

Analyse der Rolle von DNA-*cis*-Elementen bei der homologen Rekombination

Dissertation

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

vorgelegt von

Gisa Susanne Boehden

Hamburg

2003

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

Tag der Disputation: 27. Juni 2003

Hamburg, den 11. Juni 2003



Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Doppelstrangbruchreparatur.....	2
1.2	Das Tumorsuppressorprotein p53 und seine Rolle bei der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität	5
1.3	Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1).....	10
1.4	Akute Leukämien und krebsrelevante Bruchpunktregionen.....	11
1.4.1	<i>TAL1</i> und <i>LMO2</i>	12
1.4.2	<i>RARα</i>	13
1.4.3	<i>MLL</i>	14
1.5	MARs (<i>matrix attachment regions</i>).....	15
1.6	Repetitive DNA	15
1.7	SV40 (Simian Virus 40).....	16
1.8	Problemstellung.....	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Chemikalien und Biochemikalien.....	21
2.1.2	Sonstige Materialien.....	22
2.1.3	Verbrauchsmaterial.....	22
2.1.4	Geräte	23
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	23
2.1.6	Nährmedien	26
2.1.7	Antikörper.....	27
2.1.7.1	Primärantikörper.....	27
2.1.7.2	Sekundärantikörper.....	28
2.1.8	Nukleinsäuren.....	29
2.1.8.1	Oligonukleotide.....	29
2.1.8.2	DNA	30
2.1.9	Bakterienstämme	33
2.1.10	Viren.....	34
2.1.11	Zelllinien	34
2.2	DNA-Techniken.....	36
2.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	36
2.2.2	Transformation kompetenter Bakterien	36
2.2.3	Einfrieren von Bakterienkulturen.....	36
2.2.4	Isolierung der Plasmid-DNA	37
2.2.5	DNA-Markierung mit [³ H]-Thymidin	37
2.2.6	Präparation episomaler DNA aus eukaryontischen Zellen.....	37
2.2.7	Präparation genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen.....	38
2.2.8	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	38
2.2.9	Ethanolpräzipitation von DNA	38
2.2.10	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	39
2.2.10.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	39
2.2.10.2	Quantifizierung geringer DNA-Mengen.....	39
2.2.11	Sequenzierung von DNA	39

2.2.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
2.2.12.1	Standardprotokoll	40
2.2.12.2	Radioaktive PCR	41
2.2.13	Kinasierung von PCR-Fragmenten	41
2.2.14	Herstellung von glatten DNA-Enden	41
2.2.15	Dephosphorylierung von Vektoren	42
2.2.16	Ligation	42
2.2.17	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	43
2.2.18	DNA-Agarosegelelektrophorese	43
2.2.19	Isolierung von Restriktionsfragmenten und PCR-Produkten	43
2.2.20	Messung des radioaktiven Einbaus in die DNA	43
2.2.20.1	Messung von radioaktiven PCR-Produkten	43
2.2.20.2	Messung von [³ H]-Thymidin-markierter episomaler DNA	44
2.3	Zellkultur-Techniken	44
2.3.1	Erhaltung und Kultur	44
2.3.2	Transfektion nach der Kalziumphosphat-Methode	45
2.3.3	Selektion und Klonierung	45
2.3.4	Generationszeitbestimmung	45
2.4	Proteinbiochemische Techniken	46
2.4.1	Sequentielle Kernfraktionierung	46
2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	46
2.4.3	Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.4.4	SDS-PAGE	47
2.4.5	Coomassie-Blaufärbung	47
2.4.6	Western-Blot-Analyse	47
2.5	Gelretardations-Analyse (<i>electrophoretic mobility shift assay</i> , EMSA)	48
2.6	Virologische Techniken	48
2.6.1	Herstellung von Virenüberständen	48
2.6.2	Konzentrierung von Virenüberständen	49
2.6.3	Infektion von eukaryontischen Zellen	49
2.6.4	Bestimmung der MOI (<i>multiplicity of infection</i>)	49
2.6.5	Indirekte Immunfluoreszenz	50
2.6.6	Rekombinations-Assay	50
2.6.7	Plaque-Assay	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Etablierung eines auf SV40 basierenden Testsystems zur Untersuchung der Rolle von DNA- <i>cis</i> -Elementen bei der homologen Rekombination	53
3.1.1	Notwendige Modifizierung des Systems	54
3.1.1.1	Verkleinerung des SV40-Genoms als Vorbereitung für die Klonierung der <i>Cla</i> - <i>Linker</i>	55
3.1.1.2	Klonierung der <i>Cla</i> - <i>Linker</i>	56
3.1.1.3	Klonierung der <i>Bgl</i> - <i>Linker</i>	60
3.1.2	Auswahl und Klonierung der zu untersuchenden DNA- <i>cis</i> -Elemente	62
3.1.2.1	Fragmente aus BCRs mit ursächlicher Beteiligung an der Entstehung von Leukämien	64
3.1.2.1.1	Klonierung des <i>MLL</i> -BCR-Fragmentes	64
3.1.2.1.2	Klonierung des <i>RARα</i> -BCR-Fragmentes	66
3.1.2.1.3	Klonierung des <i>TAL1</i> -BCR-Fragmentes	67
3.1.2.1.4	Klonierung des <i>LMO2</i> -BCR-Fragmentes	69
3.1.2.2	Klonierung der MAR-Fragmente	70
3.1.2.2.1	Klonierung des <i>IgHE</i> -MAR-Fragmentes	70
3.1.2.2.2	Klonierung des <i>PARP</i> -MAR-Fragmentes	71
3.1.2.3	Klonierung des CTG98-Fragmentes	71
3.1.2.4	Klonierung einer Erkennungssequenz und des mutierten Gegenstücks [RGC und RGCmut (RGC mutiert)]	72

3.1.2.5	Klonierung des SceRS-Fragmentes.....	72
3.1.3	Produktion von rekombinanten Viruspartikeln basierend auf den Konstrukten mit DNA- <i>cis</i> -Elementen.....	73
3.1.4	Analyse der Stabilität der Vireng Genome	75
3.2	Etablierung und Charakterisierung von p53her-Varianten exprimierenden LLC-MK ₂ -Zellen.....	81
3.2.1	Klonierung des Expressionsplasmids pSV53(15A)her	82
3.2.2	Etablierung von Wtp53her- und p53(138V)her-exprimierenden Klonen.....	83
3.2.3	Quantifizierung der p53her-Menge.....	84
3.2.4	Bestimmung der Wachstumseigenschaften der etablierten Klone.....	85
3.2.5	Transkriptionelle Transaktivierung durch p53her und p53(138V)her.....	87
3.3	Analyse des Einflusses von DNA- <i>cis</i> -Elementen auf die homologe Rekombination.....	89
3.3.1	Ermittlung der Rekombinationsfrequenzen in LLC-MK ₂ (neo)/LMV2-Zellen.....	91
3.3.2	Untersuchungen zum Einfluss von DNA- <i>cis</i> -Elementen auf die DNA-Rekombination in Wtp53her- und p53(138V)her-exprimierenden Zellen.....	93
3.3.3	Untersuchungen zum Einfluss von DNA- <i>cis</i> -Elementen auf die homologe Rekombination in Wtp53her- und PARP-1-exprimierenden Zellen.....	95
3.4	Bestimmung der <i>de novo</i> DNA-Synthese der rekombinativen SV40-Viren unter Rekombinations-Assay-Bedingungen.....	98
3.4.1	Untersuchungen mit LLC-MK ₂ -(p53)her-17/LMV2-p53her-K18- und LLC-MK ₂ (neo)/LMV2-Zellen.....	98
3.4.2	Untersuchungen mit LMV2-p53her-K18-, LMV2-PARP-K13- und LMV2-p53herPARP-K11-Zellen.....	100
3.5	Gelretardationsanalysen zur Untersuchung der spezifischen Erkennung von DNA- <i>cis</i> -Elementen durch p53.....	103
3.5.1	Aufreinigung von Wtp53, p53(248P) und p53(273P) und Analyse der aufgereinigten p53-Proteine.....	103
3.5.2	Herstellung der radioaktiven DNA-Fragmente.....	104
3.5.3	Gelretardationsanalysen.....	105
3.5.3.1	Gelretardationsanalyse mit dem RGC-Fragment.....	106
3.5.3.2	Gelretardationsanalyse mit dem CTG98-Fragment.....	107
3.5.3.3	Gelretardationsanalyse mit dem RAR α BCR-Fragment.....	108
3.6	Studien unter Applikation verschiedener Chemotherapeutika.....	110
3.6.1	Untersuchungen mit Etoposid.....	110
3.6.2	Untersuchungen mit Camptothecin.....	113
4	Diskussion	115
4.1	Entwicklung eines auf SV40 basierenden Testsystems zur Untersuchung der Rolle von DNA- <i>cis</i> -Elementen bei der homologen Rekombination und des Einflusses von <i>in trans</i> wirkenden Faktoren.....	115
4.2	Identifizierung von <i>cis</i> -regulatorischen Sequenzen bei der homologen Rekombination.....	119
4.3	Die sequenzunabhängige Inhibition der homologen Rekombination durch p53.....	123
4.4	Die sequenzabhängige Steigerung der homologen Rekombination durch p53.....	125
4.5	Die Rolle von PARP-1 im Zusammenspiel mit p53 bei der homologen Rekombination.....	127
5	Zusammenfassung	131
6	Literaturverzeichnis	134

7	Anhang	147
7.1	Absolute Rekombinationsfrequenzen der in dieser Arbeit eingesetzten Viren in den Wtp53her- und p53(138V)her-Klonen.....	147
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	148
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	151
7.4	Tabellenverzeichnis.....	152
7.5	Nukleotidsequenzen der verwendeten DNA- <i>cis</i> -Elemente.....	153
7.5.1	PCR-Fragmente und ihre Orientierung im SV40-Genom.....	153
7.5.2	Restriktionsfragmente und ihre Orientierung im SV40-Genom.....	154
7.6	Eigene Veröffentlichungen.....	156
7.7	Danksagung.....	157

1 Einleitung

Das Überleben von Organismen hängt entscheidend von der korrekten Übertragung der genetischen Information von einer Zelle zu seinen Tochterzellen ab. Solche zuverlässige Übertragung erfordert nicht nur eine extrem hohe Genauigkeit während der Replikation der DNA und der Chromosomenverteilung, sondern auch das Vermögen, spontan auftauchende oder exogen induzierte Schädigungen der DNA bei gleichzeitiger Minimierung der Zahl von erblichen Mutationen umgehend zu beseitigen. Um diese Fähigkeit zu erwerben, haben Zellen Mechanismen entwickelt, die die Chromosomenstruktur überwachen und die DNA-Reparatur und den Zellzyklus koordinieren (Zhou & Elledge, 2000).

Genetische Instabilität, d.h. die Veränderung einzelner Nukleotide (Punktmutationen) und/oder ganzer Chromosomen (Deletion, Amplifikation, Translokation) kann zur Entwicklung eines Tumors führen, wenn im Verlauf dieses Prozesses Onkogene aktiviert oder Tumorsuppressoren inaktiviert werden (Vogelstein & Kinzler, 1993). Der Entstehung eines Tumors geht die Veränderung tausender von Genen voraus (Loeb & Loeb, 2000), wobei exogene Noxen sowie endogene Suszeptibilitäts-Faktoren eine entscheidende Rolle bei der DNA-Schadensakkumulation und damit der Entstehung von Krebs spielen.

Rekombinationsprozesse stellen, neben anderen Reparaturwegen, wie der Basen-Exzisions-Reparatur (BER), der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und der *mismatch*-Reparatur (MMR), eine der wichtigsten und auf unterschiedlichste DNA-Schädigungen reagierende DNA-Reparatur-Form dar. Sie sind der letztmögliche und unersetzliche Reparaturmechanismus, wenn DNA-Quervernetzungen, DNA-Doppelstrangbrüche oder DNA-Lücken es nicht erlauben, die fehlende Information vom komplementären Strang zu übertragen (Nicolas *et al.*, 1989; Szostak *et al.*, 1983). Darüber hinaus müssen Einzelstrangbrüche oder noch unreparierte Läsionen an der Replikationsgabel, also während der DNA-Synthese in proliferierenden Zellen, ebenfalls rekombinativ beseitigt werden (Haber, 1999; Cox, 2000).

Aus diesen Gründen sind Rekombinationsprozesse essentiell für das Überleben von tierischen Zellen sowie für die Vermeidung von Tumoren in Säugetieren (Lim & Hasty, 1996; Tsuzuki *et al.*, 1996; Thomson & Schild, 2001).

1.1 Die Doppelstrangbruchreparatur

Doppelstrangbrüche, die z.B. zur Initiation von Rekombinationsprozessen zwischen homologen Chromosomen während der Meiose generiert werden und als Intermediate während der entwicklungsbedingten V(D)J-Rekombination auftreten, tragen entscheidend zur genetischen Vielfalt bei. Dagegen stellen die DNA-Doppelstrangbrüche, die z.B. infolge von ionisierender Bestrahlung oder chemotherapeutischen Agenzien, oder auch während der DNA-Replikation an den Replikationsgabeln entstehen, die wohl gefährlichste Form der DNA-Schädigung in der Zelle dar (Khanna & Jackson, 2001; Kowalczykowski, 2000). Unreparierte Doppelstrangbrüche können zum Zelltod (Apoptose), oder falschrepariert zu onkogenen Chromosomenabberationen und Translokationen und damit zur Tumorgenese führen (Hiom, 1999).

Es können zwei Doppelstrangbruch-Reparaturwege unterschieden werden, die von der Hefe bis zum Säuger hoch konserviert sind: Die homologe Rekombination (HR), die ihrerseits vereinfachend in die beiden häufigsten Typen, die Genkonversion und das *single-strand-annealing* (SSA) unterteilt wird (Karran, 2000) und das illegitime oder nicht-homologe *end-joining* (NHEJ). Die Genkonversion stellt dabei einen konservativen homologen Rekombinationsprozess (kHR) dar, die geschädigte Sequenz wird vollständig rekonstituiert. Beim nicht-konservativen SSA gehen dagegen DNA-Abschnitte zwischen den homologen Austausch-Partnern verloren, d.h. sie sind oft Ursache von Deletionen. In Hefen werden Doppelstrangbrüche überwiegend über HR repariert (Paques & Haber, 1997). Dagegen dominiert in Säugern das NHEJ in frühen Stufen des Zellzyklus (vor allem in G₀ und G₁), HR ist ein sehr wichtiger Weg während der S- und G₂-Phase (Johnson & Jasin, 2000). Ebenso muss heute angenommen werden, dass NHEJ und Genkonversion häufig aneinander gekoppelt sind, wodurch es zu einer Minimierung von mutagenen Rearrangements kommt (Richardson & Jasin, 2000).

Die Doppelstrangbruch-Reparatur über kHR stellt einen fehlerfreien Weg dar, für den 100%ige Sequenzhomologien von mindestens 200 bp notwendig sind (Elliott *et al.*, 1998; Rubnitz & Subramani, 1984). Die an HR beteiligten Proteine sind in Hefe charakterisiert worden, in Säugern finden sich die entsprechenden Homologe (s. Tabelle 1.1).

Funktion	<i>E. coli</i>	Hefe	Säugetiere
Einzelstrangbindung	SSB RecA	RPA Rad51	RPA Rad51
Strangaustausch	RecA	Rad51 Rad52 Rad55/57	Rad51 Rad52 Xrcc2 Xrcc3 Rad51B-D
Helikase, Exonuklease	RecBCD	Rad50/Mre11/Xrs2 Rad54 RDH54/TID1	Rad50/Mre11/Nbs1 Rad54 Rad54B
Mediator	nicht essentiell	Rad53 Rad59	Rad53

Tabelle 1.1: Aufstellung der an der homologen Rekombination beteiligten Proteine in *E. coli*, Hefen und Säugern (s. Friedberg *et al.*, 1995; Kanaar, 1998; Lambert *et al.*, 1999; van den Bosch *et al.*, 2002).

Tritt ein Doppelstrangbruch innerhalb der DNA auf, so werden zunächst beiderseits 3'-ssDNA-Überhänge durch exonukleolytischen Abbau der 5'-Enden erzeugt. Hierbei ist wahrscheinlich der Rad50/Mre11/Nbs1(Xrs2)-Komplex beteiligt (Morrison & Takeda, 2000). Das Rad51-Protein stellt die initiale Strangtransferase dar, die zusammen mit RPA, Rad52 Rad54 und Rad54B die Invasion der einzelsträngigen 3'-Enden in einen homologen Sequenzabschnitt, entweder im Schwesterchromatid in der S- bzw. G2-Phase oder auf dem homologen Chromosom in der G1-Phase des Zellzyklus, katalysiert (Clever *et al.*, 1997; Golub *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1996; Petukhova *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 1999; van den Bosch *et al.*, 2002). Xrcc2, Xrcc3 und Rad51B-D kooperieren ebenfalls mit Rad51 bezüglich der Assemblierung der Nukleoproteinfilamente und der Interaktion mit dem geeigneten Rekombinationssubstrat und bilden einen funktionellen Komplex (Sonoda *et al.*, 2001; Jackson, 2002). Zwei Möglichkeiten der weiteren Prozessierung werden diskutiert (Ferguson & Holloman, 1996; Paques *et al.*, 1998). Bei der DNA-Lücken-Reparatur dringen beide einzelsträngigen DNA-Enden in die homologe Duplex ein und die Lücke wird mittels DNA-Synthese aufgefüllt. Die resultierenden *Holliday-junctions* werden nach der Strangwanderung (*branch migration*) mit oder ohne *cross over* getrennt. Bei der von Synthese abhängigen Strangligation dringt dagegen nur ein ssDNA-Ende in die homologe Duplex ein. Dieses wird für die Auffüll-Synthese als *primer* benützt. Nach DNA-Synthese wird der neusynthetisierte Strang mit dem anderen Ende des Doppelstrangbruchs 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* prädominiert (Dronkert *et al.*, 2000). Für weitere Proteine ist die Beteiligung an der kHR nachgewiesen worden. Die

Tumorsuppressoren BRCA1 und BRCA2 scheinen für die Ausübung der kHR notwendig zu sein, wobei BRCA2 direkt an Rad51 bindet und BRCA1 mit Rad51 in größeren Komplexen assoziiert vorliegt (Moynahan *et al.*, 1999; 2001; Scully *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999). Der MMR-Faktor MSH2 kontrolliert die Genauigkeit der kHR, indem er den Austausch zwischen divergierenden Sequenzen während des Strangaustausches inhibiert (Modrich & Lahue, 1996). Schließlich scheint eine zentrale Rolle für p53 bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität durch Vermeidung fehlerhafter kHR immer wahrscheinlicher. Interaktionen zwischen p53 und Rad51, BRCA1 und BRCA2 konnten ebenso nachgewiesen werden (Stürzbecher *et al.*, 1996; Ouchi *et al.*, 1998; Marmorstein *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998) wie eine Erhöhung von Rekombinationsfrequenzen in Zellen mit mutiertem p53 (Mutp53) (Wiesmüller *et al.*, 1996; Bertrand *et al.*, 1997; Mekeel *et al.*, 1997; s. auch 1.2).

Doppelstrangbrüche, die in unmittelbar aufeinander folgenden, gleich orientierten Sequenzen mit einer Homologie von mindestens 60-90 Nukleotiden auftreten, können durch SSA repariert werden (Wilson *et al.*, 1999). Am Doppelstrangbruch werden zunächst die 5'-Enden der DNA (wahrscheinlich durch den Rad50/Mre11/Nbs1-Komplex) exonukleolytisch degradiert, so dass lange einzelsträngige 3'-Überhänge entstehen (Klein, 1995). Die resultierenden komplementären einzelsträngigen DNA-Überhänge werden zu doppelsträngiger DNA hybridisiert, nichthomologe einzelsträngige DNA-Überhänge nukleolytisch entfernt und die Enden ligiert. Dadurch bedingt SSA die Deletion der Zwischensequenzen (Dronkert *et al.*, 2000). In den letzten Jahren wurde zunehmend deutlich, dass Rad52 den initialen Faktor beim SSA darstellt: Rad52 bildet ringförmige Multimere, bindet an die einzelsträngige DNA und vermittelt das *annealing* der komplementären Einzelstränge (van den Bosch *et al.*, 2002).

Beim NHEJ werden DNA-Enden zusammengefügt, die entweder keine oder nur geringe Sequenzhomologien von 1-5 Bp aufweisen. So konnten an bestimmten chromosomalen Bruchpunkten nach Deletionsereignissen Sequenzhomologien von 2-3 Bp zwischen den rearrangierten Sequenzen nachgewiesen werden (Woods-Samuels *et al.*, 1991). Diese Art der Reparatur ist häufig fehlerhaft und Ursache von Deletionen unterschiedlicher Größe (Wilson *et al.*, 1999). Doppelstrangbrüche, die während der V(D)J-Rekombination durch die sequenzspezifische RAG1/RAG2-Nuklease gebildet werden, werden über NHEJ prozessiert, was an strahlensensitiven SCID-(*severe combined immune deficiency*)-Mäusen, deren Immunsystem durch eine gestörte V(D)J-Rekombination weitestgehend ausgeschaltet ist, besonders deutlich wurde (Wagener, 1999). Das heterodimere Ku-Protein, das aus Ku70 und Ku80 besteht und den Initialfaktor des NHEJ repräsentiert, bindet an die freien Enden eines

Doppelstrangbruchs und aktiviert die katalytische Untereinheit (DNA-PK_{KD}) der DNA-abhängigen Proteinkinase DNA-PK. Diese Proteinkomplexe bilden zusammen das DNA-PK-Holoenzym. DNA-PK repräsentiert den primären DNA-Schadenserkennungsfaktor und gehört neben ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia telangiectasia Rad3-related*) zur Familie der PI3-Kinasen, die bei der Signaltransduktion in Zellen nach DNA-Schädigung beteiligt sind (Karran, 2000; Durocher & Jackson, 2001). Da die meisten Doppelstrangbrüche aufgrund nichthomologer Enden nicht direkt religiert werden können, werden sie von einem Komplex aus Rad50/Mre11/Nbs1 und/oder DNA-Polymerasen prozessiert/polymerisiert, was wiederum das Auftreten von Fehlern und Deletionen beim NHEJ erklärt (Jackson, 2002; Haber 1999). Schließlich rekrutiert das DNA-PK-Holoenzym einen Komplex aus Xrcc4 (*X-ray cross complementing 4*) und DNA-Ligase IV und die Enden werden religiert.

1.2 Das Tumorsuppressorprotein p53 und seine Rolle bei der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität

Besonders deutlich wird die Notwendigkeit für die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität zur Vermeidung von Krebs am Beispiel des Tumorsuppressor-Proteins p53, der schon früh als „Wächter des Genoms“ (Lane, 1992) bezeichnet wurde, da man erkannte, dass die funktionelle Inaktivierung von p53 mit der Zunahme von genetischen Instabilitäten, wie Aneuploidien und Genamplifikationen, verbunden ist. So ist in 50-60% der Krebsarten p53 in seiner Wildtyp-Form durch Mutation bzw. Deletion der beiden Allele ausgeschaltet, in weiteren Tumoren führen epigenetische Mechanismen wie Kernausschluss, beschleunigter Abbau oder Komplexierung des Proteins indirekt zur funktionellen Inaktivierung von p53 (Wiesmüller, 2001).

Das p53-Protein wird in drei Domänen unterteilt (s. Abbildung 1.1): Die zentrale, hydrophobe Domäne beherbergt die 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Mummenbrauer *et al.*, 1996) und die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne (El-Deiry *et al.*, 1992; Bargonetti *et al.*, 1993), über die sowohl die p53-Konsensussequenz wie auch die räumliche Faltung (Kim *et al.*, 1997) der DNA erkannt werden. Die meisten der in menschlichen Tumorzellen nachgewiesenen Mutationen finden sich in dieser Domäne (Hollstein *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 1991). Besonders häufig wurden Mutationen an den Aminosäuren 175, 248 und 273 beobachtet (Deppert *et al.*, 1994; Donehower & Bradley, 1993). Über diese Region findet auch die Interaktion mit dem PML (promyelozytäre Leukämie)-Protein statt (s. 1.4.2), der Verlust

desselben führt in der Zelle zur Beeinträchtigung der p53-Stabilisierung und stellt somit einen p53 regulatorisch vorgeschalteten Faktor dar (Ryan *et al.*, 2001). p53 kann über diese Domäne weiter mit dem großen T-Antigen (T-Ag) des Simian Virus 40 (SV40) interagieren, dieser Komplex führte zur Entdeckung des p53-Proteins (Lane & Crawford, 1979).

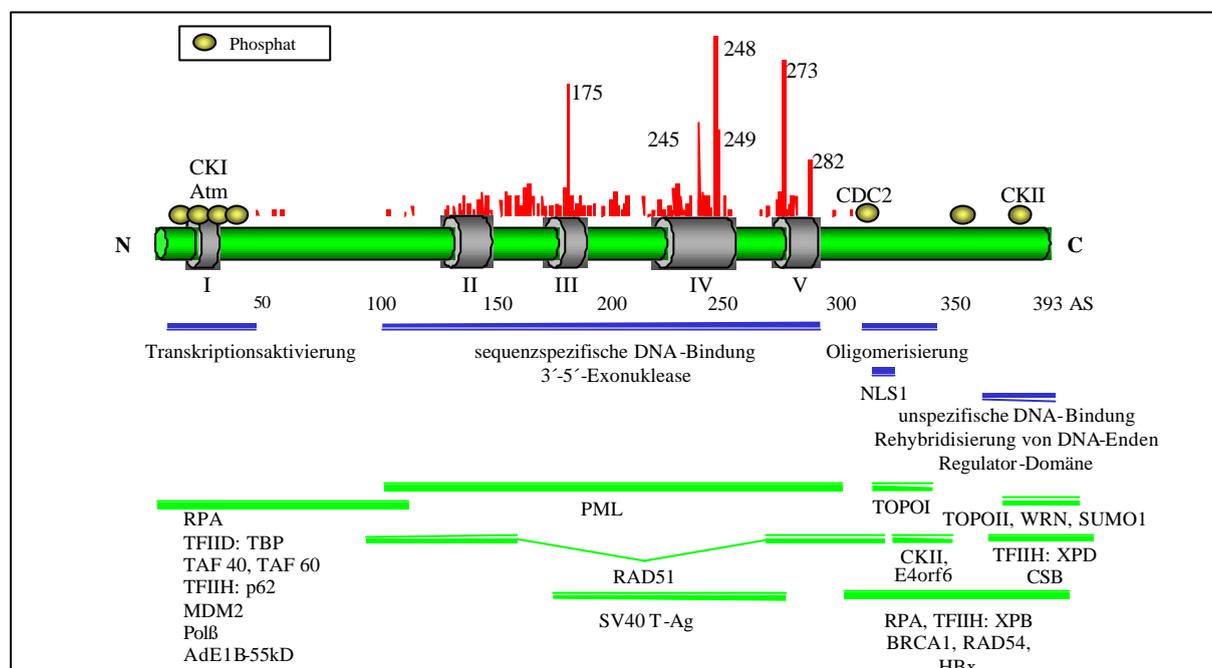


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der p53-Domänen. Die Verteilung der krebsverursachenden Mutationen mit Häufigkeitsprofil und die Phosphorylierungsstellen sind angegeben. Die hoch-konservierten Regionen sind mit den römischen Ziffern I-V gekennzeichnet und in grau hervorgehoben. Funktionelle Domänen sind in blau und Interaktionsregionen mit den angegebenen Proteinen in grün gekennzeichnet. Die roten vertikalen Striche zeigen je nach Höhe die Häufigkeiten von Mutationen an bestimmten Aminosäuren auf (nach Albrechtsen *et al.*, 1999).

Die saure, N-terminale Transaktivator-Domäne erlaubt dem p53-Protein, im Kontext mit der Bindung einer spezifischen DNA-Sequenz, die basale Transkriptionsmaschinerie, wie TFIIH und an TBP-assoziierte Faktoren, zu rekrutieren und somit die Expression bestimmter Gene zu aktivieren (Prives & Hall, 1999). Diese Region ist auch in Interaktionen mit Proteinen involviert, die die Aktivität und Stabilität von p53 regulieren, wie MDM2 (*mouse double minute protein 2*). So vermittelt MDM2 die p53-Degradierung über das Ubiquitin-Proteasomen-System (Wu *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 2000). MDM2 wird selbst durch p53-vermittelte transkriptionelle Transaktivierung exprimiert und blockiert wiederum durch Bindung an den N-Terminus die Transaktivatorfunktion von p53 (Brown *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1993). Diese Wechselwirkung von p53 und MDM2 zeigt den Mechanismus eines negativen *feedback loops*.

Dagegen führt die Bindung von p19^{ARF}, dem Produkt des Tumorsuppressorgens ARF (*open reading frame*), an MDM2 zur Aufhebung der p53-antagonisierenden Wirkung, möglicherweise durch Sequestrierung von MDM2 im Nukleolus (Vogelstein *et al.*, 2000).

In der N-terminalen Domäne finden sich auch zahlreiche Phosphorylierungsstellen: Ser15 und Ser37 werden von ATM, ATR (*A-T-related*) und DNA-PK, Ser6, Ser9 und Thr18 von CK1 (*casein 1-like kinase*), Ser15, Ser20 und Ser37 von ChK1 und ChK2 phosphoryliert (Liang & Clarke, 2001; Jabbur *et al.*, 2000).

Die basische C-terminale Domäne hat vor allem regulatorische Aufgaben (Prives & Hall, 1999). Die Tetramerisierung von p53 ist für kooperative Effekte bei der sequenzspezifischen DNA-Bindung und damit indirekt für die effektive Ausübung der Transaktivatorfunktion essentiell und wird über die Oligomerisierungsdomäne geleistet (Stürzbecher *et al.*, 1992; Prives & Hall, 1999). Die Tetramerisierung wird über Phosphorylierung an Ser392 durch CKII stabilisiert und an Ser315 durch Cdk2/CyklinB und Cdk2/CyklinA destabilisiert (Liang & Clarke, 2001). Die p53-Stabilisierung wird auch durch Acetylierung von Lysinresten am C-Terminus durch Histon-Acetyltransferasen wie p300/CBP und pCAF vermittelt (Ryan *et al.*, 2001). In der C-terminalen Domäne finden sich auch die drei Kernlokalisierungssignale (NLS) und ein Kernexportsignal (NES) (Shaulsky *et al.*, 1990; Liang & Clarke, 2001). Weiterhin ist eine Region vorhanden, die unspezifisch mit DNA und RNA interagiert (Steinmeyer & Deppert, 1988) und DNA-schadenartige Strukturen, wie einzelsträngige DNA-Enden (Bakalkin *et al.*, 1995) bindet und die DNA-Bindungs- und Exonuklease-Aktivität der zentralen Domäne reguliert (Hupp *et al.*, 1993; Janus *et al.*, 1999).

In normalen proliferierenden Zellen liegen jeweils 1000-10000 p53-Moleküle (Oren *et al.*, 1981; Patschinsky & Deppert, 1990) vor. DNA-Schäden infolge von z. B. Bestrahlung mit UV- oder ionisierenden Strahlen oder nach Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen führen zur raschen Akkumulation von p53 durch die oben erwähnten posttranslationalen Modifikationen (Maltzman & Czyzyk, 1984; Nelson & Kastan, 1994), insbesondere durch Phosphorylierung am N-Terminus und Acetylierung am C-Terminus (Lutzker & Levine, 1996; Siegel *et al.*, 1995). Durch diese p53-Stabilisierung wird in der Zelle entweder Zellzyklusarrest oder Apoptose eingeleitet. Der von p53 abhängige 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). Das *p21^{Waf1/Cip1}*-Gen hat als Inhibitor der Zellzyklusstadien-spezifischen Kinasen Cdk2/CyklinE und Cdk2/CyklinA das Potential, den Zellzyklus in G1 anzuhalten (Levine, 1997). *p21^{Waf1/Cip1}* unterbindet die Phosphorylierung des anti-onkogenen Retinoblastom-Proteins (pRb) und damit die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F aus dem inaktivierenden pRB/E2F-Komplex, so dass wichtige Enzyme für die DNA-Synthese, wie z.B. CyklinE, CyklinA und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) nicht bereitgestellt werden können. PCNA ist ein auxiliärer Faktor der

Polymerase δ und kann durch $p21^{Waf1/Cip1}$ komplexiert und damit inaktiviert werden. Dadurch wird zwar die PCNA-abhängige DNA-Replikation inhibiert (Waga *et al.*, 1994), nicht aber die DNA-abhängige Reparatur (Li *et al.*, 1994). Außerdem transaktiviert p53 das Gadd45 (*growth arrest DNA damage 45*)-Protein, für das eine Beteiligung an der BER gezeigt wurde (Kastan *et al.*, 1992).

Neben der prädominierenden Rolle beim G1-Arrest wurde auch die Beteiligung von p53 am S- und G2/M-Arrest beschrieben (Jacks & 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, zum aktiven Zelltod (Apoptose) führen (Clarke *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1993; Shaw *et al.*, 1992). 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 $p21^{Waf1/Cip1}$ -Gens durch p53 eine zentrale Rolle für seine Tumor-Suppressoraktivität spielt, zeigten $p21^{Waf1/Cip1}$ -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. Untersuchungen mit Mäusen nach Behandlung mit Pifitrin α , einem Molekül, das zwar die p53-abhängige Transaktivierung und Apoptose, nicht aber die p53-vermittelte Rekombinationskontrolle inhibiert, lieferten weitere Hinweise, dass neben der transkriptionellen Transaktivierungsaktivität alternative Mechanismen der Tumorsuppression durch p53 wahrscheinlich sind (Deng *et al.*, 1995; Komarov *et al.*, 1999; Willers *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2003).

Während der letzten Jahre wurde zunehmend deutlich, dass p53 über die oben beschriebenen Aktivitäten hinaus auch biochemische Funktionen ausübt, die auf eine aktive Teilnahme bei Replikations- oder Reparatur-Prozessen hindeuten (Wiesmüller, 2001). So kann p53 als Exonuklease DNA-Einzelstränge vom 3' zum 5'-Ende hin abbauen (Janus *et al.*, 1999). Dies deutet darauf hin, dass neben den sequenzunspezifischen DNA-Interaktionen eine Beteiligung von p53 als Kontrollfaktor der Genauigkeit der DNA-Replikation, an der Entfernung von DNA-Regionen während der postreplikativen MMR oder an der Prozessierung von DNA-Enden während der Doppelstrangbruch-Reparatur wahrscheinlich ist (Albrechtsen *et al.*,

1999). Die Assoziation von p53 mit Komponenten von unterschiedlichen Reparaturwegen lieferte Hinweise auf die direkte Beteiligung von p53 bei der DNA-Reparatur. p53 bindet z.B. an die beiden Helikase-Komponenten XBP und XPD des Transkriptionsinitiations-/Reparaturfaktors TFIIH und die Helikase CSB, die an der Kopplung der Transkription und dem NER beteiligt ist. Als weitere Bindungspartner wurden Topoisomerase I und II, die bei Transkription, Replikation, Reparatur und Rekombination mitwirken, das *Werner's syndrome protein* (WRN), eine Helikase und Exonuklease mit genomstabilisierender Wirkung und Ref1 und die Polymerase β mit Funktionen bei der BER identifiziert (Cowell *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002; Albor *et al.*, 1998; Albrechtsen *et al.*, 1999; Wiesmüller, 2001; Blander *et al.*, 1999; Gobert *et al.*, 1999).

Die Beteiligung von p53 an Rekombinationsprozessen wird in zunehmenden Maße aufgeklärt. Einerseits bindet Wildtyp-p53 (Wtp53) unspezifisch an freie DNA-Enden und Basenfehlpaarungen und ist in der Lage, kurze DNA-Einzelstränge wieder zu einem Doppelstrang zu vereinigen (DNA-Rehybridisierung) (Oberosler *et al.*, 1993; Brain & Jenkins 1994), vor allem jedoch wechselwirkt p53 in seiner Wildtyp-Form hochspezifisch mit DNA-Rekombinations-Intermediaten, insbesondere mit Fehlpaarungen in der Heteroduplex und prozessiert diese exonukleolytisch (Süße *et al.*, 2000; Janz *et al.*, 2002). Aus diesen Gründen wird eine Rolle von p53 nicht nur bei der exonukleolytischen Kontrolle während der DNA-Replikation (Huang, 1998; Melle & Nasheuer, 2002), sondern auch bei der Überwachung des NHEJ und/oder Genkonversions-Ereignissen angenommen (Wiesmüller *et al.*, 1996; Bertrand *et al.*, 1997; Mekeel *et al.*, 1997; Dudenhöffer *et al.*, 1998; 1999; Saintigny *et al.*, 1999; Willers *et al.*, 2000; Süße *et al.*, 2000; Janz *et al.*, 2002; Akyüz *et al.*, 2002). Neueste Daten deuten auf eine Kontrolle von p53 in replikationsassoziierten Rekombinationsprozessen hin (Saintigny & Lopez, 2002; Janz & Wiesmüller, 2002). Darüber hinaus wurden Daten zu bestimmten p53-Mutanten erhalten, die Funktionen in Bezug auf die Inhibierung der HR und auf die Induktion des G1-Arrestes in unterschiedlicher Weise ausüben (Dudenhöffer *et al.*, 1999; Saintigny *et al.*, 1999; Willers *et al.*, 2000; Akyüz *et al.*, 2002). Die Interaktion von p53 mit der Strangtransferase Rad51, mit BRCA1, welches den Weg der nichtmutagenen HR fördert und BLM (*Bloom's syndrome protein*), einer antirekombinogenen Helikase, wurde durch Immunpräzipitations- und Kolokalisationsstudien gezeigt (Ouchi *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Stürzbecher *et al.*, 1996; Moynahan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Zink *et al.*, 2002). Schließlich konnte gezeigt werden, dass bei Anwesenheit von p53 nicht nur die HR unterdrückt wird, sondern dass auch das NHEJ inhibiert wurde (Akyüz *et al.*, 2002). Diese und weitere Ergebnisse, welche eine Abhängigkeit des rekombinationsregulierenden Effektes

von Basenfehlpaarungen im Rekombinations-Intermediat zeigten, führten zu der Annahme, dass p53 zusammen mit Rad51 komplementär zum MMR-Faktor MSH2 zur Genauigkeit von Strangaustauschprozessen beiträgt (Dudenhöffer *et al.*, 1998; Süsse *et al.*, 2000; Akyüz *et al.*, 2002). Tatsächlich wurde in konfokalmikroskopischen und biochemischen Studien weiterführend eine Assoziation von p53 und MSH2 in rekombinativen Reparaturkomplexen nachgewiesen (Zink *et al.*, 2002).

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

PARP-1 (oder oftmals einfach als PARP bezeichnet) ist ein nukleäres Protein, das in drei Domänen organisiert ist. Die N-terminale DNA-Bindungsdomäne enthält zwei Zinkfinger- und zwei putative Helix-loop-Helix (HLH)-Motive, die DNA-Brüche erkennen und diese unspezifisch binden können (Uchida *et al.*, 1987; Gradwohl *et al.*, 1990). Sie enthält weiterhin ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und eine Caspase-Schnittstelle, an der es während der Apoptose geschnitten werden kann. Die C-terminale katalytische Domäne enthält eine Nukleotid-Triphosphat (NTP)-Bindungs-Domäne, die die Formation von ADP-Ribose-Polymeren vom NAD⁺ katalysiert. Dazwischen liegt die Automodifikations-Domäne, an die ADP-Ribose-Polymere gebunden werden können (Uchida *et al.*, 1993). PARP-1 bindet sehr schnell und unspezifisch an ssDNA- oder dsDNA-Brüche und katalysiert die kovalente Bindung von Poly(ADP-Ribose)-Ketten an Zielproteine, wie Histone, Topoisomerase I und II, Xrcc1, DNA-PK, p53 und sich selbst (Le Rhun *et al.*, 1998). Die Automodifizierung führt zur Aufhebung der DNA-Bindung und ermöglicht die nachfolgende DNA-Reparatur (Lindahl, *et al.*, 1995). PARP-1 schützt somit wahrscheinlich die DNA-Enden so lange vor exonukleolytischem Abbau, bis die nachfolgenden, an der Reparatur beteiligten Proteine, rekrutiert sind (Le Rhun *et al.*, 1998). PARP-1 ist für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität von äußerster Wichtigkeit, wie die verschiedenen Arten der Zielproteine zeigen. Die Assoziation von PARP-1 mit Xrcc1, einer Komponente des BER-Komplexes, impliziert eine direkte Rolle in diesem Reparaturweg (Masson *et al.*, 1998). Aus PARP^{-/-}-Mäusen stammende Zellen zeigten eine höhere SCE (*sister chromatid exchange*)-Frequenz, chromosomale Abberationen und Verlust oder Zunahme von ganzen Chromosomen und Abnahme der Telomerlänge (Tong *et al.*, 2001b). Besonders interessant sind Untersuchungen mithilfe von Mausmodellen in Bezug auf eine Verbindung zwischen p53 und PARP-1. PARP-1^{+/+}p53^{-/-}-Mäuse zeigten nach Tumorzellinjektion ein geringeres Tumorwachstum als PARP-1^{-/-}p53^{-/-}-Mäuse, was den Schluss nahe legt, dass PARP-1 als Kofaktor bei der Unterdrückung der

Tumorentstehung über seine Rolle bei der Stabilisierung des Genoms und/oder Interaktionen mit anderen Molekülen, die DNA-Brüche erkennen können, wirkt (Bürkle *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2001b). Kontroverserweise beobachteten Conde und Mitarbeiter eine Verlangsamung der Tumorgenese in PARP-1^{-/-}p53^{-/-}- versus PARP-1^{+/+}p53^{-/-}-Mäusen (Conde *et al.*, 2001).

Dass PARP-1 über DNA-PK an der V(D)J-Rekombination beteiligt ist, wurde aus den Ergebnissen von Ko-Immünpräzipitations-Versuchen aus nukleären Extrakten und Kompetitionsstudien von DNA-PK und PARP-1 um die Bindung von DNA-Enden nahegelegt (Morrison *et al.*, 1997). Neben diesen protektiven Funktionen kann eine PARP-1-Überaktivität zur Apoptose und Nekrose führen. So konnte gezeigt werden, dass PARP-1 ein Mediator der Apoptose z.B. nach Entzündungsprozessen ist, indem es die Translokation des Apoptose induzierenden Faktors (AIF) von den Mitochondrien zum Zellkern induziert (Yu *et al.*, 2002).

1.4 Akute Leukämien und krebsrelevante Bruchpunktregionen

Leukämie ist ein Sammelbegriff für Erkrankungen, die durch maligne Transformation hämatopoetischer oder lymphatischer Zellen entstehen. Die Einteilung erfolgt nach den verschiedenen Eigenschaften der atypischen Zellen (myelisch-lymphatisch; reifzellig-unreifzellig) und dem klinischen Verlauf (akut bzw. chronisch). Die akute Leukämie wird eingeteilt in die akute lymphatische (lymphoblastische) Leukämie (ALL) und die akute (pro-)myeloische Leukämie (A(P)ML). Die ALL ist die häufigste Leukämie des Kindesalters und macht etwa 20% der akuten Leukämien des mittleren Erwachsenenalters aus. Die AML macht ca. 80% der akuten Leukämien im Erwachsenenalter aus (Hexal Lexikon Onkologie, 1996). Charakteristisch für Leukämien ist das Auftreten von nichtvererbten somatischen Mutationen wie Translokationen, Deletionen und Insertionen in den betroffenen Zellen (Rabbits, 1994). In den meisten Fällen werden Sequenzen eines Transkriptionsfaktors oder Teile von Rezeptortyrosinkinasen mit normalerweise nicht verwandten Genen fusioniert und resultieren in einem Hybridgen mit onkogenen Eigenschaften. Ein weiterer Mechanismus durch den Translokationen Malignität auslösen, ist die Repositionierung von Transkriptionsfaktoren in die Nähe von hochaktiven Promotor-/*enhancer*-Elementen, wie sie bei Immunglobulin- oder T-Zell-Rezeptorgenen vorkommen, die normalerweise nur während der B- und T-Zelldifferenzierung rearrangiert werden (Vogelstein & Kinzler, 2002).

Im Folgenden werden einige der Gene, die bei Leukämien rearrangiert sind und in dieser Arbeit bezüglich der *cis*-Wirkung auf die Rekombination hin untersucht wurden, vorgestellt.

1.4.1 *TAL1* und *LMO2*

TAL1 steht für *T-cell acute leukemia 1*, daneben existieren noch die Bezeichnungen *SCL* für *stem cell leukemia* und *TCL5* für *T-cell leukemia 5*. *LMO2* (*LIM-domain only 2*) wird außerdem als *RBTN2* bzw. *RHOM2* (*rhombotin-2*), *RBTN1* (*rhombotin-like-1*) und *TTG2* (*T-cell translocation gene 2*) bezeichnet (Begley *et al.*, 1989; Finger *et al.*, 1989; Royer-Pokora *et al.*, 1991; Boehm *et al.*, 1991).

