFPs (autofluoreszierende Proteine) repräsentieren, die mit dem Argon-Laser (488 nm) angeregt werden können und deutlich unterschiedliche Emissionsmaxima bei 508 nm (EGFP) bzw. bei 583 nm (RFP) besitzen. Durch die sogenannte Kompensierungsmethode am FACScan konnten rot- bzw. grünfluoreszierende Zellen klar voneinander getrennt werden, jedoch erwies es sich als schwierig rot- und grünfluoreszierende Zellen eindeutig zu quantifizieren, da EGFP ein breites Emissionsspektrum besitzt und schwach im Rot/Orangen-Bereich fluoresziert. Aus diesem Grunde konnten beim gegebenen Design zwar reine Deletions- und Rekonstitutions-Ereignisse erfasst werden, jedoch nur eingeschränkt eine Kombination aus den beiden. Eine Verbesserungsmöglichkeit könnte durch den Einsatz der leuchtintensiveren RFP-Variante Red2 von Clontech erreicht werden, da hier pseudorotfluoreszierende Zellen von klar rotfluoreszierenden Zellen unterschieden werden könnten. In diesem Zusammenhang sollte auch erwähnt werden, dass die Detektion von RFP besonders durch die Faltung des Proteins erschwert wurde. RFP war erst zwei Tage nach Transfektion in die Zellen am Immunfluoreszenz-Mikroskop sichtbar (Daten nicht gezeigt). Auch diesbezüglich wurde Red2 optimiert und benötigt nur noch einen Tag für die perfekte

Faltung. Durch die Installation einer zweiten Laser-Lampe mit einer Anregung bei 558 nm, welches die optimale Excitationswellenlänge für RFP darstellt, könnte außerdem die Detektion von RFP und die Trennung beider Fluoreszenzen weiter verbessert werden. Zusammenfassend können wir feststellen, dass sich dieses kombinierte System aufgrund der Vorexperimente für eine Analyse von sowohl Deletions- als auch Rekonstitutions-Ereignissen eignet, jedoch noch bestimmter Optimierungsschritte bedarf.

5.2 Anwendungspotential des fluoreszenzbasierten Test-Systems

Das hier beschriebene Test-System trägt das Potential nicht nur zur quantitativen Analyse von Rekombinationsereignissen sondern auch als Verfahren zum Nachweis von genotoxischer Wirkung wie z. B. nach Bestrahlung oder Behandlung mit Chemotherapeutika. Rekombinative Reparatur eignet sich hervorragend als Indikator für DNA-Schädigung, da erstens DSBs und Quervernetzungen ausschließlich rekombinativ beseitigt werden können, darüber hinaus aber auch anderweitige unrepariert gebliebene Läsionen spätestens an der Replikationsgabel rekombinativ beseitigt werden (Haber, 1999). Aus diesem Grunde wurde geprüft, ob Bestrahlung oder Behandlung mit dem Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid die Stimulierung der Rekombination in einem für uns nachweisbaren Maß verursachen.

Die Auswirkungen der ionisierenden Strahlung umfassen hochreaktive freie Radikale, die am Riboseanteil und den einzelnen Basen, insbesondere den Pyrimidinen, der DNA angreifen, was in SSB, DSB, Basenschädigung und anschließendem Basenverlust, DNA-DNA- oder DNA-Protein-*Cross-Links* resultiert (Pouget und Mather, 2001). Etoposid ist ein Inhibitor der Topoisomerase II (TopoII), einem Enzym, welches überspiralisierte DNA entwinden kann. DNA-Topoisomerasen (Topo) sind Enzyme, die die DNA-Topologie regulieren und sind für die Integrität des genetischen Materials während der Transkription, Replikation und Rekombination essentiell (Binaschi *et al.*, 1995). Inhibitoren wie Camptothecin (anti-TopoI) oder Etoposid (anti-TopoII) und andere Topo-Inhibitoren repräsentieren wichtige chemotherapeutische Agentien, die häufig bei Krebstherapien eingesetzt werden. Beide Stoffe interagieren während des katalytischen Zyklus mit der Topo während der Ausbildung des kovalenten Komplexes zwischen Enzym und DNA. TopoII arbeitet als Dimer (α - und β -Form) und katalysiert die Restriktion beider DNA-Stränge. Das Einsetzen von Etoposid verlängert die Halbwertszeit des Komplexes zwischen DNA und TopoII, was in einer Erhöhung von DSBs und in der Folge in der Auslösung des aktiven Zelltods resultiert.

Beide Versuche zeigten eindeutig, dass die verwendete Strahlungs-dosis von 500 Rad und Etoposid-Behandlung mit 100 μM für 2 h eine Erhöhung der Rekombinationsraten über die Detektionsgrenze hinaus bewirkten. Die Behandlung von Zellen mit Etoposid für nur 2 h repräsentiert im Vergleich zur Behandlungsdauer bei Apoptose-Induktionsstudien eine sehr kurze Exposition (Yang *et al.*, 2001). Unter den gegebenen genotoxischen Bedingungen waren die gemessenen Raten gering, nämlich zwischen 10^{-5} und 10^{-4} , weshalb weitere Untersuchungen nötig sind, bei denen Dosis, Behandlungsdauer und zu testende Agentien variiert werden sollten. Als weitere Möglichkeit zur Empfindlichkeitssteigerung bietet sich auch die Analyse von 50000-100000 Zellen statt 30000 Zellen, da beispielsweise auch mit 1 μM Etoposid Einzelereignisse beobachtet wurden, die jedoch rechnerisch unter die Nachweisgrenze fielen. Der wohl vielversprechendste Ansatz zur Sensitivitätssteigerung des Test-Systems als Genotoxizitäts-Nachweisverfahren besteht in der Applikation des im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Zweifarben-Systems mit Rotfluoreszenz-Nachweis. Wie an meinen hier vorgestellten Ergebnissen deutlich zu erkennen ist, zeigte sich, dass die Frequenz der inaktivierenden Ereignisse (Verlust der Rotfluoreszenz) bis zu sechsfach über der Frequenz der rekonstituierenden Ereignisse (Zunahme der Grünfluoreszenz) lag. In Verbindung mit dem wie EGFP leuchtintensiven Red2-Protein sollten deswegen genotoxische Ereignisse nun schätzungsweise eine Größenordnung frequenter, und damit deutlich über der Nachweisgrenze erfassbar sein. In der Tat konnten Schiestl und Kollegen bereits in der Hefe (Brennan und Schiestl, 1999) die Anwendbarkeit eines Messverfahrens für Deletionsereignisse auf die Identifizierung von karzinogenen Stoffen darlegen. Die Bedeutung von Genotoxizitätsnachweisverfahren ergibt sich nicht zuletzt aufgrund der Notwendigkeit die in Hochdurchsatzverfahren neuentdeckten, zahlreichen Wirkstoffe für deren Zulassung zu prüfen.

5.3 Analyse der Rolle von p53

Rekombination repräsentiert den einzigen Reparaturmechanismus für die Eliminierung von DNA-DSBen. In Säugetierzellen werden ungefähr die Hälfte aller DSBe über HR repariert (Lambert *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 1998). Nach Etablierung des auf der Rekonstitution von *wtEGFP* basierenden Test-Systems wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die Rolle von p53 bei der DSB-Reparatur nach Initiation durch die hochspezifische Endonuklease I-SceI untersucht. Um eventuelle Sequestrierung oder dominant negative Effekte zwischen endogen und exogen exprimierten p53-Varianten zu eliminieren, wurden wtp53 und verschiedene Mutanten in der Leukämie-Zelllinie K562 bzw. in der davon abgeleiteten Linie KMV5

überexprimiert. Gleichzeitig wurden durch die Auswahl von K562 mögliche mit Apoptose assoziierte Effekte durch p53 auf die Rekombination ausgeschlossen (Mahdi *et al.*, 1998).

Durch den Einsatz dieses Test-Systems konnten wir zeigen, dass wtp53 auf unterschiedlichen Protein-Expressions-Niveaus, exogen oder endogen exprimiert, die rekombinativen Reparaturereignisse an episomal vorliegenden Vektoren wie auch an chromosomal integrierten Substraten inhibiert. So wurde die inhibitorische Wirkung von p53 nicht nur nach Elektroporation mit 10 µg Expressions-Plasmid (pC53-wt₃) sondern auch bei bis zu 10000fach niedrigeren Plasmid-Konzentrationen beobachtet. Titrationsexperimente belegten außerdem, dass Rekombinationsenzyme unter diesen Bedingungen nicht limitierend waren und mit steigender Substratkonzentration die Rekombinationsraten linear anstiegen. Titrationsreihen zeigten auch, dass wtp53 die Rekombination für unterschiedliche Substratkonzentrationen in ähnlicher Weise reguliert. Insgesamt bestätigten die Daten, dass wtp53 HR supprimiert (Bertrand *et al.*, 1997; Mekeel *et al.*, 1997; Meyn *et al.*, 1994; Wiesmüller *et al.*, 1996).

Ein inhibitorischer Effekt von wtp53 wurde auch für wtEGFP-Rekonstitution mit donorlosem EJ-EGFP-Substrat, welches speziell zur Bestimmung von NHEJ-Ereignissen kreiert worden war, nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit früheren Studien, bei denen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung eine Erhöhung von NHEJ erst nach Verlust von wtp53-Funktionen beobachtet wurden (Bristow *et al.*, 1998). Demgegenüber wurde von Yang *et al.* (1997) und Tang *et al.* (1999) NHEJ-Stimulierung durch p53 berichtet. In letzterer Studie wurde ein linearisierter Vektor benutzt, welcher zwischen einem Promotor und einem *Luciferase*-Gen mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* geschnitten wurde und anschließend unbehandelt blieb oder mit Klenow-Fragment an den Enden geglättet wurde. So zeigten die Autoren, dass wtp53 NHEJ an überlappenden DNA-Enden fördert, während NHEJ mit glatten DNA-Enden unbeeinflusst blieb. In diesem Zusammenhang wurde außerdem beobachtet, dass die stimulierende Aktivität von p53 dessen C-Terminus benötigt, aber unabhängig von der transkriptionellen Transaktivierungsfunktion abläuft. Abweichend von dieser Studie benutzte ich hier Plasmide, welche innerhalb des EJ-EGFP-Gens nach internem Schnitt durch *I-SceI* die Prozessierung des DSBes bis zu den flankierenden Mikrohomologien erforderten, um das wtEGFP-Gen erfolgreich zu rekonstituieren. Aus diesem Grunde könnten die hier festgestellten, für wtp53 spezifischen Effekte beim NHEJ mit dem Auftauchen von nicht-homologen DNA-Überhängen zusammenhängen. Eine Unterscheidung von NHEJ-Ereignissen mit nicht-homologen Bereichen würde eine Parallele zur

Genauigkeitskontrollfunktion von p53 bei der HR repräsentieren (Dudenhöffer *et al.*, 1998). Um eindeutige Aussagen treffen zu können, müssten jedoch vergleichende Experimente für entsprechend modifizierte Substrate durchgeführt werden.