Veränderungen des *TAL1*-Gens werden bei Patienten mit akuter T-ALL beobachtet, in ca. 25% der Fälle handelt es sich um eine 90 kb große Deletion stromaufwärts des *TAL1*-Locus, bei ca. 3% findet sich die Translokation t(1;14), durch die das *TAL1*-Gen von seiner normalen Position auf Chromosom 1 in das T-Zell-Rezeptor α/β ($TCR\alpha/\beta$)-Gen auf Chromosom 14 transloziert wird (Chen *et al.*, 1990; Breit *et al.*, 1994). Das *TAL1*-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit HLH-Motiv und basischer DNA-Bindungsdomäne (bHLH), wird nur in myeloiden und erythroiden, nicht aber in T-Zellen exprimiert (Begley, *et al.*, 1989; Aplan *et al.*, 1992) und scheint ein essentieller Regulator der hämatopoetischen Entwicklung in sehr frühen Stadien zu sein (Porcher *et al.*, 1996). Das *TAL1*-Protein kann mit dem E2A-Transkriptionsfaktor und *LMO2* (s.u.) dimerisieren, seine aberante Expression in T-Zellen mit t(1;14)-Translokation oder Deletionen könnte spezifische Zielgene, die in T-Zellen normalerweise ausgeschaltet sind, aktivieren. Es ist auch möglich, dass *TAL1* die Funktion des E2A-Transkriptionsfaktors im Verlauf der T-Zelldifferenzierung blockiert, da E2A/*TAL1*-Heterodimere als transkriptionelle Transaktivatoren inaktiv sind (Look, 1997; Vogelstein & Kinzler, 2002).

Die t(11;14)-Translokation zwischen dem *LMO2*-Gen und dem $TCR\alpha/\delta$ -Lokus findet sich in 10-20% aller Fälle von T-ALL des Kindes (Williams *et al.*, 1984; Lampert *et al.*, 1988; Raimondi *et al.*, 1988). Das *LMO2*-Gen kodiert für ein Protein, das ein LIM-Motiv und ein zinkfinger-ähnliches Transkriptionsfaktor-Strukturmotiv (Sanchez-Garcia & Rabbits, 1994), aber keine DNA-Bindungsdomäne aufweist. Die LIM-Domäne von *LMO2* assoziiert mit der HLH-Domäne des *TAL1*-Proteins. Somit steht die Dysregulation von *TAL1* und *LMO2* in einem funktionellen Zusammenhang. *LMO2* spielt, wie *TAL1*, eine entscheidende Rolle bei der Hämatopoese und Embryogenese (Warren *et al.*, 1994; Yamada *et al.*, 1998). Bei *TAL1*^{-/-} *LMO2*^{-/-}-Knockout-Mäusen findet keine normale Erythropoese statt, die Tiere sterben daher in der Embryonalphase an einer Anämie. Diese Befunde sprechen dafür, dass das *TAL1*-*LMO2*-Heterodimer bei T-ALL Gene aktiviert, die für den unreifen Phänotyp der Tumorzellen verantwortlich sind (Wagener, 1999).

Es finden sich sowohl beim *TAL1*- als auch beim *LMO2*-Gen Erkennungssequenzen (sog. Heptamer-/Nonamer-Sequenzen) für die V(D)J-Rekombinase in den Proto-Onkogenen, so dass illegitime V(D)J-Rekombination als ein Mechanismus der Translokation angenommen wird (Boehm *et al.*, 1989; Marculescu *et al.*, 2002)

1.4.2 *RAR α*

RAR α wird auch als *RARA* bezeichnet, beides ist die Abkürzung für *retinoic acid receptor alpha*.

Bei etwa 98% aller APL-Fälle tritt die Translokation t(15;17) auf, bei der das *PML* (promyelozytäre Leukämie)-Gen und das *RAR α* -Gen involviert sind und resultiert in der Expression der Hybridgene *PML-RAR α* und *RAR α -PML* (de Thé *et al.*, 1990; 1991). Der Block in der myeloiden Differenzierung, mit der die APL assoziiert ist, resultiert wahrscheinlich aus der kombinierten Störung beider Protein-Aktivitäten (Melnick & Licht, 1999).

Die Retinsäureisomere 13-*cis*-Retinsäure und all-*trans*-Retinsäure üben einen grundlegenden Einfluss auf Prozesse der Morphogenese und Differenzierung aus. So kann z.B. Retinsäure das gesamte morphogenetische Programm der Extremitätenentwicklung von Vertebraten initiieren (Petkovich *et al.*, 1987). Die Wirkung der Retinsäure wird über die Retinsäurerezeptoren (RAR) α , β und γ vermittelt, die zur Familie der Steroid-Schilddrüsenhormonrezeptoren gehören. Nach Komplexierung über eine entsprechende Domäne und die nachfolgende Assoziation der Komplexe mit Retinsäure-Antwortelementen der DNA, den sogenannten *retinoic acid response elements* (RAREs) über eine separate Region mit Zinkfinger-Motiv, aktivieren die Rezeptoren die Transkription entsprechender Gene (Wagener, 1999). Dagegen wirkt das PML-Protein als negativer Wachstumsregulator, der in der Lage ist, einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus, Seneszenz und Apoptose auszulösen (Strudwick & Borden, 2002). PML wird ubiquitär in allen normalen Zellen von Säugern exprimiert und formiert mit anderen Proteinen Komplexe, die sogenannten PML-NBs (*PML nuclear bodies*) oder PODs (*PML oncogenic domains*). In APL sind diese Strukturen aufgelöst und die Behandlung von APL-Patienten mit all-*trans*-Retinsäure (ATRA) führt zur Remission der Krankheit und Reformierung der PODs (Melnick & Licht, 1999).

1.4.3 MLL

MLL (*myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia*) wird auch als *ALL1*, *HRX* und *Htrx* (*human trithorax*) bezeichnet (Ziemin-van der Poel *et al.*, 1991; Tkachuk *et al.*, 1992; Djabali *et al.*, 1992; Butler *et al.*, 1997).

Eine außergewöhnlich diverse Gruppe von chromosomalen Translokationen, Deletionen und Inversionen betrifft das Chromosom 11 (11q23). In Kontrast zu den anderen Rearrangements finden sich diese Veränderungen sowohl in lymphoiden als auch myeloiden Leukämien (7-10% in ALL-Patienten, 5-6% in AML) und zu einem hohen Prozentsatz in den sogenannten gemischtlinigen Leukämien, deren Tumorzellen Marker verschiedener Linien exprimieren (Vogelstein & Kinzler, 2002). Diese Veränderungen betreffen häufig das *MLL*-Gen und führen zur Expression verschiedener Fusionsproteine mit *MLL*-Sequenzen und unterschiedlichen Fusionspartnern. Mittlerweile sind über 30 verschiedene Hybridgene bekannt (Reichel *et al.*, 1998). Das *MLL*-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der in verschiedene Domänen unterteilt werden kann. N-terminal befinden sich *AT-hook*-Motive, in Richtung C-Terminus folgen eine Region mit Homologie zu DNA-Methyltransferasen, eine Zinkfinger-Domäne und eine Domäne mit Homologie zum Trithorax-Protein von *Drosophila* (Tkachuk *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1992; Jones & Gelbart, 1993; Yu *et al.*, 1995). Ferner wurden zwei Regionen identifiziert, die die Transkription regulieren. Eine Repressordomäne überlappt mit der Methyltransferasedomäne, eine Aktivierungsdomäne schließt C-terminal der Zinkfinger-Domäne an. *AT-hooks* sind Sequenzmotive, die die sequenzunabhängige Bindung von Proteinen an die kleine Furche der DNA vermitteln und wohl eine Rolle beim Aufbau der Chromatinstruktur spielen (Reeves & Nissen, 1990). Methyltransferasen beeinflussen über eine Methylierung von CpG-Dinukleotiden der DNA die Genexpression und gewährleisten die Beibehaltung des Methylierungsmusters in den Genomen somatischer Zellen nach der DNA-Replikation (Vogelstein & Kinzler, 2002; Wagener, 1999). *Trithorax* von *Drosophila* reguliert die Wirkung eines weiten Spektrums von *Homeobox* (*Hox*)-Genen in den *Antennapedia*- und *Bithorax*-Komplexen und ist notwendig innerhalb der gesamten Embryogenese für die normale Entwicklung des Kopfes, des Thorax und des Abdomens (Mazo *et al.*, 1990). *MLL* wird während der Embryogenese exprimiert und wirkt als positiver Regulator der *Hox*-Gene (Benjamin *et al.*, 1998). Untersuchungen zeigten, dass in Mäusen der Verlust beider *MLL*-Allele letal ist, *MLL*^{+/-}-Mäuse zeigten Störungen der Hämatopoese wie z.B. Anämie und Thrombopenie (Yu *et al.*, 1995).

Die Translokationspunkte innerhalb des 92 kb großen *MLL*-Gens treten ausschließlich in einer 8,3 kb großen Region auf und vereinigen *MLL*-Sequenzen mit Genen vieler

verschiedener Chromosomen und formieren Fusionsgene (Gu *et al.*, 1992). Die resultierenden Fusionsproteine enthalten immer die N-terminalen *AT-hooks* und die Methyltransferasedomäne. Dies legt den Schluss nahe, dass die N-terminale Domäne des MLL-Proteins die entscheidende pathogenetische Rolle spielt (Wagener, 1999).

Ein besonders interessanter Aspekt der Translokationen, in die *MLL* involviert ist, betrifft die Generierung sekundärer Leukämien nach Chemotherapie. Bei 85% der Patienten, die nach Chemotherapie mit Topoisomerase II-Inhibitoren, wie Etoposid, eine sekundäre Leukämie entwickeln, finden sich Translokationen, die die Chromosomenregion 11q23 betreffen. *MLL* ist somit ein *hot spot* für chromosomale Rearrangements nach Behandlung mit Epipodophyllotoxinen wie Etoposid (Pui *et al.*, 1989).

1.5 MARs (matrix attachment regions)

MARs (*matrix attachment regions*) oder auch SARs (*scaffold attachment regions*) repräsentieren 600-3000 bp lange, meist AT-reiche DNA-Sequenzen, die die Anheftungspunkte der Chromatinschleifen an die nukleäre Matrix, also das Proteinrückgrat der Chromosomen, darstellen. Sie definieren die Grenzen zwischen verschiedenen Chromatindomänen, die jeweils ein Gen oder Segment eines Gens oder eine Gruppe verwandter Gene beherbergen (Boulikas, 1995). Sie kommen sowohl in Introns als auch an 5'- und 3'-Seiten von Genen (Hancock & Boulikas, 1982) vor und üben wahrscheinlich neben ihrer angenommenen Rolle in der Zellkernarchitektur Aufgaben in den verschiedensten Prozessen aus: Sie rekrutieren Proteine, die Funktionen in der Transkription, Replikation, Reparatur und Rekombination und Tumorgenese ausüben (Boulikas, 1995). Sie können z.B. als transkriptionelle *enhancer* wirken und sie finden sich in DNA-Replikationsursprüngen vieler Gene. Darüber hinaus konnten DNA-Bindungsstudien zeigen, dass MARs spezifisch von Mutp53 gebunden werden, wenn diese über sogenannte *DNA-unwinding*-Elemente verfügen, die für strukturelle Veränderungen im Chromatin verantwortlich sind und ein regionales *base-unpairing* fördern (Will *et al.*, 1998b). Neueste Untersuchungen zeigten, dass in normalen Zellen auch Wtp53 an die nukleäre Matrix bindet (Jiang *et al.*, 2001).

1.6 Repetitive DNA

Repetitive DNA-Sequenzen sind in allen eukaryontischen Genomen vorhanden. Es werden zwei Klassen von Tandem-Wiederholungs-Sequenzen unterschieden, die Mikrosatelliten, die

aus 10-50 Kopien von relativ einfachen Sequenzwiederholungen bestehen und pro Einheit unter 10 bp groß sind und die Minisatelliten, die aus Kopien von DNA-Abschnitten aus 10-100 bp, die im Genom verstreut sind, aber gehäuft im subtelomeren Bereich vorkommen, bestehen (Richard & Paques, 2000). Repetitive DNA-Sequenzen besitzen eine intrinsische Instabilität in allen Genomen (Mikrosatelliteninstabilität, MSI), die als eine z.T. erhebliche Veränderung in der Länge durch Expansionen oder Deletionen der repetitiven Einheiten verursacht werden (Charlesworth *et al.*, 1994) und häufig die Ursache von Krankheiten bis hin zu Krebs sind (Sutherland & Richards, 1995). Eine wachsende Anzahl von neurologischen Funktionsstörungen resultiert aus der Expansion einer Klasse von besonderen Mikrosatelliten, den Trinukleotid-*repeats* (TNR), wie z.B. Chorea Huntington (*Huntington disease*, HD), Fragiles X Syndrom (FRAXA), Friedreich Ataxia (FRDA) und Myotonische Dystrophie (MD) (zur Übersicht siehe Usdin & Grabczyk, 2000). So sind Veränderungen in den langen Folgen von sich wiederholenden CTG-CAG-Sequenzen verantwortlich für MD. Normale Individuen haben 5-37 Wiederholungen dieser Basenfolge im *MD-Kinase*-Gen, wogegen nach Expansion 50-3000 Wiederholungen vorliegen können. Früher wurde v.a. angenommen, dass replikative Mechanismen die Ursache für diese Instabilitäten sind (McMurray, 1999). Neuere Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass die homologe Rekombination, vor allem Genkonversion, die Ursache von expandierenden TNR sein könnten (Richard & Paques, 2000; Pluciennik *et al.*, 2002).

Jüngste Untersuchungen zeigten zum ersten Mal die Promotor-Induktion durch eine direkte Bindung eines Transkriptionsfaktors an einen Mikrosatelliten-*repeat*. Apoptoseinduzierende p53-Varianten binden einen polymorphen, d.h. bei verschiedenen Individuen mit unterschiedlicher *repeat*-Zahl auftretenden Mikrosatelliten im Promotor des *PIG3*-Gens, eines an der Apoptose beteiligten Faktors. Dieser Mikrosatellit stellt außerdem das erste p53-responsible Element dar, das polymorph ist und könnte somit bei Vererbung die Krebs susceptibility beeinflussen (Contente *et al.*, 2001; Polyak *et al.*, 1997).

1.7 SV40 (Simian Virus 40)

Für die Untersuchung der Rolle von p53 bei DNA-Austausch-Mechanismen erwies sich ein auf SV40-Viren basierendes Testsystem als sehr erfolgreich, das die Quantifizierung von homologen Rekombinationfrequenzen in eukaryontischen Zellen ermöglicht (Wiesmüller *et al.*, 1996).

Das Simian Virus 40 (SV40) wurde 1960 als Verunreinigung von Polio-Vakzinen entdeckt, die mit Zellen des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) produziert worden waren. Da das Virus in den Zellen des natürlichen Wirts persistiert und keine Symptome einer akuten Infektion aufweist, wurde es erst entdeckt, als es auf Nierenzellen der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiopsis*) übertragen wurde, die einen produktiven Infektionsverlauf aufzeigten, also permissiv waren (Sweet & Hillemann, 1960).

SV40 ist ein DNA-Doppelstrangvirus und gehört zur Gruppe der Polyomaviren, einer Familie der Papovaviren. Die isokaedrische Nukleoproteinstruktur von ca. 45 nm Durchmesser setzt sich aus den drei Hüllproteinen VP1, VP2 und VP3 zusammen, in dessen Innern sich das 5243 bp lange, doppelsträngige Virusgenom befindet (Fiers *et al.*, 1978, Liddington *et al.*, 1991). Die DNA liegt in geschlossener, zirkulärer Form vor und bildet mit Histonen der Wirtszelle 24 Nukleosomen aus. Dieses SV40-„Minichromosom“ ist demnach vergleichbar mit der Grundstruktur des zellulären Chromatins. Das Genom unterteilt sich in die frühe und späte Region proteinkodierender Sequenzen (sog. frühe und späte Gene), die von einer Kontrollregion ausgehend in entgegengesetzter Richtung angeordnet sind. Diese Kontrollregion beinhaltet die Promotoren für die frühen und späten Gene sowie Regulatoren der Genexpression und den DNA-Replikationsursprung, der auch als *origin* oder kurz *Ori* bezeichnet wird (s. Abbildung 1.2).

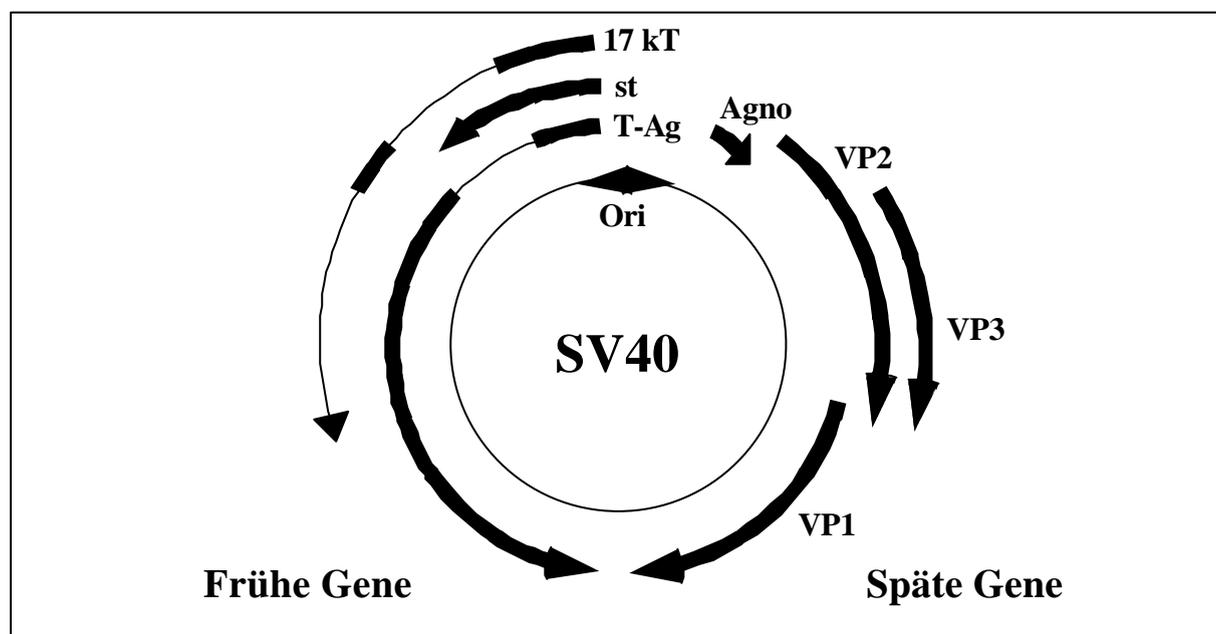


Abbildung 1.2: Die SV40-Genomstruktur. Die proteinkodierenden Bereiche sind durch Pfeile dargestellt. Die SV40-Tumorantigene werden von den frühen Genen kodiert: Das große Tumorantigen (*T-Ag*), das kleine Tumorantigen (*st*) und das 17 kDa Tumorantigen (*17 kT*) sind alternative Spleißprodukte der frühen kodierenden Region des SV40-Genoms. Die späte Region ist durch den DNA-Replikationsursprung (*Ori*) von der frühen getrennt und kodiert für das Agnoprotein (*Agno*) und die drei Hüllproteine VP1, VP2 und VP3.

Zur Replikation der viralen DNA benötigt das Virus zelluläre Faktoren, so dass im ersten Schritt der produktiven Infektion die Zellen durch Expression der frühen viralen Gene in die S-Phase geführt werden und die DNA-Synthese aktiviert wird. Im Gegensatz zur zellulären DNA-Synthese kommt es bei der viralen DNA-Replikation zu mehreren Replikationsrunden innerhalb eines Zellzyklus (Endoreplikation). Daran schließt sich die späte Phase der Genexpression an, die zur Synthese der Hüllproteine führt (Wiley *et al.*, 1993; Zuo *et al.*, 1997). Die SV40-„Minichromosomen“ werden in die aus Hüllproteinen zusammengesetzten Kapside verpackt (*self assembly*) und durch Lyse der Wirtszellen freigesetzt.

Die frühe Region von SV40 kodiert für drei sogenannte Tumorantigene, die durch alternatives Spleißen aus einem gemeinsamen Primärtranskript entstehen. Sie werden nach ihrer Größe als großes (*T-Ag*), kleines (*st* oder *t-Ag*) und 17 kDa-Tumorantigen (*17 kT*) bezeichnet. Die Bezeichnung Tumorantigene trägt der Fähigkeit des SV40-Virus Rechnung, nicht-permissive Säuger-Zellen zu transformieren (Sullivan & Pipas 2002).

Das große Tumorantigen T-Ag enthält ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), mithilfe dessen es nach seiner Synthese im Zytoplasma in den Zellkern transportiert wird, wo es für die virale DNA-Replikation benötigt wird (Kalderon *et al.*, 1984). Es ist ein multifunktionales Protein, es aktiviert eine Reihe von zellulären Genen, die unter anderem direkt an der DNA-Replikation beteiligt sind (Postel, 1976) und reguliert den frühen und späten SV40-Promotor. Das T-Ag bindet als Doppel-Hexamer an den *Ori* durch eine spezifische DNA-Bindungsdomäne und direkt an die DNA-Polymerase α , DNA-Primase und Topoisomerase und rekrutiert damit den zellulären Replikationsapparat zum *Ori* und initiiert so die DNA-Replikation (Dean *et al.*, 1992). Jedes Hexamer fungiert dabei als DNA-Helikase (Sáenz-Robles *et al.*, 2001). Das TAg interagiert mit einer Reihe zellulärer Proteine, wie z.B. den Mitgliedern der Retinoblastom-Familie (pRb, p107 und p130) und p53. Eine Funktion der Rb-Familie ist die negative Regulation des Transkriptionsfaktors E2F. Die Freilassung von E2F aus der Rb-vermittelten Kontrolle durch die Bindung an T-Ag resultiert u.a. in der Expression von für die S-Phase spezifischen Genen, wie z.B. Cyklin E und A, Cdc2 und Cdk2 und treibt die Zellen in den Zyklus (Dyson, 1998; Sáenz-Robles *et al.*, 2001). Die Bindung von T-Ag an p53 schaltet dessen transkriptionelle Transaktivatorfunktion (Segawa *et al.*, 1993), sowie die Fähigkeit zur Rekombinationsinhibition (Wiesmüller *et al.*, 1996) aus.

Das *st* wird in SV40-infizierten und auch -transformierten Zellen exprimiert und befindet sich dabei sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Untersuchungen an *st*-defizienten (*st*⁻) Virusmutanten haben gezeigt, dass es für die produktive SV40-Infektion nicht erforderlich ist (Cicala *et al.*, 1994), wohl aber eine Helferfunktion ausübt.

Das 17 kT-Tumorantigen ist für die virale SV40-Vermehrung in Zellkultursystemen nicht essentiell, erhöht aber unter nicht-optimalen Infektionsbedingungen die Rate. Neuere Untersuchungen weisen das 17 kT-Tumorantigen als Transaktivator der frühen SV40-Gene aus (Scheidig, 1998).

Die späten Gene des SV40-Genoms kodieren für das Hauptkapsidprotein VP1, die für die geordnete Assemblierung des Kapsids nötigen Proteine VP2 und VP3 und für das Agnoprotein. Letzteres spielt wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle bei der Assemblierung oder beim Austritt des Virus aus infizierten Zellen (Sáenz-Robles *et al.*, 2001).

1.8 Problemstellung

Neben der zunehmenden Bedeutung, welche die Rekombination durch die Entdeckung von Krebs susceptibility-Genen erlangte, deuten auch die in Tumorzellen meist beobachteten chromosomalen Veränderungen und hyperrekombinativen Phänotypen auf eine fundamentale Stellung bei der Krebsentstehung hin.

Es ist immer noch schwierig und zeitaufwendig, genetische Alterationen quantitativ durch zytogenetische Untersuchungen zu erfassen. Darüber hinaus können Deletionen oder kleine Rearrangements oftmals durch diese Methoden nicht detektiert werden. Um die Rolle von auf die Genominstabilität in *cis* wirkende Mechanismen aufzuklären, sollten in dieser Arbeit chromosomale Loci, auf ihr intrinsisches Potential, an schädlichen Rekombinationsereignissen teilzuhaben, vergleichend untersucht werden.

Zu diesem Zweck sollten eine Reihe von krankheitsassoziierten Fragmenten mit unterschiedlichen Substratstrukturen in das auf SV40-Viren basierende Testsystem (Wiesmüller *et al.*, 1996) eingeführt werden. Das auf der Rekonstitution von SV40-Viren basierende Testsystem zur Quantifizierung homologer Rekombinationsereignisse konnte bereits erfolgreich zur Analyse von p53 als in *trans* auf die Rekombination wirkender Faktor eingesetzt werden (Wiesmüller *et al.*, 1996; Dudenhöffer *et al.*, 1998) und sollte hier weiterführend für Untersuchungen zur Rolle von p53 und PARP-1 bei der Rekombination an krebisrelevanten Sequenzen appliziert werden.

Schließlich sollten in dieser Arbeit in Vorbereitung zur Bestimmung von Rekombinationsaktivitäten als Biomarker für Genotoxizität und Krebs susceptibility Testsysteme entwickelt werden, welche auf der Basis fragiler chromosomaler Sequenzen DNA-Rearrangements in Abhängigkeit von exogenen und endogenen Faktoren detektieren.

Um das auf SV40-Viren basierende Testsystem auf die Untersuchung des individuellen Einflusses von putativ in *cis* wirkenden DNA-Elementen bei der Rekombination anwenden zu können, musste das SV40-Virengenom dergestalt modifiziert werden, dass Fremdsequenzen in Virenpartikel aufgenommen werden konnten. Nach erfolgreicher Etablierung dieses modifizierten Testsystems sollten die verschiedenen DNA-*cis*-Elemente, wie Fragmente aus Bruchpunktregionen mit ursächlicher Beteiligung an der Entstehung von Leukämien (siehe Reichel *et al.*, 1999; Boehm *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1990; Alcalay *et al.*, 1991), aus MAR-Sequenzen (Boulikas & Kong, 1994; Will *et al.*, 1998a; 1998b) und aus repetitiver DNA (Kern *et al.*, 1992; Bowater *et al.*, 1996), auf ihren Einfluss bei der Rekombination untersucht werden.

Um erste endogene Faktoren zu überprüfen, also um zu testen, ob Rekombination in Nachbarschaft dieser *cis*-Elemente durch bestimmte Proteine in der Zelle beeinflusst wird, sollten Zellen mit funktionell anschaltbarem Wtp53 (Dudenhöffer *et al.*, 1998) und p53(138V) etabliert werden und diese neben weiteren Zellsystemen mit unterschiedlichem Wtp53- und/oder PARP-1-Status untersucht werden.

Mit diesen viralen Rekombinationstest- und zellulären Proteinexpressions-Systemen sollte anschließend unter Ausschluss von indirekten Effekten, wie durch Veränderungen des zellulären Wachstums oder der Virusgenomgröße, quantitativ die genomdestabilisierende Wirkung der einzelnen DNA-*cis*-Elemente vor dem jeweiligen zellulären Hintergrund vergleichend bestimmt werden.

Da insbesondere aufgrund jüngster Publikationen (Flores-Rozas & Kolodner, 2000; Saintigny, *et al.*, 2001; Janz & Wiesmüller, 2002) von einer engen Verknüpfung zwischen DNA-Replikation und Rekombination auszugehen ist, sollte die *de novo* DNA-Synthese der rekombinanten SV40-Viren unter Rekombinations-*Assay*-Bedingungen durch DNA-Markierung mit [³H]-Thymidin untersucht werden, um mögliche Verbindungen in Bezug auf die jeweiligen in *cis* bzw. in *trans* wirkenden Faktoren aufzudecken.

Um mögliche Änderungen der Rekombinationsfrequenzen in Abhängigkeit von bestimmten DNA-*cis*-Elementen und dem DNA-Bindeprotein p53 mechanistisch aufzuklären, sollten außerdem Gelretardations-Analysen (EMSA) durchgeführt werden.

Studien unter Applikation verschiedener Chemotherapeutika sollten schließlich zur Aufklärung beitragen, ob sich das neu aufgebaute System für die Risikoabschätzung der Generierung von sekundären Leukämien nach Gabe bestimmter Therapeutika unter Berücksichtigung des genetischen Hintergrundes eignet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Die Chemikalien wurden mit dem höchsten Reinheitsgrad (*pro analysi*) verwendet. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Biorad (München), Merck (Darmstadt), Serva (München) und Sigma (München) bezogen. Spezielle (Bio-) Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Acrylamide/Bis Solution (19:1) 40% (w/v)	Invitrogen, Karlsruhe
Bacto-Agar, -Trypton, -Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, USA
BSA	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Carbenicillin	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
Coomassie-Blau R-250	Serva, Heidelberg
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Marker <i>I/HindIII</i>	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Längenmarker 1Kb+	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	New England Biolabs, Frankfurt am Main
FCS	PAA, Cölbe; Roche, Mannheim
G418 (Geneticin)	Invitrogen, Karlsruhe
Hygromycin B	Roche, Mannheim
Klenow-Fragment	New England Biolabs, Frankfurt am Main
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
[Methyl- ³ H]-Thymidin	Hartmann, Braunschweig
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Norit A	Merck, Darmstadt
Nystatin	Sigma, München
PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1))	Biomol, Hamburg
Penicillin/Streptomycin (5000 U/ml/75000 µg/ml)	Biochrom, Berlin
Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim
Protogel (30% Acrylamid; 0,8% Bisacryl- amid 37,5:1)	Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
Puromycin	Serva, Heidelberg
Refobacin	Ratiopharm, Ulm
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt am Main; MBI-Fermentas, St. Leon-Rot; Roche, Mannheim
RNAse A	Sigma, München
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
SeaPlaque Agarose	Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
S-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
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
Tetrazyklin	Serva, Heidelberg
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Fluka, Neu Ulm
Viapurex steriles Wasser	Baxter, Unterschleißheim
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
β -Östradiol	Sigma, München
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$	Hartmann, Braunschweig

2.1.2 Sonstige Materialien

ABI PRISM Big Dye Ready Reaction Cycle Sequencing Kit	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
DNA DipStick Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Concert High Purity Plasmid Maxiprep System	Invitrogen, Karlsruhe
Prestained SDS-Molecular Weight Standard Broad Range	Biorad, München
QIAEX II DNA Purification 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
Super-Signal-ULTRA Chemilumineszenz Substrat	Pierce, Illinois, USA
Szintillationsflüssigkeit	Packard, Groningen, Holland

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Einfrierröhrchen	Nunc GmbH, Wiesbaden Biebrich
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher und Schüll, Dassel
Glasfaserfilter	Schleicher und Schüll, Dassel
Immobilon TM -P Membran	Millipore, Eschborn
Polypropylenröhrchen	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm Kodak X-OMAT/ BiomaxMR	Amersham Buchler KG, Braunschweig
Sterivex (Sterilfilter)	Millipore, Eschborn
Zellkultur-Platten	Nunc GmbH, Wiesbaden Biebrich

2.1.4 Geräte

Agarosegelelektrophoresensystem Horizon	Invitrogen, Karlsruhe
Blotkammer TE Series	Hoefler, Pharmacia Biotech, Freiburg
Geldokumentationsanlage	Intas, Göttingen
Immunfluoreszenz-Mikroskop Axiovert	Zeiss, Jena
Mini-Gel-Apparatur	Hoefler, Pharmacia Biotech, Freiburg
Minitan S Ultrafiltrationsgerät und Membranblätter (100kDa Molekulargewichtsgrenze)	Millipore, Eschborn
Nassblotapparatur	Hoefler, Pharmacia Biotech, Freiburg
Photometer Bio Spec	Shimadzu, Duisburg
Polyacrylamid-Gelelektrophoresensystem	Hoefler, Pharmacia Biotech, Freiburg
Szintillationszähler	Beckman, München
Thermocycler	MWG-Biotech, Ebersberg
Thoma-Zählkammer	NeoLab, Heidelberg
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg; Du Pont, Bad Homburg
Vortex	Merck, Darmstadt

2.1.5 Puffer und Lösungen

5x DNA-Auftragspuffer	50 % 0,1 M 1 %	Glyzerin EDTA Bromphenolblau (oder Xylencyanol)
Bradford-Lösung	100 mg 50 ml 100 ml	Coomassie-Blau R-250 Ethanol 85%ige Phosphorsäure mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen
Coomassie-Entfärber	5% 7%	Methanol Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,15% 50% 10%	Coomassie-Blau R-250 Methanol Essigsäure
10x DNA-Bindepuffer	250 mM 50 mM 60% 10 mM	Tris/HCL, pH 8,0 EDTA Glyzerin DTT (frisch zugeben)
dNTP-Lösung	20 mM 20 mM 20 mM 20 mM	dATP dCTP dGTP dTTP

Einfriermedium	20 ml	2 x DMEM
	25 ml	FCS
	4 ml	NaHCO ₃
	6 ml	DMSO
Elutionspuffer	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2 mM	DTT (frisch zugeben)
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml	Ethidiumbromid in H ₂ O
2x HeBS	247 mM	NaCl
	10 mM	KCl
	1,4 mM	Na ₂ HPO ₄
	42 mM	Hepes
Hybridisierungspuffer	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	100 mM	NaCl
	2 mM	DTT (frisch zugeben)
Kristallviolett-Stammlösung	2%	Kristallviolett
	1 Teil	Formaldehyd (37%)
	2 Teile	Ethanol
	7 Teile	H ₂ O
Kristallviolett-Färbelösung	1 Teil	Kristallviolett-Stammlösung
	1 Teil	Formaldehyd (37%)
	8 Teile	H ₂ O
Mounting-Medium	5 g	Polyvinylalkohol 25/140
	90 ml	PBS
	10 ml	Glyzerin
PBS	140 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	8 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
10x RegG-Laufpuffer	67 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	33 mM	Natriumacetat
	20 mM	EDTA
SDS-PAGE-Laufpuffer	250 mM	Tris/HCl
	1,9 M	Glycin
	1%	SDS

2x SDS-Probenpuffer	125 mM 20 % 4 % 3,1 % 0,05 % 4 %	Tris/HCl, pH 6,8 Glyzerin SDS DTT Bromphenolblau β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)
4x SDS-Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4%	Tris/HCl, pH 6,8 SDS
4x SDS-Trenngelpuffer	1,5 M 0,4%	Tris/HCl, pH 8,8 SDS
TAE (50x)	121 g 27,55 ml 50 ml	Trisbase Eisessig 0,5M EDTA, pH 8,0 mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen
10x TBE	0,89 M 2 mM 50% 0,5 mM	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA Glyzerin DTT (frisch zugeben)
TBST	20 mM 137 mM 0,2%	Tris/HCl, pH 7,6 NaCl Tween 20
TBS-T-5% MP	5%	Magermilchpulver in TBS-T
TCM-Puffer	10 mM 10 mM 10 mM	Tris/HCl, pH 8,0 CaCl ₂ MgCl ₂
TE	10 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA
TES	0,8%	SDS in TE
TFB-I-Puffer	100 mM 50 mM 10 mM 30 mM 15%	RbCl MnCl ₂ CaCl ₂ Kaliumacetat Glyzerin mit 0,2M Essigsäure auf pH 5,8
TFB-II-Puffer	10 mM 10 mM 75 mM 15 %	MOPS RbCl CaCl ₂ Glyzerin mit NaOH auf pH 7,0

Tris-Glycin-Puffer	250 mM 50 mM	Glycin Tris/HCl, pH 8,3
Trypsin-Lösung	0,05% 0,5 mM	Trypsin EDTA, pH 8,0 in 1x PBS
Zellfraktionierungspuffer A	10 mM 1,5 mM 5 mM	Hepes, pH 7,4 MgCl ₂ KCl
Zellfraktionierungspuffer B	10 mM 1,5 mM 5 mM	Hepes, pH 9,0 MgCl ₂ KCl
Zellfraktionierungspuffer C	10 mM 1,5 mM 200 mM	Hepes, pH 9,0 MgCl ₂ KCl
Zellfraktionierungspuffer D	10 mM 1,5 mM 500 mM	Hepes, pH 9,0 MgCl ₂ KCl

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

2.1.6 Nährmedien

Erhaltungsmedium DMEM 5(10)/1	5-10% 1%	FCS Penicillin/Streptomycin in DMEM-Flüssigmedium
Erhaltungsmedium DMEMØ10/1	10% 1%	FCS (östradiolarm) Penicillin/Streptomycin in phenolrotfreiem DMEM- Flüssigmedium
Erhaltungsmedium RPMI 10/1	10% 1% 1%	FCS Penicillin/Streptomycin L-Glutamin in RPMI1640-Flüssigmedium
FCS (östradiolarm)	10 g 1 g 1 l	Norit A (Aktivkohle) Dextran 40 FCS 30 min rühren lassen, anschließend bei 14000 rpm abzentrifugieren und Überstand sterilfiltrieren.

LB-Agar	15 g	Bacto Agar in 1 l LB-Medium autoklavieren und nach dem Abkühlen auf 50 °C mit oder ohne Antibiotika (s.u.) ausplattieren
LB-Medium	10 g 5 g 10 g	Bacto-Trypton Hefeextrakt NaCl in 1 l ddH ₂ O, pH 7,4
LB-Medium mit Antibiotika	50-100 µg/ml 50-100 µg/ml 30 µg/ml 30 µg/ml 12 µg/ml	Ampicillin Carbenicillin Kanamycin Streptomycin Tetrazyklin Zugabe der Antibiotika je nach Bedarf
Softagar	1,4% 2% 1/200 1/1000	SeaPlaque Agarose in DMEM FCS Nystatin Refobacin
Ψ-Broth-Medium	10 mM 10 mM	MgSO ₄ MgCl ₂ in LB-Medium mit KOH auf pH 7,6 bringen

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primärantikörper

PAb421	Muriner monoklonaler Antikörper gegen das humane p53-Protein, erkennt ein C-terminales Epitop zwischen den Aminosäuren 372 und 382 (Harlow <i>et al.</i> , 1981; Arbeitskonzentration im <i>Western-Blot</i> : 1: 200-1: 500).
PAb240	Muriner monoklonaler Antikörper gegen das humane p53-Protein, erkennt ein Epitop zwischen den Aminosäuren 213 und 217 (Arbeitskonzentration im <i>Western-Blot</i> : 1:200-1:500).

DO1	Muriner monoklonaler Antikörper gegen das humane p53-Protein, erkennt ein N-terminales Epitop zwischen den Aminosäuren 20 und 25 (Calbiochem, Bad Soden; Vojtesek <i>et al.</i> , 1992; Arbeitskonzentration im <i>Western-Blot</i> : 1:1000-1: 5000).
Polyklonales Schaf-Anti-p53-Serum	Roche, Mannheim (Arbeitskonzentration im <i>Western-Blot</i> : 1:2000).
PAb1801	Muriner monoklonaler Antikörper gegen das humane p53, der ein Epitop zwischen den Aminosäuren 32 und 79 erkennt (Pharmingen, USA; Banks <i>et al.</i> , 1986; Arbeitskonzentration im <i>Western-Blot</i> : 1:200-1:500).
Anti-hMDM2	Muriner monoklonaler Antikörper gegen das humane MDM2-Protein, erkennt ein N-terminales Epitop zwischen den Aminosäuren 26 und 150 (Calbiochem, Bad Soden, Arbeitskonzentration im <i>Western-Blot</i> : 1:1000).
Anti-hp21 (WAF-1)	Muriner monoklonaler Antikörper, der das humane p21 ^{WAF} -Protein erkennt (Calbiochem, Bad Soden; Arbeitskonzentration im <i>Western-Blot</i> : 1:200-1:1000).
Anti-Aktin	Monoklonaler Ziege-Antikörper, erkennt ein Epitop am C-Terminus von Aktin (Santa Cruz, Heidelberg; Arbeitskonzentration im <i>Western-Blot</i> : 1:2500).
PAb108	Muriner Antikörper, erkennt SV40 T-Ag-Epitop, SV40 t-Ag und SV40 17kT (Gurney <i>et al.</i> , 1986; Arbeitskonzentration in der Immunfluoreszenz: 1:2-1:5).

2.1.7.2 Sekundärantikörper

Huhn-Anti-Ziege-Peroxidase	Biomol, Hamburg Arbeitskonzentration im <i>Western-Blot</i> : 1:5000
Kaninchen-Anti-Schaf-Peroxidase	Sigma, München Arbeitskonzentration im <i>Western-Blot</i> : 1:10000
Streptavidin-Cy3-Konjugat	Dianova, Hamburg Arbeitskonzentration in der Immunfluoreszenz: 1:400

Ziege-Anti-Maus-Biotin	Dianova, Hamburg Arbeitskonzentration in der Immunfluoreszenz: 1:100
Ziege-Anti-Maus-Peroxidase	Biomol, Hamburg Arbeitskonzentration im <i>Western-Blot</i> : 1:2500-1: 10000

2.1.8 Nukleinsäuren

2.1.8.1 Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Die hochgestellten Zahlen geben die Positionen der Oligonukleotide innerhalb der jeweiligen Sequenz (in Klammern) an (dabei steht *GenBank #* für *GenBank-Accession-Number*). In grün ist die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *ClaI*, in türkis die von *SmaI*, in gelb die von *BglIII* und in violett die von *NdeI* angegeben. Von der Wildtyp-Sequenz abweichende Nukleotide sind unterstrichen. Alle synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, bezogen.

cis-2b	AGGAGGAGATCTATCGATACCCGGG→ → ²⁶⁸² CAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTG ^{2656 (SV40)}
cis-2c	A ²⁶⁶⁶ GTTAACAACAACAATTG ^{2682/2534} CCCC ^{2531 (SV40)} →
LMO-1	AGGAGGAGATCTATCGAT→ → ²⁵³¹⁴⁶⁴⁰ TAAGTGGGCTTTGCTATTCACAAG ^{25314617 (Chromosom 11, GenBank# NT_009237)}
LMO-2	GCTGCTAGATCTATCGAT→ → ²⁵³¹⁴²¹² TGACTCACCGTGGGGCCTCTC ^{25314232 (Chromosom 11, GenBank# NT_009237)}
MLL-1	AGGAGGAGATCTATCGATA ⁶⁶³⁸ CTTACAACCTG→ →CTTACAACCTGTTTCGTATATTACAG ^{6662 (MLL-Gen, GenBank# X83604)}
MLL-2	GCTGCTAGATCTATCGAT ⁷⁰³⁶ GAAGGGCTCACA→ →ACAGACTTG ^{7016 (MLL-Gen, GenBank# X83604)}
VP1-MutC	²³³⁸ GCAGTGGAAAGGGACTT <u>CC</u> CAGATATTTTAAAATTACC ^{2374 (SV40)}
VP1-MutN	¹⁵⁴¹ GCAGCTCCCAAAAACCT <u>TT</u> AGGAACCAGTGCAAGT ^{1575 (SV40)}
Nde1Oligo1	³⁸⁰² TGTTGGCATATGGTTTTTTGGTTTTTTG ^{3828 (SV40)}
Nde1Oligo2	AGGAGGCATATGCCCGGGAGATCT→ → ⁴⁵⁹⁹ ACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTT ^{4574 (SV40)}
Nco-2	⁶²² AGATGGCCATGGCGCGGACGCGG ^{600 (p53-cDNA in pSV53her (XbaI-Fragment))}
Nco-Mut15-1	CTGGTA ¹³⁵ CCATGGAGGAGCCGCAGATCCTAGCGTCCGAG→ →CCCCCTCTGGC ^{180(p53-cDNA in pSV53her (XbaI-Fragment))}
RAR-1	AGGAGGAGATCTATCGAT ⁹¹⁹²⁰ AGTGGCCGGC→ →TTTGAATATCCTG ^{91898 (Chromosom 17, GenBank# AC090426)}
RAR-2	GCTGCTAGATCTATCGAT ⁹¹⁶⁴⁰ AAGCCTCCAGC→ →ACCCCATCACT ^{91661 (Chromosom 17, GenBank# AC090426)}
SeeRS-1	AGGAGGAGATCTATCGAT ⁷⁴² GACGTAAACGGCCACAAGTTCA ^{763 (pEGFP-N1)}
SeeRS-2	GCTGCTAGATCTATCGAT ¹⁰⁵⁸ TTCAGCTCGATGCGGTTACCA ^{1037 (pEGFP-N1)}

st Seq.Oligo1	3672 AGCAGAGCCTGTAGAACC ³⁶⁸⁹ (SV40)
st Seq.Oligo2	3901 ATACATTTTAAACACATTTTC ³⁹²⁰ (SV40)
st Seq.Oligo3	4126 AATATTCCTTATTAACCCCT ⁴¹⁴⁵ (SV40)
st Seq.Oligo4	4352 GAGTTCTATTACTAAACAC ⁴³⁷⁰ (SV40)
TAL-1	AGGAGGAGATCTATCGATA ¹⁴⁵³⁷² CAAGCCCCCTTCCC→ →AACTCCAT ¹⁴⁵³⁵¹ (Chromosom 1, GenBank # NT_032977)
TAL-2	GCTGCTAGATCTATCGAT ¹⁴⁵¹¹¹ GTGTCTACGCGGTTG→ →CCTCCT ¹⁴⁵¹³¹ (Chromosom 1, GenBank # NT_032977)
VP1-6	2318 ACCAACACTTCTGGAACAC ²³³⁶ (SV40)
VP1-10	2905 ACAGCCAGGAAAATGCTGA ²⁸⁸⁷ (SV40)
VP1-8b	2495 GAGGTTAGGGTTTATGAGGAC ²⁵¹⁵ (SV40)
VP1-9	2773 ATCATAATCAGCCATACCAC ²⁷⁵⁴ (SV40)
173-2	500 GTGACTTGCACGTACTCC ⁵¹⁷ (p53-cDNA in <u>pSV53her</u> (<i>Xba</i> I-Fragment))
173	721 GATAAGATGCTGAGGAGG ⁷⁰² (p53-cDNA in <u>pSV53her</u> (<i>Xba</i> I-Fragment))
955	956 GTTTGTGCCTGTCCTGGGAG ⁹⁷⁵ (p53-cDNA in <u>pSV53her</u> (<i>Xba</i> I-Fragment))
hp53-1-1	326 CCAGAATGCCAGAGGCTGCTC ³⁴⁶ (p53-cDNA in <u>pSV53her</u> (<i>Xba</i> I-Fragment))
hp53-2-2	433 GGAAGGGACAGAAGATGACAG ⁴¹³ (p53-cDNA in <u>pSV53her</u> (<i>Xba</i> I-Fragment))
hp53-3-1	811 GGCTCTGACTGTACCACCATCC ⁸³² (p53-cDNA in <u>pSV53her</u> (<i>Xba</i> I-Fragment))
hp53-4-2	1035 GGGCAGCTCGTGGTGAGGCTC ¹⁰¹⁵ (p53-cDNA in <u>pSV53her</u> (<i>Xba</i> I-Fragment))
Kompetitor-Oligo	GTGAACAGCTCCTCGCCCTTG

2.1.8.2 DNA

Die Vektoren, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, sind unter 3.1 und 3.2.1 ausführlich beschrieben. Hier aufgeführte Vektoren standen für die vorgestellte Arbeit zur Verfügung (Ausnahme: Der Vektor **pUC-PuroD**, der in dieser Arbeit generiert wurde). Alle aufgeführten Vektoren werden unterstrichen dargestellt, in dieser Arbeit generierte zusätzlich fett.

λ143

Lambda-Phagen-DNA, die den unarrangierten *RARα*-Lokus enthält (von Frau Dr. A. Dejean, Institut Pasteur, Paris, Frankreich, zur Verfügung gestellt; deThé *et al.*, 1990).

pBlueScriptII KS^(+/-)

Ein Plasmidderivat des pBR322 mit einer multiplen Klonierungsstelle (Stratagene, Heidelberg). Das Plasmid wird im Text als pBS abgekürzt.

pBS-K28a

Ein pBS-Derivat, das ein MAR-Fragment des humanen PARP-Gens enthält (von Fr. Dr. K. Will zur Verfügung gestellt).

pBS-Kpn-SV40

Das SV40-Genom über KpnI in pBlueScript M 13⁺ (Stratagene, Heidelberg) kloniert.

<u>G2111B</u>	SV40-Genom (4974 bp) mit Deletion von 269 bp im T-Ag-Intron, die den Leserahmen des ϵ Ag zerstört. Über <i>Bam</i> HI in <u>pGEM3Zf()</u> kloniert (von Prof. W. Deppert, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, zur Verfügung gestellt).
<u>pHyg</u>	Vektor zur Expression des Hygromycin-Resistenzgens in eukaryontischen Zellen (Dudenhöffer <i>et al.</i> , 1998).
<u>pM5Neo</u>	Vektor zur Expression des <i>Neomycinresistenz-</i> Gens in eukaryontischen Zellen (Laker <i>et al.</i> , 1987).
<u>pRSetB-NcoI</u>	<i>Nco</i> I-Fragment des Vektors pSV53her im Expressionsvektor pRSetB (Invitrogen, Karlsruhe).
<u>pRW3246</u>	Ein <u>pUC18</u> -Derivat mit inseriertem CTG- <i>repeat</i> aus einem an Myotonischer Dystrophie leidenden Patienten (von Herrn Dr. R. Bowater, University of East Anglia, UK, zur Verfügung gestellt; Bowater <i>et al.</i> , 1996).
<u>pSK-45-13-2-PyCAT</u>	13 Kopien der p53-Konsensus-Sequenz aus dem RGC (<i>ribosomal gene cluster</i>) im <u>pBS-CAT-Vektor</u> , genannt „p σ 13“ (von Herrn Prof. B. Vogelstein, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA, zur Verfügung gestellt; Kern <i>et al.</i> , 1991).
<u>pSK-89-15-I-PyCAT</u>	15 Kopien der mutierten p53-Konsensus-Sequenz aus dem RGC im <u>pBS-CAT-Vektor</u> , genannt „M σ 15“ (von Herrn Prof. B. Vogelstein, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA, zur Verfügung gestellt; Kern <i>et al.</i> , 1991).
<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>pSV53(138V)her</u>	Vektor zur Expression des humanen temperatursensitiven p53 mit einer Mutation A138V 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 (Akyüz <i>et al.</i> , 2002).
<u>pUC18</u>	Ein Derivat von <u>pBR322</u> mit einer multiplen Klonierungsstelle (Stratagene, Heidelberg).
<u>pUCΔBam</u>	<u>pUC19</u> -Vektor mit Deletion der Polylinkerregion zwischen den Schnittstellen <i>SmaI</i> und <i>PstI</i> (Dudenhöffer <i>et al.</i> , 1998).
<u>pUCΔBamXba</u>	1616 bp- <i>XbaI</i> -Fragment des Vektors <u>pSV53her</u> in <u>pUCΔBam</u> (Dudenhöffer <i>et al.</i> , 1998).
<u>pUChLMO2</u>	Ein <u>pUC18</u> -Derivat, das den humanen <i>LMO2</i> -Lokus enthält (von Frau Dr. C. Stocking, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, zur Verfügung gestellt).
<u>pUChtal1</u>	Ein <u>pUC18</u> -Derivat, das den humanen <i>TAL1</i> -Lokus enthält (von Frau Dr. C. Stocking, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, zur Verfügung gestellt).
<u>pUC19-IgHE-MAR</u>	Ein <u>pUC19</u> -Derivat, das ein 997 bp- <i>XbaI</i> -Fragment des 5'-MAR des Genlokus der schweren Kette der Immunglobuline der Maus enthält (von Fr. Dr. K. Will zur Verfügung gestellt).
<u>pUC19-K28a</u>	Ein <u>pUC19</u> -Derivat, das ein Fragment des 3'UTR des humanen PARP-Gens enthält (von Fr. Dr. K. Will zur Verfügung gestellt).
<u>pUC-Kpn-SV40</u>	Das SV40-Genom (5243 bp) über die <i>KpnI</i> -Schnittstelle in <u>pUCΔBam</u> kloniert (Wiesmüller <i>et al.</i> , 1996).
<u>pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)</u>	Virales SV40-Genom mit der durch <i>in vitro</i> -Mutagenese eingeführten Punktmutation C2084T, welches für temperatursensitives VP1 mit dem Aminosäureaustausch H196Y kodiert, über <i>KpnI</i> -Restriktionsschnittstellen in <u>pUCΔBam</u> kloniert (Ng <i>et al.</i> , 1985; Wiesmüller <i>et al.</i> , 1996). Weitere Bezeichnung: <u>pUC-Kpn-Mut-196</u> .

pUC-Kpn-SV40-tsVP1(P286S)

Virales SV40-Genom mit den durch *in vitro*-Mutagenese eingeführten Punktmutationen C2354T und C2356T, welche für temperatursensitives VP1 mit dem Aminosäureaustausch P286S kodiert, über *Kpn*I-Restriktionsschnittstellen in pUC Δ Bam kloniert (Ng *et al.*, 1985; Wiesmüller *et al.*, 1996).

pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)

Virales SV40-Genom mit der durch Klonierung eingeführten Punktmutation A2367C, welches für temperatursensitives VP1 mit dem Aminosäureaustausch K290T kodiert, über *Kpn*I-Restriktionsschnittstellen in pUC Δ Bam kloniert (Ng *et al.*, 1985; Wiesmüller *et al.*, 1996).

Weitere Bezeichnungen: pUC-Kpn-Mut-ts und pUC-Kpn-tsB11.

pUC-Puro-D

Ein Plasmidderivat von pUC18. Mithilfe von PCR-Reaktionen wurden 46 bp aus der Chromophor-Region des *EGFP*-Gens durch die *Eco*RI (6 bp) und die *I*SceI-Erkennungssequenz (18 bp) ersetzt (s. Akyüz, 2001).

2.1.9 Bakterienstämme*E. coli DH 5a*

Genotyp: F[']/endA1 hsdR17 (r_k-m_k+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Naf^r) relA1 Δ (lacIZYA-argF) U169 deoR(ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15) (New England Biolabs, Frankfurt am Main).

E. coli SURE

Genotyp: e14^r(McrA^r) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 RelA1 lac recB recJ sbcC umuC:Tn5 (Kan^r) uvrC [F['] proAB lac^qZ Δ (M15Tn10(Tet^r))] (Stratagene, Kalifornien, USA).

E. coli XL 10 Gold

Genotyp: Tet^r Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F['] proAB lac^qZ Δ M15Tn10 (Tet^R) Amy Cam^r]^a (Stratagene, Kalifornien, USA).

E. coli SCS 110

Genotyp: rpsL (Str^r) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (lac-proAB) [F['] traD36 proAB lac^qZ Δ M15] (Stratagene, Kalifornien, USA).

2.1.10 Viren

Die Viren, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, sind unter 3.1.3 ausführlich beschrieben. Hier aufgeführte Viren standen für die vorgestellte Arbeit zur Verfügung.

SV40-Wt	Stamm 776; erstes kloniertes SV40-Virus, mit kleiner Plaquebildung (<i>small plaque strain</i>). <i>GenBank-accession-nummer</i> JO2400, ATTC-Nummer 45019, 4501 (Fiers <i>et al.</i> , 1978).
SV40-tsVP1(290T)	Virus, der durch <i>in vitro</i> -Einführung der Punktmutation A2367C im SV40-Genom entstanden ist (Wiesmüller <i>et al.</i> , 1996).
SV40-tsVP1(196Y)	Virus, der durch <i>in vitro</i> -Einführung der Punktmutation C2084T im SV40-Genom entstanden ist (Wiesmüller <i>et al.</i> , 1996).
Baculoviren	Wtp53-, p53(273P)- und p53(248P)-exprimierend (Dudenhöffer <i>et al.</i> , 1999).

2.1.11 Zelllinien

Die Zelllinien, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, sind unter 3.2 ausführlich beschrieben und in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Hier aufgeführte Zelllinien standen für die vorgestellte Arbeit zur Verfügung.

CV1	SV40-permissive Affennierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>) mit fibroblastenähnlicher Morphologie und pseudodiploidem Chromosomensatz. ATTC#CCL70 (Manteuil <i>et al.</i> , 1973). Zur Erhaltung wurde DMEM5/1 verwendet.
COS-1	CV1-Zelllinie, die mit einer Mutante von SV40 transformiert wurde, deren SV40-Replikationsursprung eine 6 bp-Deletion besitzt. ATTC#CRL1650 (Gluzman, 1981). Zur Erhaltung wurde DMEM10/1 verwendet.
K562	Eine humane Zelllinie aus einem an chronisch myeloischer Leukämie leidenden Patienten mit p53 ^{-/-} -Genotyp (ATTC#243). Zur Erhaltung wurde RPMI 10/1 verwendet. Die Zelllinie wurde von Prof. Dr. W. Ostertag, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

LLC-MK ₂	Affennierenzellen des Rhesusaffen (<i>Macaca mulatta</i>) (Hull <i>et al.</i> , 1956). Zur Erhaltung wurde DMEMØ10/1 verwendet.
LLC-MK ₂ (neo)	LLC-MK ₂ -Zelllinie, die stabil mit pM5Neo transfiziert wurde (Dudenhöffer <i>et al.</i> , 1998). Zur Erhaltung wurde DMEMØ10/1 verwendet.
LLC-MK ₂ (p53her)-17	LLC-MK ₂ -Zelllinie, die stabil mit pM5Neo und pSV53her transfiziert wurde (Dudenhöffer <i>et al.</i> , 1998). Zur Erhaltung wurde DMEMØ10/1 verwendet.
LMV2	LLC-MK ₂ -Zelllinie, die stabil mit Vektor pMV-GalER-VP (Brasemann <i>et al.</i> , 1993) transfiziert (Dudenhöffer <i>et al.</i> , 1999). Zur Erhaltung wurde DMEMØ10/1 verwendet.
LMV2-p53her-KI8	LMV2-Zelllinie, die stabil mit pSV53her transfiziert sind. Die Zelllinie wurde von Fr. E. Bendrat etabliert. Zur Erhaltung wurde DMEMØ10/1 verwendet.
LMV2-PARP-KI3	LMV2-Zelllinie, die stabil mit pGC-PARP transfiziert sind. Der pGC-Vektor ist ein eukaryontischer Expressionsvektor (Brasemann <i>et al.</i> , 1993) und erlaubt hier die Expression des PARP-Gens unter der Kontrolle des Gal4-Promotors. Die Zelllinie wurde von Fr. E. Bendrat etabliert. Zur Erhaltung wurde DMEMØ10/1 verwendet.
LMV2-p53herPARP-KI1	LMV2-Zelllinie, die stabil mit pSV53her und pGC-PARP (s. LMV2-PARP-KI3) transfiziert sind. Die Zelllinie wurden von Fr. E. Bendrat etabliert. Zur Erhaltung wurde DMEMØ10/1 verwendet.

2.2 DNA-Techniken

2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Von einer frisch ausgestrichenen Bakterienplatte (LB-Agar mit oder ohne Antibiotikum, s. 2.1.6) wurde eine Einzelkolonie gepickt, in 5 ml LB-Medium angeimpft und im Schüttler (180 UpM, ü.N., 37°C) inkubiert. Mit dieser Kultur wurde eine 50 ml- ψ -Broth (je nach Bakterienstamm mit oder ohne Antibiotikum) angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,22-0,30 in einem Schüttler (180 UpM, 37°C) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 15 min auf Eis gestellt und abzentrifugiert (2500 x g, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde in 12 ml eiskaltem TFB-I-Puffer resuspendiert und auf Eis für 15-45 min inkubiert. Die Bakterien wurden erneut abzentrifugiert (s.o.) und in 4 ml TFB-II-Puffer resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden je 100-200 μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zu acht Wochen gelagert.

Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurde ein Aliquot mit 2 ng pUC18 transformiert und 10% des Transformationsansatzes ausplattiert und inkubiert (ü.N., 37°C). Es wurden mindestens 10⁷ cfu/mg pUC18 erreicht.

2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

5-10 μ l eines Ligationsansatzes (s. 2.2.16) wurden mit 30 μ l TCM-Puffer verdünnt, mit 90 μ l kompetenten Bakterien (2.2.1) für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 90 s auf 42°C erhitzt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 45-60 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB-Platten (mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Einfrieren von Bakterienkulturen

Die Bakterienkultur (in LB-Medium) wurde entweder mit Glycerin (Endkonzentration 30-50%) oder mit DMSO (Endkonzentration 7%) versetzt und bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.2.4 Isolierung der Plasmid-DNA

Für Mini-Plasmidpräparationen wurden je 5 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit je einer transformierten Bakterienkolonie angeimpft und auf einem Schüttler (180 UpM, ü.N., 37°C) inkubiert. 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (16000 x g, 1 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zur Isolierung der Plasmid-DNA mit dem *QIAmp-Mini-DNA-Kit* nach Anleitung des Herstellers bearbeitet.

Die in 10 mM Tris, pH 8,5, aufgenommene Plasmid-DNA wurde durch Restriktion (s. 2.2.17) und analytische Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.18) untersucht.

Für Maxi-Plasmidpräparation wurde eine Übernachtskultur von 200-400 ml in einem 2 l Kolben inkubiert (180 UpM, ü.N., 37°C). Die Bakterien wurden pelletiert (6000 x g, 10 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus dieser Kultur wurde mit Hilfe des *QIAGEN Plasmid Maxi Kits* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde durch Restriktion mit verschiedenen Endonukleasen (s. 2.2.17) und anschließender Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.18) oder durch Sequenzierung (s. 2.2.11) charakterisiert.

2.2.5 DNA-Markierung mit [³H]-Thymidin

Die Zellen wurden auf 5 cm-Zellkulturschalen ausgesät und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (2.6.3) markiert. Dazu wurde das Medium auf 1 ml reduziert und mit 30µCi [Methyl-³H]-Thymidin (spezifische Aktivität 70-80 Ci/mM) versetzt. Nach einer Stunde wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die DNA wie unter 2.2.8 beschrieben extrahiert.

2.2.6 Präparation episomaler DNA aus eukaryontischen Zellen

Zellen in drei bis fünf konfluent bewachsenen Platten wurden dreimal 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.

Nach der Zellyse (s. oben) wurde zur Zellsuspension ¼ des Volumens an 5 M NaCl (Endkonzentration 1 M) zugegeben. Der Ansatz wurde durch vorsichtiges Schwenken des Reaktionsgefäßes gemischt und ü.N. im Kühlraum auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation

(16000 x g, 30 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von RNaseA (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 Zellysate wurde entweder durch PCI- oder Phenol/Chloroform-Behandlung (s. 2.2.8) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit einem zweifachen Volumen Ethanol versetzt und 2 h bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (16000 x g, 30 min, 4°C) wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und für ca. 30 min bei 37 °C getrocknet. Das Pellet (episomale DNA) wurde in geeigneter Weise in TE aufgenommen.

2.2.7 Präparation genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

$0,5-1 \times 10^7$ Zellen wurden zentrifugiert (250 x g, 5 min, RT) , 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 *QIAampMini DNA Kits* nach Angaben des Herstellers bearbeitet.

2.2.8 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

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, zentrifugiert (16000 x g, 5 min, RT), die wässrige Phase in ein neues 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 weiterbehandelt.

2.2.9 Ethanolpräzipitation von DNA

Eine wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit 0,1 Vol. 3 M NaAc und 2,5 Vol. Ethanol abs. versetzt und gefällt (1 h, -20°C). Anschließend wurde die DNA pelletiert (16000 x g, 30 min, 4°C), einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE aufgenommen.

2.2.10 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

2.2.10.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch bestimmt und das Ergebnis durch Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.18) überprüft.

Die DNA-Lösung wurde 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.

Es gilt dabei 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.

2.2.10.2 Quantifizierung geringer DNA-Mengen

Mithilfe des *DNA DipStick Kits* war es möglich, DNA-Konzentrationen zu bestimmen, die zwischen 0,1-10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ lagen. Diese Methode wurde vor allem zur Quantifizierung von radioaktiven PCR-Produkten verwendet (s. 2.2.12.2) und nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.11 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzanalyse wurde das *ABI PRISM Big Dye Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* verwendet.

Zur Sequenzierung wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

200-500 ng	DNA
3 μl	<i>BigDye Sequencing Reagent</i>
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 (s. 2.2.12.1)
Neustrangsynthese	4 min	60°C

Anschließend wurde auf 4°C gekühlt und mit Ethanol gefällt (2.2.9).

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).

2.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.12.1 Standardprotokoll

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	<i>Taq</i> -Puffer (10x)
20 µl	Q-Lösung (5x)
1 U	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase

und mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt.

Der Ansatz wurde in einem auf 90°C vorgeheizten Thermocycler 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

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

abgeschätzt und die Hybridisierungstemperatur entsprechend gewählt.

2.2.12.2 Radioaktive PCR

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten und deren Amplifikation 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 ohne dCTP (2 mM)
2 µl	dCTP (0,2 mM)
5 µl	[α - ³² P]-dCTP (50 µCi)
10 µl	<i>Taq</i> -Puffer (10x)
20 µl	Q-Lösung (5x)
1 U	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase

und mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt.

Der Ansatz wurde in einem auf 90°C vorgeheizten Thermocycler wie unter 2.2.12.1 beschrieben inkubiert. Anschließend wurden die PCR-Produkte wie unter 2.2.19 beschrieben gereinigt und der radioaktiven Einbau wie unter 2.2.20.1 beschrieben gemessen.

2.2.13 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	<i>T4</i> -Polynukleotidkinase (U/µl)

ad 50 µl mit ddH₂O.

Der Reaktionsansatz wurde für 45 min bei 37 °C inkubiert.

2.2.14 Herstellung von glatten DNA-Enden

Insert- und Vektor-DNA 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 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	<i>T4</i> -DNA-Polymerase Puffer (10x)
1-3 U	<i>T4</i> -DNA-Polymerase
ad 100 µl mit ddH ₂ O.	

Der Ansatz wurde 20 min bei 12°C inkubiert.

2.2.15 Dephosphorylierung von Vektoren

Zur Dephosphorylierung des Vektors wurde dieser mit alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline 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 bei Vektor-DNA mit überhängenden Enden 15 min und bei Vektor-DNA mit glatten Enden 1 h.

2.2.16 Ligation

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

2.2.17 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Klonierung, Charakterisierung oder Orientierungsbestimmung eines DNA-Fragmentes wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers behandelt. Die Enzyme wurden durch Hitze (10 min, 75°C oder 20 min, 65°C) oder durch Zugabe von 50 mM EDTA inaktiviert.

2.2.18 DNA-Agarosegelelektrophorese

DNA-Agarosegelelektrophoresen wurden mit TAE-Agarosegelen und TAE-Puffer durchgeführt. Die aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden mit 1/5 DNA-Auftragspuffer versetzt und Agarosekonzentrationen zwischen 1% und 2% gewählt. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, enthielten die Gele 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Die angelegte Spannung variierte zwischen 70 und 130 V, die Trenndauer betrug 30-90 min. Als Größenstandard wurden 5 µl des DNA-Längenmarkers 1 Kb+ oder λ /HindIII aufgetragen.

2.2.19 Isolierung von Restriktionsfragmenten und PCR-Produkten

PCR-Produkte und Restriktionsfragmente, die zur Sequenzierung oder zur Klonierung eingesetzt wurden, wurden durch Agarosegelelektrophorese (2.2.18) 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 *QIAEX II*- oder von PCR-Fragmenten (2.2.12.1 und 2.2.12.2) das *QIAquick PCR Purification Kit* nach Angaben des Herstellers benutzt.

2.2.20 Messung des radioaktiven Einbaus in die DNA

2.2.20.1 Messung von radioaktiven PCR-Produkten

Die Messung der Radioaktivität erfolgte unter Zugabe von 8 ml Szintillationsflüssigkeit pro 1µl-Aliquot PCR-Produkt (aus 2.2.12.2 und 2.2.19) in einem Szintillationszähler.

2.2.20.2 Messung von [³H]-Thymidin-markierter episomaler DNA

Aliquots [³H]-Thymidin-markierter DNA (aus 2.2.5) wurden mit 10% TCA für 30 min auf Eis gefällt. Anschließend wurde die Präzipitate auf Glasfaserfilter abfiltriert und danach wiederholt mit eiskaltem 5% TCA, Aceton und 70% Ethanol gewaschen. Die Filter wurden getrocknet und die Radioaktivität unter Zugabe von 2 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationszähler bestimmt.

2.3 Zellkultur-Techniken

2.3.1 Erhaltung und Kultur

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 30°C, 37°C oder 39°C im Brutschrank (5% CO₂, 95% Luftatmosphäre, 90% relative Luftfeuchtigkeit).

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

Erhaltung von Zellen: Alle 2-3 Tage, nach dem Erreichen der 80-90%igen Konfluenz, wurden die Zellen durch Trypsinierung von der Platte abgelöst und durch auf- und abpipettieren im Kulturmedium vereinzelt. Nach Zellzahlbestimmung in einer Thoma-Zählkammer nach Anleitung des Herstellers wurden die Zellen in einer Konzentration von 10⁵ Zellen/ml auf einer neuen Platte ausgesät.

Einfrieren von Zellen: Die Zellen aus einer konfluent bewachsenen Platte wurden durch Zentrifugation (250 x g, 5 min) geerntet. Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Einfrier Röhrchen überführt. Zum langsamen Einfrieren wurden die Röhrchen in einem Styroporkasten bei -80°C vier Tage gelagert und danach in flüssigen Stickstoff überführt oder bei -80°C für höchstens sechs Monate gelagert und verwendet.

2.3.2 Transfektion nach der Kalziumphosphat-Methode

(Graham & van der Eb, 1973)

Bei der Kalziumphosphat-Methode wird die DNA in Form von feinkörnigen Kalziumphosphat-Präzipitaten auf die Zellen aufgebracht und von ihnen durch Endozytose aufgenommen. Das Präzipitat wird durch langsame Mischung eines Ansatzes aus DNA, Kalziumchlorid und Phosphationen erhalten.

Dafür wurden in ein Polypropylenröhrchen 500 µl 2xHeBS und 20 µg DNA vorgelegt und tropfenweise 500 µl 0,25 M CaCl₂ unter gleichzeitiger Durchmischung mit Hilfe einer Pasteurpipette hinzugegeben. Das so erhaltene DNA-Kalziumphosphat-Präzipitat wurde für 30 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Nach 16-20 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium mit DNA-Kalziumphosphat-Präzipitat abgesaugt und frisches Medium auf die Zellen gegeben.

2.3.3 Selektion und Klonierung

Zur Isolierung von Klonen, die ein gewünschtes DNA-Fragment in ihr zelluläres Genom integriert haben, wurden die Zellen 48 h nach Transfektion (2.3.2) aus einer 9 cm-Platte auf fünf 9 cm-Platten verteilt. Nach Absetzen der Zellen (ca. 6 h) wurde das Erhaltungsmedium abgesaugt und Selektionsmedium (Erhaltungsmedium mit Selektionsagens) auf die Zellen gegeben. Nach 14-16 Tagen Selektion wurde das Medium abgesaugt und Klonierungsringe (0,5-1 cm Durchmesser), an deren Unterseite Silikonfett aufgebracht wurde, um die makroskopisch sichtbaren Klone gelegt. Nach Trypsinierung der Zellen innerhalb eines jeden Klonierungsringes wurden die Klone einzeln in je ein Loch einer 96-Loch-Platte überführt. Nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz wurden die Klone auf größere Platten transferiert.

2.3.4 Generationszeitbestimmung

Zur Bestimmung der Generationszeit von Zelllinien wurden 2×10^5 Zellen in 6 cm-Schalen (Doppelbestimmung) ausgesät (mit und ohne 1µM Östradiol) und nach 24- und 48-stündiger Inkubation ausgezählt.

2.4 Proteinbiochemische Techniken

2.4.1 Sequentielle Kernfraktionierung

(Dudenhöffer *et al.*, 1998)

Bei dieser Methode werden die Gesamtzellextrakte durch Veränderung des pH-Wertes und Erhöhung des Salzgehaltes der Puffer fraktioniert. Die Fraktion A enthält überwiegend zytosolische Proteine, die Fraktionen B bis D stellen die Kernfraktionen dar (B und C enthalten die löslichen Kernbestandteile, D die unlösliche Kernmatrix).

Das Zellpellet (ca. 2×10^7 Zellen) wurde auf Eis aufgetaut und im Kaltraum mit vorgekühlten Lösung weiterverarbeitet. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Zellfraktionierungspuffer A resuspendiert und inkubiert (1 h, auf Eis). Diese Suspension wurde in einen „Dounce“-Homogenisator überführt und die Zellmembranen durch 30 Stöße mechanisch zerstört. Die Proteine wurden während einer 45-minütigen Inkubation auf Eis extrahiert und nicht lösliche Bestandteile abzentrifugiert (3000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand SA (*supernatant* A) wurde aufbewahrt und das Pellet PA (Pellet A) in 1,5 ml Zellfraktionierungspuffer B aufgenommen, wiederum inkubiert und zentrifugiert (s.o.) und der Überstand SB und das Pellet PB gewonnen. Zwei weitere Extraktionsrunden mit den Zellfraktionierungspuffern C und D resultierten in den Überständen SC und SD und den Pellets PC und PD. Die Überstände SA, SB, SC und SD wurden jeweils durch Zentrifugation (16000 x g, 30 min, 4°C) geklärt und aliquotiert in Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurden Coomassie-Färbungs- (2.4.5) und Western-Blot-Analysen (2.4.6) angefertigt.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

(Bradford, 1976)

Es wurde eine Mischung aus

1 µl Zelllysat

99 µl H₂O

990 µl Bradford-Lösung

inkubiert (5-20 min, RT) und anschließend die OD₅₉₅ der Proben und verschiedenen Verdünnungen von BSA (als Standardkurve) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der BSA-Standardreihe bestimmt.

2.4.3 Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

1×10^6 - 1×10^7 Zellen wurden für 5 min bei $250 \times g$ zentrifugiert und in einer Konzentration von $0,5$ - 1×10^4 Zellen/ μl mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 100°C aufgekocht und bei -20°C aufbewahrt.

2.4.4 SDS-PAGE

(Laemmli *et al.*, 1970)

Die Proteine wurden in einer diskontinuierlichen Elektrophorese aufgetrennt, d.h. es wurde ein Trenn- und ein Sammelgel gegossen. Die Acrylamidkonzentration der Trenngele (375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS) betrug je nach Größe der aufzutrennenden Proteine 10-13%. Das Sammelgel hatte eine Acrylamidkonzentration von 2% (125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS). Zur Polymerisation wurden die Gele mit je $150 \mu\text{l}$ 10 APS und $30 \mu\text{l}$ TEMED pro 45 ml Endvolumen versetzt. Die Proteine wurden für 60-90 min bei 25 mA pro Mini-Gel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese erfolgte die Darstellung der Proteine durch Coomassie-Blaufärbung (2.4.5) oder *Western-Blot*-Analyse (2.4.6).

2.4.5 Coomassie-Blaufärbung

Nach Auftrennung im Gel (2.4.4) wurden die Proteine durch Coomassie-Blau angefärbt. Dazu wurden die Gele 10 min in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Nicht gebundener Farbstoff wurde anschließend durch wiederholtes Schwenken in Coomassie-Entfärber ausgewaschen.

2.4.6 Western-Blot-Analyse

Nach der SDS-PAGE (2.4.4) erfolgte der Elektrotransfer der Proteine auf eine ImmobilonP-Membran in einer Nassblotapparatur nach Anleitung des Herstellers.

Zum immunchemischen Nachweis von Proteinbanden wurde der Blot geblockt (1-4 h in TBS-T-5% MP) und mit dem Primärantikörper in TBS-T-5% MP geschwenkt (1 h, RT, oder ü.N., 4°C). Danach wurde kurz mit TBS-T-Puffer gespült und dreimal 15 min mit TBST

gewaschen. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper in TBS-T-5% MP (30 min bis zu 1 h, RT) wurde der Blot erneut mit TBS-T-Puffer gespült und viermal 15 min mit TBS-T-Puffer gewaschen.

Die Immundetektion erfolgte mit dem *Super Signal Ultra* Chemilumineszenz-Substrat nach Anleitung des Herstellers. Die Proteinbanden wurden durch Auflegen und Entwickeln von Röntgen-Filmen sichtbar gemacht.

2.5 Gelretardations-Analyse (*electrophoretic mobility shift assay*, EMSA)

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

Die Reaktionsansätze aus radioaktiv markierten, aufgereinigten PCR-Fragmenten (2.2.12.2 und 2.2.19), Proteinen (2.4.1) und Antikörpern (optional) wurden in DNA-Bindpuffer für 30 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von DNA-Probenpuffer in einem 4%igen nativen, kontinuierlichen Polyacrylamidgel (1:19 Bisacrylamid) in 1 x RegG-Puffer bei einer Spannung von 180 V durchgeführt. Das Gel wurde danach auf Filterpapier unter Vakuum bei 80°C getrocknet und auf X-OMAT-Röntgenfilmen exponiert.

2.6 Virologische Techniken

2.6.1 Herstellung von Virenüberständen

Zur Herstellung der Virussuspension wurde das ins bakterielle Plasmid klonierte Virusgenom (10 µg Plasmid-DNA, s. 2.1.10 und 3.1 mit Unterpunkten) mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode (2.3.2.1) in 1×10^6 COS-1-Zellen transfiziert. In den nächsten Tagen wurden die Zellen zunächst auf drei Schalen verteilt, um dann schließlich auf je drei 175 cm²-Flaschen verteilt zu werden. Die Inkubation erfolgte bei der permissiven Temperatur von 32°C. Nach zwei bis drei Wochen waren eine deutliche Lyse der Zellen zu beobachten. Um noch verbliebene Zellen aufzubrechen, wurden diese zweimal eingefroren und aufgetaut. Die

Zelltrümmer wurden pelletiert (1000 x g, 5 min, RT), der virushaltige Überstand sterilfiltriert (0,2 µm Porenweite), aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.6.2 Konzentrierung von Virenüberständen

Um Virenüberstände mit niedrigem Titer zu konzentrieren, wurde eine MinitanS-Ultrafiltrationsanlage benutzt. Bei dieser Tangentialfiltration wurde der verdünnte Virusüberstand entlang einer Membran mit einem Ausschlussvolumen von 100 kDa gepumpt. Die Viruspartikel wurden zurückgehalten und das Medium durch die Membran filtriert. Der zurückgehaltene Virusüberstand wurde so aufkonzentriert (10-15 ml Volumen), sterilfiltriert (0,2 µm Porenweite) und bei -70°C gelagert.

2.6.3 Infektion von eukaryontischen Zellen

Die Virenüberstände (aus 2.6.1 oder 2.6.2) wurden bei RT aufgetaut und 10 s sonifiziert, um Aggregate aufzulösen. COS-1- oder CV1-Zellen in Schalen wurden vom Erhaltungsmedium befreit und mit Virenüberständen in der gewünschten Verdünnung infiziert, indem diese inkubiert (39°C, 1,5 h) und dabei mindestens alle 15 Minuten geschwenkt wurden. Danach wurde die Virus-Suspension abgesaugt, einmal mit DMEM gewaschen und inkubiert.

2.6.4 Bestimmung der MOI (*multiplicity of infection*)

Um die Effizienz der Infektion zu bestimmen, wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen/6-Loch-3,5 cm-Schale COS-1-Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Der zu testende Virusüberstand (aus 2.6.1 und/oder 2.6.2) wurde in geeigneter Weise mit DMEM verdünnt. Die Zellen wurden jeweils mit 200 µl des Virenüberstandes infiziert (s. 2.6.3). Nach Inkubation (39°C, 48 h) wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen entnommen. Die adhären auf den Deckgläschen wachsenden Zellen wurden zunächst in kaltem Methanol fixiert (-20°C, 5 min) und dann in Aceton permeabilisiert (-20°C, 5 min). Durch die indirekte Immunfluoreszenz (2.6.5) war es nun möglich, den Anteil der FAg-positiven gegen die Gesamtzahl der Zellen auszuzählen. Die MOI gibt die Anzahl der infektiösen Viruspartikel im Verhältnis zur eingesetzten Zellzahl an.

2.6.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Mit SV40 infizierte Zellen exprimieren das T-Ag, welches in der indirekten Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden kann. Die fixierten und permeabilisierten Zellen auf Deckgläschen (s. 2.6.4) wurden zunächst getrocknet.

Zuerst wurde die Zellen auf den Deckgläschen mit pAb108 inkubiert (30 min, 37°C). Vor, zwischen und nach den Antikörperinkubationen wurden die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Als zweites folgte eine Inkubation mit Ziege-Anti-Maus-Biotin, als drittes Streptavidin-Cy3-Konjugat. Streptavidin bindet mit hoher Affinität an Biotin. Da mehrere Streptavidin-Moleküle an ein Biotin-Molekül binden, wird eine deutliche Signalverstärkung erreicht. Abschließend wurde zweimal mit H₂O gewaschen und die Zellen in einem Tropfen Mounting Medium eingebettet. Nach Aushärtung (ü.N., im Dunkeln) konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden (Anregungswellenlänge $\lambda=550$ nm). Es wurden jeweils mindestens drei Gesichtsfelder ausgezählt. Die angefärbten Zellen wurden dann gegen die Gesamtzellzahl dividiert, um die MOI zu erhalten.

2.6.6 Rekombinations-Assay

(Wiesmüller *et al.*, 1996)

Im Rekombinations-Assay werden die interchromosomalen Rekombinationsfrequenzen geeigneter Viruspaare in verschiedenen Zellen gemessen. Die eingesetzten Viren tragen unterschiedliche Mutationen im VP1-Gen, die jeweils zu einem temperatursensitiven Phänotyp führen. Viruspartikel können nur bei der permissiven Temperatur von 32°C gebildet werden. Unter restriktiven Bedingungen (39°C) können sich nur die durch Rekombination zweier Mutantenpartikel entstandenen Wildtyp-Viren vermehren. Die Zellen wurden 24 h vor der Infektion mit einer Dichte von $1,5-2 \times 10^5$ -Zellen pro Loch einer 6-Loch-3,5 cm-Platte in Erhaltungsmedium mit Zusatz von 1 μ M Östradiol ausgesät. Es wurden jeweils Zweifachbestimmungen für die Wildtyp-Viren und Vierfachbestimmungen für die Doppelinfektionen mit den Mutanten-Viren durchgeführt. Die Virenüberstände wurden bei RT aufgetaut, 10 s sonifiziert und auf die zur Infektion eingesetzte MOI verdünnt. Für die Doppelinfektionen wurden Virusmischungen hergestellt. Die Zellen wurden mit 170 μ l der verdünnten Virensuspension/Loch infiziert (s. 2.6.3) und inkubiert (84 h, 39°C). Die Platten wurden bei -20°C eingefroren, aufgetaut und erneut eingefroren, wieder aufgetaut und der

Überstand sterilfiltriert und bis zur Bestimmung der Virustiter im Plaque-Assay (2.6.7) in Reaktionsgefäßen bei 4°C aufbewahrt.

2.6.7 Plaque-Assay

(Wiesmüller *et al.*, 1996)

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

24 h vor der Infektion wurden 3×10^6 Zellen/10 cm-Schale ausgesät, so dass am nächsten Tag ein dichter Zellrasen entstanden war. Die Infektion (s. 2.6.3) erfolgte mit je 400 µl Zellüberstand aus dem „Rekombinations-Assay“ (2.6.6). Die Wildtyp-Virenüberstände wurden dabei in geeigneter Weise verdünnt (1:1000-1:10000), die Überstände aus Doppel- und Einzelinfektionsüberständen wurden unverdünnt eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Platten mit je 12 ml flüssigem Softagar (40°C) überschichtet und nach Festwerden des Softagars 21 Tage (mit Wildtyp-Viren infizierte Zellen) bzw. 24 Tage (mit Mut1/Mut2-Viren infizierte Zellen) bei 39°C inkubiert.

Zur Fixierung und Färbung wurden die Schalen mit Kristallviolettlösung überschichtet und nach mindestens 2 h wurde der Softagar abgeschlagen, die Platten mit H₂O gewaschen und getrocknet.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das bereits etablierte, auf SV40-Viren basierende Testsystem (Wiesmüller *et al.*, 1996) zur Messung von homologen Rekombinationsereignissen auf die Anwendung zur Untersuchung des Einflusses von in *cis* wirkenden DNA-Elementen auf die Rekombination erweitert werden.

Hierzu mussten zunächst die SV40-Virengenome dergestalt modifiziert werden, dass sie in der Lage waren, bei gleichzeitiger Gewährleistung einer normalen Virenproduktion (s. 2.6), Fremdsequenzen aufzunehmen. Konsequenterweise waren die Verkleinerung (s. 3.1.1.1) und die Einführung von neu kreierten, multiplen Klonierungsstellen für die Aufnahme von Fremdsequenzen in die SV40-Genome (s. 3.1.1.2 und 3.1.1.3) eine Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Systems. Die Virenproduktion wurde durch Bestimmung der MOI (s. 2.6.4) quantifiziert (s. 3.1.3). Die Reisolierung der viralen DNAs (s. 2.2.6) mit nachfolgenden Restriktionsverdau (s. 2.2.17) und anschließender Analyse nach DNA-Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.18) stellten sicher, dass keine unerwünschten Rearrangements mit der viralen Amplifikation einhergegangen waren (s. 3.1.4). Die neu generierten und charakterisierten Viren (pro Fremdsequenz jeweils zwei temperatursensitive Mutanten (Mut)-Viren und ein Wildtyp (Wt)-Virus) standen so für Rekombinationsstudien zur Verfügung (s. 3.3).

Für die Untersuchungen wurden DNA-*cis*-Elemente ausgewählt, die unter 3.1.2 ausführlich vorgestellt werden. Dazu gehören sowohl Fragmente aus Bruchpunktregionen mit ursächlicher Beteiligung an der Entstehung von Leukämien (*MLL*, *TAL1*, *LMO2*, *RAR α* ; siehe Reichel *et al.*, 1999; Boehm *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1990; Alcalay *et al.*, 1991) als auch solche aus zwei *MAR*-Sequenzen (Boulikas & Kong, 1994; Will *et al.*, 1998a; 1998b) und aus repetitiver DNA [eine *RGC*-Sequenz mit 13 Kopien einer Wtp53-Erkennungssequenz (Kern *et al.*, 1992), deren mutiertes Gegenstück und ein *CTG-repeat* (Bowater *et al.*, 1996)].

Mit dieser Auswahl an rekombinanten Viren sollte es nun möglich sein, zu untersuchen, inwieweit DNA-Elemente Rekombinationsprozesse in *cis* modulieren.

Um zu überprüfen, ob Rekombination in Nachbarschaft dieser *cis*-Elemente durch Proteine wie p53 und auch PARP-1 in *trans* beeinflusst wird, sollten Primatenzell-Klone eingesetzt werden, die sich hinsichtlich ihres p53- als auch ihres PARP-1-Status unterscheiden. Neben den schon etablierten LLC-MK₂-Klonen mit funktionell anschaltbarem Wtp53 (Dudenhöffer *et al.*, 1998) und einem Wtp53- und/oder PARP-1-exprimierenden Zellsystem (LMV2-p53her-K18, LMV2-PARP-K13, LMV2-p53herPARP-K11) sollten weitere Wtp53-exprimierende und auch p53(138V) exprimierende LLC-MK₂-Klone etabliert und charakterisiert werden (s. 2.3 und 3.2).

Mithilfe von Gelretardations-Analysen (EMSA, s. 2.5) sollten interessante DNA-*cis*-Elemente hinsichtlich ihrer spezifischen Erkennung durch p53 untersucht werden (s. 3.5).

Da insbesondere aufgrund jüngster Publikationen (Flores-Rozas & Kolodner, 2000; Saintigny, *et al.*, 2001; Janz & Wiesmüller, 2002) von einer engen Verknüpfung zwischen DNA-Replikation und Rekombination auszugehen ist, wurde die *de novo* DNA-Synthese der rekombinanten SV40-Viren unter Rekombinations-*Assay*-Bedingungen durch DNA-Markierung mit [³H]-Thymidin untersucht (2.2.5, 2.2.6, 2.2.20.2 und 3.4).

Studien unter Applikation verschiedener Chemotherapeutika sollten schließlich zur Aufklärung beitragen, ob sich das neu aufgebaute System für die Risikoabschätzung der Generierung von sekundären Leukämien nach Gabe bestimmter Therapeutika unter Berücksichtigung des genetischen Hintergrundes eignet (s. 3.6).