Eine Überwachungsfunktion durch p53 für HR-Prozesse bestätigte sich in meiner Arbeit eindeutig in Bezug auf das Ausmaß der Sequenzhomologien zwischen den DNA-Austauschsubstraten. Durch die Generierung von DNA-Rekombinationssubstraten mit unterschiedlich langen Sequenzhomologien konnte ich zeigen, dass in Zellen mit p53-negativem Status für HR mit Δ - bzw. *HR-EGFP*-Akzeptor und jeweils *N'-EGFP*-Donor keine signifikanten Unterschiede auftauchten. Demgegenüber wurde in Zellen mit wtp53 Rekombination für limitierte homologe Sequenzen (Δ -*EGFP*) bis zu siebenfach stärker unterdrückt als für Homologien im Bereich von 200 Bp (*HR-EGFP*). Dies bedeutet, dass p53 möglicherweise entscheidend dazu beiträgt, dass in sich mitotisch teilenden Zellen Genkonversionsprozesse erst für Homologien ab 200 Bp effizient, nämlich zu 90 %, ablaufen können. Saintigny *et al.*, (1999) konnten mit direkten und indirekten Sequenzwiederholungen nachweisen, dass wtp53 die Rad51-abhängige Stranginvasion und damit vor allem die Genkonversion mehr als das SSA beeinflusst. Genkonversion ist im Gegensatz zu SSA und NHEJ durch sehr hohe Reparatur-Genauigkeiten gekennzeichnet (Richardson und Jasin, 2000). Weitere Daten aus unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass p53 eine wichtige Rolle bei der Genauigkeitskontrolle während der HR durch Erkennung von Basenfehlpaarungen übernimmt (Dudenhöffer *et al.*, 1998; Süsse *et al.*, 2000). Insgesamt scheint p53 also einen Genauigkeitskontrollfaktor der HR und möglicherweise auch des NHEJ darzustellen, wobei p53 eine besondere Rolle bei der Überwachung von Genkonversionsprozessen spielt. Entsprechende Überwachungsmechanismen sind für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität beim Menschen im Vergleich zur Hefe, welcher p53 fehlt, lebensnotwendig, da die zahlreichen, über das Genom verstreuten, repetitiven Sequenzen anderweitig genomische Rearrangements auslösen würden.

Kürzlich wurden überzeugende Beweise dafür geliefert, dass HR und NHEJ nicht vollständig zu trennen sind und dass die Kopplung von Stranginvasion in eine homologe Sequenz und anschließendes NHEJ des ursprünglich gebrochenen Chromosoms, effektiv vor Rearrangements zwischen unterschiedlichen Chromosomen schützt (Richardson und Jasin, 2000). Interessanterweise haben wir für wtp53 und einem unserer Substrate, nämlich mit *EJ-EGFP*-Akzeptor und *Stop-EGFP*-Donor, welches die Bestimmung von NHEJ über Mikrohomologien im *EJ-EGFP* und gleichzeitig von Genkonversion und SSA zwischen den

homologen Partnern *EJ-EGFP* und *Stop-EGFP* erlaubt, die niedrigsten inhibitorischen Effekte beobachtet. Dies lässt sich dahingehend interpretieren, dass bei der gekoppelten Reparatur der Anteil der Genkonversion, dessen Überwachung von p53 reguliert wird, gering ist und dadurch die apparente p53-Inhibition ebenfalls sinkt. Derzeit werden abschließende Experimente im Rahmen meiner Doktorarbeit durchgeführt, bei denen mittels genomischer PCR-Analysen eindeutig geklärt werden soll, ob in der Tat die postulierten Reparatur-Prozesse für die jeweilige Substrat-Kombination ablaufen.

Für die von p53 abhängige Inhibition der Genkonversion repräsentiert die Interaktion zwischen p53 und Rad51 eine mögliche biochemische Grundlage (Stürzbecher *et al.*, 1996). Die Autoren dieser Arbeit konnten zeigen, dass p53 *in vivo* an Rad51 bindet. Es wurde postuliert, dass durch diese p53-Interaktion Rad51 keine Homooligomere mehr bilden kann und damit weiterer Strangtransfer unterbunden wird (Buchhop *et al.*, 1997). In Übereinstimmung damit wurde nachgewiesen, dass das Einbringen des großen Tumor-Antigens von Simian Virus 40 (SV40) in primäre humane Fibroblasten eine Erhöhung der homologen Rekombinationsraten zur Folge hat, welche auf die Sequestrierung von p53 durch das große Tumor-Antigen und demzufolge auf die ungestörte Aktivität von Rad51 zurückzuführen ist (Wiesmüller *et al.*, 1996; Arnaudeau *et al.*, 1999). Im Zusammenhang mit der erwähnten Kopplung zwischen Genkonversion und NHEJ ist es interessant, dass in bestrahlten S-Phase-Zellen p53 nicht nur mit der Strangtransferase Rad51 sondern auch mit Rad50 und MSH2 innerhalb nukleärer Foci kolokalisiert (Zink *et al.*, 2001). Rad50/Mre11-Komplexe beteiligen sich an der DSB-Reparatur sowohl durch NHEJ als auch durch HR, höchstwahrscheinlich bei der nukleolytischen DNA-Enden-Prozessierung (Khanna und Jackson, 2001). Für den DNA-Mismatch-Reparatur-Faktor MSH2 wurde bereits vor einigen Jahren eine Rolle bei der Unterdrückung von Austauschereignissen zwischen divergierenden Sequenzen gezeigt (Modrich und Lahue, 1996). MSH2 zeigt demzufolge Ähnlichkeiten zu der für p53 beobachteten Regulation von homologer DSB-Reparatur und wechselwirkt darüberhinaus wie p53 hochspezifisch mit Rekombinationsintermediaten (Dudenhöffer *et al.*, 1998; Zink *et al.*, 2001). *Crosslinking*-Experimente ergaben schließlich, dass p53 und MSH2 innerhalb der gleichen nukleären Komplexe koexistieren können (Zink *et al.*, 2001) und dass MSH2 mit frühen HR-Intermediaten in einer von Rad50 abhängigen Art interagiert (Evans *et al.*, 2000). So ist es vorstellbar, dass MSH2 und p53 die Genauigkeit der DSB-Reparatur während der frühen HR und/oder während dem NHEJ überwachen.

Nachdem kürzlich physikalische Interaktionen zwischen p53 und Polymerase β nachgewiesen wurden, postulierte man, dass hierauf die BER (*Base Excision Repair*)-Regulation durch p53 beruht (Offer *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). p53 scheint BER während den G1- und G2-Phasen des Zellzyklusses zu modulieren (Offer *et al.*, 2001). Demgegenüber ist die auf Homologie gerichtete rekombinative Reparatur häufig mit der DNA-Replikation assoziiert und auch p53 ist mit Rekombinationsenzymen vornehmlich während der DNA-Replikation in nukleären Foci assoziiert (Cox *et al.*, 2000; Haber, 1999; Lambert *et al.*, 1999; Zink *et al.*, 2001). In den hier präsentierten Arbeiten wurde DNA-Reparatur spezifisch durch die Applikation der I-SceI-Meganuklease ausgelöst, so dass nicht wie bei ionisierender Strahlung, wodurch neben DSBen auch Basenmodifikationen entstehen können, von p53 abhängige Rekombinations-Effekte indirekt auf Aktivitäten bei der BER zurückgeführt werden können. Interessanterweise ist jedoch Polymerase β sowohl bei der reparatur-assoziierten DNA-Synthese während der meiotischen, d. h. homologen, Rekombination wie auch bei der Lücken-Auffüllreaktion während dem NHEJ beteiligt und zwar gemeinsam mit einer noch unidentifizierten Nuklease, welche terminale Basenfehlpaarungen eliminiert (Plug *et al.*, 1997; Wilson und Lieber 1999). Da p53 Aktivitäten, wie den exonukleolytischen Abbau von DNA in 3' zu 5'-Richtung und hochaffine Bindung an Rekombinationsintermediate *in vitro* ausübt, stellt p53 einen möglichen Kandidaten für die mit Polymerase β assoziierte Korrekturfunktion während der Rekombination dar (Huang, 1998; Jean *et al.*, 1997; Mummenbrauer *et al.*, 1996; Shakked *et al.*, 2000; Skalski *et al.*, 2000; Süsse *et al.*, 2000).

In einer früheren Studien wurde eine Erhöhung der HR-Raten in Korrelation zur Expression von konformationell veränderten p53-Mutanten in Zellen mit wtp53 gebracht, während für die strukturell unveränderte DNA-Kontakt-Mutante p53(273H) keine Rekombinations-Stimulierung gezeigt werden konnte (Cho *et al.*, 1994; Dudenhöffer *et al.*, 1999; Ory *et al.*, 1994; Saintigny *et al.*, 1999). In meiner Arbeit wurden die Mutanten p53(175H), p53(248W) und p53(273H) vor einem p53-negativem Hintergrund überexprimiert und waren, unabhängig von ihrem Konformationsstatus, dramatisch beeinträchtigt in ihrer rekombinationsregulatorischen Wirkung. Als Erklärung für die Widersprüchlichkeit der Ergebnisse in Bezug auf p53(273H) müssen deswegen Unterschiede im endogenen p53-Status herangezogen werden. Es ist bekannt, dass durch Konformations-Mutanten von p53 dominant negative Effekte gegenüber wtp53 ausgeübt werden können, wohingegen DNA-Kontakt-Mutanten dazu nicht in der Lage sind (Harvey *et al.*, 1995). Unsere Ergebnisse mit der p53-negativen Zelllinie K562 stehen in Einklang mit dem Verlust der biochemischen Aktivitäten, wie die Bindung von Rekombinationsintermediaten und deren exonukleolytischer Abbau,

welcher mit Konformations- wie auch Kontakt-Mutanten assoziiert ist (Dudenhöffer *et al.*, 1999; Mummenbrauer *et al.*, 1996; Süsse *et al.*, 2000). p53(273H) stellt diejenige p53-Mutante dar, welche in unserem Test-System durch den niedrigsten Rekombinations-Unterdrückungseffekt gekennzeichnet war, sich also als maximal inaktiviert bei der Rekombinationsunterdrückung erwies. p53(273H) wurde demgegenüber in früheren Studien als partiell aktiv in transkriptions- und wachstums-regulatorischen Funktionen beschrieben (Dudenhöffer *et al.*, 1999). Aus diesem Grund muss Arginin 273 eine besondere Rolle bei den biochemischen Aktivitäten im Rahmen der Rekombinationskontrolle durch p53 zugeschrieben werden. Gemäß der Röntgenkristallstruktur ist Arginin 273 an elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Phosphat-Rückgrat der DNA beteiligt und damit kritisch für die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 (Cho *et al.*, 1994).

Wie bereits bei einer früheren Studie zeigte p53(143A) in unserem Test-System intermediäre Suppressor-Aktivität im Vergleich zu wtp53 und p53(273H) (Willers *et al.*, 2000). Mit Δ -EGFP-Akzeptor, also bei limitierten Sequenz-Homologien, war der Verlust der Suppressor-Aktivität von krebsrelevanten Mutanten generell und insbesondere für p53(143A) am deutlichsten. Es sollte betont werden, dass mit den *Gain-of-Function*-Mutanten p53(175H), p53(281G) und p53(174Y), welche zur Krebs-Progression aktiv beitragen, keine *Gain-of-Recombination*-Aktivitäten unter diesen Bedingungen gegenüber den Raten in p53-freien Zellen beobachtet wurden (Layni *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1995; Preuss *et al.*, 2000). Ferner erwies sich p53(281G) als die Mutante, die im Vergleich zu den anderen krebsrelevanten Mutanten-Formen den geringsten Rekombinationsregulationsdefekt aufwies. Insgesamt zeigen unsere Daten, dass p53-Mutationen, welche häufig bei Krebs-Patienten nachgewiesen werden, Defekte bei der HR-Unterdrückung, insbesondere für kurze Homologien zeigen und damit schädlichen Genom-Veränderungen nicht mehr entgegenwirken (Hollstein *et al.*, 1991). In unserem Test-System zeigen Funktionsgewinn-Mutanten keine aktiven Funktionen in der Genom-Destabilisierung.