3.1 Etablierung eines auf SV40 basierenden Testsystems zur Untersuchung der Rolle von DNA-*cis*-Elementen bei der homologen Rekombination

Zur Untersuchung des Einflusses von *cis*-Elementen, hier besonders krankheitsassoziierten Sequenzen, auf die homologe Rekombination sollte das auf SV40 basierende Testsystem (Wiesmüller *et al.*, 1996) angewandt werden. Dieses System basiert auf effizientem Gentransfer durch virale Infektion und nachfolgendem genetischen Austausch zwischen verschiedenen mutierten SV40-„Minichromosomen“. Es beruht auf zwei temperatursensitiven SV40-Mutanten, die jeweils an verschiedenen Stellen eine Punktmutation im VP1-Gen tragen (s. Abbildung 3.1). Beide Mutationen führen zur Expression eines temperatursensitiven VP1-Hüllproteins (Ng *et al.*, 1985), deren Defekte sich nicht in *trans* kompensieren. Bei der restriktiven Temperatur von 39°C werden die Viren, die die Mutationen tragen, auf der gleichen Stufe der Virusassemblierung geblockt. Nur bei der permissiven Temperatur von 32°C können Viruspartikel produziert werden. Dieser temperatursensitive Phänotyp erlaubt es, infektiöse Partikel nach Kalziumphosphat-Transfektion (s. 2.3.2) der manipulierten Vireng Genome in Affennierenzellen bei 32°C zu produzieren. Koinfiziert man die Zellen bei 39°C mit beiden temperatursensitiven Viren, so können sich nur die durch homologe Rekombination zweier mutanter Virenpartikel entstandenen Wt-Viren vermehren (s. 2.6.6). Zur Ermittlung der freigesetzten Viruspartikel wird ein Virusnachweis genutzt, der darauf beruht, dass SV40-Wt-Viren Zellen der grünen Meerkatze (CV1-Zellen) lysieren. Nach Infektion und Übersichtung mit Softagar (wiederum bei 39°C) bilden sich Löcher (Plaques)

im Zellrasen, da jeweils nur die benachbarten Zellen vom Infektionsherd ausgehend infiziert werden können. Diese Löcher werden nach Anfärbung sichtbar und können ausgezählt werden. Die Rekombinationsfrequenz kann nun durch die Anzahl der *plaque forming units* (pfu) aus koinfizierten Zellen versus der Anzahl aus SV40-Wt-infizierten Zellen ermittelt werden.

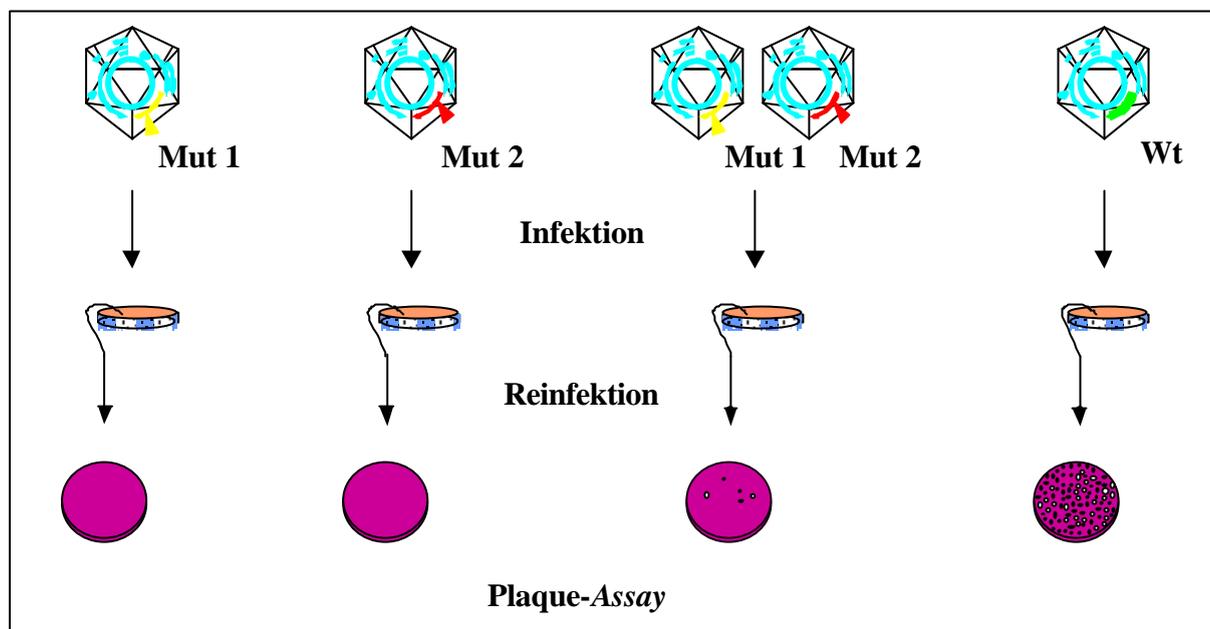


Abbildung 3.1: Auf SV40-Infektion und Virusfreisetzung basierendes Testsystem zur quantitativen Messung von homologen Rekombinationsereignissen. Mut1 bezeichnet den Virus SV40-tsVP1(K290T), Mut2 den Virus SV40-tsVP1(H196Y), Wt den Virus SV40-Wt (nach Wiesmüller *et al.*, 1996).

Dieses Testsystem bietet entscheidende Vorteile gegenüber anderen Testsystemen, die auf der Einführung von Rekombinationssubstraten durch Transfektion beruhen. Die DNA-Substrate sind in Nukleosomen verpackt, so dass keine Aktivierung von Reparaturwegen durch nackte DNA in Gang gesetzt werden sollte; die virale Infektion erlaubt einen effizienten DNA-Transfer; die leichte Manipulierbarkeit, Reisolierung und Analyse der DNA-Substrate bietet die Möglichkeit, den rekombinatorischen Effekt der DNA mit dessen Struktur zu korrelieren.

3.1.1 Notwendige Modifizierung des Systems

Das Nachweissystem bietet grundsätzlich die Möglichkeit, in *cis* wirkende DNA-Elemente auf deren Einfluss bei der Rekombination zu testen. Hierzu musste das System aber dergestalt modifiziert werden, dass es Fremdsequenzen aufnehmen kann, ohne die Virusbiologie zu stören. Dies geschah zunächst durch Verkleinerung des Genoms und anschließend durch Einführung multipler Klonierungsstellen für die Aufnahme der Fremdsequenzen. Die Lage

der multiplen Klonierungsstellen sollte in zwei verschiedenen Positionen innerhalb des Virengensoms, nämlich in Nachbarschaft der Rekombinations-Marker und der Replikations-Terminations-Region (s. 3.1.1.2, *Cla-Linker*) oder in Nachbarschaft des Replikations-Ursprungs (Ori) (s. 3.1.1.3, *Bgl-Linker*) inseriert werden, um einen möglichen Einfluss der Lage auf Ergebnisse aus Rekombinationsversuchen beziehen zu können. In Abbildung 3.2 sind schematisch die Viren, die neu erzeugt werden sollten, dargestellt.

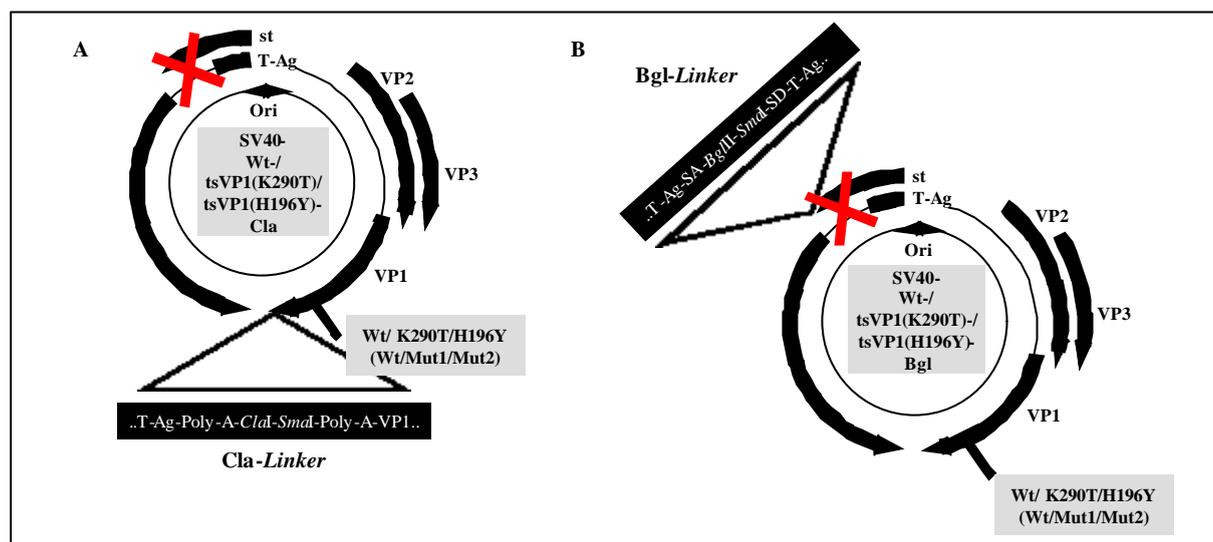


Abbildung 3.2: Testsystem für die Rekombination in Nachbarschaft von DNA-Fremdsequenzen in SV40-Chromosomen. In (A) ist der *Cla-Linker*, dessen *ClaI*- und *SmaI*-Klonierungsstellen in Nachbarschaft der Rekombinations-Marker und der Replikations-Terminations-Region eingeführt sind, dargestellt. In (B) ist der *Bgl-Linker*, dessen *BglII*- und *SmaI*-Klonierungsstellen in Nachbarschaft des Replikations-Ursprungs (Ori) inseriert sind, dargestellt. Die roten Kreuze markieren schematisch die deletierten 269 bp aus dem T-Ag-Intron (*Cla-Linker*) bzw. 252 bp (*Bgl-Linker*). Wt bezeichnet die Wt-Sequenz, tsVP1(H196Y) (Mut2) bezeichnet die Mutation C2084T, tsVP1(K290T) (Mut1) die Mutation A2367C. Poly-A bezeichnet das Polyadenylierungs-Signal, SA den Spleiß-Akzeptor, SD den Spleiß-Donor.

Die in dieser Arbeit generierten Plasmide sind in Fettdruck und unterstrichen dargestellt. Weitere Plasmide sind in Normaldruck mit Unterstreichung dargestellt. Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft (2.2.11).

3.1.1.1 Verkleinerung des SV40-Genoms als Vorbereitung für die Klonierung der *Cla-Linker*

Um Fremdsequenzen von bis zu 500 bp in die Virengnome aufzunehmen, ohne die Verpackungsgrenze zu überschreiten, mussten die für temperatursensitive Hüllproteine kodierenden Indikatorchromosomen [tsVP1(K290T) (Mut1) und tsVP1(H196Y) (Mut2)] und auch das SV40-Wt-Kontrollchromosom verkleinert werden. Das kleine Tumorantigen (st) ist weder für die virale Replikation noch für die Virusproduktion essentiell und bot sich somit als Ansatzpunkt für die Verkleinerung der Genome an. In Abbildung 3.3 ist die Strategie zur Generierung von *st*-negativen (*st*⁻) Virengensomen schematisch dargestellt. Zunächst wurde

der das SV40-Genom enthaltende Vektor pG2111B, bei welchem der Leserahmen des *st* durch die Entfernung von 269 bp aus dem großen *T-Antigen (T-Ag)*-Intron zerstört war, mit den Restriktionsendonukleasen *Sfi*I und *Bam*HI verdaut (2.2.17). Das 2432 bp große Fragment, das den um 269 bp deletierten Bereich enthält, wurde isoliert (2.2.18 und 2.2.19). pUC-SV40, pUC-Kpn-SV40-VP1-H196Y, pUC-Kpn-SV40-VP1-P286S und pUC-Kpn-SV40-VP1-K290T wurden nach *Sfi*I/*Bam*HI-Verdau und Dephosphorylierung mit *SAP* (2.2.15) für die Ligation (2.2.16) mit dem *Sfi*I-*Bam*HI-Fragment eingesetzt. Es entstanden so die neuen Plasmide pUC-SV40-*st*, pUC-SV40-*tsVP1(H196Y)*-*st*, pUC-SV40-*tsVP1(P286S)*-*st* und pUC-SV40-*tsVP1(K290T)*-*st*. Bei der weiteren Beschreibung von Klonierungen in dieser Arbeit wird auf die oben angegebenen Standardverfahren nicht mehr gesondert verwiesen. Die Klonierung wurde von Fr. Prof. Dr. L. Wiesmüller durchgeführt.

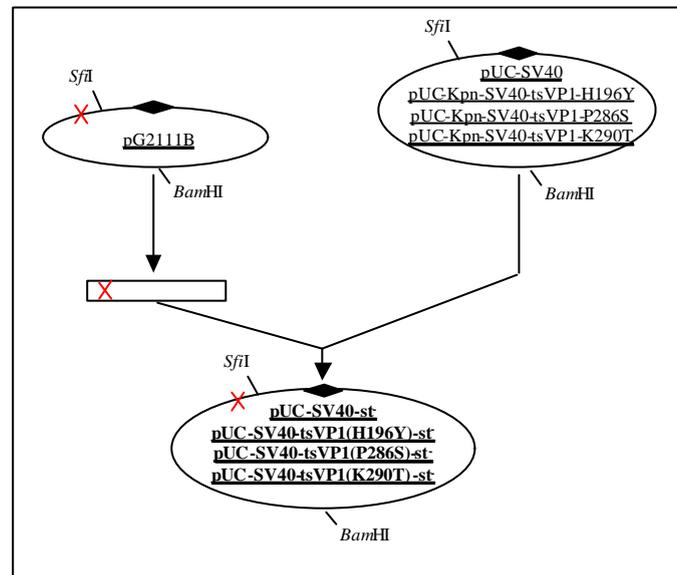


Abbildung 3.3: Klonierung der Vektoren pUC-SV40-*st*, pUC-SV40-*tsVP1(H196Y)*-*st*, pUC-SV40-*tsVP1(P286S)*-*st* und pUC-SV40-*tsVP1(K290T)*-*st*. Die roten Kreuze markieren schematisch die deletierten 269 bp aus dem *T-Ag*-Intron. Die Größe des SV40-Genoms verringerte sich hiermit von 5243 bp auf 4974 bp. Die schwarze Raute gibt als Orientierung die Lage des Ori an, dargestellt ist nur das SV40-Genom ohne bakterielle Vektoranteile. *Sfi*I und *Bam*HI geben schematisch die Lage der Schnittstellen an. H196Y gibt die Mutation C2084T, K290T die Mutation A2367C und P286S die Mutationen C2354T und C2356T an.

3.1.1.2 Klonierung der *Cla*-Linker

Die Einführung multipler Klonierungsstellen war eine Voraussetzung für die Einführung von Fremdsequenzen in das Virengenom. Dieser neue *Linker* sollte in die Nachbarschaft der Rekombinations-Marker und der Replikations-Terminations-Region, also zwischen den Genen kodierend für T-Ag und VP1, also zwischen früh und spät exprimierten Genen, eingeführt werden. Um die Einfügung des *Linkers* zu erreichen, war eine Verdopplung von 150 bp der überlappend transkribierten Bereiche von *T-Ag* und *VP1* über die unten beschriebene PCR-Klonierungsstrategie notwendig. Für die Einfügung einer jeweils

einmaligen *Cla*I- und einer *Sma*I-Restriktionsenzym-Erkennungssequenz als multipler Klonierungsstelle (MCS), dem *Cla*-Linker, wurde eine synthetische *Bg*III-Schnittstelle mit der kompatiblen *Bam*HI-Schnittstelle im SV40-Genom verknüpft. In Abbildung 3.4 ist die Klonierungsstrategie dargestellt.

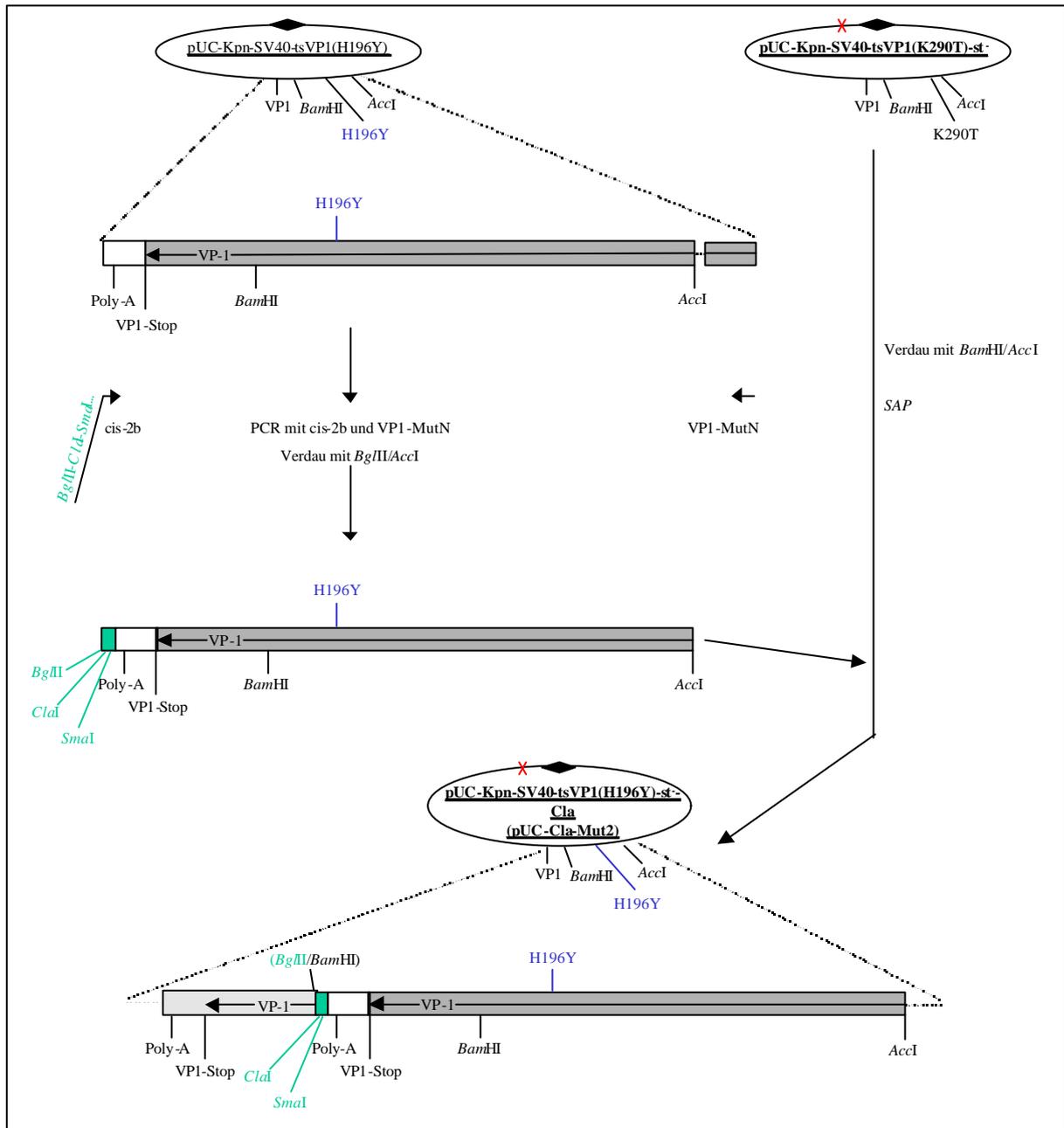


Abbildung 3.4: Klonierung des Plasmids **pUC-SV40-tsVP1(H196Y)-st-Cla** (kurz **pUC-Cla-Mut2**). Die Oligonukleotide *cis*-2b und *VP1*-MutN wurden zur Einführung der Schnittstellen *Bg*III, *Cla*I und *Sma*I (in türkis) über eine PCR-Reaktion benutzt. Die duplizierten 150 bp befinden sich zwischen der *Bg*III/*Bam*HI-Schnittstelle (zerstörte Erkennungssequenzen durch Einklammerung gekennzeichnet), der neuen MCS (türkiser Balken) und der (intakten) *Bam*HI-Schnittstelle. Poly-A bezeichnet das Polyadenylierungssignal, *VP1*-Stop das Stop-Kodon von *VP1* (in grau die intakte *VP1*-Sequenz, in grau schraffiert das zerstörte ursprüngliche Ende der *VP1*-Sequenz). Die Mutation C2084T kodierend für H196Y auf Aminosäureebene ist als H196Y in blau dargestellt und A2367C für K290T. Die roten Kreuze markieren schematisch die deletierten 269 bp aus dem *T*-Ag-Intron.

Zur Generierung von **pUC-SV40-tsVP1(H196Y)-st'-Cla** (oder kurz **pUC-Cla-Mut2**) wurde zunächst eine PCR-Reaktion (2.2.12.1) mit dem Plasmid **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)** (s. 3.1.1.1) als Matrize und den Oligonukleotiden cis-2b und VP1-MutN durchgeführt. Nach Verdau mit *Bgl*III/*Acc*I wurde das 923 bp große Fragment isoliert. **pUC-Kpn-SV40-VP1(K290T)-st'** wurde nach *Bam*HI/*Acc*I-Verdau und Dephosphorylierung mit *SAP* für die Ligation mit dem *Bgl*III/*Acc*I-geschnittenen PCR-Fragment eingesetzt. Das so entstandene Plasmid **pUC-SV40-tsVP1(H196Y)-st'-Cla** (oder kurz **pUC-Cla-Mut2**) beinhaltet den neu generierten *Cla*-Linker. Die Klonierung wurde von Fr. E. Bendrat durchgeführt.

Die Generierung des Konstrukts **pUC-SV40-st'-Cla-Wt** (oder kurz als **pUC-Cla-Wt** bezeichnet) ist schematisch in Abbildung 3.5 dargestellt.

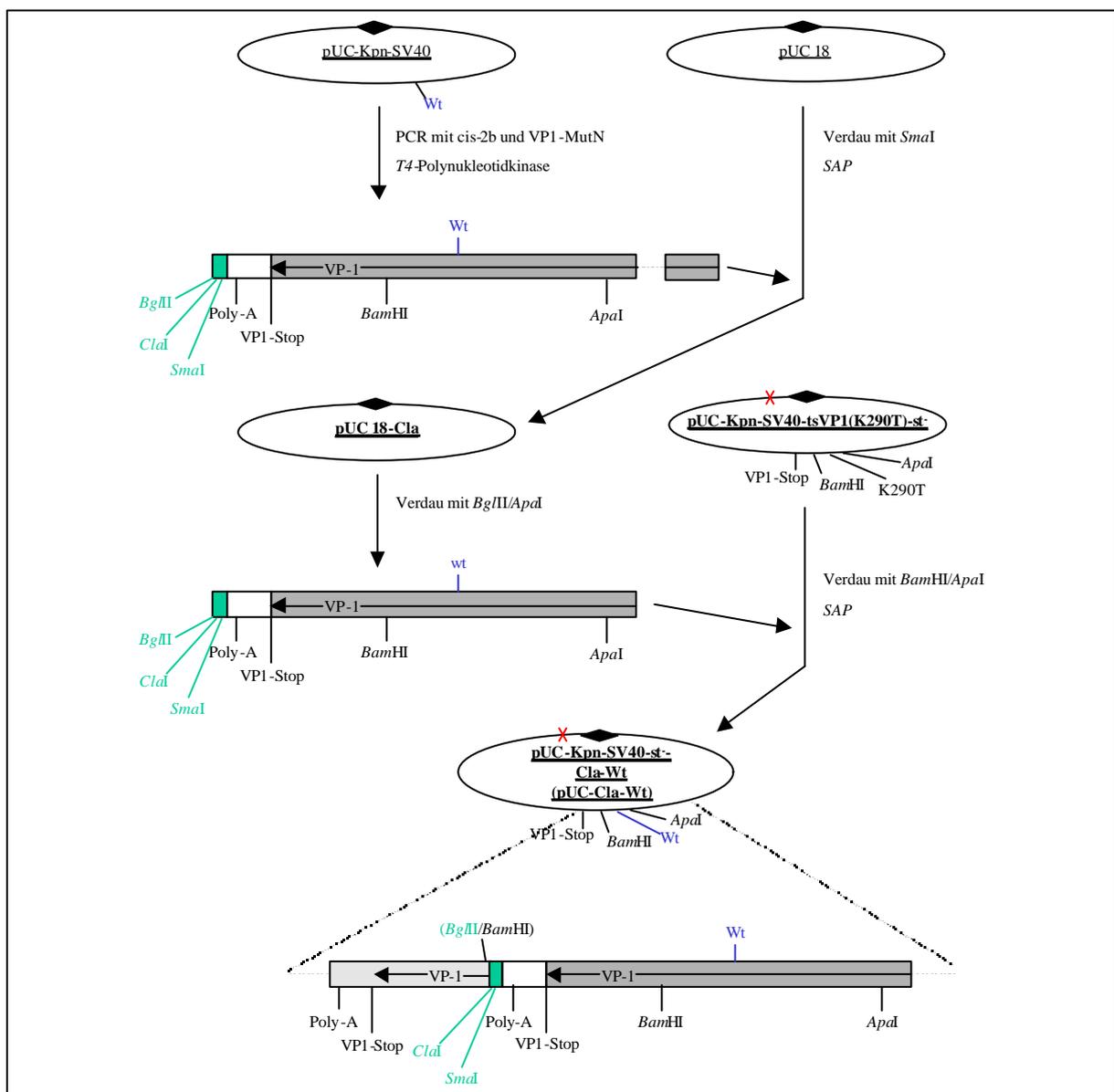


Abbildung 3.5: Klonierung des Plasmids **pUC-Kpn-SV40-st-Cla-Wt** (**pUC-Cla-Wt**). Die Oligonukleotide cis-2b und VP1-MutN wurden zur Einführung der Schnittstellen *Bgl*III, *Cla*I und *Sma*I (in türkis) über eine PCR-Reaktion benutzt. Die duplizierten 150 bp befinden sich zwischen der *Bgl*III/*Bam*HI-Schnittstelle (zerstörte Erkennungssequenzen durch Einklammerung gekennzeichnet) der neuen MCS (türkiser Balken) und der (intakten) *Bam*HI-Schnittstelle. Poly-A bezeichnet das Polyadenylierungssignal, VP1-Stop das Stop-Kodon von *VP1* (in grau die intakte *VP1*-Sequenz, in grau schraffiert das zerstörte ursprüngliche Ende der *VP1*-Sequenz), Wt (in blau) bezeichnet die Wt-*VP1*-Sequenz. Die Mutation A2367C, kodierend für K290T auf Aminosäureebene, ist als K290T bezeichnet. Die roten Kreuze markieren schematisch die deletierten 269 bp aus dem *T-Ag*-Intron.

Es wurde zunächst eine PCR-Reaktion mit dem Plasmid **pUC-Kpn-SV40** als Matrize und den Oligonukleotiden cis-2b und VP1-MutN durchgeführt. Nach Kinasierung (2.2.13) wurde das 1140 bp große Fragment isoliert. **pUC 18** wurde nach *Sma*I-Verdau und Dephosphorylierung mit *SAP* zur Ligation mit dem kinasierten PCR-Fragment eingesetzt. Es entstand so das Plasmid **pUC 18-Cla**, das neben dem *Linker* auch die Wt-Sequenz des *VP1* trägt. **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st** wurde nach *Bam*HI/*Apa*I-Verdau und Dephosphorylierung mit *SAP* für die Ligation mit dem isolierten *Bgl*III/*Apa*I-Fragment aus **pUC 18-Cla** eingesetzt. Es entstand so das Plasmid **pUC-Kpn-SV40-st-Cla** bzw. **pUC-Cla-Wt**. Die Klonierung wurde von Fr. E. Bendrat durchgeführt.

Die Generierung von **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st-Cla** (oder kurz als **pUC-Cla-Mut1** bezeichnet) ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

Zur Generierung wurde zunächst eine PCR-Reaktion mit dem Plasmid **pUC-Cla-Wt** (s. oben) als Matrize und den Oligonukleotiden cis-2b und VP1-MutN durchgeführt. Nach Verdau mit *Sfi*I/*Bam*HI wurde das 2282 bp große Fragment isoliert. **pUC-Kpn-SV40-VP1(K290T)-st** wurde nach *Sfi*I/*Bam*HI-Verdau und Dephosphorylierung mit *SAP* für die Ligation mit dem *Sfi*I/*Bam*HI-geschnittenen PCR-Fragment eingesetzt. Es entstand so das Plasmid **pUC-SV40-tsVP1(K290T)-st-Cla** (oder kurz **pUC-Cla-Mut1**). Die Klonierung wurde von Fr. E. Bendrat durchgeführt.

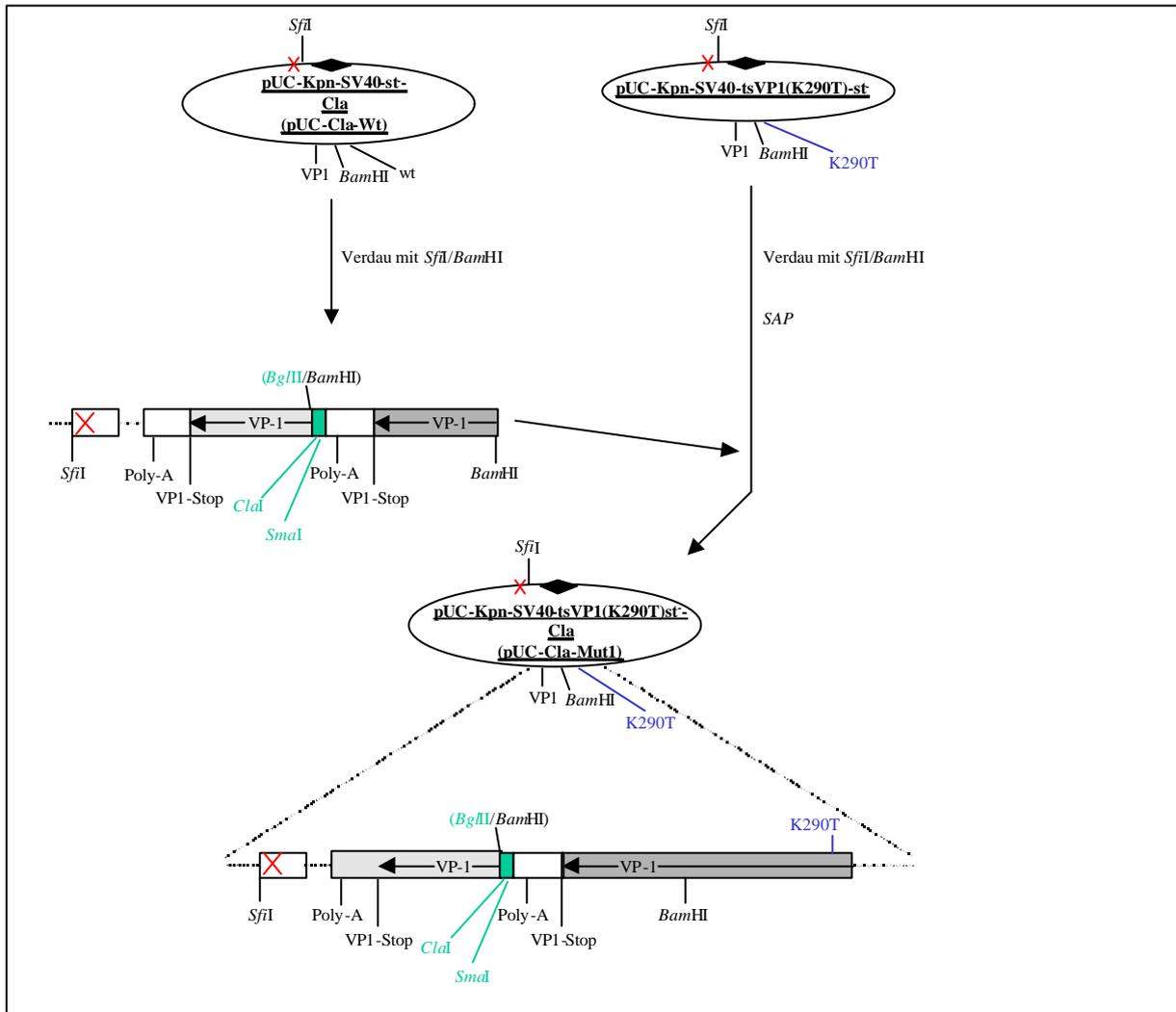


Abbildung 3.6: Klonierung des Plasmids **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st-Cla (pUC-Cla-Mut1)**. Die Oligonukleotide cis-2b und VP1-MutN wurden zur Einführung der einmaligen Schnittstellen *Clal* und *SmaI* (in türkis) über eine PCR-Reaktion benutzt. Die duplizierten 150 bp befinden sich zwischen der *BglIII/BamHI*-Schnittstelle (zerstörte Erkennungssequenzen durch Einklammerung gekennzeichnet) der neuen MCS (türkiser Balken) und der (intakten) *BamHI*-Schnittstelle. *Poly-A* bezeichnet das Polyadenylierungssignal, *VP1-Stop* das Stop-Kodon von *VP1* (in grau die intakte *VP1*-Sequenz, in grau schraffiert das zerstörte ursprüngliche Ende der *VP1*-Sequenz). Die Mutation A2367C, kodierend für K290T auf Aminosäureebene ist in blau als K290T dargestellt und Wt bezeichnet die Wt-*VP1*-Sequenz. Die roten Kreuze markieren schematisch die deletierten 269 bp aus dem *T-Ag*-Intron.

3.1.1.3 Klonierung der *Bgl-Linker*

Bei der Einführung von Klonierungsstellen in Nachbarschaft des Replikations-Ursprungs (*Bgl-Linker*) wurde gleichzeitig ein Bereich von 252 bp aus dem Intronbereich von *T-Ag* deletiert. Hierbei blieben die Spleiß-Akzeptor- und -Donorsequenzen erhalten. In Abbildung 3.7 ist die Klonierungsstrategie dargestellt.

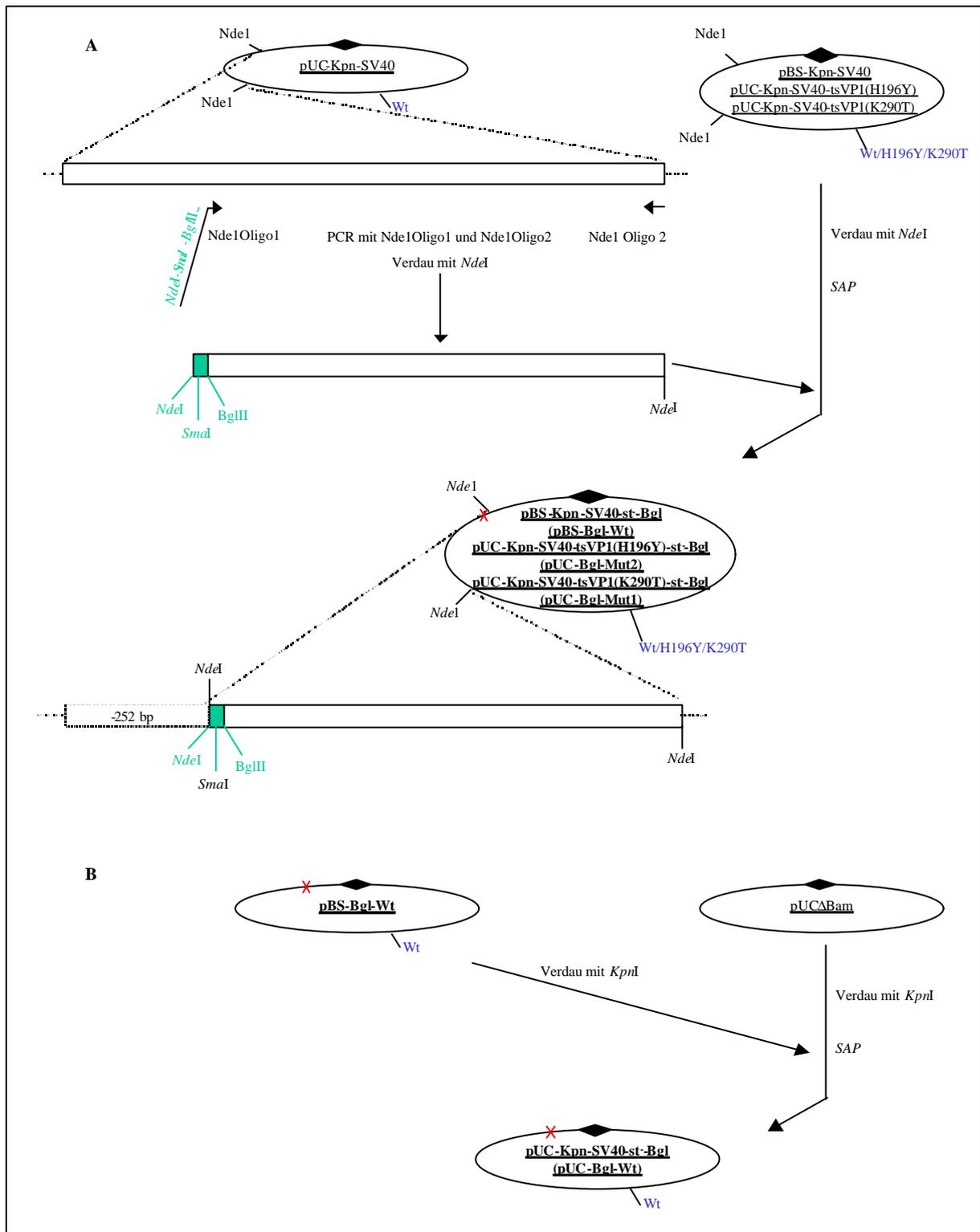


Abbildung 3.7: Klonierung der Plasmide **pBS-Kpn-SV40-st-Bgl** (kurz **pBS-Bgl-Wt**), **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-st-Bgl** (kurz **pUC-Bgl-Mut2**) und **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st-Bgl** (kurz **pUC-Bgl-Mut1**) und **pUC-Kpn-SV40-st-Bgl** (kurz **pUC-Bgl-Wt**). In (A) ist die Klonierung des Bgl-Linkers dargestellt, in (B) die Umklonierung von pBS-Bgl-Wt in pUC-Bgl-Wt. Die Oligonukleotide Nde1Oligo1 und Nde1Oligo2 wurden zur Einführung der Schnittstellen *NdeI*, *SmaI* und *BglIII* (in türkis) über eine PCR-Reaktion benutzt. H196Y (in blau) bezeichnet die Mutation C2084T, K290T die Mutation A2367C und Wt die Wt-Sequenz in VP1. Die roten Kreuze und der gestrichelt dargestellte Balken markieren schematisch die deletierten 252 bp aus dem T-Ag-Intron.

Zur Generierung von **pBS-Kpn-SV40-st⁻-Bgl** (kurz **pBS-Bgl-Wt**), **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-st⁻-Bgl** (kurz **pUC-Bgl-Mut2**) und **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st⁻-Bgl** (kurz **pUC-Bgl-Mut1**) wurde zunächst eine PCR-Reaktion mit pUC-Kpn-SV40 als Matrize und den Oligonukleotiden Nde1Oligo1 und Nde1Oligo2 durchgeführt. Nach Verdau mit *NdeI* wurde das 781 bp große Fragment isoliert. **pBS-Kpn-SV40**, **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)** und **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)** wurden nach *NdeI*-Verdau und Dephosphorylierung mit *SAP* für die Ligation mit dem *NdeI*-verdauten PCR-Fragment eingesetzt. Es entstanden so die Plasmide **pBS-Kpn-SV40-st⁻-Bgl** (kurz **pBS-Bgl-Wt**), **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-st⁻-Bgl** (kurz **pUC-Bgl-Mut2**) und **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st⁻-Bgl** (kurz **pUC-Bgl-Mut1**). Anschließend erfolgte eine Umklonierung von **pBS-Bgl-Wt** über *KpnI* in pUCΔBam (s. Abbildung 3.7 B), so dass das Plasmid **pUC-Kpn-SV40-st⁻-Bgl** (kurz **pUC-Bgl-Wt**) entstand. Die Klonierung wurde, bis auf die Umklonierung, von Fr. E. Bendrat durchgeführt.

3.1.2 Auswahl und Klonierung der zu untersuchenden DNA-*cis*-Elemente

Mit den beiden, unter 3.1.1 beschriebenen, modifizierten Testsystemen war es nun möglich, DNA-*cis*-Elemente mit einer Größe von bis zu 500 bp auf ihren Einfluss auf die Rekombination zu untersuchen. Hierzu mussten zunächst die für die Rekombinationsstudien interessanten Bereiche ausgewählt werden, die anschließend in die Konstrukte **pUC-Kpn-SV40-st⁻-Cla/Bgl-Wt** (**pUC-Cla/Bgl-Wt**), **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st⁻-Cla/Bgl** (**pUC-Cla/Bgl-Mut1**) und **pUC-SV40-tsVP1(H196Y)-st⁻-Cla/Bgl** (**pUC-Cla/Bgl-Mut2**) integriert werden sollten. In Abbildung 3.8 ist eine schematische Übersicht über die Klonierungsstrategien dargestellt, die unter 3.1.2.1.1 bis 3.1.2.5 ausführlich beschrieben werden. Die anschließende Sequenzierung (2.2.11) stellte bei den folgenden Konstrukten sicher, dass die Fremdsequenzen in jeweils einem Satz (Wt, Mut1 und Mut2) in der gleichen Orientierung eingeführt worden waren. Die Nukleotidsequenzen der untersuchten DNA-*cis*-Elemente und ihre Orientierung innerhalb des SV40-Genoms finden sich im Anhang unter 7.5.

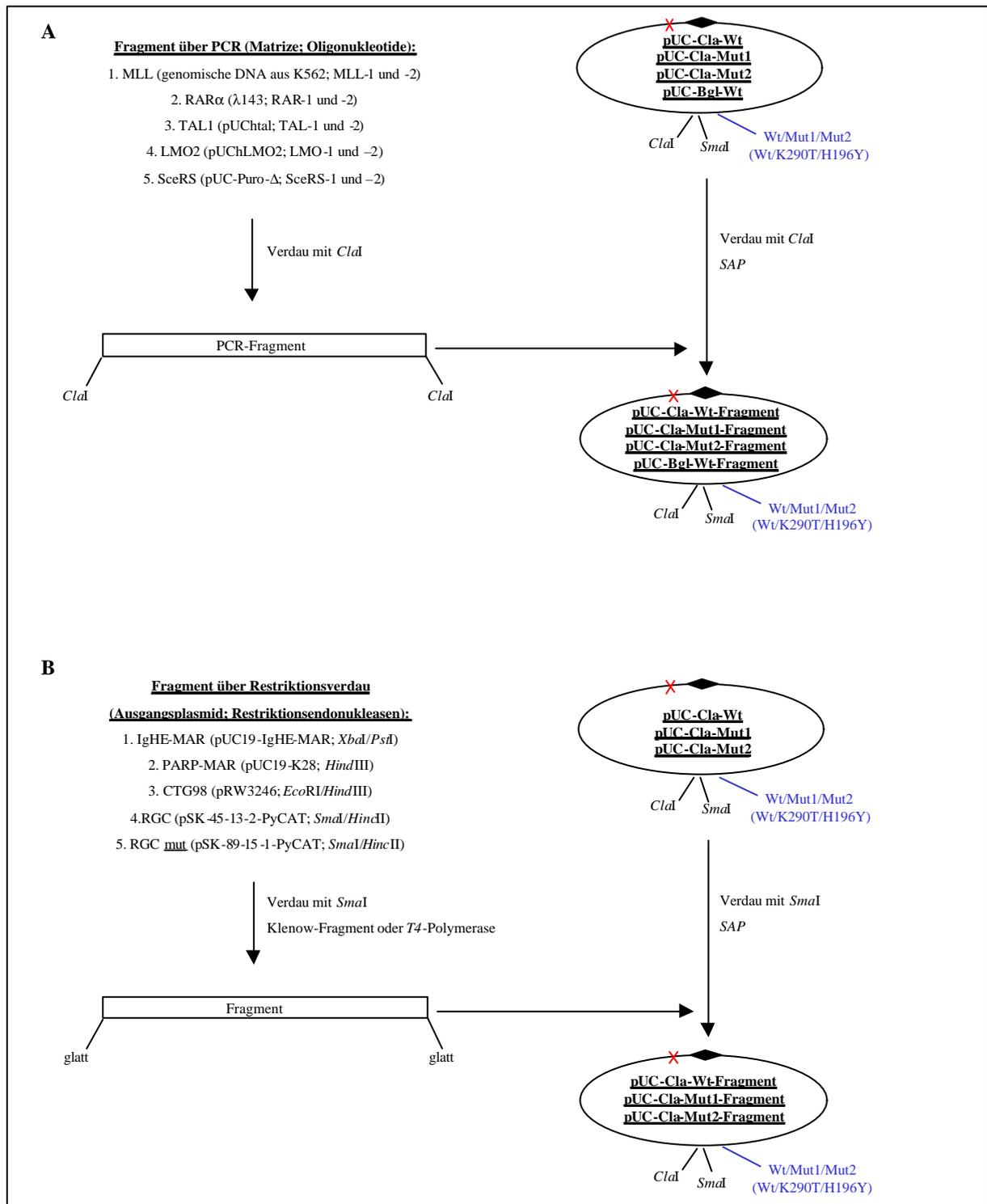


Abbildung 3.8: Klonierungsstrategien für die zu untersuchenden DNA-*cis*-Elemente. In (A) ist schematisch die Klonierungsstrategie über PCR-Amplifikation der Fragmente dargestellt. In (B) ist schematisch die Klonierungsstrategie über Restriktionsverdau dargestellt.