Für p53 ist eine Beteiligung bei der DNA-Rekombination über dessen transkriptionelle Transaktivierung von MSH2 oder KARP-1 (*Ku86 autoantigen-related protein-1*) vorstellbar (Myung *et al.*, 1998; Scherer *et al.*, 2000). Dagegen spricht, dass in Zellen, die in der DNA-Synthese-Phase synchronisiert wurden, p53 mit rekombinativen Reparatur-Komplexen kolokalisiert und DNA-Rekombinationsintermediate erkennt (Zink *et al.*, 2001), während es als Antwort auf γ -Strahlung in entsprechend synchronisierten Zellen keine transkriptionelle Transaktivator-Funktionen zeigt (Gottfredi *et al.*, 2001). Außerdem wurden *Separation-of-*

Function-Mutationen entdeckt, welche p53-Effekte bei der Rekombination auslöschen jedoch nicht die transkriptionelle Transaktivierung und die Wachstumsarrest-Funktion (Dudenhöffer *et al.*, 1999; Saintigny *et al.*, 1999; Willers *et al.*, 2000). p53(138V) präsentiert das humane Gegenstück zur *Separation-of-Function*-Mutante p53(135V) aus der Maus, die keine transkriptionelle Transaktivierungs-Funktion ausüben kann, jedoch aktiv im Bezug auf HR-Inhibition ist (Willers *et al.*, 2000). Unsere Daten bestätigen, dass p53 HR über einen von seiner transkriptionellen Transaktivierungs-Funktion unabhängigen Mechanismus regulieren kann, da transkriptionell inaktives p53(138V) bei ausreichend hoher Expression, nämlich z. B. via pSV53(138V)her versus p53(138V) in pGC, die HR ähnlich wie wtp53 reguliert. Dies gilt für Substrate, die *HR-EGFP*- oder *EJ-EGFP*-Akzeptor-Gene tragen. Für Substrate mit Δ -*EGFP*-Akzeptor, welche Sequenzhomologien von weniger als 200 Bp erzeugen, wurde ein intermediärer Effekt beobachtet.

Das Zielgenprodukt von p53, KARP-1, kodiert für ein KU86-Homolog mit putativer stimulatorischer Aktivität auf DNA-PK (Myung *et al.*, 1998). Somit könnte p53 durch Stimulierung von NHEJ indirekt HR herabregulieren (Hendrickson, 1997). Die Notwendigkeit von p53 für die Expression von KARP-1 und demzufolge möglicherweise auch für die DNA-PK-Aktivität wurde gezeigt. In Bezug auf die Möglichkeit, dass MSH2 als p53 nachgeschalteter Faktor HR unterdrückt, spricht dagegen, dass p53 als Antwort auf DNA-Schäden in Zellen akkumuliert, wohingegen die MSH2-Niveaus stabil bleiben (Zink *et al.*, 2001). Mehr noch, der Verlust von sowohl p53 als auch von MSH2 verursachten nach genotoxischer Behandlung sowohl eine synergistische Erhöhung von *Frameshift*-Mutationsfrequenzen in CA-Wiederholungen wie auch synergistisch erhöhte Krebs-Anfälligkeiten, was auf unabhängige, aber komplementäre Aktivitäten von p53 und MSH2 bei der Genom-Stabilisierung hindeutet (Cranston *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2000). Bei p53(138V) könnte aber auch die Aktivierung oder Reprimierung eines bisher noch unbekannten transkriptionellen Zielgens gestört sein oder es könnte eine transkriptions-unabhängige Aktivität, wie z. B. die Interaktion mit bestimmten Proteinen fehlen, um eine nur partielle Suppression mit Δ -*EGFP*-Akzeptor-Substraten oder nach Expression via p53(138V) in pGC zu erklären. Interessanterweise ist das humane p53(138V) das Gegenstück zur Maus-Mutante p53(135V), welche Defekte in der Ausübung der 3'-5'-Exonuklease Aktivität zeigt (Mummenbrauer *et al.*, 1996). Die oligomerisierungsdefekte Mutante p53(1-333) zeigte in früheren Studien eine reduzierte Spezifität für und exonukleolytische Prozessierung von Rekombinations-DNA-Intermediaten (Dudenhöffer *et al.*, 1999; Janz *et al.*, 2001), so dass diese biochemischen Defekte der Aktivitäts-Reduktion bei der Rekombinationsregulation

zugrunde liegen können. C-Terminal trunkiertes p53(1-363) besitzt die volle Exonuklease- und Rekombinationsintermediat-Bindungskapazität (Dudenhöffer *et al.*, 1999; Janus *et al.*, 1998) und ist voll aktiv in der Rekombinationskontrolle. Demzufolge könnten reduzierte regulatorische Aktivitäten bei den p53-Mutanten p53(138V) und p53(1-333), insbesondere für Substrate mit kurzen Sequenzhomologien, durch Defekte bei exonukleolytischen Korrekturlesefunktionen erklärt werden.

In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass zahlreiche p53-Mutanten bei der Überwachung von DNA-Austauschereignissen zwischen Sequenzen mit kurzen Homologien beeinträchtigt sind, was darauf hindeutet, dass die Einmischung von p53 bei der fehlerhaften HR steigt. Mehr noch, es ist jetzt klar, dass transkriptions-unabhängige Aktivitäten von p53 bei der Rekombinationsüberwachung beteiligt sind. Demzufolge postulieren wir, dass p53 bei der Tumor-Suppression als Wächter für Wachstum und DNA-Austausch funktioniert.

Verstärkt durch meine hier vorgestellten Ergebnisse muss p53 eine Beteiligung bei der Rekombination eingeräumt werden. Mit Hilfe des mir entwickelten Test-Systems basierend auf der Rekonstitution eines *wtEGFP*-Gens könnte weiterführend das Zusammenspiel zwischen p53 und Rad51 näher untersucht werden, indem Zellen mit und ohne anti-Rad51-Ribozym auf Rekombinationsunterschiede hin analysiert werden. Um mögliche regulatorische Funktionen von p53 bei der NHEJ genauer zu untersuchen, könnte ähnlich wie bei Tang *et al.*, (1999) das kommerziell erhältliche Plasmid pEGFP-N1 und der im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Vektor p5xwtEGFP vor dem EGFP-Gen mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten und linearisiert in die Zellen eingebracht werden. Die Rekonstitution eines zirkulären Plasmids in diesem Fall würde mit einer Förderung des NHEJ einhergehen und damit in Grünfluoreszenz der Zellen resultieren. Die gleichzeitige Überexpression von der *Separation-of-Function*-Mutante p53(138V) könnte Aufschluss über die Beteiligung der transkriptionellen Transaktivierungsfunktion von p53 beim NHEJ geben.

6. Zusammenfassung

Während Doppelstrangbrüche (DSBe) meiotischen Ursprungs für die Entstehung der Artenenvielfalt essentiell sind, stellen sie für die genomische Integrität von sich mitotisch teilenden Zellen eine große Bedrohung dar. Ein einziger DSB kann zum Zelltod führen und ein falsch reparierter DSB kann onkogene Chromosomen-Aberrationen hervorrufen. Um DSBe beheben zu können, wurden von der Zelle zwei Reparaturwege entwickelt: Nicht-homologes *End-Joining*, auch illegitime Rekombination genannt, und homologe Rekombination, welche in die beiden prädominierenden Typen der Genkonversion und SSA (*single strand annealing*) unterteilt wird. Um die existierenden Methoden zur DSB-Reparatur-Messung durch eine reaktionsschnelle und weniger arbeitsaufwendige Methode ersetzen zu können, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein neues Test-System basierend auf der Rekonstitution eines *wtEGFP*-Gens entwickelt. Das grün autofluoreszierende Protein EGFP eignet sich sehr gut für die Detektion von seltenen zellulären Ereignissen durch Identifizierung von Grünfluoreszenz in lebenden Zellen am FACScan-Durchflußzytometer. Für die Funktionalität essentiell sind eine von Sauerstoff abhängige posttranslationale Modifikation der Chromophor-Region und die Integrität der Proteinstruktur, so dass die Deletion von nur wenigen Aminosäuren mit dem Verlust der Grünfluoreszenz einhergehen. Dementsprechend konnten unterschiedlich mutierte, nichtfluoreszierende EGFP-Varianten zur Bestimmung von *wtEGFP* rekonstituierenden Rekombinationsereignissen designed werden. Zur Unterscheidung von verschiedenen Reparaturformen wurden unterschiedliche Rekombinations-Akzeptor- (Δ -, *HR*- oder *EJ-EGFP*) und -Donor-Gene (*N'-EGFP*, *Stop-EGFP* oder *wtEGFP*) in gleicher Orientierung in ein retrovirales Vektorgerüst integriert, welches wiederum die lineare Insertion der Substrate in das zelluläre Genom ermöglicht. Die hinter einen Promotor geschalteten Akzeptor-Gene wurden so gewählt, dass durch die Größe

von Deletionen (46 Bp bei Δ -, 4 Bp bei *HR-EGFP*) und Duplikation (5 Bp bei *EJ-EGFP*) innerhalb der Chromophor-Region unterschiedlich lange Homologien zum Donor-Gen erzeugt wurden.

Um DSBe gezielt innerhalb des Akzeptor-Gens initiieren zu können, wurde die selten schneidende Restriktionsendonuklease *I-SceI* überexprimiert und dessen 18 Bp lange nicht-palindromische Erkennungssequenz in das Akzeptor-Gen inseriert. Für die Produktion der Meganuklease wurde das *I-SceI*-Gen in einer Variante des Systems als Abstandhalter zwischen die Rekombinationssubstrate hinter einen durch Östradiol regulierbaren Promotor plaziert. Durch die Überexpression von *I-SceI* in humanen Zellen wurden Rekombinationsraten in unserem System um das 20-80fache erhöht. Hierbei wurden nach transienter Transfektion von menschlichen Leukämiezellen, aufgrund der hohen Kopienzahl der Substrate, Rekombinationsraten im Bereich von $1-30 \times 10^{-2}$ beobachtet, wohingegen nach stabiler Integration der Rekombinationsvektoren in das zelluläre Genom Werte im Bereich von $1-15 \times 10^{-4}$ gemessen wurden.

Die Erzeugung von p53-Null-Mäusen hatte deutlich gemacht, dass der Tumorsuppressor p53 nicht nur Funktionen bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden ausübt, sondern auch eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Genom-Stabilität/-Integrität und möglicherweise bei der Rekombination spielt. So zeigte sich, dass p53 Aneuploidien, Allel-Verlusten, Schwesterchromatidaustauschen und Gen-Amplifikationen entgegenwirkt. Um die Beteiligung von p53 bei der homologen Rekombination und beim nicht-homologen *End-Joining* näher untersuchen zu können, wurden wtp53, krebsrelevante p53-Mutanten und funktionell interessante Deletionsmutanten in Zellen mit den beschriebenen Rekombinationssubstraten eingeführt. So konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass wtp53 dosisabhängig, aber bis zu extrem geringen p53-Mengen in der Zelle, die homologe Rekombination inhibiert. Auch eine inhibitorische Wirkung auf das nicht-homologe *End-Joining* mit kurzen repetitiven Sequenzen wurde eindeutig nachgewiesen. Die krebsrelevanten Mutanten waren gegenüber wtp53 bis zu 30fach weniger effektiv in der Rekombinationsinhibierung, zeigten jedoch keine Steigerung der Raten über den Wert für p53-freie Zellen. Die Analyse einer transkriptionell und damit auch wachstumsregulatorisch defekten p53-Mutante zeigte, dass diese unabhängig von der Transkription die Rekombination herabreguliert. Bei diesen Analysen wurden ähnliche Ergebnisse sowohl mit chromosomal integrierten Rekombinationssubstraten als auch in transienten Experimenten, also mit episomalen Plasmidsubstraten, erhalten. Ein besonders interessantes Ergebnis war, dass p53 bei der Regulation der Rekombination zwischen Rekombinationssubstraten mit langen und

kurzen Homologien diskriminiert, und insbesondere bei der konservativen Rekombination, also vor allem bei der Genkonversion, die Rekombination zwischen Substraten mit kurzen homologen Sequenzen unterdrückt.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Test-System etabliert, welches die Bestimmung von DSB-Reparatur-Ereignissen innerhalb von 24-72 h durch Rekonstitution eines *wtEGFP*-Gens zuverlässig erlaubt und damit die Möglichkeit schafft, die Reparatur-Antwort auf bestimmte Stimuli systematisch und reaktionsschnell zu analysieren. Die Anwendbarkeit des Systems wurde für den Tumorsuppressor p53 und seine inhibierende Wirkung auf die Rekombination bestätigt. Hierbei ergaben sich aus Substratanalysen Hinweise auf die biologische Bedeutung dieser von der Transkription und Wachstumsregulation unabhängigen p53-Funktion, nämlich die Unterdrückung von genomdestabilisierenden Rekombinationsprozessen zwischen Sequenzen mit nur kurzen Homologien wie z. B. repetitiven Sequenzen im menschlichen Genom.

7. Literaturverzeichnis

- Albor, A., S. Kaku, und M. Kulesz-Martin. 1998. Wild-type and mutant forms of p53 activate human topoisomerase I: a possible mechanism for gain of function in mutants. *Cancer Res.* 5: 2091-2094.
- Albrechtsen, N., I. Dornreiter, F. Grosse, E. Kim, L. Wiesmüller, und W. Deppert. 1999. Maintenance of genomic integrity by p53: Complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene* 18: 7706-7717.
- Arnaudeau C., T. Helleday und D. Jenssen. 1999. The RAD51 protein supports homologous recombination by an exchange mechanism in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 289: 1231-1238.
- Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K. P., Szekely, L., Klein, G., Terenius, L., und 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.
- Bargonetti, J., Manfredi, J. J., Chen, X., Marshak, D. R., und 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., P. Forster, S. Hegewisch-Becker und K. Harbers. 1994. An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *BioTechniques.* 17: 1058-1062.
- Bayle, J. H., Elenbaas, B., und Levine, A. J. 1995. The carboxyl-terminal domain of the p53 protein regulates sequence-specific DNA binding through its nonspecific nucleic acid-binding activity. *Proc Natl Acad Sci Usa* 92, 5729-5733.
- Benson F. E., P. Baumann und S. C. West. 1998. Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature.* 391: 401-404.
- Bertrand, P., D. Rouillard, A. Boulet, C. Levalois, T. Soussi, und B.S. Lopez. 1997. Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene* 14: 1117-1122.
- Bierhuizen, Marti F. A., Yvonne Westerman, Trudi P. Visser, Albertus W. Wognum und Gerard Wagemaker. 1997a. Green fluorescent protein variants as markers of retroviral-mediated gene transfer in primary hematopoietic cells and cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 234, 371-375.
- Bierhuizen, Marti F. A., Yvonne Westerman, Trudi P. Visser, W. Dimjati, Albertus W. Wognum und Gerard Wagemaker. 1997b. Enhanced green fluorescent protein as selectable marker of retroviral-mediated gene transfer in immature hematopoietic bone marrow cells. *Blood.* Vol. 90, No. 9 (November), 3304-3315.
- Bill, C.A., Y. Yu, N.R. Miselis, J.B. Little, J.A. Nickoloff. 1997. A role for p53 in DNA end rejoining by human cell extracts. *Mutat. Res.* 385: 21-29.
- Binaschi, M., F. Zunino und G. Capranico. 1995. Mechanism of action of DNA topoisomerase inhibitors. *Stem Cells.* 13(4): 369-379.

- Blander, G., J. Kipnis, J.F.M. Leal, C.-E. Yu, G.D. Schellenberg, und M. Oren. 1999. Physical and functional interaction between p53 and the Werner's syndrome protein. *J. Biol. Chem.* 274: 29463-29469.
- Borman, A. M., P. Le Mercier, M. Girard und K. M. Kean. (1997). Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, No. 5:925-932.
- Braselmann, S., P. Graninger, und M. Busslinger. 1993. A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1657-16616.
- Brennan RJ. und Schiestl RH. 1999. The aromatic amine carcinogens o-toluidine and o-anisidine induce free radicals and intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* 430(1):37-45.
- Brennemann, M., F. S. Gimble und J. H. Wilson. (1996). Stimulation of intrachromosomal homologous recombination in human cells by electroporation with site-specific endonuclease. *Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 93: 3608-3612.
- Bristow, R.G., Q. Hu, A. Jang, S. Chung, J. Peacock, S. Benchimol, und R. Hill. 1998. Radioresistant MTP53-expressing rat embryo transformants exhibit increased DNA-dsb rejoining during exposure to ionizing radiation. *Oncogene* 16: 1789-1802.
- Brown, D. R., Deb, S., Munoz, R. M., Subler, M. A., und Deb, S. P. 1993. The tumor suppressor and the oncoprotein simian virus 40 T antigen bind to overlapping domains on the MDM2 protein. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6849-6857.
- Buchhop, S., Gibson, M. K., Wang, X. W., Wagner, P., Stuerzbecher, H. W., und Harris, C. C. 1997. Interaction of p53 with the human Rad51 protein. *Nucleic Acids Res* 25, 3868-3874.
- Chen CY, Oliner JD, Zhan Q, Fornace AJ Jr, Vogelstein B, Kastan MB. 1994. Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(7):2684-8.
- Chen J, Marechal V, Levine AJ. 1993. Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol.* 13(7). 4107-14.
- Chen J, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G, Couch FJ, Weber BL, Ashley T, Livingston DM, Scully R. 1998. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol. Cell.* 2(3):317-28.
- Chen JJ, Silver D, Cantor S, Livingston DM, Scully R. 1999. BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res.* 59(7 Suppl):1752s-1756s.
- Cho, Y., S. Gorina, P.D. Jeffrey, und N.P. Pavletich. 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265: 346-355.
- Choulika, A., A. Perrin, B. Dujon und J.-F. Nicolas. (1995). Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 1968-1973.
- Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L., und Wyllie, A. H. 1993. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362, 849-852.
- Cleaver, E., V. Afzal, L. Feeney, M. McDowell, W. Sadinski, J.P. Volpe, D.B. Busch, D.M. Coleman, D.W. Ziffer, Y. Yu, H. Nagasawa, und J.B. Little. 1999. Increased ultraviolet sensitivity and chromosomal instability related to p53 function in the xeroderma pigmentosum variant. *Cancer Res.* 59: 1102-1108.
- Clever, B., H. Interthal, J. Schmuckli-Maurer, J. King, M. Sigrist und W.-D. Heyer. 1997. Recombinational repair in yeast; functional interactions between Rad51 and Rad54 proteins. *EMBO J.* 16: 2535-2544.
- Colleaux, L., L. d'Auriol, M. Betermier, G. Cottarel, A. Jacquier, F. Galibert und B. Dujon. (1986). Universal code equivalent of a yeast mitochondrial intron reading frame is expressed into *E. coli* as a specific double strand endonuclease. *Cell*. Vol. 44:521-533.
- Cormack, B. P, R. Valdivia und D. Falkow. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*. 173:33-38.
- Cowell, I.G., A.L. Okorokov, S.A. Cutts, K. Padget, M. Bell, J. Milner, und C.A. Austin. 2000. Human topoisomerase II α and II β interact with the C-terminal region of p53. *Exp. Cell. Res.* 255: 86-94.
- Cox, M.M., M.F. Goodman, K.N. Kreuzer, D.J. Sherratt, S.J. Sandler, und K.J. Mariani. 2000. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404: 37-40.

- Cranston, A., T. Bockerm, A. Reitmair, J. Palazzo, T. Wilson, T. Mak, und R. Fishel. 1997. Female embryonic lethality in mice nullizygous for both Msh2 and p53. *Nature Genet.* 17:114-118.
- Cubitt, A. B., R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross und R. Y. Tsien. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *TIBS.* 20:448-455.
- Czosnek, H. H., Bienz, B., Givol, D., Zakut-Houri, R., Pravtcheva, D. D., Ruddle, F. H., und Oren, M. 1984. The gene and the pseudogene for mouse p53 cellular tumor antigen are located on different chromosomes. *Mol Cell Biol* 4, 1638-40.
- DeLeo AB, Shiku H, Takahashi T, John M, Old LJ. 1977. Cell surface antigens of chemically induced sarcomas of the mouse. I. Murine leukemia virus-related antigens and alloantigens on cultured fibroblasts and sarcoma cells: description of a unique antigen on BALB/c Meth A sarcoma. *J Exp Med.* 146(3):720-734.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., und 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. *Semin Cancer Biol.* 5(3):187-202.
- Donehower LA, Bradley A. 1993. The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta.* 1155(2):181-205.
- Dong Z, Zhong Q, Chen PL. 1999. The Nijmegen breakage syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage. *J Biol Chem.* 274(28):19513-6.
- Donoho, G., M. Jasin und P. Berg. 1998. Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell. Bio.* 18:4070-4078.
- Dronkert, M. D. G., H. B. Beverloo, R. D. Johnson, J. H. J. Hoeijmakers, M. Jasin und R. Kanaar. (2000). Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Molecular and Cellular Biology.* Vol 20, No. 9:8096-8106.
- Dudenhöffer, C., G. Rohaly, K. Will, W. Deppert, und L. Wiesmüller. 1998. Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol. Cell. Biol.* 18: 5332-5342.
- Dudenhöffer, C., M. Kurth, F. Janus, W. Deppert, und L. Wiesmüller. 1999. p53 domains involved in the control of recombination. *Oncogene* 18: 5773-5784.
- El-Awady, R. A., E. Dikamey und J. Dahm-Daphi. 2001. Heat effects on DNA repair after ionising radiation; hyperthermia commonly increases the number of non-repaired double-strand breaks and structural rearrangements. *Nucleic Acids Research.* 29:1960-1966.
- El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., und 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., und Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- Elliott, B., C. Richardson, J. Winderbaum, J.A. Nickoloff, und M. Jasin. 1998. Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 18: 93-101.
- Essers, J., R. W. Hendriks, S. M. A. Swagemakers, C. Troelstra, J. de Wit, D. Bootsma, J. H. J. Hoeijmakers und R. Kanaar. 1997. Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell.* 89: 195-204.
- Evans, E., N. Sugawara, J.E. Haber, und E. Alani. 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 mismatch repair protein localizes to recombination intermediates *in vivo*. *Mol. Cell* 5: 789-799.
- Ferguson, D. O. und W. K. Holloman. 1996. Recombinational repair of gaps in DNA is asymmetric in *Ustilago maydis* and can be explained by a migrating D-loop model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:5419-5424.
- Fields, S., und Jang, S. K. 1990. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249, 1046-1049.
- Flores-Rozas, H., und R.D. Kolodner. 2000. Links between replication, recombination and genome instability. *Trends Biochem. Sci.* 25: 196-200.
- Foord, O. S., Bhattacharya, P., Reich, Z., und Rotter, V. 1991. A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. *Nucleic Acids Res* 19, 5191-5198.