3.1.2.1 Fragmente aus BCRs mit ursächlicher Beteiligung an der Entstehung von Leukämien

Bei der Entstehung von Leukämien treten besonders Deletionen, Translokationen und/oder die Integration von Retroviren als ursächliche genetische Veränderungen auf (Rabbits, 1991; Li *et al.*, 2002). Es sollten für die Analyse Fragmente über PCR amplifiziert werden, für die durch eine Anhäufung von ebensolchen genetischen Veränderungen chromosomale Fragilität erwartet wurde. Die Oligonukleotide wurden jeweils so designiert, dass *Cla*I- bzw. *Bgl*III- für *sticky*-Klonierungen und *Sma*I-Schnittstellen für *blunt*-Klonierungen sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende eingeführt wurden.

3.1.2.1.1 Klonierung des *MLL*-BCR-Fragmentes

Innerhalb des *MLL*-BCR konnte ein nur 0,4 kb großes Fragment eingegrenzt werden, in dem 8 aus 24 (Alter unter einem Jahr) bzw. 4 aus 36 (Alter über einem Jahr) der t(4;11)-Translokationen für eine ALL-Patientengruppe identifiziert worden waren (Reichel *et al.*, 2001). Die Kartierung der Exons erfolgte nach Nilson *et al.*, 1996, die Exons 1-37 sind unter der *GenBank accession number* Z69744-Z69780 aufgelistet. Das Oligonukleotid *MLL*-1 bindet an Position 6638-6662, das Oligonukleotid *MLL*-2 an Position 7036-7016 der *MLL*-Sequenz, die unter der *GenBank accession number* X83604 zu finden ist. Innerhalb des Fragmentes sind weder Topoisomerase I-Erkennungssequenzen (A/TGATG) nach den stringenten Kriterien von Jaxel *et al.*, 1988 und Tsui *et al.*, 1989 noch Topoisomerase II-Erkennungssequenzen (Strissel *et al.*, 1996) enthalten. Abbildung 3.9 zeigt einen schematischen Überblick über das *MLL*-Gen und den über PCR amplifizierten Bereich (s. auch Anhang 7.5).

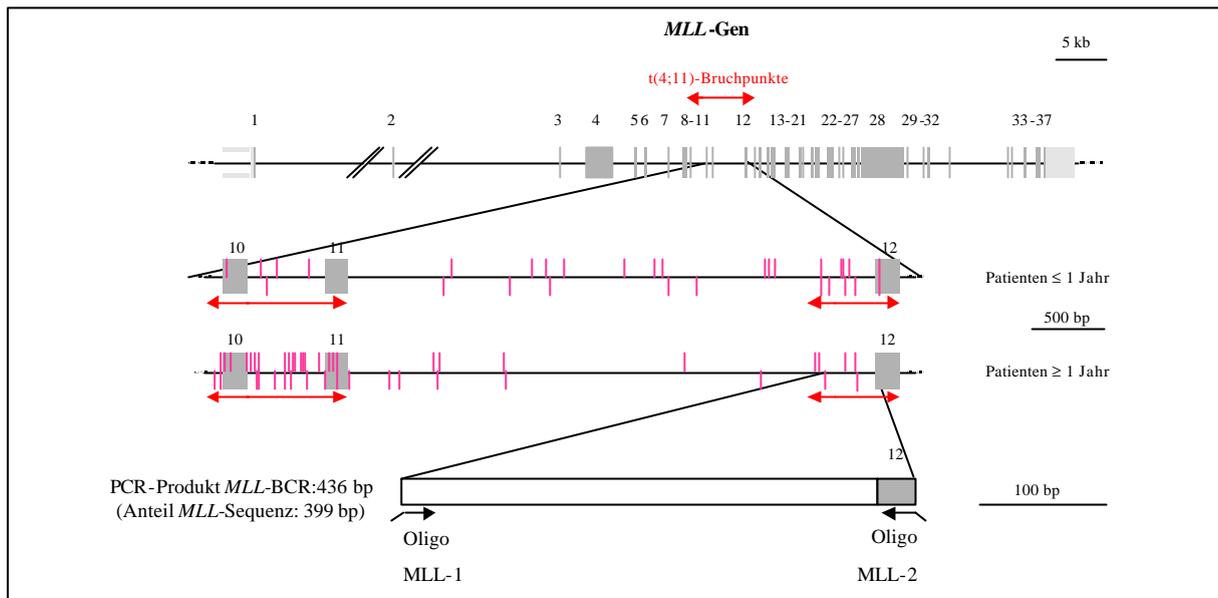


Abbildung 3.9: Genomische Organisation des *MLL*-Gens und durch PCR amplifiziertes Fragment *MLL*-BCR. Exons sind als Rechtecke dargestellt, Intronsequenzen als Strich. Proteinkodierende Regionen sind grau dargestellt, nichttranslatierte schraffiert. Rote Pfeile markieren die bei Patienten mit *t(4;11)*-Translokation gefundenen Bruchpunkte. Die mittlere Abbildung zeigt die Kartierung von Bruchpunkten für Patienten jünger bzw. älter als ein Jahr. Gehäuft treten Bruchpunkte in zwei *clustern* auf, einer umspannt die Region von Exon 10-11, ein weiterer eine Region in Intron 11 und Exon 12, aus der ein Teil im PCR-Produkt amplifiziert wurde. Für die PCR-Amplifikation wurden die Oligonukleotide (Oligo) MLL-1 und -2 und als Matrize genomische DNA aus K562-Zellen verwendet (genomische Organisation nach Reichel *et al.*, 1998, ein Ausschnitt (Mitte) nach Reichel *et al.*, 2001).

Zunächst wurde eine PCR-Reaktion mit genomischer DNA aus K562-Zellen (2.1.11) als Matrize und den Oligonukleotiden MLL-1 und MLL-2 durchgeführt. Das PCR-Fragment enthielt das *MLL*-Fragment in Größe von 399 bp, die Gesamtgröße des *MLL*-BCR-PCR-Produktes betrug 436 bp (s. auch Anhang 7.5). Für Klonierungen in die *Cla*-*Linker* wurden **pUC-Cla-Wt**, **pUC-Cla-Mut1** und **pUC-Cla-Mut2** mit *Cla*I verdaut, mit *SAP* dephosphoryliert und für die Ligation mit dem *Cla*I-verdauten, 405 bp großen PCR-Fragment eingesetzt. Für die Klonierungen in den **pUC-Bgl-Wt**-Vektor wurde über *Bgl*II, aber ansonsten wie oben beschrieben, verfahren. Es entstanden so die Konstrukte **pUC-Kpn-SV40-st-Cla-*MLL*-BCR** (**pUC-Cla-Wt-*MLL*-BCR**), **pUC-SV40-tsVP1(K290T)-st-Cla-*MLL*-BCR** (**pUC-Cla-Mut1-*MLL*-BCR**) und **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-st-Cla-*MLL*-BCR** (**pUC-Cla-Mut2-*MLL*-BCR**) sowie **pUC-Kpn-SV40-st-Bgl-*MLL*-BCR** (**pUC-Bgl-Wt-*MLL*-BCR**). Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. Für das *MLL*-Fragment (*GenBank accession number* X83604) ergab sich eine Abweichung an Position 6836 (G→A), die aber bei allen Konstrukten identisch ist (s. Anhang 7.5.1) und keine Topoisomerase I- oder II-Erkennungssequenzen generiert.

3.1.2.1.2 Klonierung des *RAR α* -BCR-Fragmentes

Die BCR von APL-Patienten innerhalb des *RAR α* -Gens wurde auf insgesamt 12 kb kartiert (Alcalay *et al.*, 1991), innerhalb derer wurden zwei t(5;17)-Translokationsorte identifiziert (de Thé *et al.*, 1990; Alcalay *et al.*, 1991). Die Kartierung der Exons 1-9 erfolgte nach Brand *et al.*, 1990 und Gu *et al.*, 2002 (*GenBank accession number* AC090426). Das Oligonukleotid RAR-1 bindet an Position 91920-91898, das Oligonukleotid RAR-2 an Position 91640-91661 von Chromosom 17 (*GenBank accession number* AC090426). Innerhalb des Fragmentes finden sich zwei Topoisomerase I-Erkennungssequenzen (A/TGATG) nach den stringenten Kriterien von Jaxel *et al.*, 1988 und Tsui *et al.*, 1989 an Position 91720-91716 und 91659-91655 und die beiden oben genannten Bruchpunkte zwischen Position 91880-91879 und 91834-91833. Abbildung 3.10 zeigt einen schematischen Überblick über das *RAR α* -Gen und den über PCR amplifizierten Bereich (s. auch 7.5.1).

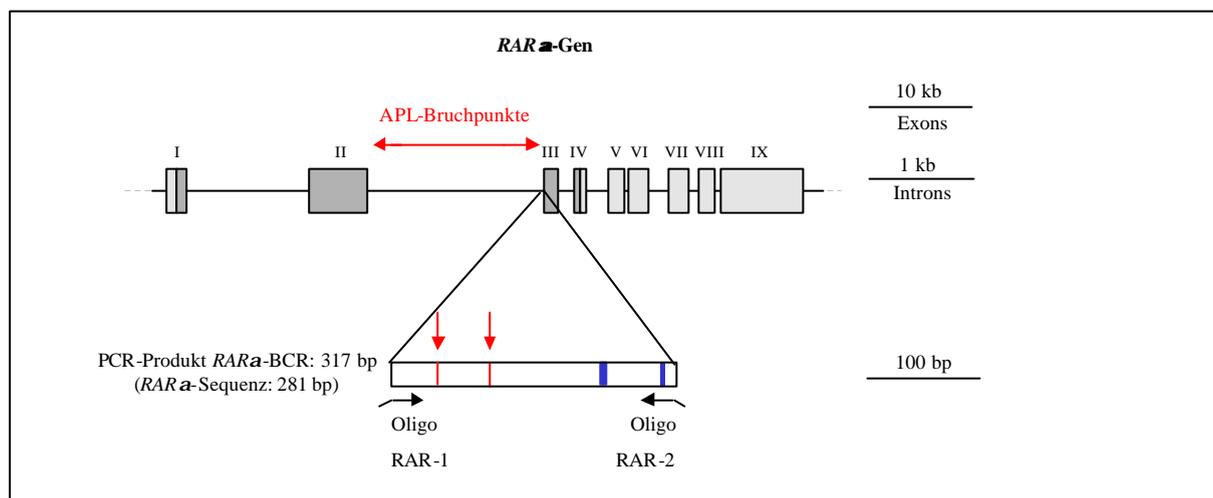


Abbildung 3.10: Genomische Organisation des *RAR α* -Gens und durch PCR amplifiziertes Fragment *RAR α* -BCR. Exons sind als Rechtecke dargestellt, Intronsequenzen als Strich. Proteinkodierende Regionen sind grau dargestellt, nichttranslatierte schraffiert. Der rote horizontale Pfeil markiert die Bruchpunktregion im zweiten Intron (zur Übersicht s. Gu *et al.*, 2002), die vertikalen Pfeile markieren zwei Bruchpunkte, die bei APL-Patienten mit t(5;17)-Translokation kartiert wurden (de Thé *et al.*, 1990; Alcalay *et al.*, 1990) und sich innerhalb des amplifizierten Fragmentes befinden. DNA-Topoisomerase I-Erkennungssequenzen sind blau dargestellt. Für die PCR-Amplifikation wurden die Oligonukleotide (Oligo) RAR-1 und -2 und als Matrize λ 143 verwendet.

Zunächst wurde eine PCR-Reaktion mit der *Lambda*-Phagen-DNA λ 146 als Matrize und den Oligonukleotiden RAR-1 und RAR-2 durchgeführt. Das PCR-Fragment enthielt das *RAR α* -Fragment in Größe von 281 bp, die Gesamtgröße des *RAR α* -BCR-PCR-Produktes betrug 317 bp (s. auch Anhang 7.5.1). Für Klonierungen in die *Cla*-Linker wurden **pUC-Cla-Wt**, **pUC-Cla-Mut1** und **pUC-Cla-Mut2** mit *Cla*I verdaut, mit *SAP* dephosphoryliert und für die Ligation mit dem *Cla*I-verdauten, 287 bp großen PCR-Fragment eingesetzt. Für die Klonierungen in den **pUC-Bgl-Wt**-Vektor wurde über *Bg*III, aber ansonsten wie oben

beschrieben, verfahren. Es entstanden so die Konstrukte **pUC-Kpn-SV40-st⁻-Cla-Wt-RAR α -BCR** (**pUC-Cla-Wt-RAR α -BCR**), **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st⁻-Cla-RAR α -BCR** (**pUC-Cla-Mut1-RAR α -BCR**) und **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-st⁻-Cla-RAR α -BCR** (**pUC-Cla-Mut2-RAR α -BCR**) sowie **pUC-SV40-st⁻-Bgl-Wt-RAR α -BCR** (**pUC-Bgl-Wt-RAR α -BCR**).

Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. Für das RAR α -Fragment (*GenBank accession number* AC090426) ergab sich ein Basenaustausch an Position 91787 (G→A). Diese Abweichung ist aber in allen Konstrukten identisch und generiert keine zusätzliche Topoisomerase I- oder II-Erkennungssequenz (s. auch 7.5.1).

3.1.2.1.3 Klonierung des *TALI*-BCR-Fragmentes

Bei der retroviralen Insertions-Mutagenese einer humanen myeloiden Vorläuferzelllinie wurden retrovirale Integrationsorte (Stocking *et al.*, 1993) in der Nähe der Deletionen und t(1;14)-Translokationen (Bernard, *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1990 und Breit *et al.*, 1994) innerhalb des *TALI*-Gens bei ALL-Patienten gefunden. Die Kartierung der Exons erfolgte wie bei Aplan *et al.*, 1990b, beschrieben. Das Oligonukleotid TAL-1 bindet an Position 145372-145351 und Oligonukleotid TAL-2 an Position 145111-145131 von Chromosom 1 (*GenBank accession number* NT_032977). Der Virus-Integrationsort befindet sich bei Position 145233-145232. Eine CpG-Insel ist Teil des amplifizierten Bereichs (Aplan *et al.*, 1990b). Abbildung 3.11 zeigt einen schematischen Überblick über das *TALI*-Gen und den über PCR amplifizierten Bereich (s. auch 7.5.1).

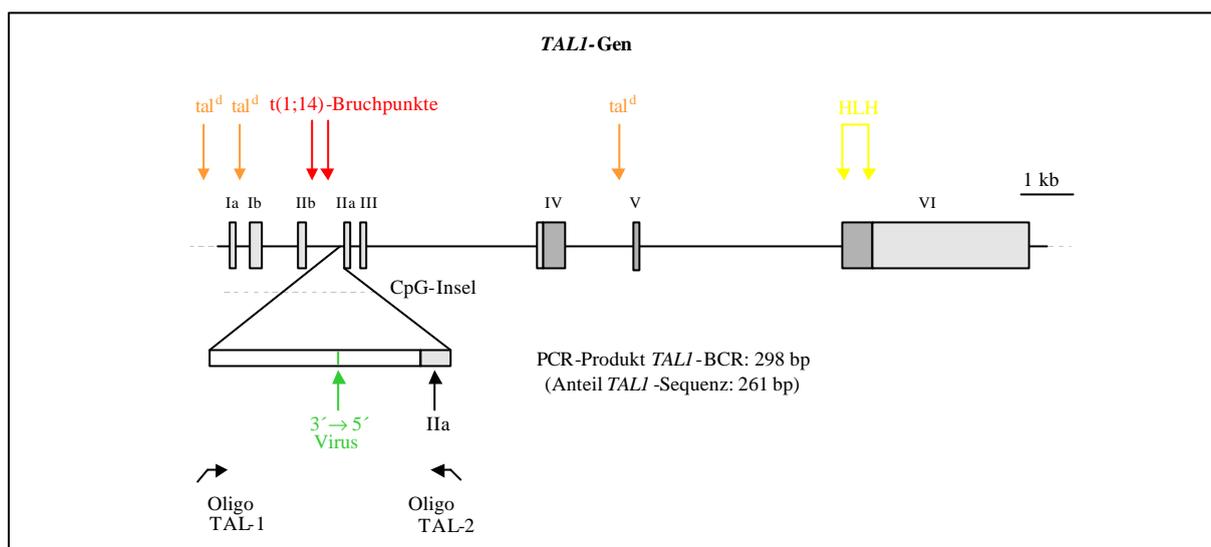


Abbildung 3.11: Genomische Organisation des *TALI*-Gens und durch PCR amplifiziertes Fragment *TALI*-BCR. Exons sind als Rechtecke dargestellt, Intronsequenzen als Strich. Proteinkodierende Regionen sind grau dargestellt, nichttranslatierte Regionen sind schraffiert [5'-und 3'-UTRs (untranslatierte Regionen)]. Rote Pfeile markieren die bei T-ALL-Patienten mit t(1;14)-Translokation gefundenen Bruchpunkte (Chen *et al.*, 1990; Bernard *et al.*, 1990). tal^d (orange Pfeile) markieren die Bruchpunkte der *TALI*-Deletionen (weiter aufwärts befinden sich noch weitere, hier nicht dargestellte Deletions-Bruchpunkte) (zur Übersicht s. Breit *et al.*, 1994). HLH markiert die Helix-loop-Helix-Domäne (gelb); die CpG-Insel ist gestrichelt eingezeichnet (nach Aplan *et al.*, 1990b). 3'→5' Virus (in grün) markiert einen retroviralen Integrationsort (C. Stocking, pers. Mitteilung). Für die PCR-Amplifikation wurden die Oligonukleotide (Oligo) TAL-1 und -2 und als Matrize pUChtal benutzt.

Zunächst wurde eine PCR-Reaktion mit pUChtal1 als Matrize und den Oligonukleotiden TAL-1 und TAL-2 durchgeführt. Das PCR-Fragment enthielt das *TALI*-Fragment in Größe von 261 bp, die Gesamtgröße des TAL-BCR-PCR-Produktes betrug 298 bp (s. auch Anhang 7.5.1). Für Klonierungen in die *Cla*-Linker wurden pUC-Cla-Wt-, pUC-Cla-Mut1 und pUC-Cla-Mut2 mit *Cla*I verdaut, mit *SAP* dephosphoryliert und für die Ligation mit dem *Cla*I-verdauten, 267 bp großen PCR-Fragment eingesetzt. Es entstanden so die Konstrukte pUC-Kpn-SV40-st'-Cla-Wt-TALI-BCR (pUC-Cla-Wt-TALI-BCR), pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st'-Cla-TALI-BCR (pUC-Cla-Mut1-TALI-BCR) und pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-st'-Cla-TALI-BCR (pUC-Cla-Mut2-TALI-BCR).

Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. Für das *TALI*-Fragment (*GenBank accession number* NT_032977) ergab sich eine Deletion (T) zwischen den Positionen 145183-145184, die die Diskrepanz der erwarteten zu der tatsächlichen Größe des Fragmentes (261 zu 262 bp) erklärt (s. auch 7.5.1). Diese Abweichung ist aber in allen Konstrukten identisch und generiert keine Topoisomerase I- oder II-Erkennungssequenz.

7.5.1). Für Klonierungen in die *Cla*-Linker wurden **pUC-Cla-Wt**, **pUC-Cla-Mut1** und **pUC-Cla-Mut2** mit *Cla*I verdaut, mit *SAP* dephosphoryliert und für die Ligation mit dem *Cla*I-verdauten, 435 bp großen PCR-Fragment eingesetzt. Es entstanden so die Konstrukte **pUC-Kpn-SV40-st'-Cla-Wt-LMO2-BCR** (**pUC-Cla-Wt-LMO2-BCR**), **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st'-Cla-LMO2-BCR** (**pUC-Cla-Mut1-LMO2-BCR**) und **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-st'-Cla-LMO2-BCR** (**pUC-Cla-Mut2-LMO2-BCR**).

Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. Es ergaben sich keine Abweichungen zur publizierten Sequenz und die Konstrukte stimmten miteinander überein (s. auch 7.5.1).

3.1.2.2 Klonierung der MAR-Fragmente

In Arbeiten, die der Aufklärung der molekularen Grundlagen der onkogenen Eigenschaften von Mutp53 dienten, konnte gezeigt werden, dass Mutp53 mit hoher Affinität an MARs bindet, die AT-reich sind und sogenannte DNA-*unwinding*-Elemente enthalten (Dittmer *et al.*, 1993; Will *et al.*, 1998a; 1998b; Roemer, 1999). Es wurden zwei MAR-Fragmente ausgewählt, für die eine Bindung an Mutp53 gezeigt wurde und diese Kriterien erfüllen.

3.1.2.2.1 Klonierung des *IgHE*-MAR-Fragmentes

Das Subfragment stammt aus dem 5'-MAR des Genlokus der schweren Kette der Immunglobuline der Maus (*IgHE*) und stellt eine AT-reiche Sequenz dar, die ein DNA-*unwinding*-Motiv enthält (AAATATTT), ein Element, für das eine rekombinationssteigernde Wirkung angenommen wird (Boulikas, 1995; Will *et al.*, 1998b) und durch Mutp53 spezifisch erkannt wird (Will *et al.*, 1998b). Innerhalb des Fragmentes findet sich eine Topoisomerase I-Erkennungssequenz (TCTAC) nach den stringenten Kriterien von Jaxel *et al.*, 1988 und Tsui *et al.*, 1989 (s. auch 7.5.2).

Zunächst wurde aus dem Plasmid **pUC19-IgHE-MAR** mit *Xba*I und *Pst*I das *IgHE*-MAR-Fragment herausgeschnitten und isoliert. Nach Behandlung mit *T4*-Polymerase wurde das 376 bp große Fragment gereinigt und für die Ligation mit den *Sma*I-geschnittenen und mit *SAP* dephosphorylierten Plasmiden **pUC-Cla-Wt**, **pUC-Cla-Mut1** und **pUC-Cla-Mut2** eingesetzt. Es entstanden so die Konstrukte **pUC-Kpn-SV40-st'-Cla-Wt-IgHE-MAR** (**pUC-Cla-Wt-IgHE-MAR**), **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st'-Cla-IgHE-MAR** (**pUC-Cla-Mut1-IgHE-MAR**) und **pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-st'-Cla-IgHE-MAR** (**pUC-Cla-Mut2-IgHE-MAR**). Die Übereinstimmung der eingeführten Fragmente bezüglich ihrer Orientierung und Sequenz in den Konstrukten wurde durch Sequenzierung festgestellt (s. auch 7.5.2). Die Klonierung wurde von Fr. E. Bendrat durchgeführt.

3.1.2.2.2 Klonierung des *PARP*-MAR-Fragmentes

Dieses MAR-Subfragment stammt aus dem 3'-UTR des humanen *PARP*-Gens und wird durch Mutp53 spezifisch erkannt (Will *et al.*, 1998a).

Zunächst wurde aus dem Plasmid pUC19-K28 mit *Hind*III das *PARP*-MAR-Fragment herausgeschnitten und isoliert. Nach Behandlung mit Klenow-Polymerase wurde das 398 bp große Fragment gereinigt und für die Ligation mit den *Sma*I-geschnittenen und mit *SAP* dephosphorylierten Plasmiden pUC-Cla-Wt, pUC-Cla-Mut1 und pUC-Cla-Mut2 eingesetzt. Es entstanden so die Konstrukte pUC-Kpn-SV40-st'-Cla-Wt-PARP-MAR (pUC-Cla-Wt-PARP-MAR), pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st'-Cla-PARP-MAR (pUC-Cla-Mut1-PARP-MAR) und pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-st'-Cla-PARP-MAR (pUC-Cla-Mut2-PARP-MAR). Die Übereinstimmung der eingeführten Fragmente bezüglich ihrer Orientierung und Sequenz in den Konstrukten wurde durch Sequenzierung festgestellt (s. auch 7.5.2). Die Klonierung wurde von Fr. E. Bendrat durchgeführt.

3.1.2.3 Klonierung des CTG98-Fragmentes

Die 98fache CTG·CAG-Wiederholung stammt aus einem TNR von der genomischen Sequenz in welcher es bei Patienten mit Myotonischer Dystrophie zu Instabilitäten kommt (Bowater *et al.*, 1996). Dieser TNR war für den Einsatz in dieser Arbeit vor allem deshalb interessant, da homologe Rekombination als Mechanismus angenommen wird, der für diese Instabilitäten verantwortlich ist (Richard & Paques, 2000).

Zunächst wurde aus dem Plasmid pRW3246 durch Verdau mit *Eco*RI und *Hind*III der CTG·CAG-repeat herausgeschnitten und isoliert. Nach Behandlung mit dem Klenow-Fragment wurde das 410 bp große Fragment für die Ligation mit den *Sma*I-geschnittenen und mit *SAP* dephosphorylierten Plasmiden pUC-Cla-Wt, pUC-Cla-Mut1 und pUC-Cla-Mut2 eingesetzt. Es entstanden so die Konstrukte pUC-Kpn-SV40-st'-Cla-Wt-CTG98 (pUC-Cla-Wt-CTG98), pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st'-Cla-CTG98 (pUC-Cla-Mut1-CTG98) und pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-st'-Cla-CTG98 (pUC-Cla-Mut2-CTG98). Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. Die Übereinstimmung der eingeführten Fragmente bezüglich ihrer Orientierung und Sequenz in den Konstrukten wurde durch Sequenzierung festgestellt (s. auch 7.5.2).

3.1.2.4 Klonierung einer Erkennungs-Sequenz und des mutierten Gegenstücks [(RGC und RGCmut (RGC mutiert))]

Vogelstein und Mitarbeiter entdeckten 1991 eine DNA-Sequenz, die *in vitro* spezifisch von Wtp53 gebunden wird. Das Plasmid pSK-45-13-2-PyCAT enthält 13 Kopien der Erkennungssequenz, die aus dem *ribosomal gene cluster* (RGC) stammt, das Plasmid pSK-89-15-1-PyCAT 15 Kopien der mutierten Sequenz (Kern *et al.*, 1991), welches nicht von Wtp53 erkannt wird.

Zunächst wurden aus den Plasmiden pSK-45-13-2-PyCAT und pSK-89-15-1-PyCAT mit *SmaI* und *HincII* das RGC- bzw. RGCmut-Fragment herausgeschnitten und isoliert. Das 288 bzw. 325 bp große Fragment mit glatten Enden wurde gereinigt und für die Ligation mit den *SmaI*-geschnittenen und mit *SAP* dephosphorylierten Plasmiden pUC-Cla-Wt, pUC-Cla-Mut1 und pUC-Cla-Mut2 eingesetzt. Es entstanden so die Konstrukte pUC-Kpn-SV40-st-Cla-Wt-RGC (pUC-Cla-Wt-RGC), pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st-Cla-RGC (pUC-Cla-Mut1-RGC) und pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-st-Cla-RGC (pUC-Cla-Mut2-RGC) und die Konstrukte pUC-Kpn-SV40-st-Cla-Wt-RGCmut (pUC-Cla-Wt-RGCmut), pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st-Cla-RGCmut (pUC-Cla-Mut1-RGCmut) und pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-st-Cla-RGCmut (pUC-Cla-Mut2-RGCmut). Die Übereinstimmung der eingeführten Fragmente bezüglich ihrer Orientierung und Sequenz in den Konstrukten wurde durch Sequenzierung festgestellt. Bei RGCmut ist eine Base deletiert, die Fragmente in den Konstrukten stimmen jedoch überein (s. auch 7.5.2). Die Klonierung wurde von Fr. E. Bendrat durchgeführt.

3.1.2.5 Klonierung des SceRS-Fragmentes

Um Doppelstrangbrüche experimentell gezielt in die *Cla-Linker* einführen zu können, wurde eine Erkennungssequenz der Megaendonuklease *I-SceI* in die Konstrukte inseriert. *I-SceI* wurde in Hefe-Mitochondrien entdeckt (Colleaux *et al.*, 1986) und besitzt eine 18 bp lange, nicht-palindromische Erkennungssequenz (Perrin *et al.*, 1993). Es konnte bereits in früheren Versuchen gezeigt werden, dass die *I-SceI*-Endonuklease beim Zusammentreffen mit einem die *I-SceI*-Erkennungssequenz tragenden Plasmid die Rekombination initiierte und die spontanen Rekombinationsfrequenzen um das 100fache erhöhte (Moynahan & Jasin, 1997).

Dieses als Kontrolle in dem hier vorgestellten Testsystem verwendbare Fragment mit *I-SceI*-Erkennungssequenz sollte in Zelllinien zum Einsatz kommen, die hinter einem für (Wt und Mut)-p53 positiven oder negativen Hintergrund die *I-SceI*-Endonuklease exprimieren. Hiermit sollte es möglich sein, experimentell gezielt Doppelstrangbrüche in die Konstrukte

einzuführen und homologe Rekombination auszulösen. Gleichzeitig sollte es der Überprüfung dienen, ob eine zufällig gewählte Sequenz im Gegensatz zu den anderen *cis*-Elementen die Rekombinationsfrequenzen wie für SV40-Wt angenommen, unbeeinflusst lassen würde.

Zunächst wurde eine PCR-Reaktion mit pUC-Puro Δ (s. Akyüz *et al.*, 2002; Akyüz 2001) als Matrize und den Oligonukleotiden SceRS-1 und SceRS-2 durchgeführt. Das PCR-Fragment enthielt das SceRS-Fragment in Größe von 296 bp, die Gesamtgröße des SceRS-PCR-Produktes betrug 332 bp (s. auch Anhang 7.5.1). Für Klonierungen in die *Cla*-*Linker* wurden pUC-Cla-Wt-, pUC-Cla-Mut1 und pUC-Cla-Mut2 mit *Cla*I verdaut, mit *SAP* dephosphoryliert und für die Ligation mit dem *Cla*I-verdauten, 302 bp großen PCR-Fragment eingesetzt. Es entstanden so die Konstrukte pUC-Kpn-SV40-st⁻-Cla-Wt-SceRS (pUC-Cla-Wt-SceRS), pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-st⁻-Cla-SceRS (pUC-Cla-Mut1-SceRS) und pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-st⁻-Cla-SceRS (pUC-Cla-Mut2-SceRS). Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft (7.5.1).

3.1.3 Produktion von rekombinanten Viruspartikeln basierend auf den Konstrukten mit DNA-*cis*-Elementen

In dieser Arbeit wurden die in der Tabelle 3.1 aufgeführten DNA-*cis*-Elemente in die *Cla*-*Linker* inseriert. Für über PCR eingeführte Fragmente errechnet sich die Gesamtlänge der nicht zu SV40 gehörenden Nukleotide aus der Fremdsequenz der BCRs oder der Kontrollsequenz mit I-*Sce*I-Erkennungsstelle zuzüglich 19 bp für den *Cla*-*Linker* und die auf beiden Seiten des PCR-Fragmentes eingeführten *Cla*I-Schnittstellen (s. auch Anhang 7.5.1).

Zu den über Restriktionsverdaus eingeführten Fragmenten ergibt sich eine hinzuzurechnende Größe von 13 bp für den *Cla*-*Linker*. Die *Bgl*-*Linker*-Konstrukte (pUC-Bgl-Wt, pUC-Bgl-Mut1 und pUC-Bgl-Mut2) und die korrespondierenden rekombinanten Viren sind in der Tabelle nicht aufgeführt, da sie aufgrund der extrem niedrigen Virenausbeuten nicht für Rekombinationsmessungen benutzt werden konnten (siehe unten).

Element	Größe	MOI Wt	MOI Mut1	MOI Mut2
SV40 (st ⁺ , ohne Linker)	—	27,6	40,0	33,8
<i>Cla</i> -Linker (∅)	13 bp	11,8	7,8	18,1
<i>MLL</i> -BCR (AML)	418 bp	18,3	2,8	6,8
<i>RARα</i> -BCR (APL)	300 bp	32,3	4,8	9,9
<i>TALI</i> -BCR (T-ALL)	280 bp	2,1	0,8	1,8
<i>LMO2</i> -BCR (T-ALL)	448 bp	11,2	0,8	1,0
<i>IgHE</i> -MAR	389 bp	2,8	0,7	0,7
<i>PARP</i> -MAR	411 bp	7,5	1,7	3,3
CTG98 (Minisatellit)	423 bp	5,3	1,0	4,2
RGC (Wtp53-Erkennungssequenz)	301 bp	6,7	2,1	1,3
RGCmut (Mutp53-Erkennungssequenz)	338 bp	1,6	1,1	1,0
ScRS (Positivkontrolle)	315 bp	29,0	2,0	1,7

Tabelle 3.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten DNA-*cis*-Elemente mit Insertion ins SV40-Genom via *Cla*-Linker. In der ersten Spalte ist der Name der Fremdsequenz angegeben, in Klammern die zugehörige Leukämieform bzw. Oberbegriffe dieses DNA-*cis*-Elementes (st⁺ bei SV40-Wt deutet auf das Vorhandensein von st hin). Die zweite Spalte listet die Größen der Fremdsequenzen auf (vgl. Text). Die MOIs zu den Viren-Subtypen für das jeweilige Element sind in abgekürzter Form in der dritten bis fünften Spalte aufgeführt (Wt bezeichnet *Cla*-Wt-Viren, Mut1 bezeichnet *Cla*-Mut1-Viren und Mut2 bezeichnet *Cla*-Mut2-Viren).

Nach Fertigstellung der Konstrukte wurden diese in COS-1-Zellen mittels Kalziumphosphat-Transfektion eingeführt (2.3.2). Es folgte die Herstellung der Virenüberstände bei der permissiven Temperatur von 32°C wie unter 2.6.1 beschrieben. Es zeigte sich, dass die Zelllyse durch Virenpartikel in den Zellen, die mit der Mut-Viren-DNA transfiziert waren, nach 24 Tagen einsetzte und zu ausreichenden Virentitern gemäß MOI-Bestimmung führte (siehe unten). Für Zellen, die mit Wt-Viren-DNA transfiziert wurden, zeigte sich eine Zelllyse bereits nach ca. 14-18 Tagen. Dieser Unterschied in der Virenproduktion wurde jedoch auch mit st⁻-Viren ohne weitere Mutation oder Fremdsequenz beobachtet, so dass von den Fremdsequenzen keine Inhibition der Virenproduktion ausging. Um die Vergleichbarkeit zu wahren, wurden auch die Wt-Viren-Überstände nach 21 Tagen gewonnen. Die Bestimmung der MOI (2.6.4) der produzierten Viren zeigte teilweise so geringe Werte, dass es notwendig wurde, die Virenüberstände zu konzentrieren (2.6.2). Danach wurde die MOI erneut bestimmt. In Tabelle 3.1 ist das Ergebnis der MOI-Bestimmung sämtlicher produzierter bzw. konzentrierter Viren aufgelistet. Es zeigte sich, dass nach Transfektion mit allen *Cla*-Viren-Konstrukten ausreichende MOIs für den Einsatz in Rekombinationsmessungen erzielt werden konnten. Die *Bgl*-Linker-Konstrukte zeigten hingegen so niedrige MOI-Werte (für pUC-*Bgl*-Wt < 0,01 und für pUC-*Bgl*-Wt-*MLL*-BCR 0,07), dass es nicht möglich war, auch diese im

Testsystem einzusetzen, da die Wahrscheinlichkeit für Doppelinfektionen der Zellen zu gering wurde.

Die MOI-Werte für die verschiedenen Konstrukte machten es möglich, die Rekombinationsmessungen mit einer MOI von mindestens 0,7 durchzuführen. Die MOI-Werte für die Wt-Viren-Subtypen waren, bis auf die Werte für Cla-Linker-Viren, im Vergleich zu den Mut1- und Mut2-Subtypen, also den temperatursensitiven Viren, am höchsten. Dies stimmt mit Beobachtungen überein, die bereits mit dem unmodifizierten Testsystem gemacht werden konnten (Wiesmüller, *et al.*, 1996; Dudenhöffer, *et al.*, 1998).

3.1.4 Analyse der Stabilität der Virengenome

Nach erfolgreicher Klonierung der Virengenome und Produktion der rekombinanten Viren sollten die Viren-DNAs nach Reisolierung (2.2.6) daraufhin untersucht werden, ob ihre Amplifikation trotz eingeführter Fremdsequenzen ohne unerwünschte Rearrangements abgelaufen war. Hierzu wurden CV1-Zellen mit den neu produzierten Virenüberständen infiziert (2.6.3) und für die Dauer einer Virengeneration inkubiert (48 h, 32°C). Die isolierten DNAs wurden zunächst unverdaut mittels DNA-Agarosegelelektrophorese (2.2.18) und Ethidiumbromidfärbung analysiert, um die Mengen für die anschließenden Analysen zu ermitteln (nicht dargestellt). Dabei stellte sich heraus, dass kaum DNA aus den mit den Mut1- bzw. Mut2-Viren infizierten Zellen reisoliert werden konnte. Aus diesem Grund wurden die Analysen nur für alle Wt-Viren-Subtypen durchgeführt. Als Standards wurden jeweils die Cla-Wt-DNA und die korrespondierende Plasmid-DNA (**pUC-Cla-Wt-...**) mit analysiert. Es wurden dabei möglichst Restriktionsendonukleasen ausgewählt, die sowohl spezifisch nur einmal im jeweiligen Fragment schneiden als auch nur einmal in der SV40-Sequenz. Einige der reisolierten DNAs (Cla-Wt-IgHE-MAR, -PARP-MAR, -CTG98, -RGC, -RGCmut und -SceRS) ließen sich nur sehr schwer mit den Restriktionsendonukleasen schneiden, so dass es oftmals nur zu einem teilweisen Verdau kam, der phototechnisch kaum darstellbar war. Deshalb repräsentieren die folgenden Darstellungen eine Auswahl der aussagekräftigen Analysen.

In Abbildung 3.13 ist ein Auszug aus den Analysen mit DNAs abgebildet, die *MLL*-BCR als Fremdsequenz tragen.

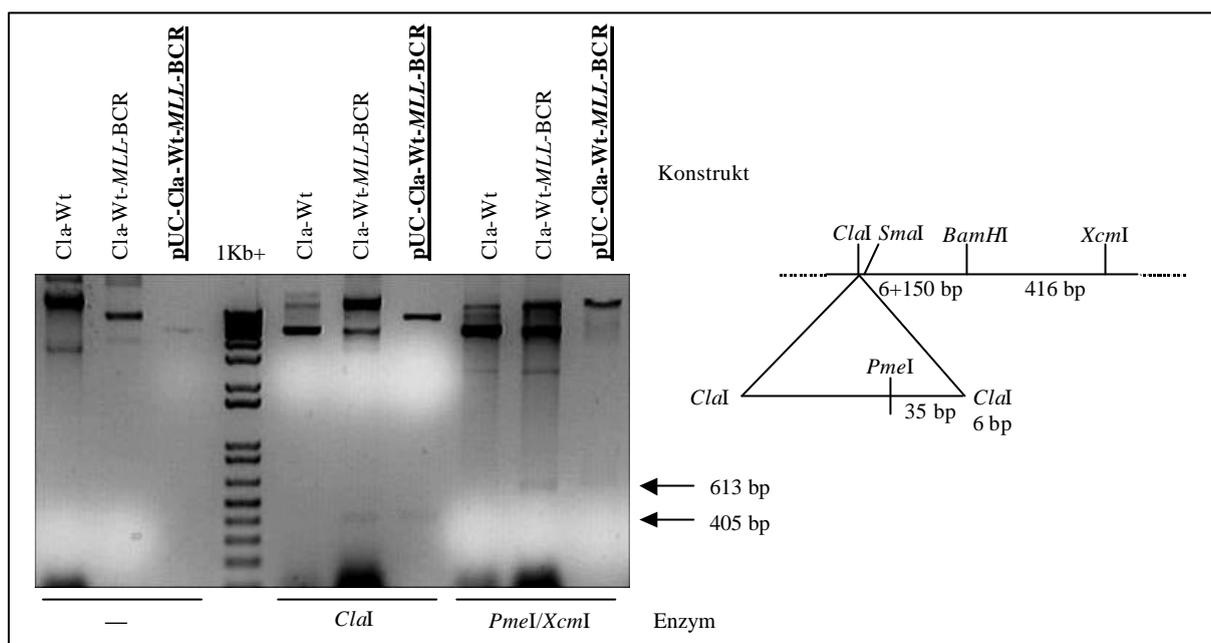


Abbildung 3.13: Analyse der Stabilität der viralen *Cla*-Wt-*MLL*-BCR-DNA. *Cla*-Wt und *Cla*-Wt-*MLL*-BCR bezeichnen die reisolierten, viralen DNAs, ***pUC-Cla*-Wt-*MLL*-BCR** die bakterielle Plasmid-DNA. Die jeweils verwendeten Restriktionsenzyme (Enzyme) sind unter den Spuren aufgetragen, ein Minuszeichen steht unter den Spuren mit unverdaut aufgetragener DNA. Als Größenstandard ist der DNA-Längenmarker 1 Kb + aufgetragen. Die Karte gibt einen schematischen Überblick über die Lage der Restriktionsschnittstellen. Die Pfeile markieren die Lage und Größe der ausgeschnittenen Fragmente im Gel. Die Schwarz-Weiß-Darstellung ist invertiert.

Das *MLL*-BCR-Fragment wird durch den Verdau mit *ClaI* sowohl aus der viralen *Cla*-Wt-*MLL*-BCR- als auch aus der Plasmid-DNA ***pUC-Cla*-Wt-*MLL*-BCR** herausgeschnitten (405 bp), während die *Cla*-Wt-DNA (ohne Fremdsequenz) lediglich im *Cla*-Linker linearisiert wurde. Die Linearisierung der DNA wird deutlich durch das langsamere Laufverhalten im Gel. *PmeI* schneidet nur im *MLL*-BCR-Fragment, der gleichzeitige Verdau mit den beiden Restriktionsenzymen *PmeI* und *XcmI* resultiert daher in einem 613 bp großen Fragment in beiden, das *MLL*-BCR-Fragment enthaltenden DNAs. Aus diesen Ergebnissen und weiteren, hier nicht dargestellten Restriktionsuntersuchungen ließ sich darauf schließen, dass die Amplifikation der Viren, die das *MLL*-BCR-Fragment inseriert tragen, ohne Rearrangements abgelaufen war.

In Abbildung 3.14 sind Analysen der DNAs abgebildet, die die *RARα*-BCR als Fremdsequenz tragen. Durch den Verdau mit *Cla*I wird das Fragment *RARα*-BCR vollständig aus der viralen *Cla*-Wt-*RARα*-BCR-DNA und der korrespondierenden Plasmid-DNA ausgeschnitten (287 bp), während die virale *Cla*-Wt-DNA (ohne Fremdsequenz) ungeschnitten blieb. *Xcm*I schneidet einmal in der *RARα*-BCR-Sequenz (260 bp) und einmal in der SV40-Sequenz. Das Fragment von 838 bp wurde ausgeschnitten, während die *Cla*-Wt-DNA lediglich linearisiert wurde. *Sma*I linearisierte alle drei untersuchten DNAs, was die vergleichbare Qualität veranschaulicht. Aus diesen Ergebnissen und weiteren, hier nicht dargestellten Restriktionsuntersuchungen ließ sich darauf schließen, dass die Amplifikation der Viren, die das *RARα*-BCR-Fragment inseriert tragen, ohne Rearrangements abgelaufen war.