- Ford, J.M., und P.C. Hanawalt. 1997. Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272: 28073-28080.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker und W. Siede. 1995. DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, DC.
- Gebow, D., N. Miselis, und H.L. Liber. 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.
- Gobert, C., A. Skladanowski, und A.K. Larsen. 1999. The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10355-10360.
- Golub, E. I., O. V. Kovalenko, R. C. Gupta, D. C. Ward und C. M. Radding. 1997. Interaction of human recombination proteins Rad51 and Rad54. *Nucleic Acids Res.* 25: 4106-4110.
- Gottifredi, V., S.-Y. Shieh, Y. Taya, und C. Prives. 2001. p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1036-1041.
- Grzanka A. 2001. Estimation of changes in tubulin induced with etoposide in human leukemia cells line K-562 by immunofluorescence microscope. *Neoplasma.* 48(1):48-51.
- Haber JE. 1998. Meiosis: Avoiding inappropriate relationships. *Curr. Biol.* 8(23):R832-5.
- Haber, J. 1999. DNA recombination: the replication connection. *Trends Biol. Sci.* 24: 271-275.
- Harvey M, Vogel H, Morris D, Bradley A, Bernstein A, Donehower LA. 1995. A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nat Genet.* 9(3):305-11
- Harvey, M., A.T. Sands, R.S. Weiss, M.E. Hegi, R.W. Wiseman, P. Pantazis, B.C. Giovanella, M.A. Tainsky, A. Bradley, und L.A. Donehower. 1993. *In vitro* growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* 8: 2457-2467.
- Hendrickson E. A. 1997. Insights from model systems; Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 795-800.
- Hinsch, K. (2000). Diplomarbeit: Erzeugung rekombinanter Retroviren für die lineare Insertion von EGFP-Rekombinations-Markern ins zelluläre Genom.
- Hiom K. (1999). DNA repair: Rad52-the means to an end. *Current Biology.* 9:R446-R448.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, und C.C. Harris. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.
- Huang, M. T. F. und C. M. Gorman. 1990. Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Research.* Vol. 18, No: 4: 937-947.
- 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.
- Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A., und Lane, D. P. 1993. Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53. *Nucleic Acids Res* 21, 3167-3174.
- Ishizaki, K., Y. Ejima, T. Matsunaga, R. Hara, A. Sakamoto, M. Ikenaga, Y. Ikawa, und S. Aizawa. 1994. Increased UV-induced SCEs but normal repair of DNA damage in p53-deficient mouse cells. *Int. J. Cancer* 58: 254-257.
- Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M., und Croce, C. M. 1986. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320, 84-5.
- Jacks T, und Weinberg RA. 1996. Cell-cycle control and its watchman. *Nature.* 381(6584):643-4.
- Jackson, R. J., M. T. Howell und A. Kaminski. 1990. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem. Sci.* 15:477-483.
- Jang, S. K., H.-G. Kräusslich, M. J. H. Nicklin, G. M. Duke, A. C. Palmenberg und E. Wimmer. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of Encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. *Journal of Virology.* Vol. 62, No. 8: 2636-2643.
- Janus, F., Albrechtsen, N., Knippschild, U., Wiesmüller, L., Grosse, F., und Deppert, W. 1999. Different regulation of the p53 core domain activities 3' to 5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 19.

- Janz, C., S. Süsse, und L. Wiesmüller. 2001. p53 and recombination intermediates: role of tetramerization at DNA junctions in complex formation and exonucleolytic degradation. Eingereicht.
- Jasin, M. 1996. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet.* 12: 224-228.
- Jean, D., D. Gendron, L. Delbecchi, und P. Bourgaux. 1997. p53-mediated DNA renaturation can mimic strand exchange. *Nucl. Acids Res.* 25: 4004-4012.
- Jeggo, P. A., G. E. Taccioli und S. P. Jackson. 1995. Menege á trois: double strand break repair, V(D)J recombination and DNA-PK. *Bioessays.* 17: 949-957.
- Jenkins, J. R., Reddy-H-WStürzbecher /, E. P., Skalka, A. M., und Curran, T. 1988. The p53 oncogene / The Oncogene Handbook. Elsevier Science Publishers B 1988, 403-423.
- Jiang, H., Y. Xie, P. Houston, K. Stemke-Hale, U. H. Mortensen, R. Rothstein und T. Kodadek. 1996. Direct association between the yeast Rad51 and Rad54 recombination proteins. *J. Bio. Chem.* 271: 33181-33186.
- Kanaar, R., J. H. J. Hoeijmakers und D. C. van Gent. 1998. Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends Cell Biol.*, 8: 483-489.
- Karlson, L., v. Delle und G. Girvath. 1997. Short- and long-term estradiol treatment inhibits growth and alters expression of p21WAF-1/Cip1 in an endometrial adenocarcinoma cell line lacking functional p53. *E. J. Cancer.* 33: 2252-2257.
- Karran P. (2000). DNA double strand break repair in mammalian cells. *Current Opinion in Genetics & Development.* 10:144-150.
- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., und Craig, R. W. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51, 6304-6311.
- Khanna, K.K. und S.P. Jackson. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genet.* 27: 247-254.
- Kim, E., Albrechtsen, N., und Deppert, W. 1997. DNA-conformation is an important determinant of sequence-specific DNA binding by tumor suppressor p53. *Oncogene* 15, 857-869.
- Kingston, R. E., C. A. Bunker und A. N. Imbalzano. 1996. Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev.* 10: 905-920.
- Kinzler K. W. und B. Vogelstein. 1997. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature.* 386: 761-763.
- Kit S, Kurimura T, Dubbs DR. 1969. Properties of simian virus 40 rescued from cell lines transformed by ultraviolet-irradiated simian virus 40. *J Virol.* 4(5):585-95.
- Klein, H. L. 1995. Genetic control of intrachromosomal recombination. *Bioessays.* 17: 147-159.
- Ko, L.J., und C. Prives. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes and Dev.* 10: 1054-1072.
- Kolodner RD. 1995. Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem Sci.* 20(10):397-401.
- Kowalczykowski S. C. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem. Sci.* 25:156-165.
- Kühn, C., F. Müller, C. Melle, H.P. Nasheuer, F. Janus, W. Deppert, und F. Grosse. 1999. Surface plasmon resonance measurements reveal stable complex formation between p53 and DNA-polymerase α . *Oncogene* 18: 769-774.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambert, S., Y. Saintigny, F. Delacote, F. Amiot, B. Chaput, M. Lecomte, S. Huck, P. Bertrand, und B.S. Lopez. 1999. Analysis of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells, using tandem repeat sequences. *Mutat. Res.* 433: 159-168.
- Lane, D. P., und Crawford, L. V. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.
- Lanyi, A., D. Deb, R.C. Seymour, J.H. Ludes-Meyers, M.A. Subler, und S. Deb. 1998. 'Gain of function' phenotype of tumor-derived mutant p53 requires the oligomerization/ nonsequence-specific nucleic acid-binding domain. *Oncogene* 16: 3169-3176.

- Lee, H., D. Sun, J.M. Larner, und F.S. Wu. 1999. The tumor suppressor p53 can reduce stable transfection in the presence of irradiation. *J. Biomed. Sci.* 6: 285-292.
- Lee, S.M., L. Cavallo, und J. Griffith. 1997. Human p53 binds Holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. *J. Biol. Chem.* 272: 7532-7539.
- Levine, A. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331.
- Levine, A. J., Momand, J., und Finlay, C. A. 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453-456.
- Levine, A. J., und Momand, J. 1990. Tumor suppressor genes: The p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1032, 119-136.
- Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., und Stillman, B. 1994. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371, 534-537.
- Liang S.-H. und M. F. Clarke. 2001. Regulation of p53 localisation. *Eur. J. Biochem.* 268: 2779-2783.
- Liang, F., M. Han, P.J. Romanienko, und M. Jasin. 1998. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5172-5177.
- Lim D. und P. Hasty. 1996. A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal phenotype that is suppressed by a mutation in p53. *Mol. Cell. Biol.* 16: 7133-7143.
- Limón, Ana, J. Briones, T. Puig, M. Carmona, O. Fornas, J. A. Canelas, M. Nadal, J. Garcíá, F. Rueda, und J. Barquinero. 1997. High-titer retroviral vectors containing the enhanced green fluorescent protein gene for efficient expression in hematopoietic cells. *Blood*. Vol. 90, No. 9 (November), 3316-3321.
- Lin, J., A.K. Teresky, und A.J. Levine. 1995. Two critical hydrophobic amino acids in the N-terminal domain of the p53 protein are required for the gain of function phenotypes of human p53 mutants. *Oncogene* 10: 2387-2390.
- Lin, J., J. Chen, B. Elenbaas, und A.J. Levine. 1994. Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev.* 8: 1235-1246.
- Lin, X., K. Ramamurthi, M. Mishima, A. Kondo, und S.B. Howell. 2000. p53 interacts with the DNA mismatch repair system to modulate the cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide. *Mol. Pharmacol.* 58: 1222-1229.
- Liu N, Lamerdin JE, Tebbs RS, Schild D, Tucker JD, Shen MR, Brookman KW, Siciliano MJ, Walter CA, Fan W, Narayana LS, Zhou ZQ, Adamson AW, Sorensen KJ, Chen DJ, Jones NJ, Thompson LH. 1998. XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol. Cell.* 1(6):783-93.
- Livingstone, L.R., A. White, J. Sprouse, E. Livanos, T. Jacks, und T.D. Tlsty. 1992. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70: 923-935.
- Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A., und Jacks, T. 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes [see comments]. *Nature* 362, 847-9.
- Lu, H., und Levine, A. J. (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5154-5158.
- Lutzker SG, Levine AJ. 1996. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cancer Treat Res.* 87:345-356.
- Lutzker SG. und Levine AJ. 1996. A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells is activated by either DNA damage or cellular differentiation. *Nat. Med.* 2(7):804-810.
- Mahdi, T., D. Alcalay, C. Cognard, J. Tanzer, und A. Kitzis. 1998. Rescue of K562 cells from MDM2-modulated p53-dependent apoptosis by growth factor-induced differentiation. *Biol. Chem.* 90: 15-27.
- Maltzman, W., und Czyzyk, L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1689-1694.
- Marmorstein, L.Y., T., Ouchi, und S.A. Aaronson. 1998. The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13869-13874.
- Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JH. 1997. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol.* 17(10):6087-6096.
- Matz, M. V., fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky A. P., Zaisky, A. G., Markelov, M. L. und Lukyanow. S. A. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotech.* 17: 969-973.

- Meek, D.W. 1999. Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification ? *Oncogene* 18: 7666-7675.
- Mekeel, K.L., W. Tang, L.A. Kachnic, C.-M. Luo, J.S. DeFrank, und S.N. Powell. 1997. Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene* 14: 1847-1857.
- Meyn, M.S., L. Strasfeld, und C. Allen. 1994. Testing the role of p53 in the expression of genetic instability and apoptosis in ataxia-telangiectasia. *Int. J. Radiat. Biol.* 66: S141-S149.
- Mirzayans, R., L. Enns, K. Dietrich, R.D.C. Barley, und M.C. Paterson. 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: 691-698.
- Miyashita T, und Reed JC. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 80(2):293-9.
- Modrich, P., und R. Lahue. 1996. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 101-133.
- Molloy C. J., D. P. Bottaro, T. P. Fleming, M. S. Marschall, J. B. Gibbs und S. A. Aaronson. 1989. PDGF induction of tyrosine phosphorylation of GTPase activating protein. *Nature.* 342: 711-714.
- Moynahan M. E. und M. Jasin. 1997. Loss of heterozygosity induced by a chromosomal double-strand break. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 94: 8988-8993.
- Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M. 1999. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell.* 4(4):511-518.
- Miyashita T, Reed JC. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80(2):293-299.
- Muldoon, R. R., J. P. Levy, S. R. Kain, P. A. Kitts und C. J. Link Jr. 1997. Tracking and quantitation of retroviral-mediated transfer using a completely humanised, red-shifted green fluorescent protein gene. *BioTechniques.* 22:162-167.
- Mummenbrauer, T., F. Janus, B. Müller, L. Wiesmüller, W. Deppert, und F. Grosse. 1996. p53 protein exhibits 3'- to -5' exonuclease activity. *Cell* 85: 1089-1099.
- Myung, K., C. Braastad, D.M. He, und E.A. Nendrickson. 1998. KARP-1 is induced by DNA damage in a p53- and ataxia telangiectasia mutated-dependent fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7664-7669.
- Nakamura S, Roth JA, 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(24):9391-8.
- Nelson, W.G., und M.B. Kastan. 1994. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1815-1823.
- New JH, Sugiyama T, Zaitseva E, Kowalczykowski SC. 1998. Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature.* 391(6665):407-10.
- Oberosler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., und Stahl, H. 1993. p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *EMBO J.* 12, 2389-2396.
- Offer, H., I. Zurer, G. Banfalvi, M. Reha'k, A. Falcovitz, M. Milyavsky, N. Goldfinger, und V. Rotter. 2001. p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res.* 61: 88-96.
- Oren, M., Maltzman, W., und Levine, A. J. 1981. Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* 1, 101-110.
- Ory, K., Y. Legros, C. Auguin, und T. Soussi. 1994. Analysis of the most representative tumour derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. *EMBO J.* 13: 3496-3504.
- Ouchi T, Monteiro AN, August A, Aaronson SA, Hanafusa H. 1998. BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(5):2302-6.
- Paques F, Leung WY, Haber JE. 1998. Expansions and contractions in a tandem repeat induced by double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 18(4):2045-2054.

- Paques, F. und J. E. Haber. 1997. Two pathways for removal of nonhomologous DNA ends during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17: 6765-6771.
- Patschinsky, T., und Deppert, W. 1990. Phosphorylation of p53 in primary, immortalized, and transformed Balb/c mouse cells. *Oncogene* 5, 1071-1076.
- Pellegata NS, Cajot JF, Stanbridge EJ. 1995. The basic carboxy-terminal domain of human p53 is dispensable for both transcriptional regulation and inhibition of tumor cell growth. *Oncogene*. 11(2):337-49.
- Perrin, A., M. Buckle und B. Dujon. (1993). Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions. *EMBO-Journal*. Vol. 12, No. 7: 2939-2947.
- Petukhova, G., S. Stratton und P. Sung. 1998. Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature*. 393: 91-94.
- Picksley, S. M., Vojtesek, B., Sparks, A., und Lane, D. P. 1994. Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2; fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene* 9, 2523-2529.
- Pierce, A.J., R.D. Johnson, L.H. Thompson, und M. Jasin. 1999. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes & Dev.* 13: 2633-2638.
- Plessis, A., A. Perrin, J. E. Haber und B. Dujon. 1992. Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics*. 130:451-460.
- Plug, A.W., C.A. Clairmont, E. Sapi, T. Ashley, und J.B. Sweasy. 1997. Evidence for a role for DNA polymerase β in mammalian meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1327-1331.
- Pouget JP und Mather SJ. 2001. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur J Nucl Med*. 28(4):541-61.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 111(2):229-33.
- Prasher, D. C. (1995). Using GFP to see the light. *TIG August*. Vol. 11, No. 8: 320-323.
- Preuss, U., Kreutzfeld, R., und Scheidtmann, K.-H. 2000. Tumor-derived p53 mutant C174Y is a gain-of-function mutant which activates the fos promoter and enhances colony formation. *Int. J. Cancer* 88: 162-171.
- Prives, C. 1998. Signaling to p53: Breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell. Bol.* 95:5-8.
- Rees, S., J. Coote, J. Stables, S. Goodson, S. Harris und M. G. Lee. 1996. Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to expression recombinant protein. *BioTechniques*. 20:102-110.
- Richardson, C. und M. Jasin. 2000. Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 20: 9068-9075.
- Richardson, C., M. Moynahan und M. Jasin. 1998. Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes & Development* 12:3831-3317.
- Rijkers, T., J. Van Den Ouweland, B. Morolli, A. G. Rolink, w. M. Baarends, P. P. H. Van Sloun, P. H. M. Lohman und A. Pastink. 1998. Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol Cell. Biol.* 18: 6423-6429.
- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Lane DP, Hay RT. 2000. Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* 20(22):8458-67.
- Roemer, K., und T. Friedmann. 1993. Modulation of cell proliferation and gene expression by a p53-estrogen receptor hybrid protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9252-9256.
- Rotter, V., Wolf, D., Pravtcheva, D., und Ruddle, F. H. 1984. Chromosomal assignment of the murine gene encoding the transformation-related protein p53. *Mol Cell Biol* 4, 383-5.
- Rouet, P., F. Smih und M. Jasin. 1994. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 91:6064-6068.
- Rouet, P., F. Smih und M. Jasin. 1994. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease.. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 15, No. 4:8096-8106.
- Rubnitz, J., und S. Subramani. 1984. The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2253-2258.

- Ryan, J. J., Danish, R., Gottlieb, C. A., und Clarke, M. F. 1993. Cell cycle analysis of p53-induced cell death in murine erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 13, 711-719.
- Ryan, K. M., A. C. Phillips und K. H. Vousden, 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinion in Cell Biology.* 13: 332-337.
- Saintigny, Y., D. Rouillard, B. Chaput, T. Soussi, und B.S. Lopez. 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: 3553-3565.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, und T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Scherer, S.J., S.M. Maier, M. Seifert, R.G. Hanselmann, K.D. Zang, H.K. Müller-Hermelink, P. Angel, C. Welter, und M. Scharthl. 2000. p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV. *J. Biol. Chem.* 275:37469-37473.
- Schwartz, J.L. und K.J. Russell. 1999. The effect of functional inactivation of TP53 by HPV-E6 transformation on the induction of chromosome aberrations by gamma rays in human tumor cells. *Radiat. Res.* 151: 385-390.
- Scully, R., Chen, J., Ochs, R. L., Keegan, K., hoekstra, M., Feunteun, J., und Livingston, D. M. 1997a. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 90, 425-435.
- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., und Livingston, D. M. 1997b. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265-275.
- Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G. P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinman, R., Levine, A. J., und Shenk, T. 1992. Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 89, 12028-12032.
- Shakked, Z., M. Yavnilovitch, A.J. Gilboa, V. Rotter, und T.E. Haran. 2000. DNA binding and exonuclease activity in the murine alternatively-spliced p53 protein: an alternative structure and function? *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Mendel Brno 2000 abstract.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., und 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.
- Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B., und Costa, J. 1992. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 89, 4495-4499.
- Siegel, J., Fritsche, M., Mai, S., Brandner, G., und Hess, R. D. (1995). Enhanced p53 activity and accumulation in response to DNA damage upon DNA transfection. *Oncogene* 11, 1363-1370.
- Skalski V., Z.-Y. Lin, B.Y. Choi, und K.R. Brown. 2000. Substrate specificity of the p53-associated 3'-5' exonuclease. *Oncogene* 19: 3321-3329.
- Slebos, R. J. C. und J. A. Taylor. 2001. A novel host cell reactivation assay to assess homologous recombination capacity in human cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 281, 212-219.
- Smih, F., P. Rouet, R. J. Romanienko und M. Jasin. 1995. Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research.* Vol. 32, No. 24: 5012-5019.
- Smith, M.L., I.-T. Chen, Q. Zhan, P.M. O'Connor, und A.J. Fornace Jr. 1995. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type of DNA damage. *Oncogene* 10: 1053-1059.
- Sonoda E, Takata M, Yamashita YM, Morrison C, Takeda S. 2001. Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(15):8388-8394.
- Soussi, T., de Fromentel, C. C., und May, P. 1990. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5, 945-952.
- Sprung, C. N., G. E. Reynolds, M. Jasin und J. P. Murnane. 1999. Chromosome healing in mouse embryonic stem cells. *Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 96: 6781-6786.
- Steinmeyer, K., und Deppert, W. 1988. DNA binding properties of murine p53. *Oncogene* 3, 501-507.
- Stürzbecher, H. W., Brain, R., Addison, C., Rudge, K., Remm, M., Grimaldi, M., Keenan, E., und Jenkins, J. R. 1992. A C-terminal α -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., und Buchhop, S. 1996. p53 is linked directly to homologous recombination processive RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J.* 15.
- Süsse, S., C. Janz, F. Janus, W. Deppert, und L. Wiesmüller. 2000. Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53. *Oncogene* 19:4500-4512.
- Swagemakers, S. M. A., J. Essers, J. de Wit, J. H. J. Hoeijmakers und R. Kanaar. 1998. The human Rad54 recombinational DNA repair protein is a double-stranded DNA-dependent ATPase. *J. Bio. Chem.* 273: 28292-28297.
- Tan, T. L., J. Essers, E. Citterio, S. M. Swagemakers, J. de Wit, F. E. Benson, J. H. Hoeijmakers und R. Kanaar. 1999. Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Curr. Bio.* 9: 325-328.
- Tang, W., H. Willers, und S.N. Powell. 1999. p53 directly enhances rejoining of DNA double-strand breaks with cohesive ends in γ -irradiated mouse fibroblasts. *Cancer Res.* 59: 2562-2565.
- Thut, C. J., Chen, J.-L., Klemm, R., und Tjian, R. 1995. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 267, 100-104.
- Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509-514.
- Van Dyk, E., A. Z. Stasiak, A. Stasiak und S. C. West. 1999. Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature*. Vol. 368:728-731.
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., und Stillman, B. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA [see comments]. *Nature* 369, 574-8.
- Wagener, C. 1999. Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren. Georg Thieme Verlag Stuttgart. New York.
- Wang XW, Yeh H, Schaeffer L, Roy R, Moncollin V, Egly JM, Wang Z, Freidberg EC, Evans MK, Taffe BG, et al. 1995. p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat. Genet.* 10(2):188-95.
- Wiesmüller, L. 2000. Genetic stabilization by p53 involves growth regulatory and repair pathways. *J. Biomed. Biotech.* 1: 7-10.
- Wiesmüller, L., J. Cammenga, und W.W. Deppert. 1996. *In vivo* assay of p53 function in homologous recombination between Simian Virus 40 chromosomes. *J. Virol.* 70: 737-744.
- Willers, H., E.E. McCarthy, B. Wu, H. Wunsch, W. Tang, D.G. Taghian, F. Xia, und S.N. Powell. 2000. Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G1/S cell cycle checkpoint control. *Oncogene* 19: 632-639.
- Wilson S., N. Warr, D. L. Taylor und F. Z. Watts. 1999. The role of *Schizosaccharomyces pombe* Rad32, the Mre11 homologue, and other DNA damage response proteins in non-homologous end joining and telomere length maintenance. *Nucleic Acids Research*. Vol. 27, No. 13: 2655-2661.
- Wilson, T.E., und M.R. Lieber. 1999. Efficient processing of DNA ends during yeast nonhomologous end joining. *J. Biol. Chem.* 274: 23599-23609.
- Winacker, E.-L- 1985. Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Wold, M.S. 1997. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 61-92.
- Wolkowicz, R., Peled, A., Elkind, N. B., und Rotter, V. 1998. DNA-binding activity of wild-type p53 protein is mediated by the central part of the molecule and controlled by its C terminus. *Cancer Detect Prev* 22, 1-13.
- Xia, S.J., M.A. Shamas, und R.J. Shmookler Reis. 1997. Elevated recombination in immortal human cells is mediated by *HsRAD51* recombinase. *Mol. Cell. Biol.* 17: 7151-7158.
- Yang, T.-t., H. Namba, T. Hara, N. Takamura, Y. Nagayama, S. Fukata, N. Ishikawa, K. Kuma, K. Ito, und S. Yamashita. 1997. p53 induced by ionizing radiation mediates DNA end-joining activity, but not apoptosis of thyroid cells. *Oncogene* 14: 1511-1519.
- Xiao-He Yang X.H., T. L. Sladek, X. L., B. R. Butler, C. J. Froelich, and A. D. Thor. 2001. Reconstitution of Caspase 3 Sensitizes MCF-7 Breast Cancer Cells to Doxorubicin- and Etoposide-induced Apoptosis. *Cancer Res.* 61: 348-354.