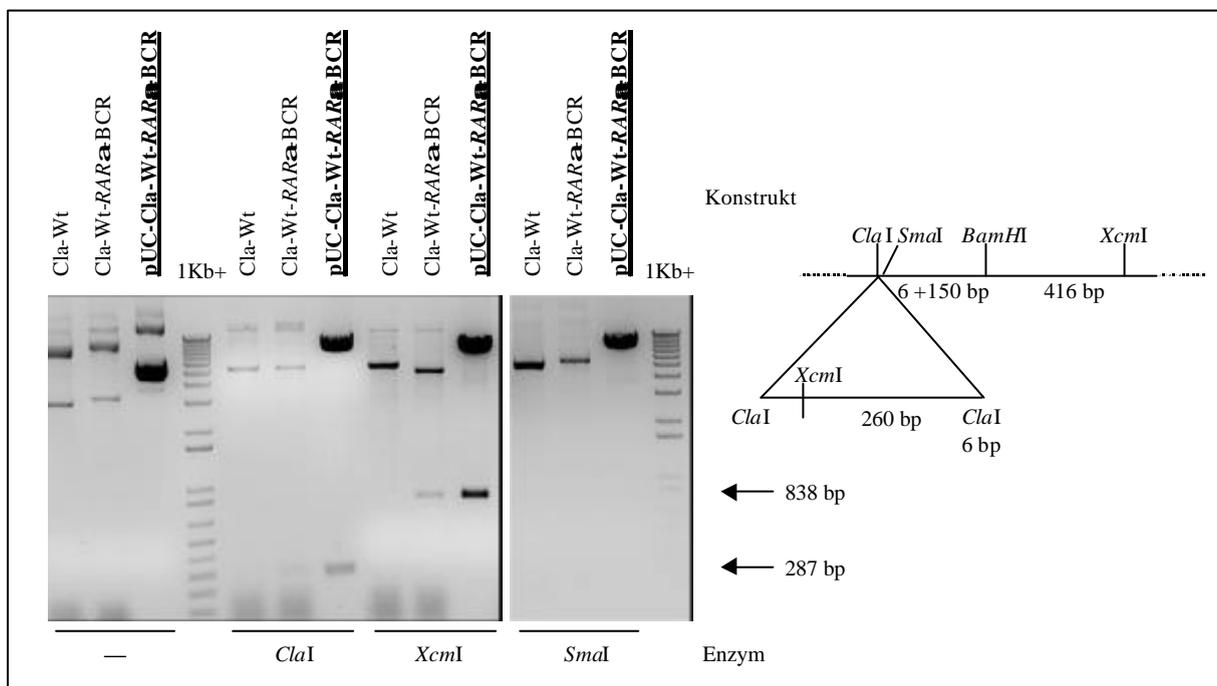


Abbildung 3.14: Analyse der Stabilität der viralen *Cla*-Wt-*RARα*-BCR-DNA. *Cla*-Wt und *Cla*-Wt-*RARα*-BCR bezeichnen die reisolierten, viralen DNAs, **pUC-Cla-Wt-*RARα*-BCR** die bakterielle Plasmid-DNA. Die jeweils verwendeten Restriktionsenzyme (Enzyme) sind unter den Spuren aufgetragen, ein Minuszeichen steht unter den Spuren mit unverdaut aufgetragener DNA. Als Größenstandard ist der DNA-Längenmarker 1 Kb+ aufgetragen. Die Karte rechts gibt einen schematischen Überblick über die Lage der Restriktionsschnittstellen. Die Pfeile markieren die Lage und Größe der ausgeschnittenen Fragmente im Gel. Die Schwarz-Weiß-Darstellung ist invertiert.

In Abbildung 3.15 ist ein Auszug aus den Analysen mit DNAs abgebildet, die *TALI*-BCR als Fremdsequenz tragen.

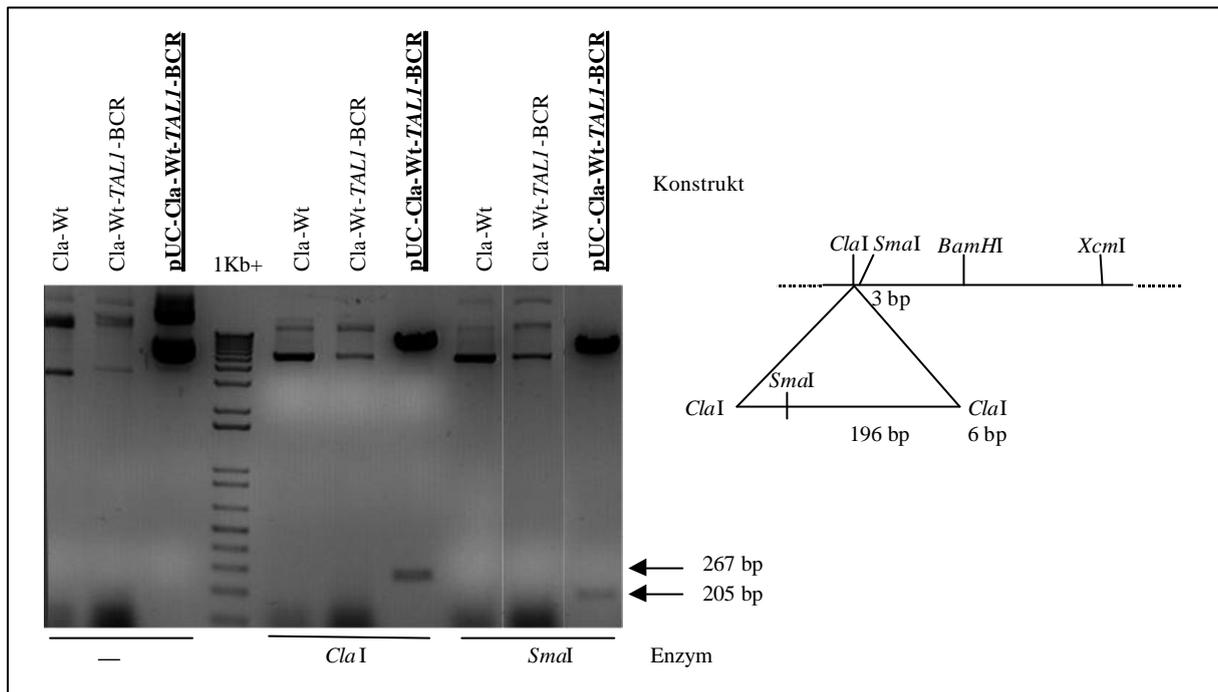


Abbildung 3.15: Analyse der Stabilität der viralen *Cla*-Wt-*TALI*-BCR-DNA. *Cla*-Wt und *Cla*-Wt-*TALI*-BCR bezeichnen die reisolierten, viralen DNAs, **pUC-*Cla*-Wt-*TALI*-BCR** die bakterielle Plasmid-DNA. Die jeweils verwendeten Restriktionsenzyme (Enzyme) sind unter den Spuren aufgetragen, ein Minuszeichen steht unter den Spuren mit unverdaut aufgetragener DNA. Als Größenstandard ist der DNA-Längenmarker 1 Kb+ aufgetragen. Die Karte rechts gibt einen schematischen Überblick über die Lage der Restriktionsschnittstellen. Die Pfeile markieren die Lage und Größe der ausgeschnittenen Fragmente im Gel. Die Schwarz-Weiß-Darstellung ist invertiert.

Mit *ClaI* wurde verdaut, um das Fragment herauszuschneiden. Dies gelang gut erkennbar nur beim **pUC-*Cla*-Wt-*TALI*-BCR**-Konstrukt, die *Cla*-Wt-*TALI*-BCR-DNA wurde nur teilverdaut, sodass das Fragment (267 bp) gut nur in der Spur des Plasmids zu erkennen war. Im Vergleich zur *Cla*-Wt-DNA zeigte sich jedoch für unverdaute *Cla*-Wt-*TALI*-BCR-DNA ein langsames Laufverhalten im Gel, was auf das Vorhandensein des *TALI*-BCR-Fragmentes in der viralen DNA schließen lässt. Die DNA-Menge des Fragments in der Spur von *Cla*-Wt-*TALI*-BCR war vermutlich zu gering, als dass sie phototechnisch dargestellt werden konnte, sondern konnte nur per Auge gesehen werden. Ähnlich sah es für den Restriktionsverdau mit *SmaI* aus. Während in der Spur mit pUC-*Cla*-Wt-*TALI*-BCR das 205 bp große Fragment gut zu erkennen war, war dies bei der *Cla*-Wt-*TALI*-BCR-DNA gut nur per Auge der Fall. Der Teilverdau mit leichter Retardierung gegenüber *Cla*-Wt-DNA war aber sowohl für den *ClaI*- als auch für den *SmaI*-Verdau erkennbar. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass es auch während der Amplifikation von *TALI*-BCR-Fragment tragenden Viren zu keinen Rearrangements gekommen war.

In Abbildung 3.16 ist ein Auszug aus den Analysen mit DNAs abgebildet, die *LMO2*-BCR als Fremdsequenz tragen.

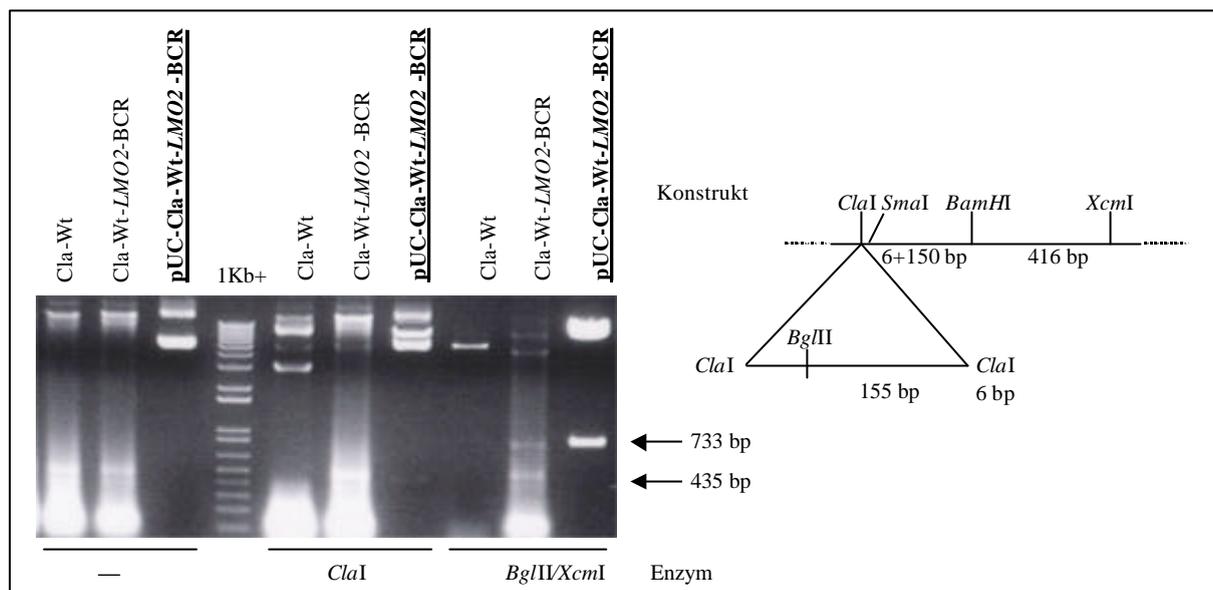


Abbildung 3.16: Analyse der Stabilität der viralen *Cla*-Wt-*LMO2*-BCR-DNA. *Cla*-Wt und *Cla*-Wt-*LMO2*-BCR bezeichnen die reisolierten, viralen DNAs, **pUC-Cla-Wt-*LMO2*-BCR** die bakterielle Plasmid-DNA. Die jeweils verwendeten Restriktionsenzyme (Enzyme) sind unter den Spuren aufgetragen, das Minuszeichen steht unter den Spuren mit unverdaut aufgetragener DNA. Als Größenstandard ist der DNA-Längenmarker 1 Kb + aufgetragen. Die Karte rechts gibt einen schematischen Überblick über die Lage der Restriktionsschnittstellen. Die Pfeile markieren die Lage und Größe der ausgeschnittenen Fragmente.

Das aus *Cla*-Wt-*LMO2*-BCR mit *Cla*I ausgeschnittene *LMO2*-Fragment (435 bp) war aufgrund der Überlappung mit kontaminierender RNA kaum sichtbar, jedoch in der Spur des Ausgangskonstruktes **pUC-Cla-Wt-*LMO2*-BCR** zu erkennen. Die Behandlung mit *Bgl*II/*Xcm*I zeigte demgegenüber sowohl in der Spur mit der viralen *Cla*-Wt-*LMO2*-BCR-DNA als auch in der mit der korrespondierenden Plasmid-DNA deutlich das erwartete, 733 bp große Fragment. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass es auch während der Amplifikation von das *LMO2*-BCR-Fragment tragenden Viren zu keinen Rearrangements gekommen war.

Die Restriktionsanalysen für das *IgHE*-MAR-, das *PARP*-MAR-, das CTG98-, das RGC-, das RGCmut- und das *ScE*RS-Fragment zeigten eine sehr schlechte Verdaubarkeit bei geringer Ausbeute der viralen DNAs selbst nach wiederholter DNA-Präparation. Es konnte aber ein verlangsamtes Laufverhalten (Linearisierung) nach Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen festgestellt werden, das zumindest auf das Vorhandensein der spezifischen Schnittstellen und damit auf eine korrekte Amplifikation der Viren mit den inserierten Fremdsequenzen hindeutete (Daten nicht gezeigt).

Sequenzierungen mit isolierter viraler DNA wurden ebenso durchgeführt, sie waren aber nur erfolgreich bei Cla-Wt- und Cla-Wt-*RARA*-BCR-DNA. Hier zeigten sich keine Abweichungen zur jeweils korrespondierenden Plasmid-DNA (Daten nicht gezeigt). Bei den anderen Präparationen konnte die Sequenzierung nicht ausgewertet werden, da die Signale nicht eindeutig waren („Rauschen“).

Anhand dieser Daten zur Stabilität der Virengnome konnte davon ausgegangen werden, dass alle Viren, die die verschiedenen DNA-*cis*-Elemente tragen, effizient und ohne große genetischen Veränderungen repliziert und verpackt wurden und als Testsystem einsetzbar waren.

3.2 Etablierung und Charakterisierung von p53her-Varianten exprimierenden LLC-MK₂-Zellen

LLC-MK₂-Zellen sind SV40-infizierbare Rhesusaffen- (*Macaca mulatta*) Nierenzellen, die Mutp53 mit einer Deletion der Aminosäuren 237-239 (p53 Δ 237-239) tragen. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Mutp53 im Vergleich zum Wtp53 aus PRK (primäre Rhesusaffen-Nieren)-Zellen z.B. eine erhöhte Stabilität und eine verlängerte Halbwertszeit aufweist, keine Komplexe mit SV40-T-Ag formiert und Reaktivität mit dem Mutkonformationsspezifischen Antikörper PAB240 zeigt (von der Weth & Deppert, 1993).

Die von Dr. H. Maacke, Dr. G. Rohaly und Dr. C. Dudenhöffer erstmals etablierte Zelllinie LLC-MK₂(p53her)-17 exprimiert konstitutiv Wtp53her, ein Fusionsprotein aus humanem Wtp53 und der Östradiolbindedomäne (Bohen & Yamamoto, 1993; Scherrer *et al.*, 1993; Landel *et al.*, 1994; Dudenhöffer *et al.*, 1998) des humanen Östradiol-Rezeptors (Roemer & Friedman, 1993). Nach Bindung von Östradiol an die Östradiolbindedomäne wird diese Domäne und das p53 aus einem Komplex mehrerer Hitzeschockproteine freigesetzt und hierdurch als *bona fide* Wtp53 aktiviert.

Es konnte mithilfe des auf SV40-Viren basierenden Testsystems gezeigt werden, dass Wtp53 in primären Rhesusaffenzellen oder LLC-MK₂(p53)her-Zellen die Rekombinationsfrequenzen im Gegensatz zum Mutp53 der LLC-MK₂-Zelllinie herabsetzte, dies noch verstärkt, wenn die Inaktivierung von Wtp53 durch die Interaktion mit dem SV40-T-Ag durch eine Mutation im SV40-T-Ag verhindert wurde (Wiesmüller *et al.*, 1996; Dudenhöffer *et al.*, 1998; 1999; Janz & Wiesmüller, 2002).

Das SV40-Rekombinations-Testsystem bot nun die Möglichkeit, *in vivo* den Einfluss von verschiedenen p53her-Varianten, die ektopisch in LLC-MK₂-Zellen exprimiert werden, in Hinblick auf Rekombinationsprozesse zu untersuchen (Dudenhöffer *et al.*, 1998).

Zu der bereits vorhandenen Zelllinie LLC-MK₂-(p53her)-17 sollten aufgrund der hohen Passagenzahl und der damit verbundenen Gefahr der phänotypischen Veränderung von LLC-MK₂(p53her)-17 seit der Klonierung (ca. 20-30) in dieser Arbeit weitere stabil p53her exprimierende Zelllinien etabliert werden. Durch die Analyse mehrerer vergleichbarer Zelllinien sollte auch die Möglichkeit klonaler Effekte als Ursache für veränderte Rekombinationsfrequenzen ausgeschlossen werden.

Des Weiteren sollten die Mutanten p53(15A)- und p53(138V) zur Klärung neuer Fragestellungen den Untersuchungen mit den auf SV40-Viren basierenden Testsystem zugänglich gemacht werden.

Die strahleninduzierte Phosphorylierung von p53 an Serin-15 wird vornehmlich durch die ATM-Kinase vermittelt, wodurch es vermutlich zur Aktivierung von p53 als *checkpoint*-Faktor kommt und ein G1-Arrest ausgelöst wird (Banin *et al.*, 1998; Canman *et al.*, 1998). Zellen, die eine p53-Mutante tragen, die der Phosphorylierung nicht zugänglich ist, wie die p53(15A)-Mutante, sind empfindlich in der schadensinduzierten Regulation ihres Zellzyklus gestört. p53(138V) ist eine temperatursensitive Konformationsmutante, die das humane Homolog der *separation-of-function*-Mutante von p53(135V) aus der Maus repräsentiert. Diese Mutante kann keine transkriptionelle Transaktivatorfunktion ausüben, beherbergt aber rekombinations-regulatorische Funktionen (Willers *et al.*, 2000). Das Expressionsplasmid pSV53(138V)her war, im Gegensatz zu **pSV53(15A)her**, bereits zu Beginn dieser Arbeit vorhanden und konnte so direkt zur Klonierung der Zellen eingesetzt werden.

3.2.1 Klonierung des Expressionsplasmids **pSV53(15A)her**

Mithilfe von Oligonukleotiden, die eine Zielsequenz mit gewünschter Basensubstitution enthalten, können mittels PCR Mutationen in DNA-Fragmente eingeführt werden. Diese die Mutation enthaltenden Fragmente dienen dann während der weiteren Zyklen in der PCR als zweite Matrize, werden so amplifiziert und können zur Klonierung eingesetzt werden.

Zur Generierung von **pSV53(15A)her** wurde zunächst eine PCR-Reaktion mit dem Plasmid **pRSetB-NcoI** als Matrize und den Oligonukleotiden Nco-Mut15-1 und Nco-2 durchgeführt. Anschließend wurde das 477 bp große PCR-Fragment mit *NcoI* geschnitten und isoliert. **pUCΔXba** wurde nach *NcoI*-Verdau und Dephosphorylierung mit *SAP* für die Ligation mit dem *NcoI*-geschnittenen PCR-Fragment eingesetzt. Das so entstandene Plasmid **pUCDBamMut15**, das die kodierende Sequenz für p53(15A)her beinhaltet, wurde mit *XbaI* verdaut und das 1612 bp große Fragment isoliert. Für die Ligation mit diesem *XbaI*-Fragment wurde das Plasmid **pSV53her** ebenso mit *XbaI* geschnitten, der Vektor vom 1612 bp großen Fragment befreit und dephosphoryliert. Nach Ligation der Fragmente entstand so das neue Plasmid **pSV53(15A)her**. Die erfolgreich eingeführte Mutation wurde anschließend durch Sequenzierung nachgewiesen.

In Abbildung 3.17 ist diese Klonierung schematisch dargestellt.

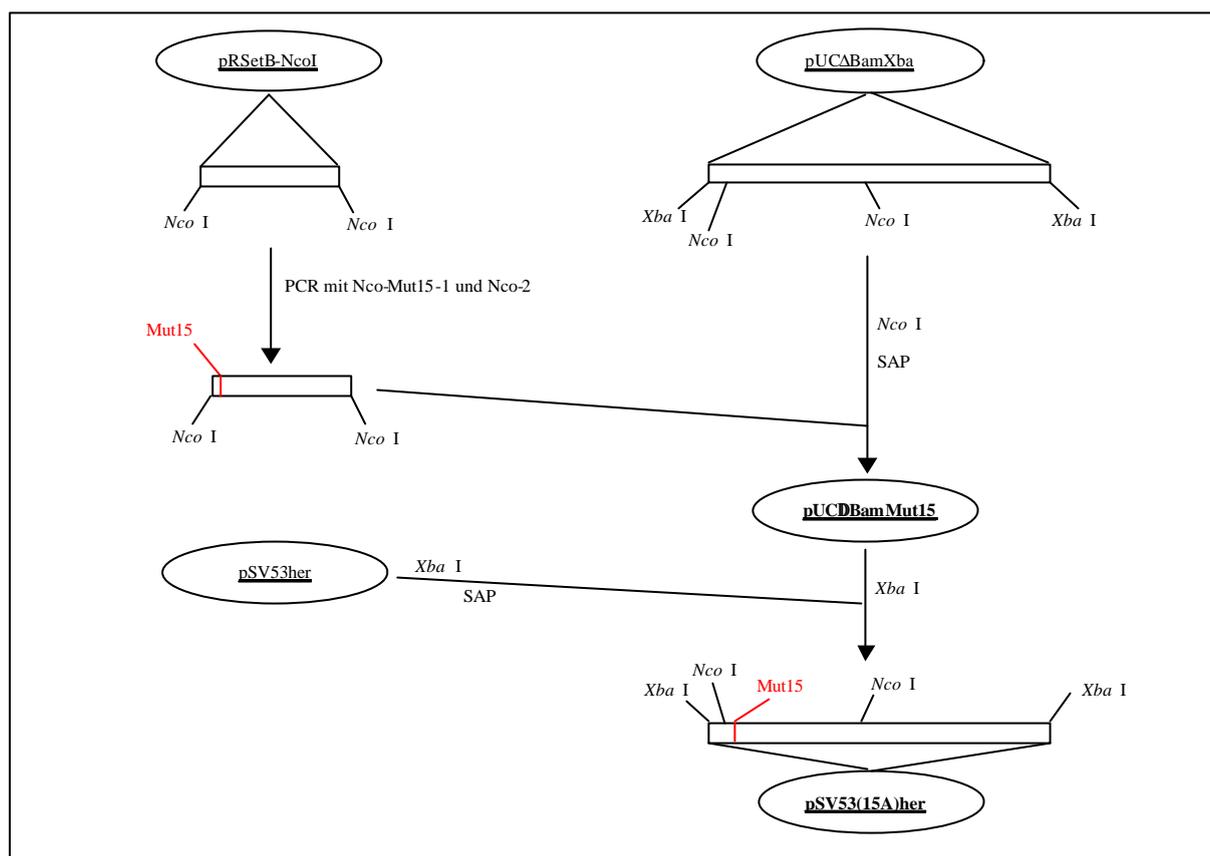


Abbildung 3.17: Klonierung des Expressionsplasmids **pSV53(15A)her**. Die Oligonukleotide Nco-Mut15-1 und Nco-2 wurden zur Einführung der Mutationen T178G und G179C (bezogen auf das *Xba*I-Fragment von pSV53her) in der PCR-Reaktion benutzt, die die Aminosäureänderung Serin zu Alanin an Position 15 der Aminosäuresequenz von p53 verursachen (Mut15 in Rot dargestellt).

3.2.2 Etablierung von Wtp53her- und p53(138V)her-exprimierenden Klonen

Die Expressionsplasmide pSV53her, pSV53(138V)her bzw. pSV53(15A)her wurden im Verhältnis 10:1 mit dem Selektionsplasmid pM5Neo, das die Neomycin-Resistenz vermittelt, gemischt und in LLC-MK₂-Zellen kotransfiziert (2.3.2). Es folgte die Selektion mit 800 µg/ml G418 (Neomycin) und Klonierung wie unter 2.3.3 beschrieben. Der Nachweis von p53her und p53(138V)her erfolgte über eine *Western-Blot*-Analyse (s. 2.4.6) unter Verwendung von DO1 als Primärantikörper. Für den Nachweis von p53(15A)her wurde das polyklonale Schaf-Anti-p53-Serum verwendet, da DO1 nur ein Epitop zwischen den Aminosäuren 20 und 25 detektiert. Es konnten so drei weitere Wtp53her- sowie zwei p53(138V)her-exprimierende Klone etabliert werden (Tabelle 3.2). Klone, die p53(15A) exprimieren, konnten demgegenüber nicht etabliert werden. Die erfolgreich etablierten Klone werden im Folgenden mit LLC-MK₂(p53her)-5, -9, -21 und LLC-MK₂[p53(138V)her]-4 und -7 bezeichnet. In Tabelle 3.2 ist die Klonierungsstatistik für die eine Neomycin-Resistenz tragenden LLC-MK₂-Klone mit unterschiedlichem p53her-Status dargestellt.

p53her-Variante	Isolierte Klone	Western-Blot-getestete Klone	Western-Blot-positive Klone	Nomenklatur der neu etablierten Zelllinien mit Klonnummern
Wtp53her	24	18	3	LLC-MK ₂ (p53her)-5, -9, -21
p53(138V)her	20	19	2	LLC-MK ₂ [p53(138V)her]-4 und -7
p53(15A)her	24	24	0	—

Tabelle 3.2: Klonierungsstatistik zur Etablierung von LLC-MK₂-Zelllinien, die stabil ins Genom integrierte p53her-Expressionsplasmid-Varianten tragen. Es wurden fünf neue Zelllinien etabliert, LLC-MK₂(p53her) mit den Klonen -5, -9 und -21 und LLC-MK₂[p53(138V)her] mit den Klonen -4 und -7.

3.2.3 Quantifizierung der p53her-Menge

Western-Blot-Analysen (s. 2.4.6) der verschiedenen Klone (LLC-MK₂(p53her)-9 wurde nicht ausgewertet) zeigten unterschiedliche Expressionsniveaus für das p53her-Protein und zwar sowohl für p53her als auch für die p53(138V)her-Mutante (s. Abbildung 3.18).

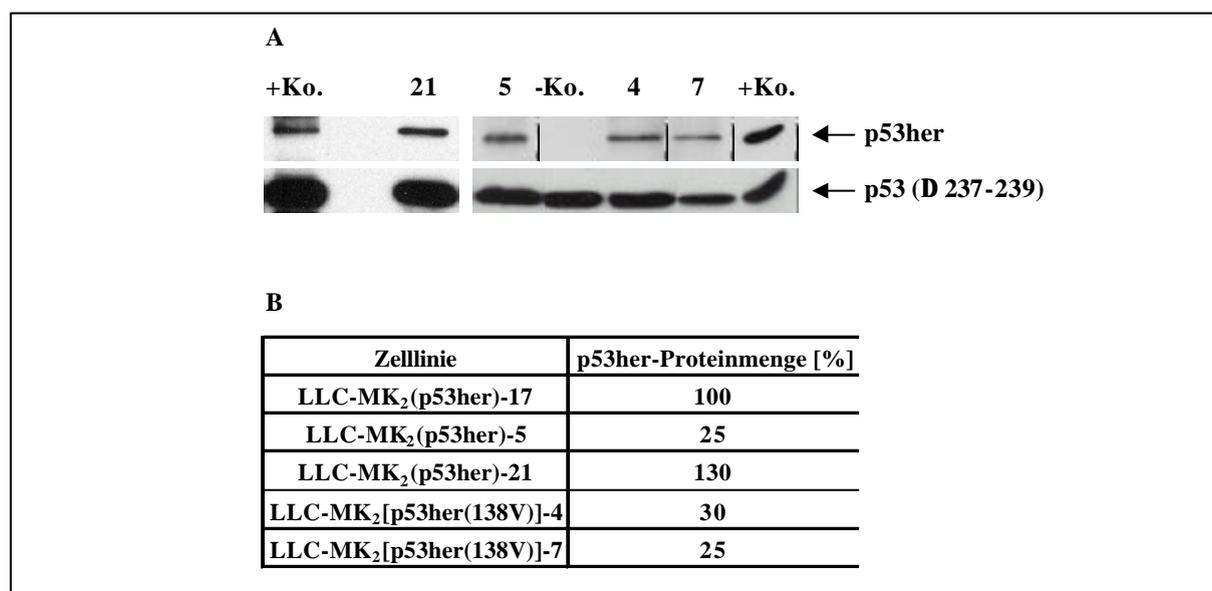


Abbildung 3.18: Western-Blot-Analyse der LLC-MK₂-Klone mit stabil integriertem pM5Neo- und pSV53her bzw. pSV53(138V)her-Plasmid. +Ko bezeichnet die Positivkontroll-Zelllinie LLC-MK₂(p53her)-17, -Ko die Negativkontroll-Zelllinie LLC-MK₂(neo). Zur Quantifizierung der Proteinmengen wurden von den Klonen Gesamtzelllysate aus 1×10^5 Zellen pro Spur (s. 2.4.3) aufgetragen. Nach SDS-PAGE (s. 2.4.4), Western-Blot-Analyse (s. 2.4.6) und Immunmarkierung mit DO1 als Primärantikörper folgte eine Auswertung der Bandenintensitäten auf den Röntgen-Filmen mit dem Programm *ImageJ 1.28*. In (A) sind die positiven Klone LLC-MK₂(p53her)- (als 5 bezeichnet), LLC-MK₂(p53her)-21 (als 21 bezeichnet) und LLC-MK₂[p53(138V)her]-4 und -7 (als 4 und 7 bezeichnet) dargestellt. Die relativen Proteinmengen bezogen auf LLC-MK₂(p53her)-17 sind gesondert in (B) aufgelistet. Die apparente Molekularmasse von p53 (Δ 237-239) beträgt 53 kDa, von p53her 90 kDa nach SDS-PAGE.

Um eine quantitative Aussage über die Menge an p53her in den einzelnen Klonen machen zu können, wurden die Banden-Intensitäten densitometrisch mit dem Programm *ImageJ 1.28* ausgewertet und mit der Menge an p53her in der Referenz-Zelllinie LLC-MK₂(p53her)-17

verglichen. Zu diesem Zweck wurde jeweils der zu untersuchende Klon auf einem Gel zusammen mit der Referenz-Zelllinie als Positivkontrolle aufgetragen. Dabei ergab sich für den Wtp53-exprimierenden Klon LLC-MK₂(p53her)-5 eine 4fach geringere Proteinmenge als für den Vergleichsklon LLC-MK₂(p53her)-17, während der Klon LLC-MK₂(p53her)-21 eine 1,3fach höhere Proteinexpression zeigte. Die Mutp53-exprimierenden Klone LLC-MK₂[p53(138V)her]-4 und -7 zeigten im Vergleich zu LLC-MK₂(p53her)-17 eine um 3- bzw. 4fach niedrigere Proteinmenge.

3.2.4 Bestimmung der Wachstumseigenschaften der etablierten Klone

Die Einführung von Wtp53 in transformierte Zelllinien inhibiert das Zellwachstum (Baker *et al.*, 1990; Mercer *et al.*, 1991). Dies bedeutet, dass eine Verlängerung der Generationszeiten bei Zellen nach Expression von Wtp53 zu erwarten ist. Um zu überprüfen, ob funktionell aktives p53her in den etablierten Klonen exprimiert wurde, wurde eine Generationszeitbestimmung (2.3.4) durchgeführt. Das p53her-Protein ist ein Fusionsprotein, bei dem humanes Wtp53 C-terminal an die Östradiolbindedomäne fusioniert ist (Roemer & Friedmann, 1993) und das eine Aktivierung von Wtp53-Funktionen nach Gabe von Östradiol zulässt.

Um eine gezielte funktionelle Anschaltung von p53her zu gewährleisten, wurden die Zellen in DMEMØ10/1 (s. 2.1.6) kultiviert (2.3.1). Diesem Medium wurde FCS zugesetzt, dessen Östradiolgehalt durch Behandlung mit Aktivkohle stark reduziert wurde. Da auch Phenolrot aufgrund seiner Strukturähnlichkeit schwach an den Östradiolrezeptor bindet, wurde phenolrotfreies Flüssigmedium verwendet. Die Induktion erfolgte stets durch Zugabe von 1 µM Östradiol. In früheren Experimenten wurden 2-5 µM Östradiol eingesetzt (Dudenhöffer *et al.*, 1998), doch zeigten spätere Analysen, dass auch die Zugabe von nur 1 µM Östradiol zur Induktion ausreichte (Akyüz *et al.*, 2002; s. auch 3.2.5).

In Abbildung 3.19 ist das Ergebnis der Generationszeitbestimmung dargestellt. Danach zeigte der Wtp53-exprimierende Klon LLC-MK₂(p53her)-17 ebenso wie die neu etablierten Klone -5, -9 und besonders -21 eine Verlängerung der Generationszeit im Vergleich zur LLC-MK₂(neo)-Zelllinie. Das p53her-Protein war also eindeutig in den Zellen funktionell durch Östradiol anschaltbar. Eine Verlängerung der Generationszeit bereits in Abwesenheit von Östradiol deutete darauf hin, dass ein Teil des p53her-Proteins auch ohne Induktion durch Östradiol konstitutiv aktiv war. Dies stand in Einklang mit früheren Daten, die mit p53her-Varianten tragenden Zellen erhoben worden waren (Dudenhöffer *et al.*, 1998).

So standen für weitere funktionelle Analysen neben dem LLC-MK₂(p53her)-17-Klon vor allem Klon -21 zur Verfügung. Für die Klone LLC-MK₂[p53(138V)her]-4 und -7 zeigte sich ein vernachlässigbar geringer wachstumsinhibierender Effekt durch p53(138V)her, die Generationszeiten entsprachen also der von LLC-MK₂(neo)-Zellen. Obwohl bei 37°C ein Teil des murinen p53(135V)her-Proteins in Wt-Konformation vorliegt (Ziegler, 1998), hatte dies offensichtlich hier mit der humanen Entsprechung p53(138V) keinen Einfluss auf das Wachstum.

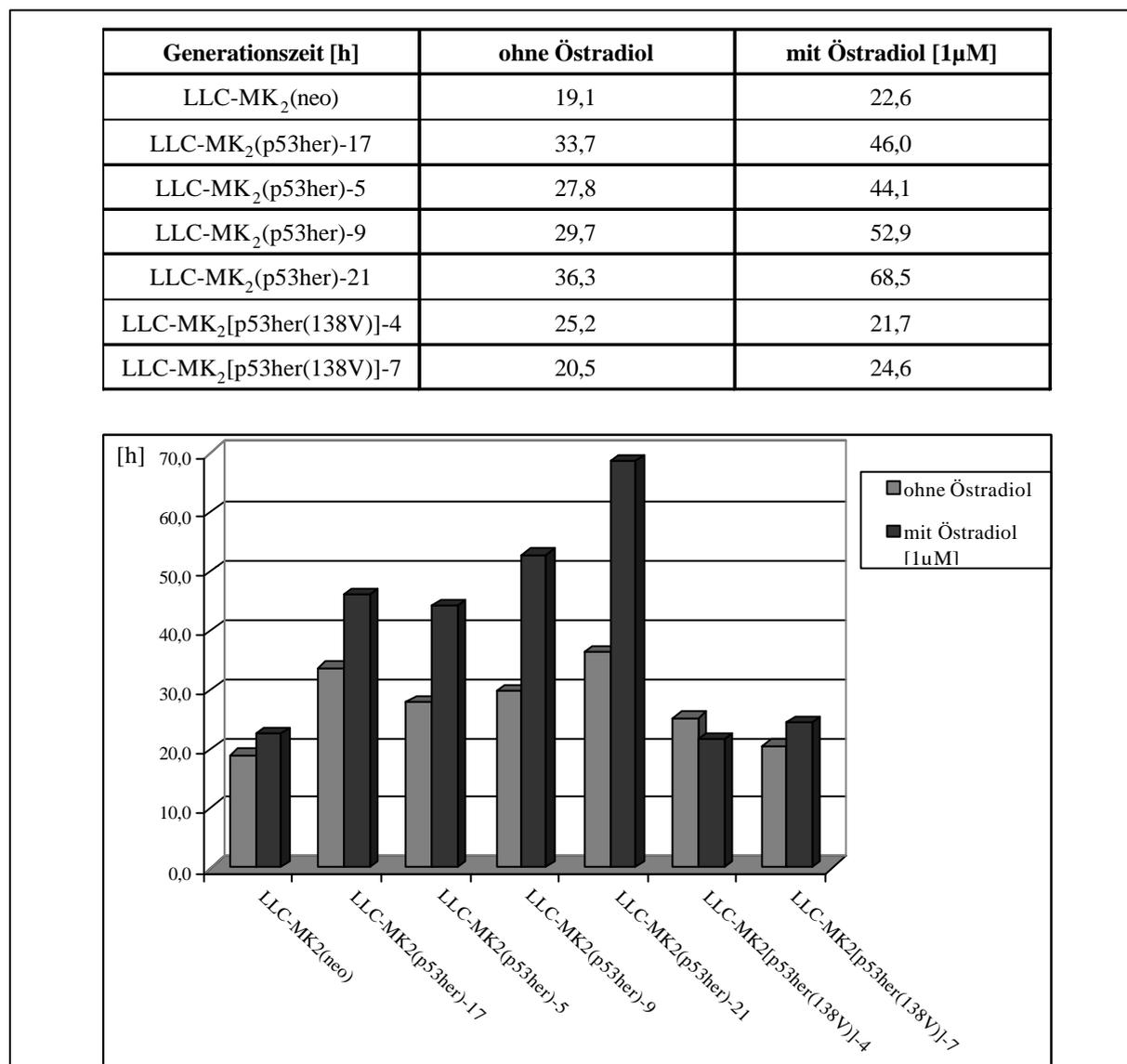


Abbildung 3.19: Generationszeiten der p53her-Varianten exprimierenden Zelllinien (Mittelwerte von Duplikaten).

3.2.5 Transkriptionelle Transaktivierung durch p53her und p53(138V)her

Wtp53 übt nachweislich die Funktion eines transkriptionellen Transaktivators aus und aktiviert unter anderem die Gene $p21^{Waf1/Cip1}$ und $mdm2$ (Levine, 1997). p53(138V) dagegen wird als transkriptionell inaktive Mutante beschrieben (Harvey *et al.*, 1995). Da p53(138V) bei 39°C noch deutlicher als bei 37°C in seinen transkriptionellen Funktionen inaktiviert ist, wurden die Klone LLC-MK₂[p53(138V)her]-Klone -4 und -7 neben dem Klon LLC-MK₂(p53her)-21 sowohl bei der permissiven Temperatur von 30°C als auch bei der nichtpermissiven Temperatur von 39°C untersucht.

Die positiven Klone LLC-MK₂(p53her)-5, -9 und -21, LLC-MK₂[p53(138V)her]-4 und -7 und der für p53her negative Klon LLC-MK₂(neo) wurden zur Charakterisierung mit (1 µM) und ohne Östradiol bei 37°C und 39°C für 24 Stunden kultiviert und anschließend durch *Western-Blot*-Analyse (2.4.6) untersucht. Die Inkubation mit Östradiol bei 30°C stellte für die Zellen eine Stresssituation dar und hatte eine Überexpression von $p21^{Waf1/Cip1}$ und auch von MDM2 in allen Zelllinien in mehr oder weniger gleichem Ausmaß zur Folge und wird hier deshalb nicht dargestellt. Es ist bekannt, dass Östradiol für eine von p53 unabhängige Hochregulierung von $p21^{Waf1/Cip1}$ und MDM2 verantwortlich ist (Karlson *et al.*, 1997).

Für MDM2 war ebenfalls keine eindeutige Expressionsveränderung bei 37°C und 39°C in Abhängigkeit von Östradiol nachweisbar, möglicherweise durch bereits auch ohne Zugabe von Östradiol in aktivierter Form vorliegendes p53her (vgl. 3.2.4: Verlangsamung der Generationszeit auch ohne Östradiolzugabe). Demgegenüber ergab sich für $p21^{Waf1/Cip1}$ nach *Western-Blot*-Analyse und Abgleichung der Proteinmengen mit Aktin (s. Abbildung 3.20 B und C) bzw. mit endogenem Mutp53 (s. Abbildung 3.20 A) mithilfe des Programms *ImageJ 1.28*, folgendes Bild (die Abgleichungswerte sind hier nicht dargestellt):

Bei gleicher Menge an endogenem Mutp53 zeigt der Klon LLC-MK₂(p53her)-21 die höchste durch p53her induzierte $p21^{Waf1/Cip1}$ -Expression, gefolgt von den Klonen -5 und -9, wobei der letztere sogar eine stärkere $p21^{Waf1/Cip1}$ -Expression bei niedrigerer p53her-Expression zeigte (Abbildung 3.20 A). Die Proteinmengen zu Abbildung 3.20 B zeigten, dass sich in LLC-MK₂(p53her)-21-Zellen bei 39°C eine durch Östradiol deutlich induzierbare Expression von $p21^{Waf1/Cip1}$ nachweisen ließ. Im Gegensatz hierzu war die Expression von $p21^{Waf1/Cip1}$ in LLC-MK₂(neo)-Zellen fast nicht nachweisbar. Abbildung 3.20 C zeigt den Vergleich der die Transaktivierungsmutanten tragenden Klone LLC-MK₂[p53(138V)her]-4 und -7 im Vergleich zu LLC-MK₂(neo)-und (p53her)-21-Zellen. Nach Abgleichung entspricht die $p21^{Waf1/Cip1}$ -Expression des Klons -7 etwa der des neo-Klons, Klon -4 zeigt dagegen eine geringere Expression. Zusammengefasst erwiesen sich jedoch die p53(138V)her-Klone als

transaktivierungsdefizient im Vergleich zu dem Wtp53-exprimierenden Klon LLC-MK₂(p53her)-21.

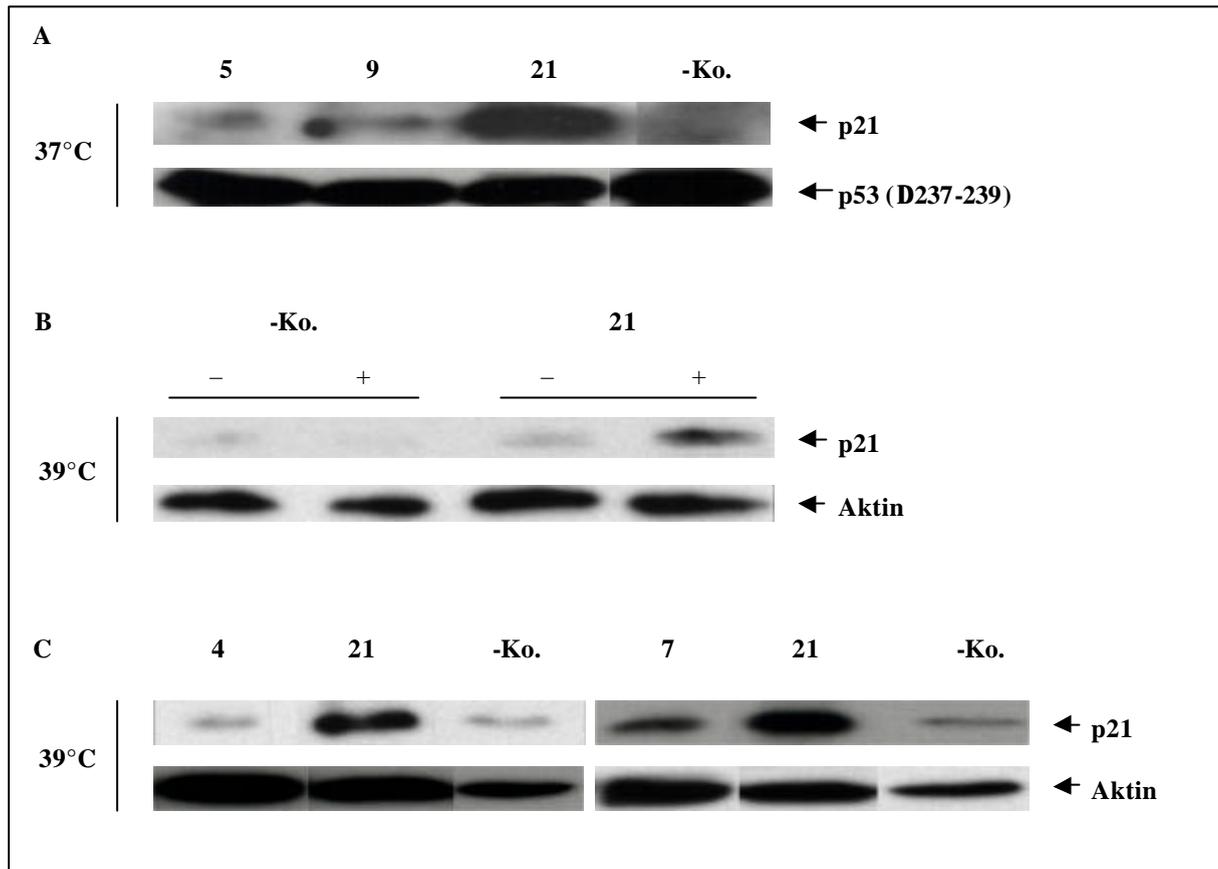


Abbildung 3.20: *Western-Blot*-Analyse zur p21^{Waf1/Cip1}-Expression in LLC-MK₂(p53her) und -[p53(138V)her]-Klonen. Nach Auftrennung der Proteine in einem 13%igen SDS-PAGE-Gel (s. 2.4.4) und Membrantransfer wurde jeder *blot* in zwei horizontale Teile geschnitten, so dass die p21^{Waf1/Cip1} (p21)- (21 kDa) und die MDM2- (110 kDa) bzw. p53 (53 kDa)-Banden getrennt wurden (Orientierung nach *Prestained SDS-Molecular Weight Standard Broad Range*). Zum Nachweis von p21^{Waf1/Cip1} bzw. MDM2 wurden die Blot-Streifen mit den Primärantikörpern (s. 21.7.1) Anti-hMDM2, Anti-hp21 (WAF1) und DO-1 und dem Sekundärantikörper (s. 2.1.7.2) Ziege-Anti-Maus-Peroxidase inkubiert. Die MDM2-Blots sind nicht gezeigt. Zum Nachweis von Aktin (43 kDa) wurden die jeweils oberen Blot-Streifen zunächst erneut nach Angabe des Herstellers aktiviert, geblockt und danach mit dem Primärantikörper Anti-Aktin und dem Sekundärantikörper Huhn-Anti-Ziege-Peroxidase inkubiert. In (A) sind Totalhomogenate der Klone LLC-MK₂(p53her)-5, -9 und -21 (5, 9, 21) und als Negativkontrolle (-Ko.) LMV2 (als Menge wurden hier nur 50% der Menge der LLC-MK₂(p53her)-Klone aufgetragen) gezeigt (Inkubation mit Östradiol). In (B) ist der Klon LLC-MK₂(neo) und der Klon LLC-MK₂(p53her)-21 bei 39°C (Inkubation mit (+) und ohne (-) Östradiol) gezeigt. In (C) sind die Klone LLC-MK₂(neo), LLC-MK₂[p53(138V)her]-4 und -7 (als 4 bzw. 7 bezeichnet) nach Kultivierung bei 39°C (Inkubation mit Östradiol) verglichen.

3.3 Analyse des Einflusses von DNA-*cis*-Elementen auf die homologe Rekombination

Die neu generierten und charakterisierten Viren (pro Fremdsequenz jeweils zwei temperatursensitive Mut-Viren und ein Wt-Virus), die in 3.1 vorgestellt wurden, standen für Rekombinationsstudien mithilfe des neu etablierten Systems (3.1.1) zur Verfügung. Es sollte nunmehr möglich sein, zu untersuchen, inwieweit diese DNA-Elemente Rekombinationsfrequenzen in *cis* modulieren. Hierzu wurden die Rekombinationsfrequenzen zunächst in LLC-MK₂-Zellen(neo)/LMV2-Zellen ermittelt (3.3.1). Um zu überprüfen, ob Rekombination in Nachbarschaft dieser *cis*-Elemente durch Proteine wie Wtp53her und p53(138V)her in *trans* beeinflusst wird, wurden die Rekombinationsfrequenzen in LLC-MK₂-(p53)her-17-, -21- und -5-Zellen und in LLC-MK₂[p53(138V)her]-4- und -7-Zellen analysiert (3.3.2). Ferner wurden die Untersuchungen noch ausgeweitet auf die Fragestellung, ob die Rekombinationsaktivitäten im Zusammenspiel von PARP-1 und Wtp53 moduliert werden (3.3.3).

Die Anzahl der produzierten Viren nach Infektion ist abhängig von der Anzahl der erfolgreich infizierten Zellen. Die Infektionsrate, gemessen in Prozent der infizierten Zellen, steigt mit zunehmender MOI des zur Infektion eingesetzten Virenüberstandes an, jedoch nicht direkt proportional, sondern nähert sich einem Wert von 100% an. Einen weiteren Einfluss auf die Virenfreisetzung, vor allem jedoch auf die DNA-Austauschrage, hat die Anzahl an Viruspartikeln, mit der eine Zelle infiziert wurde. Allgemein gilt: Je höher die eingesetzte MOI, umso mehr Zellen werden von mehr als einem Virus infiziert.

Bei der Berechnung der absoluten Rekombinationsfrequenzen muss jedoch gewährleistet sein, dass die Virusfreisetzung linear zur eingesetzten Viruskonzentration ist. Diese Forderung muss erfüllt sein, da es bei Messungen, die im Bereich der Sättigung der SV40-Produktion stattfinden, zu scheinbar erhöhten Rekombinationsfrequenzen kommt, da die Werte nach Doppelinfektion mit den Werten der Wt-Viren-Infektion normalisiert werden. Die ermittelte maximal einsetzbare MOI im linearen Bereich der Virusfreisetzung nach Infektion und 84-stündiger Inkubation liegt unter den für diese Arbeit zutreffenden Versuchsbedingungen bei 3,3 (Dudenhöffer, 1998). Wie bereits unter 3.1.3 beschrieben, ließen die MOI-Werte der Überstände für die Viren mit verschiedenen DNA-*cis*-Elementen nach Ernte und Konzentrierung vergleichende Rekombinationsmessungen mit MOIs von 0,7 bis 2,1 zu und lagen damit alle im linearen Bereich. Zur Ermittlung der absoluten Rekombinationsfrequenzen wurden jeweils SV40-Wt-, Cla-Wt- bzw. die Fremdsequenzen

tragenden Cla-Wt-Viren-Infektionen (Doppelbestimmungen) und Ko-Infektionen mit den jeweils korrespondierenden Mut1- und Mut2-Viren (Vierfachbestimmungen) durchgeführt. Ebenso wurden Einzelinfektionen zu jedem Mut-Virus durchgeführt, um spontane Rückmutationen auszuschließen.

Für den Rekombinations-Assay (2.6.6) wurden die Zellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ LLC-MK₂(neo)-Zellen bzw. 2×10^5 LLC-MK₂(p53her)-, [p53(138V)her]-Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte 24 h vor der Infektion ausgesät. Die Infektionen wurden mit 170 µl der verdünnten Virensuspension (MOI 0,7 oder höchst mögliche) für 1,5 h bei 39°C durchgeführt (2.6.3) und anschließend die Zellen in frischem Medium 84 h bei 39°C inkubiert. Der Zeitpunkt von 84 h wurde in Vorexperimenten als der Zeitpunkt identifiziert, zu dem bei kurzlebigen Virusvarianten die höchste Anzahl an freigesetzten Viren nachgewiesen werden konnte (Wiesmüller *et al.*, 1996; Dudenhöffer *et al.*, 1998). Die Anzahl der aus den Ko-Infektionen resultierenden Wt-Virenpartikel wurden im Plaque-Assay (2.6.7) wiederum bei der restriktiven Temperatur bestimmt, wobei jede infektiöse Einheit einen Plaque (pfu) induzierte. Bei den Ko-Infektionen wurden unter diesen durchgehend restriktiven Bedingungen nur die durch homologe Rekombination entstandenen Virenpartikel nachgewiesen. Die Virenfreisetzung nach Wt-Viren-Infektion wurde jeweils zur Ermittlung der Anzahl der maximal produzierten Viruspartikel ermittelt.

Für die Einzelinfektionen mit Mut-Viren konnten keine Plaques ausgezählt werden, d.h. dass keine spontanen Rückmutationen einen Wt-Virus generierten. Die absoluten Rekombinationsfrequenzen wurden bestimmt, indem der Quotient aus der Anzahl der Plaques der aus Rekombination hervorgegangenen Wt-Viren und der nach Wt-Viren-Infektion produzierten Viren gebildet wurde. Die resultierenden Werte mussten noch mit einem Korrekturfaktor multipliziert werden, welcher den Anteil der Zellen berücksichtigt, die bei der Ko-Infektion tatsächlich mit beiden Virusmutanten infiziert wurden. Durch diese Multiplikation mit dem Korrekturfaktor wurde der Wert der doppelinfizierten Zellen auf 100% heraufgesetzt. Die Werte zu Versuchen mit Viren eingesetzt bei einer MOI von 0,7 wurden mit dem Faktor 10 korrigiert, die mit einer eingesetzten MOI von 1,3 mit dem Faktor 5 und die mit einer eingesetzten MOI von 2,1 mit dem Faktor 3. So spaltet sich bei einer MOI von 0,7 die MOI für die Mut1- bzw. Mut2-Viren zu je 0,35 auf. Im nächsten Schritt ist eine Division durch 3 notwendig, da CV1-Zellen, mit denen die MOI-Bestimmungen (2.6.4) durchgeführt werden, 3mal effektiver als LLC-MK₂-Zellen infizierbar sind (Wiesmüller *et al.*, 1996; Dudenhöffer *et al.*, 1998). Multipliziert man nun die Werte der Ko-Infektionen (0,108 x 0,108) und dividiert diese wiederum durch den Wert der Einfach-Infektion pro Mut-Virus

(0,108), so ergibt sich der Wert von 0,108. Dies bedeutet, dass mit einem Faktor von 10 multipliziert werden muss, um rechnerisch auf eine Ko-Infektionsfrequenz von 100% zu kommen. Um relative Rekombinationsfrequenzen anzugeben, wurden die Werte für Wtp53her-defiziente Zellen jeweils auf 100% gesetzt und die Höhe der Frequenzen für Wtp53her- oder p53(138V)her-tragende Zellen entsprechend berechnet. Zur Auswertung der Frequenzen wurden jeweils die Mittelwerte von mehreren Experimenten gebildet sowie Standardfehler ermittelt. Es zeigte sich, dass dieses Auswertungsverfahren nicht für alle Versuche beibehalten werden konnte, da zum einen die Viren im Laufe der Zeit gealtert waren und zum anderen nicht alle Viren zum gleichen Zeitpunkt produziert wurden. Dies bedeutete, dass ein Fehler entstanden wäre, wenn alle Werte bei der Mittelwertbildung gleichermaßen berechnet worden wären, ohne die zeitliche Verteilung zu berücksichtigen, da die Anzahl der doppelinfizierten Zellen mit der Virusalterung abnahm. Aus diesen Gründen wurden zum einen Mittelwerte zunächst von zeitlich eng beieinander liegenden Experimenten gebildet und hiervon der Standardfehler ermittelt. Außerdem wurde ein weiterer Korrekturfaktor eingeführt, um Ergebnisse, welche über einen längeren Zeitraum ermittelt worden waren, vergleichbar zu machen. Die folgenden hier vorgestellten Ergebnisse repräsentieren stets korrigierte Werte.

3.3.1 Ermittlung der Rekombinationsfrequenzen in LLC-MK₂(neo)/LMV2-Zellen

Um den möglichen Einfluss der Fremdsequenzen in den SV40-Genomen zu untersuchen, wurden Rekombinationsfrequenzen in LLC-MK₂(neo) und LMV2-Zellen gemessen.

In Tabelle 3.3 ist das Ergebnis von 8-14 unabhängigen Messungen in den zwei Klonen aufgelistet. Annähernd gleiche Rekombinationsfrequenzen wurden mit dem SV40-Viren-Satz (SV40-Wt, SV40-Mut1, SV40-Mut2) und dem Cla-Viren-Satz (Cla-Wt, Cla-Mut1, Cla-Mut2) gemessen (9,7 bzw. 10,4 x 10⁻⁴). Dieses Ergebnis zeigt, dass das neu etablierte System, welches Rekombinationsfrequenzen zwischen den st-deletierten (st⁻) Cla-Virengenomen misst, keine Veränderungen gegenüber dem unmodifizierten SV40-Wt-System (Wiesmüller *et al.*, 1996) aufweist und sich somit eignet, Fremdsequenzen auf ihren Einfluss in *cis* auf die interchromosomale Rekombination zu untersuchen.

DNA-Sequenz	Rekombinationsfrequenz [x 10 ⁻⁴]	Stimulation
SV40-Wt	9,7 +/- 1,3	1,0
<i>Cla-Linker</i>	10,4 +/- 3,1	1,1
SceRS	12,5 +/- 2,5	1,3
<i>TALI</i> -BCR	17,5 +/- 2,3	1,8
<i>LMO2</i> -BCR	21,2 +/- 3,2	2,2
<i>RARα</i> -BCR	18,8 +/- 5,0	1,9
<i>MLL</i> -BCR	33,6 +/- 5,3	3,5
<i>IgHE</i> -MAR	50,9 +/- 6,0	5,2
<i>PARP</i> -MAR	209,9 +/- 49,6	21,6
CTG98	29,0 +/- 3,4	3,0
RGC	45,1 +/- 11,7	4,6
RGCmut	45,0 +/- 11,8	4,6

Tabelle 3.3: Absolute Rekombinationsfrequenzen in LLC-MK₂(neo)- und LMV2-Zellen. Rekombinations-Assays wurden mit LLC-MK₂(neo)- bzw. LMV2-Zellen mit SV40-Wt, SV40-Mut1 und SV40-Mut2 bzw. Cla-Wt, Cla-Mut1 und Cla-Mut2 bzw. mit Cla-Wt, Cla-Mut1 und Cla-Mut2 mit den angegebenen DNA-Sequenzen durchgeführt. Rekombinationsfrequenzen und Standardfehler wurden berechnet nach den Mittelwerten von 8-14 unabhängigen Messungen der beiden Klone nach Inkubation in Anwesenheit von 1 μ M Östradiol. Die Stimulationswerte repräsentieren den Quotienten aus den Rekombinationsfrequenzen der Fremdsequenz-tragenden Viren versus den Werten mit SV40-Wt-Viren. Der Rekombinationsfrequenz mit Cla-Viren mit der SceRS-Sequenz wurde in Kooperation mit Fr. Dipl.-Lebensmittel-Chem. A. Restle gewonnen.

Die Rekombinationsfrequenzen, die mit *TALI*-BCR, *LMO2*-BCR und *RAR α* -BCR bestimmt wurden, zeigten eine zweifache Stimulation in Relation zum SV40-Wt-Viren-Satz. Das *MLL*-BCR-Fragment und die repetitiven Sequenzen (CTG98, RGC und RGCmut) verursachten eine 3-5fache Erhöhung der basalen Rekombinationsfrequenzen. Cla-*IgHE*-MAR- und Cla-*PARP*-MAR-Viren rekombinierten mit den höchsten Frequenzen (50,9 bzw. 209,9 x 10⁻⁴). Diese Ergebnisse zeigen, dass die interchromosomale Rekombination durch bestimmte *cis*-regulatorische Sequenzen stimuliert wird.

Die Cla-*Linker*, die SceRS als Fremdsequenz trugen, wurden ebenfalls untersucht. Diese Fremdsequenz war in die Cla-*Linker* eingeführt worden, um in Zellen mit Expression von I-SceI Doppelstrangbrüche gezielt in die Rekombinationssubstrate einzuführen (s. auch Akyüz *et al.*, 2002). Da die Rekombinationsfrequenzen denen von SV40-Wt bzw. Cla-Wt nahezu

entsprechen (Ergebnisse sind in Kooperation mit Fr. Dipl.-Lebensmittel-Chem. A. Restle erzielt worden), spielt die Verlängerung der Homologien um 0,3-0,4 kb in Viren mit Fremdsequenz versus *Cla-Linker*-Viren keine ursächliche Rolle für die Steigerung der Rekombinationsfrequenzen z.B. im Falle der BCR- oder MAR-Viren. Des Weiteren sind diese Viren für einen Einsatz als Positivkontrolle in Zellen mit I-*SceI*-Expression geeignet.

3.3.2 Untersuchungen zum Einfluss von DNA-*cis*-Elementen auf die DNA-Rekombination in Wtp53her- und p53(138V)her-exprimierenden Zellen

Wtp53 hat das Potential, die homologe Rekombination zu regulieren (Wiesmüller *et al.*, 1996; Mekeel *et al.*, 1997; Dudenhöffer *et al.*, 1998; Akyüz *et al.*, 2002; Janz & Wiesmüller 2002). Um zu überprüfen, ob diese regulatorische Eigenschaft von Wtp53 in Nachbarschaft der *cis*-Elemente beeinflusst wird, sollten neben dem LLC-MK₂(p53her)-17- (Dudenhöffer *et al.*, 1998) und dem LMV2-p53her-K18-Klon auch die unter 3.2 beschriebenen, in dieser Arbeit neu etablierten Klone LLC-MK₂(p53)her-21 und -5 auf ihre rekombinationsinhibitorische Wirkung hin untersucht werden. Um die Funktionen der transkriptionellen Transaktivierung und Wachstumskontrolle von der rekombinationsregulatorischen Rolle von p53 in Bezug auf die Fremdsequenzen unterscheiden zu können, wurden die neu etablierten LLC-MK₂[p53(138V)her]-Klone -4 und -7 ebenso untersucht. Das Protein p53(138V) eignet sich dafür hervorragend, da es zwar transkriptionell inaktiv ist (Harvey *et al.*, 1995), aber rekombinationsinhibierende Eigenschaften besitzt (Akyüz *et al.*, 2002).

In Abbildung 3.21 ist das Ergebnis der Experimente zusammengestellt. Im Anhang unter 7.1 findet sich eine Aufstellung der absoluten Rekombinationsfrequenzen zu den in dieser Arbeit in den einzelnen Wtp53her- und p53(138V)her-Klonen eingesetzten Viren mit Standardfehlern.

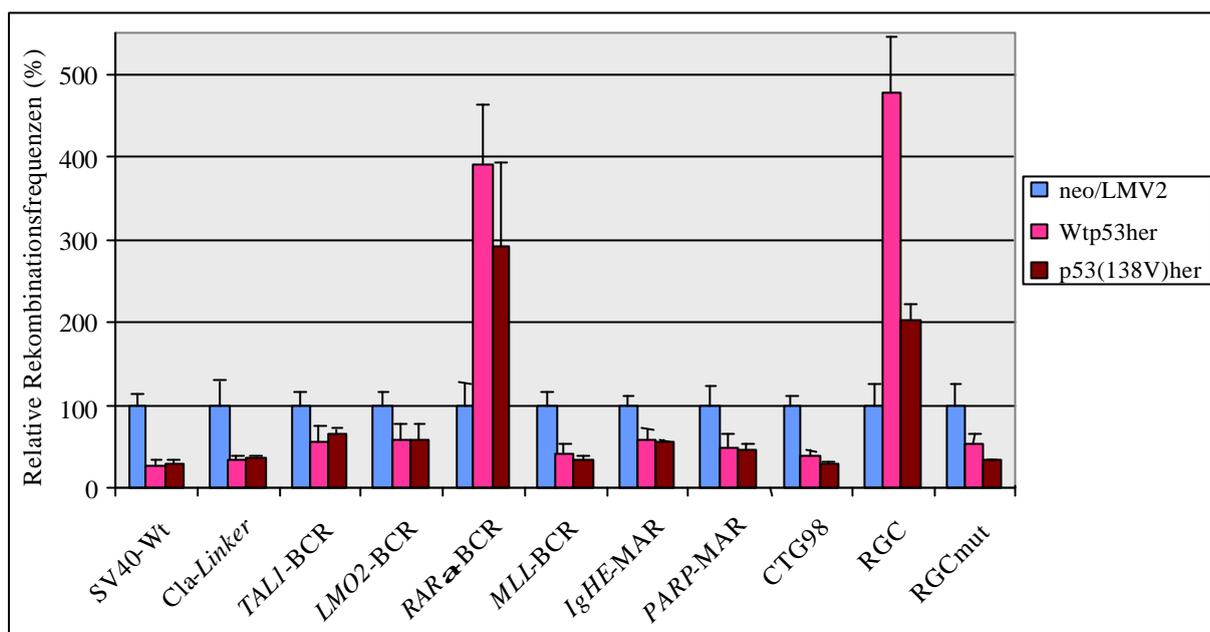


Abbildung 3.21: Einfluss von DNA-*cis*-Elementen auf die relativen Rekombinationsfrequenzen in LLC-MK₂-Zellen mit Wtp53her oder p53(138V)her. Indikator-Viren ohne Fremdsequenz (SV40-Wt), mit Cla-*Linker* oder mit eingeführten Fremdsequenzen wurden für Rekombinationsmessungen eingesetzt. Rekombinationsfrequenzen in LLC-MK₂(neo)/LMV2-Zellen (neo/LMV2) wurden auf 100% gesetzt (absolute Frequenzen siehe Tabelle 3.3) und die relativen Rekombinationsfrequenzen mit Standardfehler wurden berechnet. Es wurden insgesamt vier Wtp53her- (LLC-MK₂(p53her)-17, -21, -5 und LMV2-p53her-K18), als Wtp53her bezeichnet, und zwei p53(138V)her-Klone (LLC-MK₂[p53(138V)her-4 und -7]), als p53(138V)her bezeichnet, für jeweils zwei bis sechs unabhängige Experimente eingesetzt.

Im Einklang mit früheren Studien unter Verwendung des SV40-Testsystems (Wiesmüller *et al.*, 1996; Dudenhöffer *et al.*, 1998) konnte auch hier gezeigt werden, dass Wtp53her die homologe Rekombination wirksam unterdrückt. Die Frequenz für den SV40-Wt-Viren-Satz war im Durchschnitt 3,7fach reduziert in den Wtp53her-exprimierenden Zellen im Vergleich zu LLC-MK₂(neo)/LMV2-Zellen. Für den Wtp53her am höchsten exprimierenden Klon LLC-MK₂-(p53her)-21 betrug die Frequenz $1,8 \times 10^{-4}$, damit unterdrückte Wtp53her die homologe Rekombination um den Faktor 5,4. Die Inhibitionswerte in Wtp53her-exprimierenden Zellen waren für folgende Fremdsequenzen ähnlich: Cla-*Linker*: 3,0; TALI-BCR: 1,8; LMO2-BCR: 1,7; MLL-BCR: 2,5; IgHE-MAR: 1,8; PARP-MAR: 2,0; CTG: 2,6; RGCmut: 1,9. Der Inhibitionsfaktor lag also bei 2-4 in den Wtp53her-exprimierenden Klonen. Wtp53her hat also offenbar die Kapazität, DNA-Austauschereignissen entgegenzuwirken, sogar, wenn MAR-Elemente in den Sequenzen enthalten sind, für die eine Stimulation der spontanen Rekombination angenommen wird (Boulikas *et al.*, 1994) und die hier bestätigt werden konnte (siehe Tabelle 3.3).

Im Gegensatz zu diesen mit den oben genannten Fremdsequenz tragenden Cla-Viren-Sätzen erhöhten sich die Rekombinationsfrequenzen mit RAR α -BCR- und RGC-tragenden Cla-Viren

in einer offenbar von Wtp53her beeinflussten Weise. Eine 3,9-fache (*RAR α* -BCR-Viren) bzw. 4,8-fache Steigerung (RGC-Viren) wurde in Wtp53her-exprimierenden Zellen versus LLC-MK₂(neo)-/LMV2-Zellen gemessen.

Überdies unterschieden sich die in LLC-MK₂[p53(138V)her]-Zellen gemessenen Rekombinationsfrequenzen nicht signifikant von denen in Wtp53her-exprimierenden Zellen für die SV40-Wt-, *Cla-Linker*-, *TAL1*-BCR-, *LMO2*-BCR-, *MLL*-BCR-, *IgHE*-MAR-, *PARP*-MAR-, CTG98-, RGCmut- und *RAR α* -BCR-Viren-Sätze. In den Experimenten mit RGC-Viren wurde die Rekombination nur um das 2fache durch p53(138V)her stimuliert, d.h. 2mal weniger als durch Wtp53her-Zellen.

Durch diese Experimente konnte deutlich herausgearbeitet werden, dass sowohl rekombinationsinhibitorische als auch rekombinationsstimulatorische Aktivitäten durch Wtp53her und durch p53(138V)her ausgeübt werden. Aufgrund der Eigenschaften von p53(138V) kann angenommen werden, dass diese beiden Aktivitäten von den transkriptionellen Transaktivatorfunktionen von p53 unabhängig sind.

3.3.3 Untersuchungen zum Einfluss von DNA-*cis*-Elementen auf die homologe Rekombination in Wtp53her- und PARP-1-exprimierenden Zellen

Mithilfe der LMV2-p53her-K18-, LMV2-PARP-K13-, LMV2-p53herPARP-K11-Zellen im Vergleich zu der Parentalzelllinie LMV2 wurde der Einfluss von PARP-1, dem eine antirekombinogene Rolle zugewiesen wird (Magnussen & Ramel, 1990) im Zusammenspiel mit Wtp53her auf die homologe Rekombination untersucht. Die LMV2-Zellen besitzen endogen p53(Δ 237-239) und PARP-1, der Klon LMV2-p53her-K18 trägt zusätzlich exogen p53her, der Klon LMV2-PARP-K13 zusätzlich exogen PARP-1 und der Klon LMV2-p53herPARP-K11 zusätzlich exogen p53her und PARP-1 (s. 2.1.11).

Für den SV40-Wt-Viren-Satz (Abbildung 3.22 A) konnte in Kooperation mit Fr. Dipl.-Biol. S. Süße in LMV2-Zellen eine Rekombinationsfrequenz von $9,4 \times 10^{-4}$ ermittelt werden, die durch Wtp53 der LMV2-p53her-K18-Zellen auf $2,1 \times 10^{-4}$ herabreguliert wurde. Der Inhibitionsfaktor lag somit bei 4,5. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Ergebnissen (Dudenhöffer *et al.*, 1998) und auch den hier unter 3.3.1 und 3.3.2 vorgestellten überein. In LMV2-PARP-K13-Zellen zeigte sich eine mit der von Wtp53her vergleichbare Senkung der Rekombinationsfrequenz auf $2,8 \times 10^{-4}$. Überraschenderweise wurde die Rekombination in LMV2-p53her/PARP-K11-Zellen nicht inhibiert und zeigte mit $11,1 \times 10^{-4}$ eine ähnliche Frequenz wie in LMV2-Zellen.

Des weiteren wurden die Cla-*MLL*-BCR-, -*RAR α* -BCR- und die -*PARP*-MAR-Viren in diesem Zellsystem untersucht (Abbildung 3.22 B).

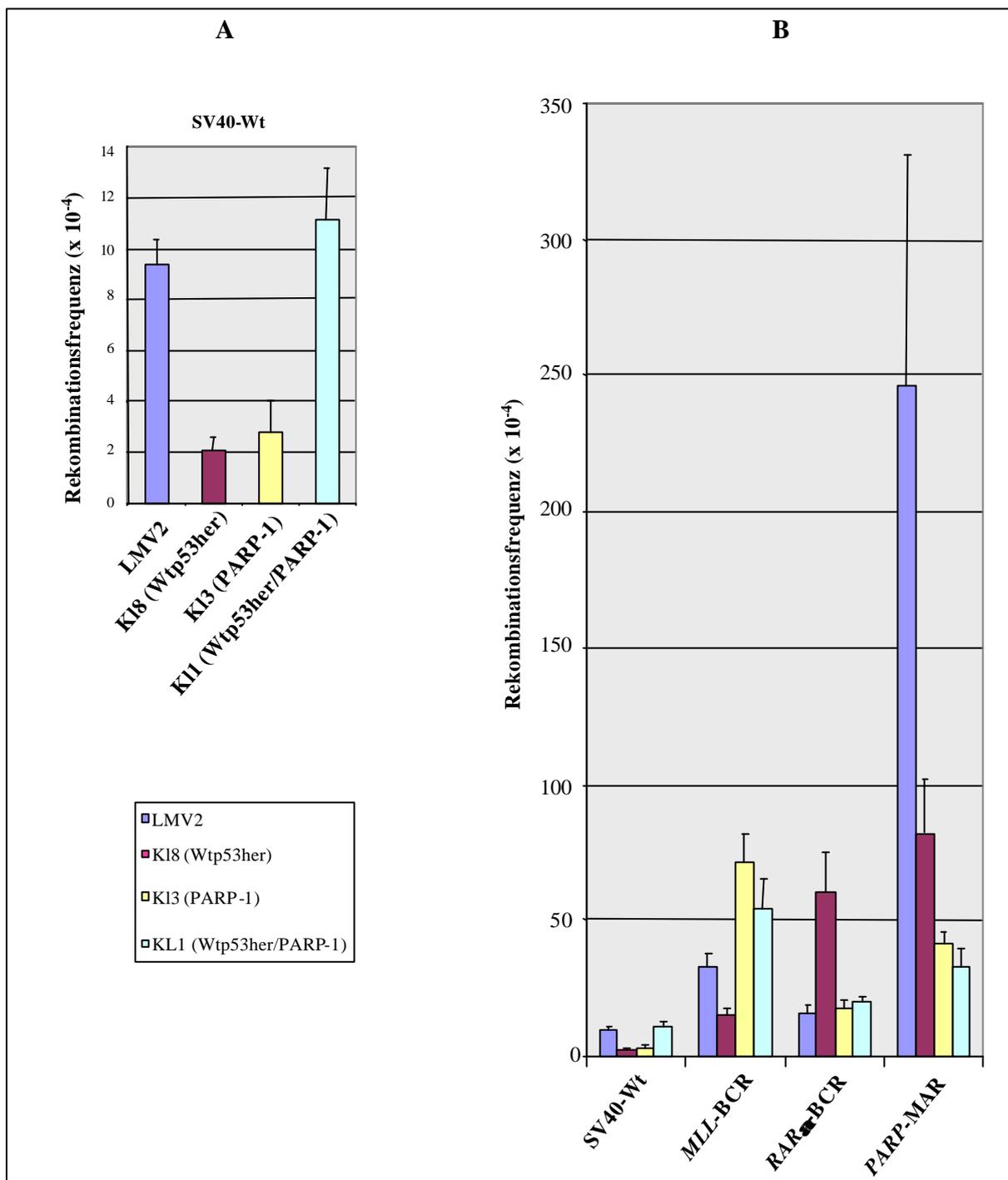


Abbildung 3.22: Rekombinationsfrequenzen in Wtp53her- und PARP-1- exprimierenden Zellen. Indikator-Viren ohne Fremdsequenz (SV40-Wt) bzw. mit Cla-Linker oder zusätzlich eingeführten Fremdsequenzen wurden für Rekombinationsmessungen eingesetzt (s. Tabelle 3.3). Es wurden in LMV2-Zellen (LMV2) vier bis neun, in LMV2-p53her-K18- [K18(Wtp53her)] acht bis vier, in LMV2-PARP-K13- [K13 (PARP-1)] und LMV2-p53her/PARP-K11-Zellen [K11 (Wtp53her/PARP-1)] vier bis zwei Einzelmessungen durchgeführt und jeweils der Standardfehler angegeben. Die in (A) dargestellten Ergebnisse wurden in Kooperation mit Frau Dipl.-Biol. S. Süße erzielt und finden sich in der Zusammenstellung der Ergebnisse in (B) wieder. In (B) ist ein Vergleich der absoluten Rekombinationsfrequenzen dargestellt.

Wie zu erwarten, zeigte sich mit *MLL*-BCR- und *-PARP*-MAR-Viren eine inhibitorische Wirkung von Wtp53her in den LMV2-p53her-K18-Zellen, mit *RAR α* -BCR-Viren jedoch eine Stimulation der Rekombination (vgl. 3.3.2). In den LMV2-PARP-K13-Zellen zeigte sich mit *RAR α* -BCR- und *PARP*-MAR-Viren eine ähnliche Rekombinationsfrequenz wie für die Zellen mit Wtp53her (vgl. 3.3.2), jedoch für die *MLL*-BCR-Viren eine stark erhöhte Frequenz ($71,0 \times 10^{-4}$), die sogar über der für LMV2-Zellen (33×10^{-4}) lag. In LMV2-p53herPARP-K11-Zellen zeigte sich mit *RAR α* -BCR-Viren wiederum eine ähnliche Frequenz wie in den LMV2-Zellen gemessen, mit *MLL*-BCR-Viren war die Frequenz erhöht (in LMV2-p53herPARP-K11-Zellen: $54,7 \times 10^{-4}$). Interessanterweise wurde die Rekombination in LMV2-p53herPARP-K11-Zellen mit *PARP*-MAR-Viren unter das Niveau von LMV2-p53her-K18-Zellen gedrückt. Klon LMV2-p53herPARP-K11 zeigte damit die deutlichste Inhibition (in LMV2-Zellen: $246,2 \times 10^{-4}$, in LMV2-p53her-K18-Zellen: $81,51 \times 10^{-4}$, in LMV2-PARP-K13: 41,6 und in LMV2-p53herPARP-K11: 32,4), obwohl die Rekombinationsfrequenzen in allen anderen Fällen durch die Expression von Wtp53her und die gleichzeitige Überexpression von PARP-1 über das Niveau der Kontrollzellen angehoben wurde.

3.4 Bestimmung der *de novo* DNA-Synthese der rekombinativen SV40-Viren unter Rekombinations-Assay-Bedingungen

Die homologe Rekombination steht in einem engen Zusammenhang mit dem Anhalten der Replikationsgabel sowohl in zellulären als auch in SV40-Chromosomen (Flores-Rozas & Kolodner, 2000; Saintigny *et al.*, 2001; Janz & Wiesmüller, 2002). Neueste Untersuchungen zeigten zudem, dass replikationsassoziierte Rekombinationsprozesse durch Wtp53 reguliert werden (Saintigny & Lopez, 2002; Janz & Wiesmüller, 2002). Mit Versuchen in isogenen Zelllinien, die Wtp53 versus Mutp53 tragen, konnte gezeigt werden, dass die SV40-Replikation unverändert bleibt (von der Weth & Deppert, 1993), bzw. durch Wtp53 schwach reduziert wird (Janz & Wiesmüller, 2002).

Um den Einfluss der ausgewählten DNA-*cis*-Elemente auf die virale DNA-Synthese und damit indirekt auf replikationsassoziierte Rekombinationsprozesse hin zu analysieren, wurde die [³H]-Thymidin-Inkorporation in die viralen Genome zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (hpi) untersucht.

Hierzu wurden als Zellsysteme LLC-MK₂(p53)her-17/LMV2-p53her-K18 und LLC-MK₂(neo)/LMV2 (3.4.1) bzw. LMV2, LMV2-p53her-K18, LMV2-PARP-K13 und LMV2-p53herPARP-K11 (3.4.2) verwendet.

LLC-MK₂(neo)/LMV2- und LLC-MK₂(p53her)-17/LMV2-p53her-K18-Zellen wurden mit den SV40-Wt-Viren bzw. den die Fremdsequenzen tragenden Cla-Wt-Viren infiziert (2.6.3), bei 39°C mit 1 µM Östradiol inkubiert und mit 20 µCi ³[H]-Thymidin nach 12, 24, 36, 48 h nach Infektion (hpi) markiert (2.2.5). Anschließend erfolgte die Isolierung der episomalen DNA (2.2.6) und Phenol/Chloroform-Extraktion (2.2.8). Die Inkorporation von ³[H]-Thymidin in die virale DNA wurde zu verschiedenen Zeiten nach Infektion (hpi) bestimmt (2.2.20.2). Die maximale DNA-Synthese-Rate für SV40-Wt in LLC-MK₂(neo)/LMV2-Zellen bei 24 h wurde als 100% gesetzt und die relativen Raten kalkuliert.

3.4.1 Untersuchungen mit LLC-MK₂(p53)her-17/LMV2-p53her-K18- und LLC-MK₂(neo)/LMV2-Zellen

Die Versuche zur *de novo* DNA-Syntheserate in SV40-Wt-infizierten Zellen wurde in Kooperation mit Fr. Dipl.-Biol. C. Janz durchgeführt.

In Abbildung 3.23 sind die Ergebnisse der Versuche dargestellt.

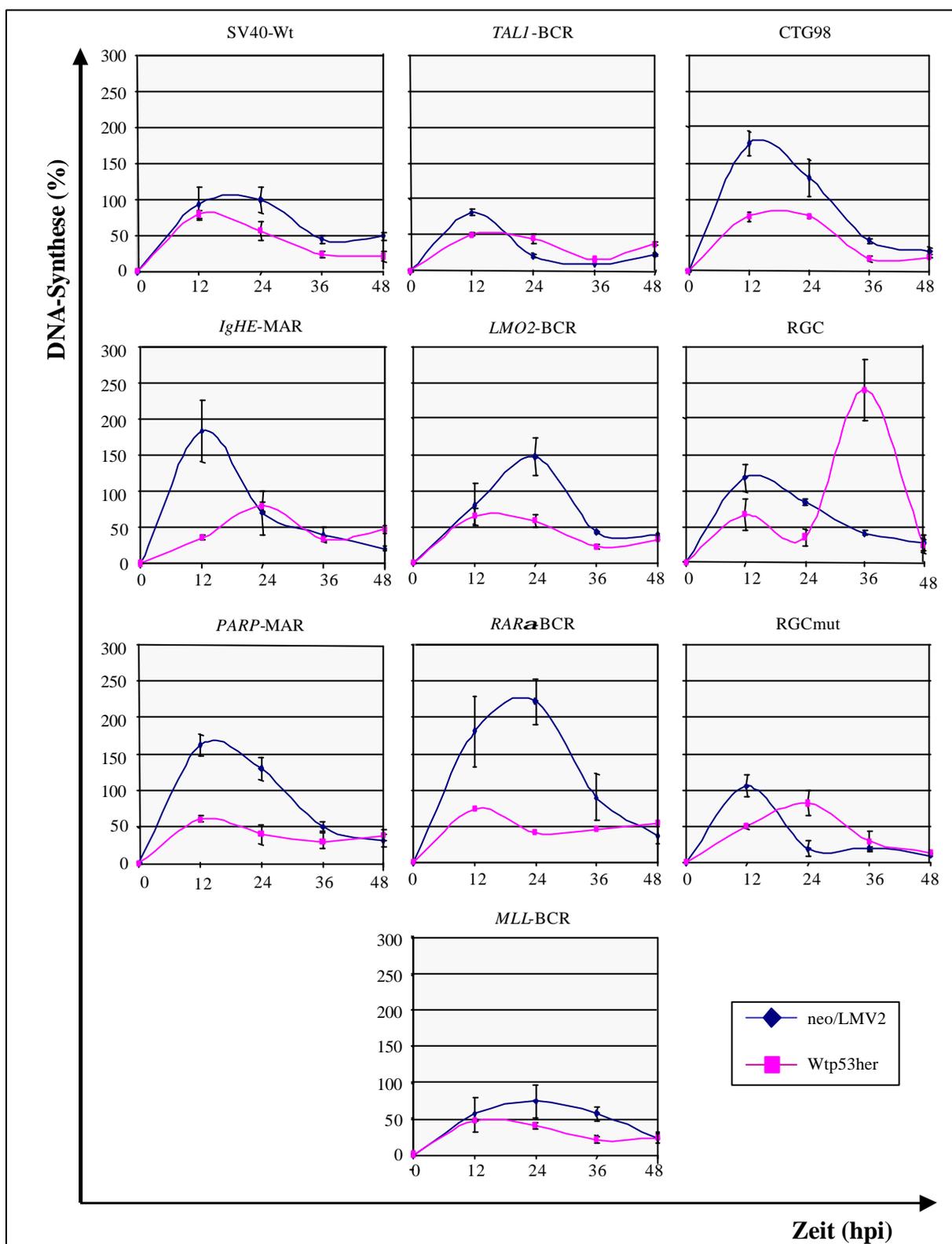


Abbildung 3.23: *De novo* DNA-Synthese der rekombinanten SV40-Viren unter Rekombinations-Assay-Bedingungen. LLC-MK₂(neo)/LMV2- (blaue Rhomben; neo/LMV2) und LLC-MK₂(p53her)-17/LMV2-p53her-K18-Zellen (pinkfarbene Quadrate; Wtp53her) wurden mit den Viren infiziert (2.6.3), die die aufgeführten Fremdsequenzen tragen. Die Zellen wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ (LLC-MK₂(neo)/LMV2-Zellen) bzw. 2×10^5 (LLC-MK₂(p53her)/LMV2-p53her-K18-Zellen) pro Loch einer 6-Loch-Platte 24 h vor der Infektion ausgesät und in Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ Östradiol bei 39°C kultiviert und mit $20 \mu\text{Ci}$ ^3H -Thymidin nach 12, 24, 36, 48 h nach Infektion (hpi) markiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der episomalen DNA und eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Die Inkorporation von ^3H -Thymidin in die virale DNA wurde zu

verschiedenen Zeiten nach Infektion (hpi) bestimmt. Die maximale DNA-Syntheserate für SV40-Wt in LLC-MK₂(neo)/LMV2-Zellen bei 24 h wurde als 100% gesetzt und die relativen Raten kalkuliert. Die Werte sind mit Standardfehler angegeben und repräsentieren die Ergebnisse von je zwei bis vier unabhängigen Messungen.

Nach Infektion von LLC-MK₂(neo)/LMV2-Zellen mit Cla-Wt-*TALI*-BCR, -*LMO2*-BCR, -*MLL*-BCR, -RGC und -RGCmut trat das gleiche Replikationsmuster wie mit der SV40-Wt-Kontrolle auf. Die höchste DNA-Syntheserate wurde zwischen 12 und 24 h nach Infektion gemessen, bei Cla-Wt-*MLL*-BCR etwas verzögert noch bis 36 hpi. Mit Cla-*IgHE*-MAR, -*PARP*-MAR- und CTG98-Virengenomen konnte eine 2fache Zunahme der DNA-Synthese bei 12 hpi gemessen werden. Die Replikation von Cla-Wt-*RAR α* -BCR-Genomen zeigte eine 2fache Zunahme nach 12, 24 und 36 hpi.

In LLC-MK₂(p53her)-17/LMV2-p53her-K18-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der ³[H]-Thymidin-Inkorporation in die SV40-Wt-, *IgHE*-MAR-, *PARP*-MAR-, *TALI*-BCR-, *LMO2*-BCR-, *MLL*-BCR-, CTG98- und RGCmut-Virengenome gemessen werden. Die höchsten DNA-Syntheseraten lagen in diesen Genomen zwischen 12 bis 24 h nach Infektion. Dagegen replizierte das Cla-Wt-RGC-Virusgenom mit einem verzögerten Höhepunkt bei 36 h bei einer um etwa das 2,5fache erhöhten DNA-Syntheserate.

Nach diesen Ergebnissen lässt sich darauf schließen, dass eine von Wtp53 abhängige Verzögerung der viralen Replikation durch zahlreiche Kopien der Wtp53-Bindungssequenz RGC verursacht wurde. Die Einführung dieser Sequenz, die spezifisch durch Wtp53 erkannt wird, veränderte also sowohl die virale Replikation als auch die interchromosomale Rekombination (s. 3.3.2) in einer von Wtp53 abhängigen Weise.

3.4.2 Untersuchungen mit LMV2-p53her-K18-, LMV2-PARP-K13- und LMV2-p53herPARP-K11-Zellen

Analog zu den Untersuchungen in 3.4.1 wurde die *de novo* DNA-Syntheserate in LMV2-, LMV2-p53her-K18-, LMV2-PARP-K13- und LMV2-p53herPARP-K11-Zellen gemessen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.24 graphisch dargestellt.

Nach Infektion von LMV2-Zellen mit Cla-Wt-*MLL*-BCR, -*RAR α* -BCR- und *PARP*-MAR trat das gleiche Replikationsmuster wie mit der SV40-Wt-Kontrolle auf. Die höchste DNA-Syntheserate wurde 24 h nach Infektion gemessen, bei Cla-Wt-*MLL*-BCR etwas verzögert noch bis 36 hpi.

In LMV2-p53her-K18-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Inkorporation in die Vireng Genome gemessen werden, einzig für das Cla-Wt-*PARP*-MAR-Genom zeigte sich bei 48 hpi eine kaum signifikante Erhöhung.

In LMV2-*PARP*-K13-Zellen lagen die höchsten DNA-Syntheseraten in SV40-Wt-Virengenomen bei 12 h nach Infektion, bei Cla-Wt-*MLL*-BCR- zwischen 12 und 24 hpi und bei Cla-Wt-*RAR α* -BCR- und *PARP*-MAR-Virengenomen zwischen 12 und 36 h nach Infektion.

In LMV2-p53her*PARP*-K11-Zellen trat die höchste $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Inkorporation bei Cla-Wt-*RAR α* -BCR- und -*PARP*-MAR-Viren bei 12 hpi auf, daneben zeigte der Cla-Wt-*MLL*-BCR-Virus ein allerdings signifikantes zweites Maximum bei 36 h nach Infektion.