- Yarbrough, D., R. M. Wachter, K. Kallio, M. V. Matz und S. J. Remington. (2001). Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 98, No. 2: 462-467.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., und Oren, M. 1991. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-347.
- Zakut-Houri, R., Bienz-Tadmor, B., Givol, D., und Oren, M. 1985. Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *Embo J* 4, 1251-1255.
- Zambetti, G. P., und Levine, A. J. 1993. A comparison of the biological activities of wild-type und mutant p53. *Faseb J* 7, 855-865.
- Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Zhang H, Bi D, Weber BL, El-Deiry WS. 1998. BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene*. 16(13):1713-21.
- Zhou, J., J. Ahn, S.H. Wilson, und C. Prives. 2001. A role for p53 in base excision repair. *EMBO J*. 20: 914-923.
- Zink D., C. Mayr, C. Janz, und L. Wiesmüller. 2001. Association of p53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S-phase. Eingereicht.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μF	Mikro-Farad
A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs	Absorption
AFP	Autofluoreszenz-Protein
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	<i>alternativ reading frame</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated protein</i>
BER	<i>base excision repair</i>
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
C'	Carboxy-Terminus
ca.	circa
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
CBP	CCAAT-Box binding protein
Cdk	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CK1	<i>Casein 1-like kinase</i>
CMV	Cytomegali Virus
CREB	<i>cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein</i>
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PK	dsDNA-aktivierte Protein-Kinase
dNTPs	desoxyNucleotid triphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylen-glykol-bis(2amino-ethylether)-N,N,N',n'-tetraessigsäure
FACS	Fluorescent activated cell sorter
FCS	Fätales Kälberserum

FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Gramm
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTU	<i>Geneticin transfer unit</i>
h	Stunden
HR	homologe Rekombination
Hyg	<i>Hygromycin-Resistenz-Gen</i>
IP	Immunpräzipitation
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
IVS	<i>intervening sequence</i>
KARP-1	Ku86 autoantigen-related protein-1
kBp	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kHR	konservative homologe Rekombination
l	Liter
LB	Laura Bertani Medium
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
m	Milli
M	Molar (mol/l)
mA	Milli Ampere
MDM2	<i>Mouse double minute 2 Gen</i>
min	Minuten
MMR	mismatch repair
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPSV	<i>Myoproliferative-Sarkoma-Virus</i>
mRNA	Boten-RNA
MSH2	MutS-homolog
MSV	<i>Moloney-Mouse-Sarcoma-Virus</i>
N'	Amino-Terminus
NBS	<i>Nijmegen breakage syndrom protein</i>
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
NES	Kern-Exportsignal
NHEJ	nicht-homologe <i>End-Joining</i>
nkHR	nicht-konservative homologe Rekombination
NLS	Kern-Lokalisationssignal
nm	nano Meter
nM	Nano Molar
NP40	Nonident [®] P40
OD	Optische Dichte
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	Phnol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
PCNA	<i>Proliferating cell nuklear antigene</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGS	Protein G Sepharose
PGS	Protein G-Sepharose
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidiumiodid
PI	Propidiumiodit
PML	Promyelozyteres-Leukämie-Protein
Puro	<i>Puromycin-Resistenz-Gen</i>
RFP	red fluorescent protein
RPA	<i>Replikation-Protein A</i>
rpm	Umdrehungen in der Minute
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAP	<i>shrimpf alkaline phosphatase</i>
SCE	<i>sister chromatide exchange</i>
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSA	<i>single strand annealing</i>
SSC	<i>Sideward scatter</i>
ssDNA	Einzelsträngige Desoxyribonucleinsäure
SV40	Simian Virus 40
T	Tymin
Tab.	Tabelle
TAF	TBP-assoziierte Faktoren
TBP	<i>TATA-Box binding protein</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TC	Tissue Culture
TEMED	N, N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
TOPOI	TopoisomeraseI
TOPOII	TopoisomeraseII
ts	Temperatur sensitiv
U	Unit
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WRN	Werner's Syndrom Protein
wt	Wild-Typ
xg	Gravitationskonstante
Xrcc4	<i>X-ray cross complementing 4</i>
z. B.	zum Beispiel
ZK	Zellkultur
Σ	Summe von

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Vergleich der bei der homologen Rekombination involvierten Proteine von Prokaryonten und Eukaryonten.....	3
Tabelle 2:	Pipettierschema für SDS-PAGE Gele.....	53
Tabelle 3:	Konzentrationen von verschiedenen Selektionsagentien für die Zelllinien K562, TK6 und WTK.....	85
Tabelle 4:	Transfektionseffizienzen bei verschiedenen Spannungen.....	86
Tabelle 5:	Bestimmung der Sensitivität am FACScan.....	88
Tabelle 6:	Bestimmung der GTU-Werte für Retroviren-Überstände.....	90
Tabelle 7:	Anteil an grünfluoreszierenden Zellen nach Östradiol-Behandlung.....	102
Tabelle 8:	Rekombinationsraten in transient transfizierten KMV5-Zellen 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Elektroporation mit Rekombinationsplasmiden.....	111
Tabelle 9:	Rekombinationsraten bezogen auf transfizierte Zellen.....	115
Tabelle 10:	Klonierungsstatistik zur Etablierung von Zelllinien mit stabil ins Genom integrierten Rekombinationssubstraten.....	116
Tabelle 11:	Rekombinationsraten in KMV5-Zellen, die mit verschiedenen Rekombinationsvektoren (s. Abb. 57) und <u>pC53-wt₃</u> zur wtp53-Expression oder alternativ mit <u>pBS</u> koelektroporiert wurden.....	124
Tabelle 12:	Rekombinationsraten in K562 (48 h), TK6 und WTK1 (24 h) mit episomal vorliegenden Rekombinationsvektoren.....	126
Tabelle 13:	Rekombinationsraten für chromosomal integrierte Substrate nach I-SceI-Expression.....	128

Tabelle 14:	Rekombinationsraten nach Koelektroporation von KMV5-Zellen mit <u>pBS</u> (-) bzw. <u>pC53-wt₃</u> (wtp53) und <u>p5xtrsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ</u> (<i>Stop-EGFP</i>) bzw. <u>p5xtrsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ</u> (<i>N'-EGFP</i>).....	138
Tabelle 15:	Rekombinationsraten nach Koelektroporation von KMV5 mit den Substraten <u>p5xtrsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ</u> (<i>Stop-EGFP</i>) und <u>p5xtrsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ</u> (<i>N'-EGFP</i>) gemeinsam mit <u>pBS</u> , <u>pC53-wt₃</u> (wtp53) bzw. <u>pC53.4.2N₃</u> [p53(273H)].....	139
Tabelle 16:	Bestimmung der Fluoreszenzanteile nach Koelektroporation der KMV5-Zellen mit den Rekombinationsvektoren, die in der Abb. 68 schematisch dargestellt wurden, gemeinsam mit <u>pBS</u> oder <u>pCMV-I-SceI</u>	140
Tabelle 17:	Mittelwerte und Standardfehler der Rekombinationsraten für ausgewählte Test-Zelllinien nach inonisierender Bestrahlung in Abhängigkeit von der Zeit.....	141
Tabelle 18:	Rekombinationsraten in MHEJ12-Zellen nach Behandlung mit Etoposid für 2 h.....	142

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der p53-Domänen.....	10
Abbildung 2:	Prinzip des neu entwickelten Test-Systems.....	55
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Rekombinationsakzeptoren <i>Δ</i> -, <i>HR</i> - und <i>EJ-EGFP</i>	56
Abbildung 4:	Klonierung der Vektoren <u>EGFP in pGC</u> (A) und <u>I-SceI in pGC</u> (B).....	58
Abbildung 5:	Klonierung der Vektoren <u>wtp53 in pGC</u> und <u>p53(138V) in pGC</u>	58
Abbildung 6:	Übersicht zur klonierung der Vektoren <u>wtp53-IRES-I-SceI in pGC</u> und <u>p53(138V)-IRES-I-SceI in pGC</u>	59
Abbildung 7:	Klonierung des Vektors <u>p5xE</u>	60
Abbildung 8:	Klonierung des Vektors <u>pUC-Puro-Δ</u>	62
Abbildung 9:	Klonierung der Vektoren <u>pCMV-Hyg</u> , <u>p5xEsCMV-Hyg</u> und <u>p5xEsCMV-HygbnPuro-Δ</u>	63
Abbildung 10:	Klonierung der retroviralen Vektoren <u>p5xEsGal4-I-SceI</u> und <u>p5xEsGal4-I-SceI-bPuro-Δ</u>	64
Abbildung 11:	Klonierung des Vektors <u>pCMV-IRES-I-SceI</u>	66
Abbildung 12:	Sequenzielle Herstellung der Vektoren <u>p5xEhSceI-IRES</u> , <u>p5xEhSceI-IRESswtp53Gal4</u> , <u>p5xEhSceI-IRESSp53(138V)Gal4</u> , <u>p5xEhSceI-IRESswtp53Gal4nPuro-Δ</u> und <u>p5xEhSceI-IRESSp53(138V)Gal4nPuro</u>	67
Abbildung 13:	Klonierung der Vektoren <u>p5xEsCMV-HygbnGal4-I-SceI</u> und <u>p5xEsCMV-HygbnGal4-I-SceInPuro-Δ</u>	68
Abbildung 14:	Klonierung der Vektoren <u>pUC-Puro-HR</u> und <u>pUC-Puro-EJ</u>	69
Abbildung 15:	Klonierung der Vektoren <u>p5xEsGal4-I-SceI-bPuro-HR</u> und <u>-EJ</u>	70
Abbildung 16:	Sequenzielle Klonierung der Vektoren <u>pCMV-Δ</u> , <u>pCMV-HR</u> , <u>pCMV-EJ</u> , <u>pUC-Puro-Δhalb</u> , <u>pUC-PuroCMV-Δ</u> , <u>pUC-PuroCMV-HR</u> und <u>pUC-PuroCMV-EJ</u>	72
Abbildung 17:	Klonierung der Rekombinationsvektoren <u>p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ</u> , <u>p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-HR</u> und <u>p5xEsGal4-I-SceIbPuroCMV-EJ</u>	73
Abbildung 18:	Übersicht über die Klonierung der retroviralen Rekombinationsvektoren <u>p5xEsCMV-HygbPuroCMV-Δ</u> , <u>p5xEsCMV-HygbPuroCMV-HR</u> und <u>p5xEsCMV-HygbPuroCMV-EJ</u>	74

Abbildung 19: Klonierung der retroviralen Rekombinationsvektoren <u>p5xwtsGal4I-SceIbPuroCMV-Δ</u> , <u>p5xwtsGal4I-SceIbPuroCMV-HR</u> und <u>p5xwtsGal4I-SceIbPuroCMV-EJ</u> .	75
Abbildung 20: Übersicht über die Klonierung des Vektors <u>p5xtrEGFP</u> .	76
Abbildung 21: Klonierung der retroviralen Rekombinationsvektoren <u>p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-Δ</u> , <u>p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-HR</u> und <u>p5xtrsGal4I-SceIbPuroCMV-EJ</u> .	77
Abbildung 22: Klonierung des Vektors <u>p5xtrsHyg</u> .	78
Abbildung 23: Übersicht über die Klonierung der Vektoren <u>p5xtrsSV40-Hyg</u> und <u>p5x.tr.sSV40-HygBpuroCMV-Δ/HR/EJ</u> .	79
Abbildung 24: Übersicht über die Klonierung des Vektors <u>p5Bpuro-wtEGFP</u> .	80
Abbildung 25: Klonierung der Vektoren <u>p5xwtEGFP</u> und <u>p5nwtEGFP</u> .	81
Abbildung 26: Klonierung der Vektoren <u>pUC-PuroCMV-wtEGFP</u> und <u>p5Bpuro-CMV-wtEGFP</u> .	82
Abbildung 27: Übersicht über die Klonierung der Vektoren <u>p5bPuroCMV-Δ</u> , <u>p5bPuroCMV-HR</u> und <u>p5bPuroCMV-EJ</u> .	83
Abbildung 28: Übersicht über die Klonierung der Vektoren <u>p5xGal4-I-SceI</u> und <u>p5xGal4-I-SceIbPuroCMV-Δ</u> , <u>p5xGal4-I-SceIbPuroCMV-HR</u> und <u>p5xGal4-I-SceIbPuroCMV-EJ</u> .	84
Abbildung 29: FL1-Histogramme zur Verdünnungsreihe.	87
Abbildung 30: FL1-Histogramme zu den elutrierten HL60-Zellen.	89
Abbildung 31: Übersichtsdiagramm zu den elutrierten HL60-Zellen.	89
Abbildung 32: Wester-Blot-Analyse zum Nachweis der stabilen Expression des Transkriptionsfaktors GalERVP.	92
Abbildung 33: FL1-Histogramme zu den verschiedenen Zelllinien.	94
Abbildung 34.: Western-Blot-Analyse zur I-SceI-Verteilung in K562-Zellen.	95
Abbildung 35: Schematische Darstellung der retroviralen Rekombinationsvektoren.	96
Abbildung 36: Western-Blot-Analyse der KMV5-Klone mit stabil integriertem Rekombinationsvektor.	96
Abbildung 37: Western-Blot-Analyse zu den Klonen I-SceI-Δ2, wtp53-Δ9 und p53(138V)-Δ3 nach Kultivierung mit (+) oder ohne (-) Östradiol bei der entsprechenden Temperatur.	98
Abbildung 38: Western-Blot Analyse zur Bestimmung der minimalen Östradiol-Konzentration.	99
Abbildung 39: p53-Expressionsverlauf.	100
Abbildung 40: Übersichtsdiagramm zur zeitlichen EGFP-Akkumulation nach Expression unter der Kontrolle des Gal4- oder CMV-Promotors.	101
Abbildung 41: Vergleich der Fluoreszenzanalyse mittels Histogramm oder Dot-Plot.	103
Abbildung 42: Quantifizierung grünfluoreszierender Zellen im Dot-Plot-Histogramm nach Elektroporation mit dem Rekombinationsvektor <u>p5xEsGal4-I-SceIbPuro-Δ</u> .	105
Abbildung 43: Vergleich der EGFP Expression unter der Kontrolle des 5'-LTRs und des CMV-Promotors 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Elektroporation der Zelllinie-K562 mit den Plasmiden <u>p5xwtEGFP</u> bzw. <u>pEGFP-N1</u> .	106
Abbildung 44: Vergleich der EGFP-Fluoreszenzen unter verschiedenen Transkriptions- und Translationsbedingungen.	108
Abbildung 45: Dot-Plots (FL1 gegen FL2) der KMV5-Zellen nach Elektroporation mit Rekombinationsvektoren.	110
Abbildung 46: Zeitlicher Verlauf der rekombinativen <i>wtEGFP</i> -Rekonstitution nach Östradiol-Gabe in KMV5-Leukämiezellen.	112
Abbildung 47: Dot-Plots (FL1 gegen FL2) zur Elektroporation von KMV5-Zellen mit dem <i>wtEGFP</i> -Donor-Vektoren.	113

Abbildung 48: Rekombinationsraten bezogen auf transfizierte KMV5-Zellen für Δ -, HR- oder EJ-EGFP-Akzeptor und N'-EGFP- (N') oder Stop-EGFP-Donor (Stop) oder ohne Donorsequenz (-).....	116
Abbildung 49: Detektion grünfluoreszierender Zellen in MHEJ12-Zellen nach Transfektion mit <u>pBS</u> oder <u>pCMV-I-SceI</u> im Dot-Plot.....	117
Abbildung 50: Rekombinationsraten in den Klonen MHA, MHHR und MHEJ.....	118
Abbildung 51: Western-Blot-Analyse der Klone MHHR-her5-12 und -13.....	119
Abbildung 52: Vergleich der Rekombinationsraten in MHHR- und MHHR-her-Klonen.....	120
Abbildung 53: Genomische PCR-Analyse der chromosomal integrierten Rekombinations-Substrate....	121
Abbildung 54: Kontrollreaktionen zu den genomischen PCR-Analyse.....	122
Abbildung 55: Schematische Darstellung der in KMV5-Zellen transfizierten Vektoren.....	123
Abbildung 56: Rekombinationsraten in den Zelllinien K562, TK6 und WTK1.....	125
Abbildung 57: Schematische Darstellung der chromosomal integrierten Rekombinationsvektoren <u>p5xtrsSV40-HygbPuroCMV-Δ-HR/-EJ</u>	127
Abbildung 58: Expressionsmuster der Proteine wtp53 und p53(174Y) aus der Ratte in MHA-Zellen und wtp53, p53(143A), p53(175H), p53(248W), p53(273H) und p53(281G) in KMV5-Zellen 72 h nach Elektroporation mit den Expressionsvektoren.....	128
Abbildung 59: Relative Rekombinationsraten in Zelllinien mit chromosomal integrierten Rekombinationsvektoren nach Expression von wtp53 oder p53(138V) bei 30 °C oder 39 °C in Gegenwart von 200 nM Östradiol.....	131
Abbildung 60: Expressionsmuster des transient in KMV5-Zellen eingebrachten wtp53 und p53(138V) nach Elektroporation der Zellen mit <u>wtp53 in pGC</u> und <u>p53(138V) in pGC</u> im Vergleich zu <u>pGC</u> und Induktion der Zellen mit 200 nM Östradiol bei 37 °C für 72h.....	131
Abbildung 61: Relative Rekombinationsraten in KMV5-Zellen.....	132
Abbildung 62: Relative Rekombinationsraten nach Koexpression von I-SceI und wtp53her (wt), p53(138V)her (138V), p53(1-333)her (1-333), p53(1-363)her (1-363) bzw. p53(174Y)her (174Y) in MHA6, MHHR4 und MHEJ12.....	134
Abbildung 63: Expressionsmuster von wtp53her (wt), p53(138V)her (138V), p53(1-333)her (333) und p53(1-363)her (363) in MHHR4-Zellen 72h nach Elektroporation und Kultivierung in 200 nM Östradiol.....	134
Abbildung 64: Vergleich der relativen Rekombinationsraten, die nach Expression von wtp53 und p53(273H) in MHA6-Zellen ermittelt wurden.....	136
Abbildung 65: wtp53- und p53(273H)-Expressionsvergleich nach Transfektion des Klons MHA6 mit unterschiedlichen Mengen an Expressionsplasmide (10 µg, 1 µg, 100 ng, 10 ng und 1ng).....	136
Abbildung 66: Schematische Darstellung der in KMV5-Zellen transfizierten Vektoren, die Rekombination durch <i>wtEGFP</i> -Rekonstitution und durch Verlust des Abstandhalter-Gens <i>RFP</i> anzeigen.....	140
Abbildung 67: Darstellung der Fluoreszenzanteile in KMV5-Zellen als FL1- (FLI) und FL3-Histogramm (FLIII) bzw. als Dot-Plot (FL1 gegen FL3).....	140

8.4 Veröffentlichungen

Patentanmeldung: Teile dieser Arbeit wurden zum Patent angemeldet: Testsystem zur Bestimmung von Genotoxizitäten. Zeitpunkt: 05.03.2001. Aktenzeichen: 101 10 449.9-41. Erfinder: L. Wiesmüller.

Akyüz, N. und L. Wiesmüller. Role of cancer-related p53 mutants in recombination as measured by a novel real-time test system (Abstract). 4-6 April 2001. AEK-Symposium, Heidelberg, Deutschland.

Akyüz, N., G. S. Boehden, C. Janz, S. Süße und L. Wiesmüller. Potential roles of p53 in recombination. 2000. Gene Ther. Mol. Biol. 5:1-17.

Akyüz, N., G. S. Boehden, S. Süsse, U. Preuss, K.-H. Scheidtmann and L. Wiesmüller. DNA substrate dependence of the p53-mediated regulation of double-strand break repair, in Revision.

8.5 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1997 bis Oktober 2001 am Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, in der Abteilung Tumorstudiologie unter der Leitung von Frau Dr. habil. Lisa Wiesmüller angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. habil. Lisa Wiesmüller für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, Überlassung von Arbeitsmaterial, die interessante Themenstellung, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und die fachliche Betreuung.

Bei Herrn Prof. Dr. H.-P. Mühlbach möchte ich mich für seine Bereitschaft, das Dissertationsgutachten zu übernehmen, bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Deppert bedanke ich mich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und den Laborplatz.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Deppert, Frau Dr. K. Will, Frau Dr. C. Stocking, Herrn Prof. Dr. W. Ostertag, Frau U. Preuss, Herrn Prof. Dr. K.-H. Scheidtmann, Herrn Dr. J. Dahm-Daphi, Frau Dipl. Biol. Gisa S. Boehden und Frau Prof. Dr. M. Jasin bedanke ich mich für die Überlassung von Arbeitsmaterial.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung Tumorstudiologie und der Arbeitsgruppe von Frau Dr. habil. Lisa Wiesmüller bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme und die zahlreichen Hilfestellungen.

Bei Gisa und meiner Schwester Aysun möchte ich mich fürs Korrekturlesen bedanken.

Bei meinen Eltern, meinem Bruder Önder und meiner Schwester Aysun bedanke ich mich für die moralische Unterstützung.

Bei Gisa und Maurice möchte ich mich für die Diskussionsbereitschaft und moralische Unterstützung bedanken.

8.6 Lebenslauf

Name:	Nuray Akyüz
Geboren am:	21.11.1971 in Trabzon (Türkei)
1977-1988	Schul Ausbildung in der Türkei
1988-1989	Besuch der Staatlichen Handelsschule mit Wirtschaftsgymnasium am Lämmermarkt, Hamburg (Vorbereitungsklasse)
1989-1990	Studium am Fachbereich Biologie (Lehramt) der technischen Universität Karadeniz, Trabzon, Türkei
1990-1996	Studium am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg Hauptfach: Genetik/Molekularbiologie
1996	Abschluss: Diplom-Biologin
1997-2001	Doktorarbeit am Heinrich-Pette-Institut, Hamburg

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Hamburg, den

.....

Nuray Akyüz