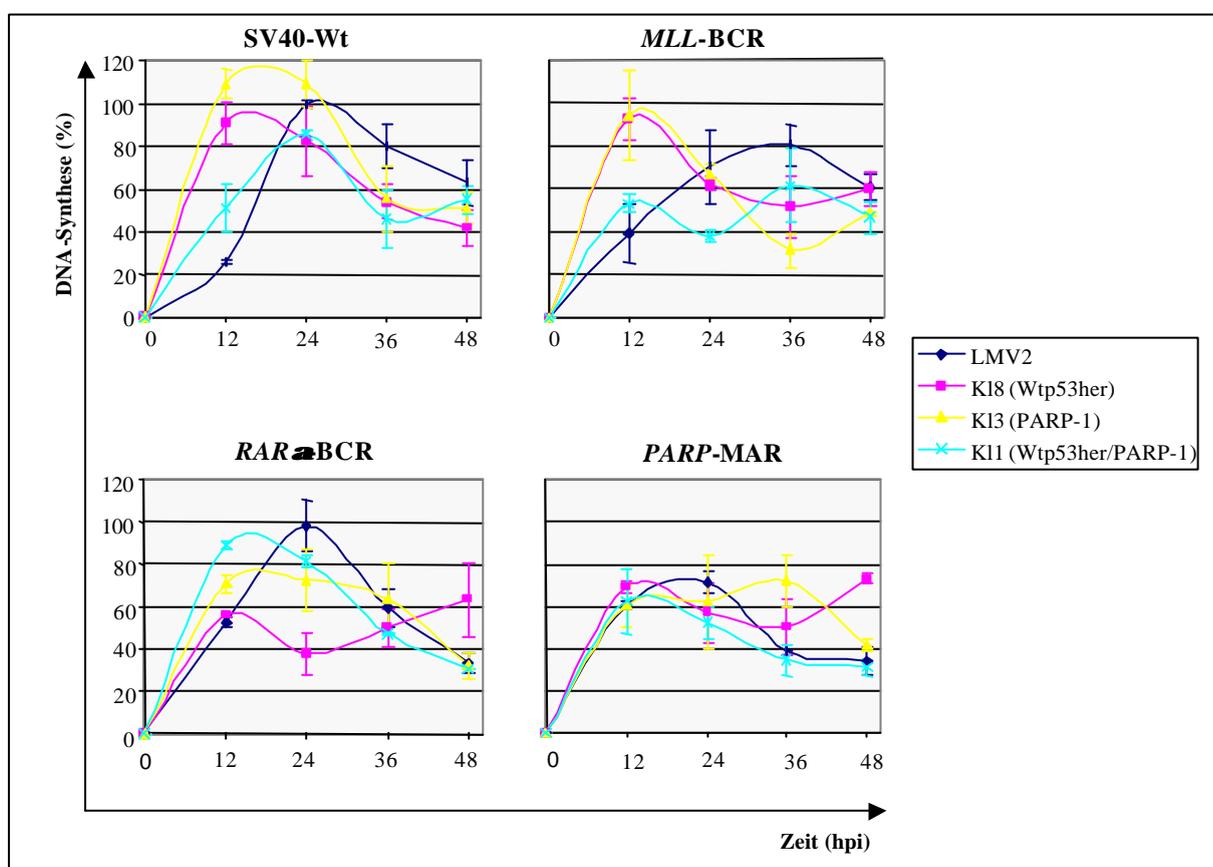


Abbildung 3.24: *De novo* DNA-Synthese der rekombinanten SV40-Viren unter Rekombinations-Assay-Bedingungen nach Expression von Wtp53her und PARP-1. LMV2- (blaue Rhomben; LMV2), LMV2-p53her-K18-Zellen (pinkfarbene Quadrate; Wtp53her), LMV2-*PARP*-K13 (gelbe Dreiecke; PARP-1) und LMV2-p53her*PARP*-K11 (türkise Kreuze; Wtp53her/PARP-1) wurden mit den Viren infiziert (2.6.3), die die aufgeführten Fremdsequenzen tragen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ LMV2-Zellen bzw. 2×10^5 (LMV2-p53her-K18-Zellen) pro Loch einer 6-Loch-Platte 24 h vor der Infektion ausgesät und in Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ Östradiol bei 39°C kultiviert und mit $20 \mu\text{Ci}$ $^3\text{[H]}$ -Thymidin nach 12, 24, 36, 48 h nach Infektion (hpi) markiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der episomalen DNA und eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Die Inkorporation von $^3\text{[H]}$ -Thymidin in die virale DNA wurde zu verschiedenen Zeiten nach Infektion (hpi) bestimmt (2.2.20.2). Die maximale DNA-Synthese-Rate für SV40-Wt in LMV2-Zellen bei 24 h wurde als 100% gesetzt und die relativen Raten kalkuliert. Die Werte sind mit Standardfehler angegeben und repräsentieren die Ergebnisse von je zwei bis sechs unabhängigen Messungen.

Nach diesen Ergebnissen scheint PARP-1 im Zusammenspiel mit Wtp53 oder alleine für die *RAR α* -BCR-, *MLL*-BCR- und *PARP*-MAR- im Vergleich zum SV40-Wt-Virengenom keine signifikanten Veränderungen in der Replikation zu verursachen.

3.5 Gelretardationsanalysen zur Untersuchung der spezifischen Erkennung von DNA-*cis*-Elementen durch p53

p53 ist ein DNA-Bindeprotein, das in der Lage ist, spezifisch an bestimmte Erkennungs-Sequenzen zu binden (El-Deiry *et al.*, 1992; Bargonetti *et al.*, 1993). Mithilfe von Gelretardationsanalysen ist es möglich, Bindungsstudien von Proteinen und DNA-Fragmenten durchzuführen. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass sich DNA-Substrate im elektrischen Feld schneller bewegen als der größere Komplex aus gebundenem Protein und DNA. Wenn die eingesetzte DNA radioaktiv markiert ist, kann die Veränderung in der Mobilität der DNA nach erfolgter Proteinbindung mit Hilfe einer Autoradiographie detektiert werden (2.5). Die Spezifität der Bindung kann durch Inkubation mit Antikörpern im sogenannten *supershift* überprüft werden.

3.5.1 Aufreinigung von Wtp53, p53(248P) und p53(273P) und Analyse der aufgereinigten p53-Proteine

Vorraussetzung für die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen p53 und den DNA-*cis*-Elementen war die Gewinnung und Aufreinigung der rekombinanten Proteine p53, p53(248P) und p53(273P) aus Bakuloviren (2.1.10). Die Aufreinigung erfolgte durch sequentielle Kernfraktionierung (2.4.1; Dudenhöffer *et al.*, 1998). Dabei findet sich der Großteil des nukleären p53-Proteins angereichert nach Salzextraktion (200 mM) bei pH 9,0 in den sogenannten SC-Überständen, welche für alle weiteren Versuche verwendet wurden. Neben Wtp53 wurden so für die Gelretardationsanalysen die Mutp53-Proteine p53(248P), das eine DNA-Kontaktmutante darstellt und p53(273P), eine Konformationsmutante (Levine *et al.*, 1991), gewonnen.

In Abbildung 3.25 sind die Untersuchungen nach den Aufreinigungen dargestellt. Nach Coomassie-Blaufärbung [Abbildung 3.25A; 2.4.5 und *Western-Blot*-Analyse (Abbildung 3.25B, 2.4.6)] wurde für alle drei aufgereinigten Proteine durch den Vergleich zur BSA-Eichreihe eine Menge von je 30 ng/ μ l abgeschätzt. Dies entspricht einer Konzentration von 0,2 μ M für das p53-Tetramer.

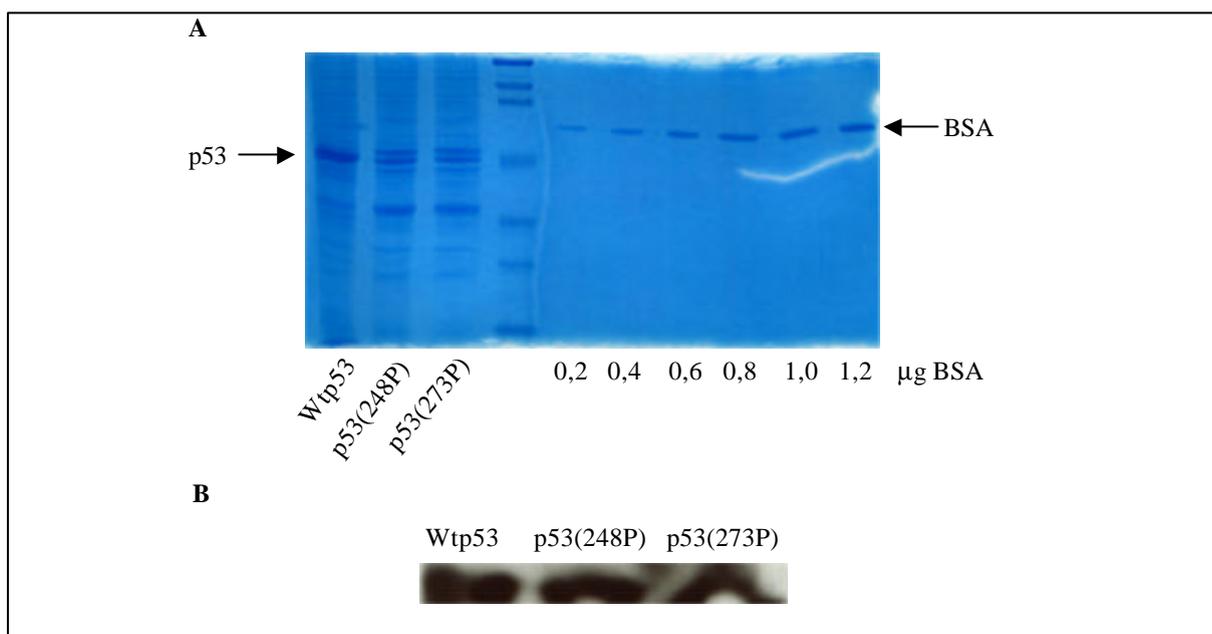


Abbildung 3.25: Analyse der Aufreinigung von Wtp53, p53(248P) und p53(273P). Die Aufreinigung wurde mithilfe sequentieller Kernfraktionierung (2.4.1) durchgeführt. Von den gewonnenen SC-Überständen wurden je 20 µl pro Spur eines Polyacrylamidgels aufgetragen und durch SDS-PAGE (2.4.4) aufgetrennt. Anschließend wurde eine Färbung mit Coomassie-Blau [2.4.5, (A)] und eine *Western-Blot*-Analyse [2.4.6 (B)] durchgeführt. Die Immunmarkierung erfolgte mit DO-1 als Primärantikörper.

3.5.2 Herstellung der radioaktiven DNA-Fragmente

Zum Einsatz der DNA-*cis*-Elemente mussten diese durch eine PCR-Reaktion mit [α - 32 P]-dCTP radioaktiv markiert werden (2.2.12.2). Dabei wurden die in Tabelle 3.4 aufgeführten Matrizen und Oligonukleotide verwendet. Zur Überprüfung der korrekten Amplifikation der PCR-Fragmente wurden parallel nichtradioaktive PCR-Reaktionen nach dem gleichen Protokoll, aber ohne [α - 32 P]-dCTP, nach Aufreinigung eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt und die DNA-Mengen (2.2.10.2) bzw. die Radioaktivität pro PCR-Fragment quantifiziert (2.2.20.1).

PCR-Fragment	Matrize	Oligonukleotide
Cla-Wt	<u>pUC-Cla-Wt</u>	cis-2b und cis-2c
<i>MLL</i> -BCR	<u>pUC-Cla-Wt-<i>MLL</i>-BCR</u>	cis-2b und cis-2c
<i>RARα</i> -BCR	<u>pUC-Cla-Wt-<i>RARα</i>-BCR</u>	RAR-1 und RAR-2
<i>LMO2</i> -BCR	<u>pUC-Cla-Wt-<i>LMO2</i>-BCR</u>	cis-2b und cis-2c
<i>TALI</i> -BCR	<u>pUC-Cla-Wt-<i>TALI</i>-BCR</u>	cis-2b und cis-2c
<i>IgHE</i> -MAR	<u>pUC-Cla-Wt-<i>IgHE</i>-MAR-BCR</u>	cis-2b und cis-2c
<i>PARP</i> -MAR	<u>pUC-Cla-Wt-<i>PARP</i>-MAR-BCR</u>	cis-2b und cis-2c
RGC	<u>pUC-Cla-Wt-RGC-BCR</u>	cis-2b und cis-2c
RGCmut	<u>pUC-Cla-Wt-RGCmut-BCR</u>	cis-2b und cis-2c
CTG98	<u>pUC-Cla-Wt-CTG98-BCR</u>	cis-2b und cis-2c
SceRS	<u>pUC-Cla-Wt-SceRS-BCR</u>	cis-2b und cis-2c
SV40-Wt	<u>pUC-Kpn-SV40</u>	VP1-8b und VP1-10

Tabelle 3.4: Liste der in den radioaktiven PCR-Reaktionen verwendeten Matrizen und Oligonukleotide.

3.5.3 Gelretardationsanalysen

Um mögliche Änderungen der Rekombinationsfrequenzen in Abhängigkeit von bestimmten DNA-*cis*-Elementen und dem DNA-Bindeprotein p53 mechanistisch aufzuklären, wurden zunächst alle Fragmente auf ihre Interaktion mit p53 hin untersucht. Dabei waren die durch p53-spezifisch die Rekombination stimulierenden Sequenzen (s. 3.3.2) *RAR α* -BCR- und RGC-Fragmente besonders interessant.

Einzig die Fragmente RGC, *RAR α* -BCR und CTG98 ließen sich in den Gelretardationsanalysen befriedigend untersuchen, alle anderen Fragmente zeigten ein mehr oder weniger aberantes Laufverhalten, sodass hier nur die Analysen mit den oben genannten Fragmenten vorgestellt werden.

3.5.3.1 Gelretardationsanalyse mit dem RGC-Fragment

In Abbildung 3.26 ist die Autoradiographie der Gelretardationsanalysen dargestellt.

Das RGC-Fragment zeigte eine spezifische Wechselwirkung mit Wtp53, was an der Retardation der radioaktiv markierten RGC-DNA durch Komplexbildung mit p53 in den Spuren 2-4 deutlich zu erkennen ist. Die Kompetitionsanalysen (Spuren 11-14) zeigten, dass die Bindung zwischen Wtp53 und RGC-DNA spezifisch war, da sich distinkte Banden in den Spuren 11-13 zeigten und die Komplexe erst bei einem 100000fachen Überschuss an t-RNA auflösten (Spur 14). Durch Zugabe der gegen Wtp53-gerichteten Antikörper DOI und PAb1801 in die Ansätze konnte deutlich ein *supershift* detektiert werden, was die Spezifität der Bindung in den p53-RGC-Komplexen untermauerte (Spuren 12 und 13), während der Anti-Aktin-Antikörper keinen *supershift* generierte. Das RGC-Fragment wurde dagegen weder von p53(248P) noch p53(273P) gebunden, was an der fehlenden Retardierung des Substrates in den Spuren 5-10 zu ersehen ist.

Diese Gelretardationsanalysen zeigten also, dass zwar Wtp53, aber weder die Kontaktmutante p53(248P) noch die Konformationsmutante p53(273P) deutlich mit der RGC-Sequenz interagierten.

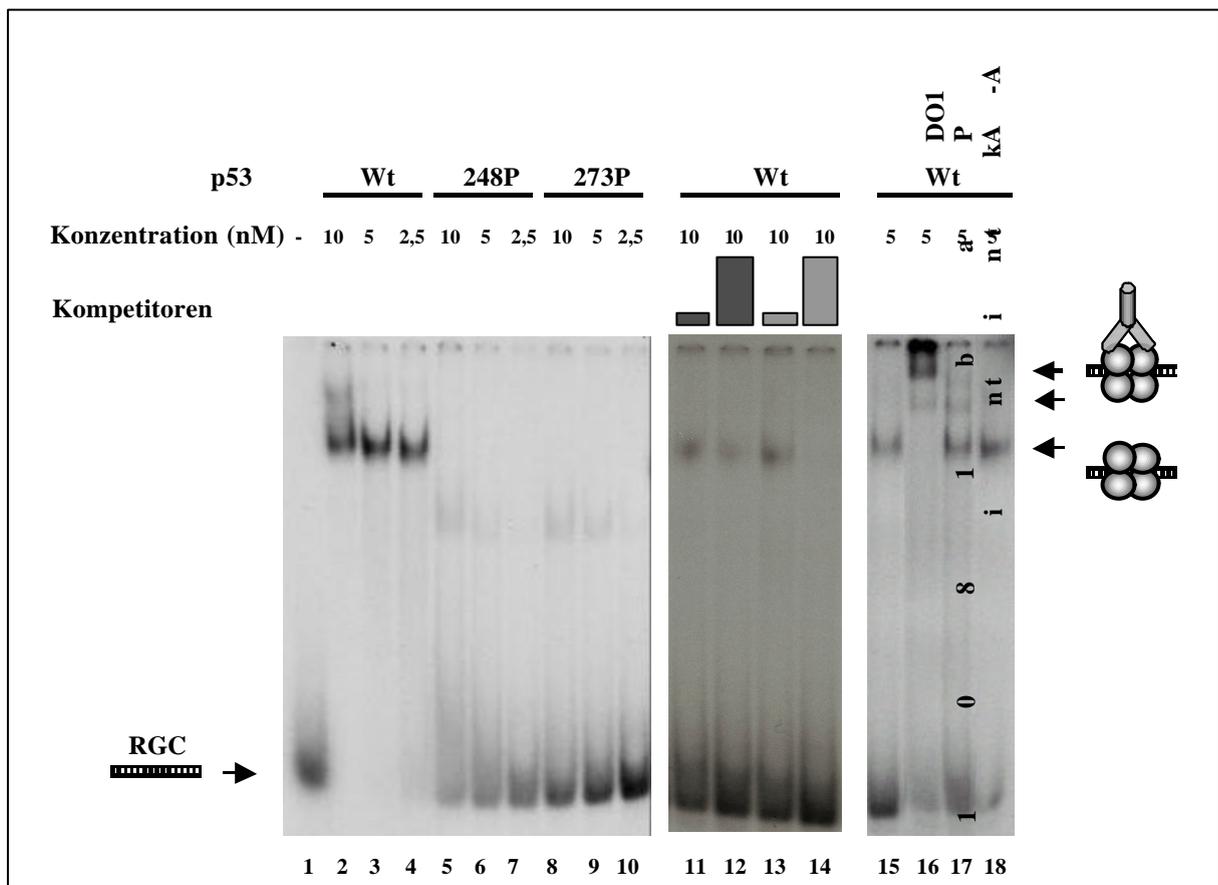


Abbildung 3.26: Gelretardationsanalyse mit dem RGC-Fragment. Aus Bakuloviren aufgereinigtes Wtp53 [Spuren 2-4], p53(248P) [Spuren 5-7] und p53(273P) [Spuren 8-10] wurden in den angegebenen

Konzentrationen zu den Ansätzen gegeben. Die Reaktionsansätze mit dem radioaktiv markierten, aufgereinigten RGC-PCR-Fragment (in einer Konzentration von 100 pM) wurden in Anwesenheit von Kompetitor-t-RNA im 10fachen molaren Überschuss und Protein für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend in einem 4%igen nativen, kontinuierlichen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Kompetitionsanalysen mit dem Kompetitor-Oligo (Spur 11: 10000facher Überschuss, Spur 12: 50000facher Überschuss) bzw. t-RNA (Spur 13: 20000facher Überschuss, Spur 14: 100000facher Überschuss) wurden wie oben durchgeführt. *Supershift*-Analysen wurden nach Vorinkubation von p53 mit den Antikörpern DO1 (Spur 16), PAb1801 (Spur 17) oder Anti-Aktin (Spur 18) durchgeführt. Die Positionen der Substratbanden, die p53-spezifischen *bandshifts* und *supershifts* in den Autoradiographien sind durch Pfeile und schematische Illustrationen indiziert.

3.5.3.2 Gelretardationsanalyse mit dem CTG98-Fragment

Da das RGCmut-Fragment ein aberantes Laufverhalten zeigte, konnte es nicht als Kontrolle zu den RGC-Gelretardationsanalysen herangezogen werden. Das CTG98-Fragment besteht ebenfalls aus repetitiver DNA und ließ eine Analyse zu, so dass es vergleichend mit dem RGC-Fragment betrachtet werden konnte.

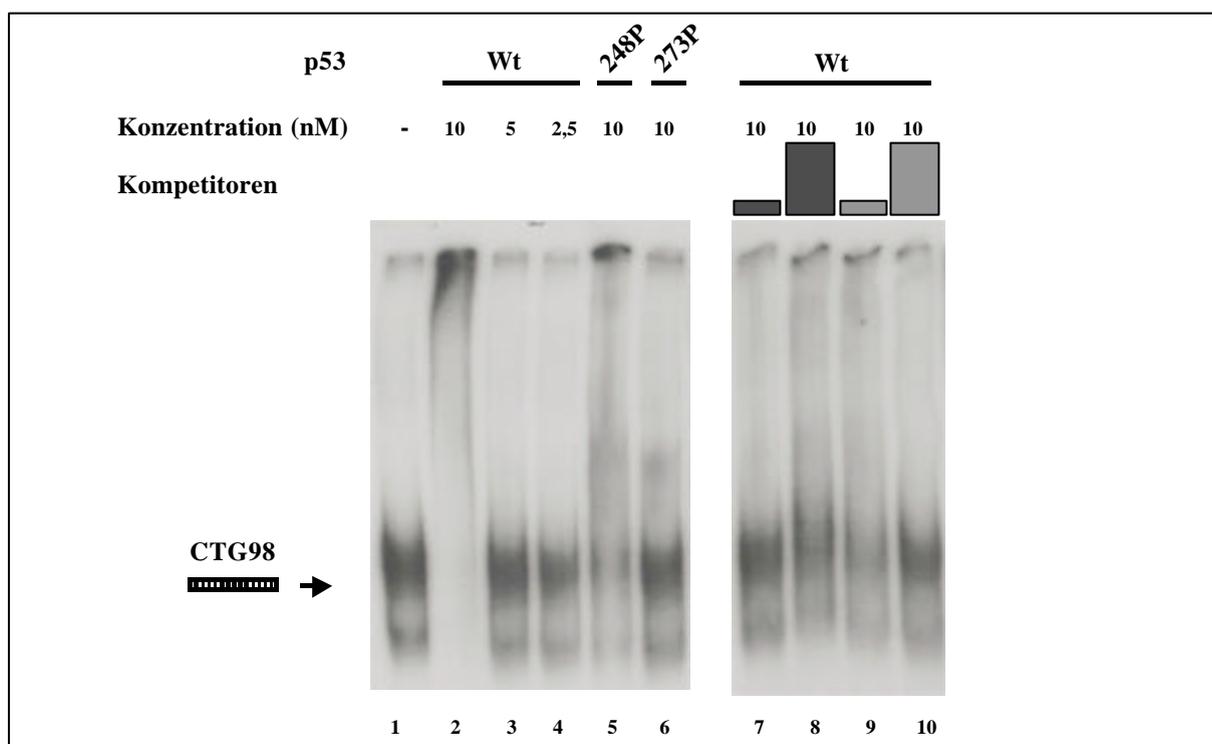


Abbildung 3.27: Gelretardationsanalyse mit dem CTG98-Fragment. Aus Bakuloviren aufgereinigtes Wtp53 [Spuren 2-4], p53(248P) [Spur 5] und p53(273P) [Spur 6] wurde in den angegebenen Konzentrationen zu den Ansätzen gegeben. Die Reaktionsansätze aus dem radioaktiv markierten, aufgereinigten CTG98-PCR-Fragment (in einer Konzentration von 100 pM) in Anwesenheit von Kompetitor-t-RNA im 10fachen molaren Überschuss und Protein wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend in einem 4%igen nativen, kontinuierlichen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Kompetitionsanalysen mit dem Kompetitor-Oligo (Spur 7: 10000facher Überschuss, Spur 8: 50000facher Überschuss) bzw. t-RNA (Spur 9: 20000facher Überschuss, Spur 10: 100000facher Überschuss) wurden wie oben durchgeführt. Die Positionen der Substratbanden in den Autoradiographien sind durch einen Pfeil und die schematische Illustrationen dargestellt.

In Abbildung 3.27 ist die Autoradiographie der Gelretardationsanalyse mit dem CTG98-Fragment dargestellt. Es zeigte sich, dass für Wtp53 nur in der höchsten Konzentration eine

Retardierung zu detektieren war, wobei es sich vermutlich um eine unspezifische Aggregatbildung handelte, da die Bande der Gelauftragstasche zuzuordnen war. Bei niedrigeren p53-Konzentrationen wurde keine distinkte Retardationsbande beobachtet. Das CTG98-PCR-Fragment wurde in den Ansätzen mit p53(248P) und p53(273P) ebenfalls nicht spezifisch gebunden, was aus dem diffusen Muster in den Spuren 5 und 6 zu erkennen ist. Die Analysen mit den Kompetitoren (Spuren 7-10) zeigten deutlich, dass sich die unspezifischen Komplexe aus Substrat und 10 nM Wtp53 bereits bei der niedrigen Menge an Kompetitoren vollständig aufgelöst hatten, so dass die freien Substrate wieder auf Höhe der Kontrolle liefen. Die fehlende Retardierung des CTG98-Substrates zeigte, dass es sich hier im Gegensatz zur Situation mit dem RGC-Fragment um keine spezifische Bindung mit Wtp53 handelte.

3.5.3.3 Gelretardationsanalyse mit dem *RAR α* -BCR-Fragment

Das *RAR α* -BCR-Fragment stimuliert die Rekombination in einer von p53 abhängigen Weise, besitzt aber keine p53-Konsensus-Sequenz. Um aber trotzdem eine spezifische Erkennung des *RAR α* -BCR-Fragmentes durch p53 auszuschließen, wurden Gelretardationsanalysen durchgeführt.

In Abbildung 3.27 ist die Autoradiographie der Gelretardationsanalyse mit dem *RAR α* -BCR-PCR-Fragment dargestellt. Im Gegensatz zu der spezifischen Bindung des Wtp53 an das RGC-Fragment konnte dies für das *RAR α* -BCR-Fragment nicht festgestellt werden. Nur bei 10 nM verursachte Wtp53 die Bildung eines p53-DNA-Aggregates, bei niedrigeren Konzentrationen wurde die *RAR α* -BCR-DNA zwar schwach retardiert, aber nicht auf eine diskrete Position. Dieses unspezifische Muster konnte auch mit p53(248P) und p53(273P) detektiert werden. Die Analysen mit den Kompetitoren (Spuren 11-14) zeigten, dass bei niedrigen Konzentrationen an Kompetitoren eine kaum distinkte Retardierung auftrat (Spuren 11 und 13). Die Komplexe aus Substrat und 10 nM Wtp53 hatten sich bei der hohen Menge an Kompetitoren vollständig aufgelöst, so dass die freien Substrate hier wieder auf der Höhe der Kontrolle liefen. Im Vergleich zu der spezifischen Bindung des RGC-PCR-Fragmentes an Wtp53 (s. 3.5.3.1) zeigte sich hier also eine deutlich unspezifischere Bindung. In Ansätzen mit dem Wtp53-spezifischen Antikörpern DO1 konnten ferner auch keine *supershifts* detektiert werden (nicht gezeigt).

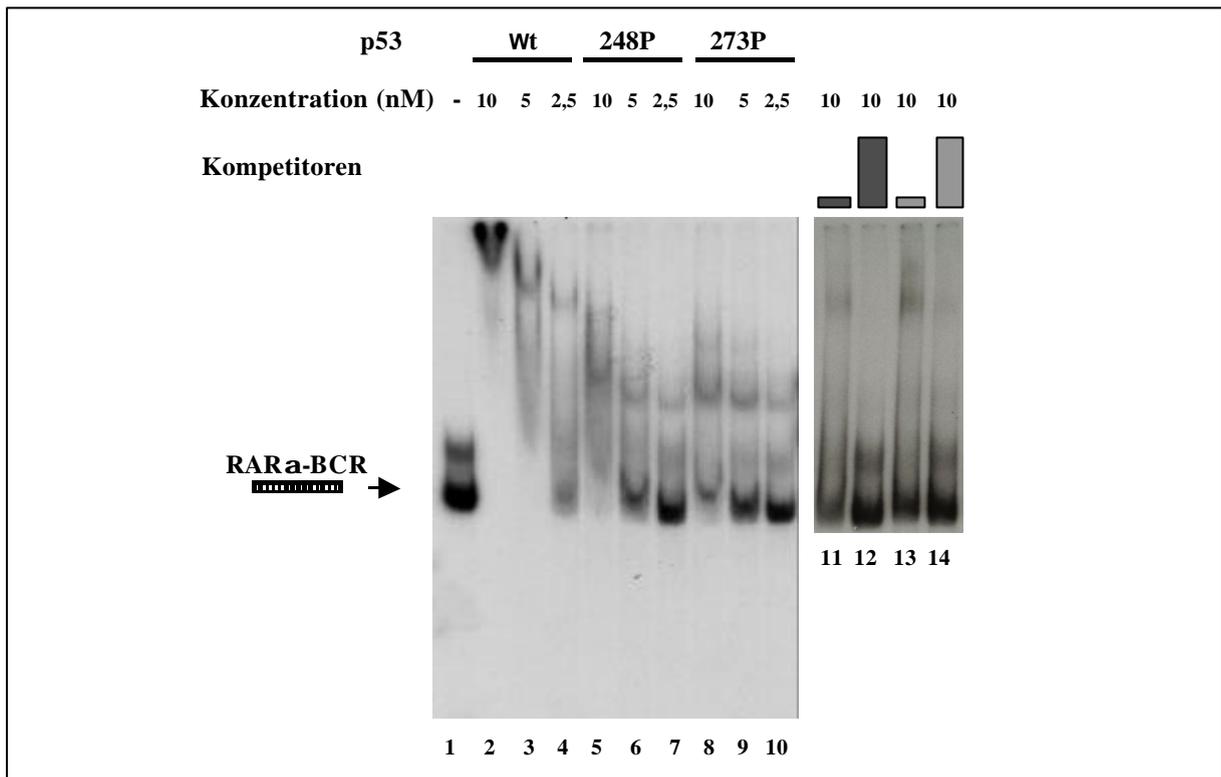


Abbildung 3.28: Gelretardationsanalyse mit dem *RARα*-BCR-Fragment. Aus Bakuloviren aufgereinigtes Wtp53 [Spuren 2-4], p53(248P) [Spuren 5-7] und p53(273P) [Spur 8-10] wurde in den angegebenen Konzentrationen zu den Ansätzen gegeben. Die Reaktionsansätze aus dem radioaktiv markierten, aufgereinigten *RARα*-BCR-PCR-Fragment (in einer Konzentration von 100 pM) in Anwesenheit von Kompetitor-t-RNA im 10fachen molaren Überschuss und Protein wurden für 30 min auf Eis inkubiert und in einem 4%igen nativen, kontinuierlichen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Positionen der Substratbanden in den Autoradiographien sind durch einen Pfeil und die schematische Illustrationen dargestellt.

3.6 Studien unter Applikation verschiedener Chemotherapeutika

Für p53 wird vermutet, dass es die *Topoisomerase II α* -Genexpression reguliert und mit Topoisomerase II α und II β , zwei Enzymen, die eine Rolle bei der DNA-Replikation und Transkription spielen, interagiert (Cowell *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002). Topoisomerase I ist ein Enzym, das in Transkription, Replikation, Rekombination und DNA-Schadenserkennung involviert ist. p53 interagiert mit Topoisomerase I und stimuliert die durch dieses Enzym vermittelte DNA-Relaxation (Albor *et al.*, 1998; Gobert *et al.*, 1996; 1999; Soe *et al.*, 2002). Topoisomerase II- und I-Inhibitoren, wie Etoposid und Camptothecin, sind antineoplastische Therapeutika, die die Komplexe zwischen der Topoisomerase und freien Enden der DNA stabilisieren und dabei Doppelstrang- bzw. Einzelstrangbrüche generieren (Burden & Osheroff, 1998; Ryan *et al.*, 1991).

Studien unter Applikation dieser Chemotherapeutika sollten zur Aufklärung beitragen, ob sich das neu aufgebaute System für die Risikoabschätzung der Generierung von sekundären Leukämien nach Gabe bestimmter Therapeutika unter Berücksichtigung des genetischen Hintergrundes eignet.

3.6.1 Untersuchungen mit Etoposid

Um zu untersuchen, ob Topoisomerasen innerhalb der Rekombinationsregulation von p53 abwärts gelegene exekutive Elemente darstellen, die die überraschende rekombinationsstimulierende Wirkung von p53 in der Nähe von *RAR α* -BCR-Fragmenten erklären könnten, wurden LLC-MK₂(neo)/LMV2-Zellen und LLC-MK₂(p53her)-21/LMV2-p53her-K18-Zellen unter Applikation des Topoisomerase II-Inhibitors Etoposid während der Rekombinations-Assays behandelt. Zum Vergleich wurden auch die *MLL*-BCR-Viren untersucht, da Rekombinationsereignisse, die das *MLL*-Gen betreffen, sekundär in Folge der Therapie mit Topoisomerase II-Inhibitoren entstehen können (Strissel *et al.*, 1996; Vogelstein & Kinzler, 2002). *MLL* stellt somit einen *hot spot* für chromosomale Rearrangements nach Behandlung mit Etoposid (Pui *et al.*, 1989) dar.

Die Zellen wurden 12 h nach Infektion für 1 h mit 0, 10, 50 bzw. 100 μ M Etoposid für SV40-Wt- und *MLL*-BCR-Viren (in DMSO gelöst) bzw. 0 und 100 μ M Etoposid für *RAR α* -BCR-Viren oder ohne Etoposid (DMSO-Kontrolle) behandelt. Diese Zeitperiode markiert die Dauer zwischen Infektion und Replikationsinitiation und ist der sensitivste Zeitpunkt innerhalb des viralen Vermehrungszyklus für durch DNA-Schäden induzierte rekombinative Rearrangements and SV40-Chromosomen (Janz & Wiesmüller, 2002). Die eingesetzte Menge

an Etoposid orientierte sich an publizierten Versuchen (Sim & Liu, 2001). Ein anderer Versuch mit einer 24stündigen Inkubation mit 0, 5, 10 und 50 μM Etoposid direkt nach Infektion führte zu ähnlichen Ergebnissen (nicht gezeigt).

In Abbildung 3.29A ist ein Versuch nach Behandlung mit 100 μM Etoposid dargestellt. Die Etoposid-Applikation verursachte eine 5- bis 6fache Stimulation der Rekombination zwischen *MLL*-BCR-Viren-Chromosomen im Vergleich zu den Werten mit DMSO, die in einer Erhöhung der Frequenz um eine Größenordnung resultierte. Die Rekombinationsfrequenzen in LLC-MK₂(p53her)-Zellen wurden durch Applikation von Etoposid zwar erhöht (0 μM Etoposid: $6,6 \times 10^{-4}$, 100 μM Etoposid: $14,8 \times 10^{-4}$), zeigten aber insgesamt eine 24fache Inhibition der Rekombination durch Wtp53her. Dagegen wurden die Rekombinationsfrequenzen an SV40-Wt- (von $9,1 \times 10^{-4}$ auf $7,1 \times 10^{-4}$ in LLC-MK₂(neo)/LMV2-Zellen bzw. von $2,6 \times 10^{-4}$ auf $2,2 \times 10^{-4}$ in LLC-MK₂(p53her)-Zellen) und *RAR α* -BCR-Viren-Chromosomen (von $22,6 \times 10^{-4}$ auf $25,8 \times 10^{-4}$ in LLC-MK₂(neo)/LMV2-Zellen bzw. $82,1 \times 10^{-4}$ auf $72,1 \times 10^{-4}$ in LLC-MK₂(p53her)-Zellen) durch Etoposid nicht beeinflusst. Dies schloss einen Einfluss von Topoisomerase II auf die Stimulierung der Rekombination in Nachbarschaft der *RAR α* -BCR-Sequenz in Zellen mit Wtp53 aus.

Um einen Einfluss des Chemotherapeutikums auf die Stabilität der Virengenome zu überprüfen, wurden CV1-Zellen bzw. LLC-MK₂(p53her)-17-Zellen wie oben beschrieben infiziert, mit 100 μM Etoposid behandelt, anschließend die episomale DNA isoliert (2.2.6) und in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 3.29B). Die Ausbeute an aus LLC-MK₂(p53her)-17 isolierter DNA war nicht ausreichend, so dass sie nicht zufriedenstellend analysiert werden konnte. Für die aus CV1-Zellen isolierte SV40-Wt-DNA zeigte sich das erwartete, für SV40-Viren typische Bandenmuster (vgl. Schirmbeck, 1989). Dagegen zeigte die Cla-Wt-*MLL*-BCR-DNA mit oder ohne Behandlung ein diffuses Bandenmuster.

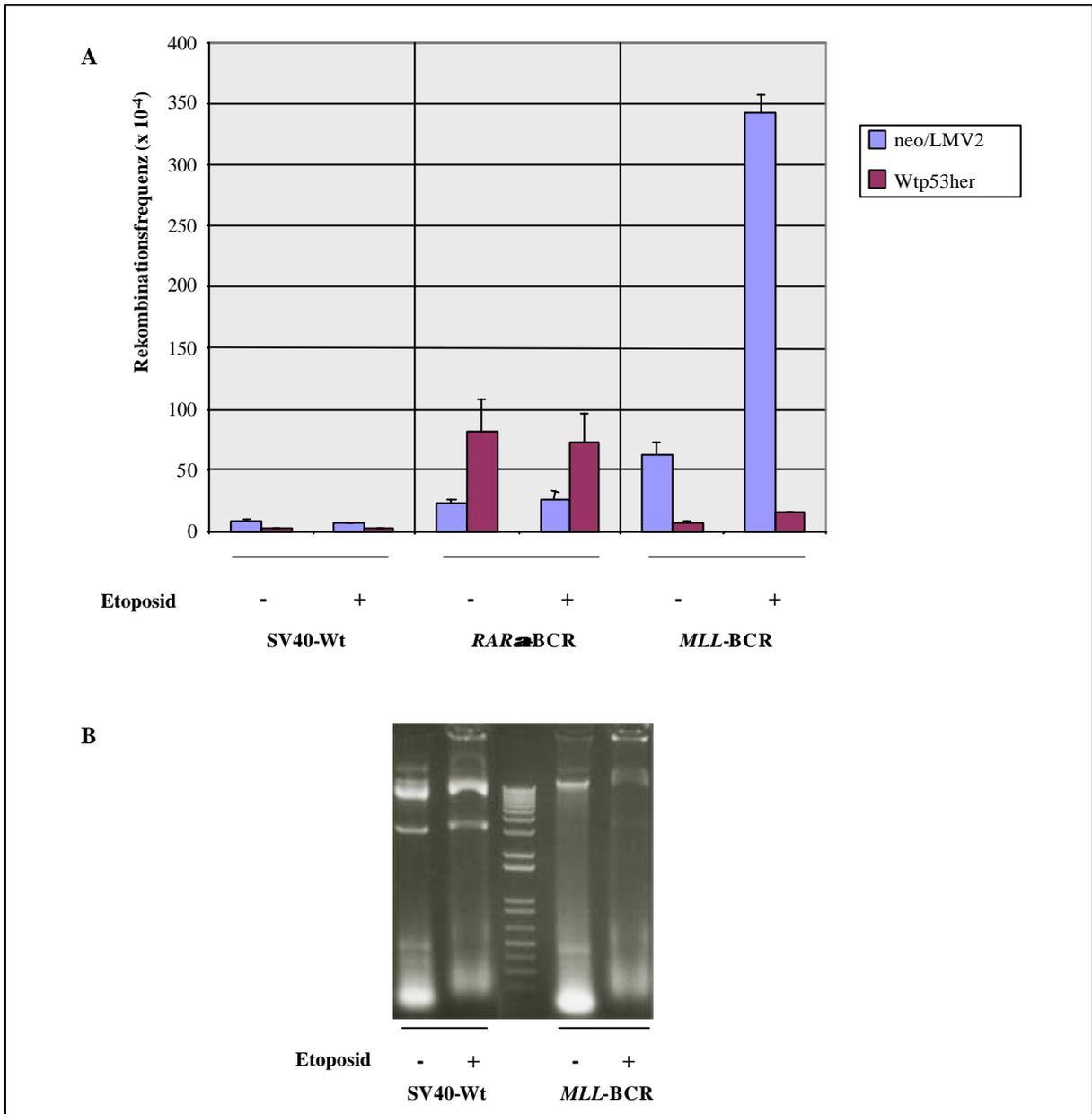


Abbildung 3.29: Rekombinationsfrequenzen von SV40-Wt- und Cla-*Linker*-BCR-Viren unter Applikation von Etoposid. In (A) sind die Daten für LLC-MK₂(neo)/LMV2-Zellen (neo/LMV2) und LLC-MK₂(p53her)-21-Zellen (Wtp53her) für den SV40-Wt- (SV40-Wt) und Cla-Wt-*MLL*-BCR-Satz (*MLL*-BCR) bzw. LLC-MK₂(neo)/LMV2-Zellen und LLC-MK₂(p53her)-21/-17/LMV2-p53her-K18-Zellen für den Cla-Wt-*RAR α* -BCR-Satz (*RAR α* -BCR) gezeigt. Nach Infektion wurden die Zellen zunächst in Medium bei 39°C mit 1 μ M Östradiol bis 12 h nach Infektion inkubiert, danach wurde das Medium mit DMSO (- Etoposid) bzw. 100 μ M Etoposid (+ Etoposid) versetzt und die Zellen 1 h weiter inkubiert. Nach Entfernung des supplementieren Mediums und Waschen wurden die Zellen in Medium mit 1 μ M Östradiol weitere 72 h inkubiert. In (B) ist die episomale DNA nach SV40-Wt- bzw. Cla-Wt-*MLL*-BCR-Viren-Infektion von CV1-Zellen unter Behandlung mit DMSO (- Etoposid) und mit 100 μ M Etoposid (+ Etoposid) in mit Ethidiumbromid gefärbtem Agarosegel dargestellt.

3.6.2 Untersuchungen mit Camptothecin

Zur Überprüfung der Hypothese, ob Topoisomerase I-vermittelte Brüche in der *RAR α* -Sequenz die p53-abhängige Zunahme von homologen Rekombinationsereignissen verursacht, wurde der Topoisomerase I-Inhibitor Camptothecin in einer Konzentration von 300 nM auf die LLC-MK₂(neo)- bzw. LLC-MK₂(p53her)-17/-21-Zellen 12 h nach Infektion für 1 h (s. 3.6.1) appliziert.

In Abbildung 3.30A ist das Ergebnis der Rekombinationsmessungen dargestellt. Nach Camptothecin-Behandlung zeigten sich in LLC-MK₂(neo)-Zellen 3- bis 4fach gesteigerte Rekombinationsfrequenzen für den *RAR α* -BCR-Virus ($73,0 \times 10^{-4}$ versus $22,6 \times 10^{-4}$). In den Wtp53her-exprimierenden Zellen rekombinierten die *RAR α* -BCR-Viren mit erhöhten, aber ähnlichen Frequenzen von $82,1 \times 10^{-4}$ versus $64,2 \times 10^{-4}$.

Dies zeigt deutlich, dass die Inhibition der Topoisomerase I in ähnlicher Weise wie Wtp53 die Rekombination zwischen *RAR α* -BCR-Viren stimuliert.

Aus diesem Grunde wurde der Einfluss von Topoisomerase I auch auf die Rekombination in der Nähe der Wtp53-spezifischen Bindungssequenz RGC untersucht. In LLC-MK₂(p53her)-17/-21-Zellen wurden nach Kontrollbehandlung mit DMSO wie erwartet höhere ($76,2 \times 10^{-4}$) Rekombinationsfrequenzen als in LLC-MK₂(neo)-Zellen ($38,7 \times 10^{-4}$) gemessen. Überraschenderweise waren die Rekombinationsfrequenzen nach Behandlung mit Camptothecin in LLC-MK₂(neo)-Zellen hoch ($120,0 \times 10^{-4}$) und in LLC-MK₂(p53her)-17/-21-Zellen durch Wtp53 herunterreguliert ($26,9 \times 10^{-4}$). Dieses Ergebnis ist insofern interessant, da keine Topoisomerase I-Erkennungssequenz in der RGC-Sequenz vorhanden ist (s. 7.5.2). Die Kontrollviren SV40-Wt und RGCmut wurden in ihren Rekombinationsfrequenzen durch die Behandlung mit Camptothecin nicht beeinflusst.

Um einen Einfluss des Chemotherapeutikums auf die Stabilität der Virengenome zu überprüfen, wurden CV1-Zellen bzw. LLC-MK₂(p53her)-17-Zellen wie oben beschrieben infiziert und mit 300 nM Camptothecin behandelt und anschließend die episomale DNA isoliert (2.2.6) und in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 3.29B). Die Ausbeute an aus LLC-MK₂(p53her)-17 isolierter DNA war auch hier nicht ausreichend, so dass sie nicht zufriedenstellend analysiert werden konnte. Aus mit Cla-Wt-*RAR α* -BCR-DNA infizierten Zellen wurde quantitativ weniger DNA isoliert, sie zeigte aber qualitativ keine Unterschiede bezüglich des Bandenmusters sowohl in behandelten wie unbehandelten Zellen.

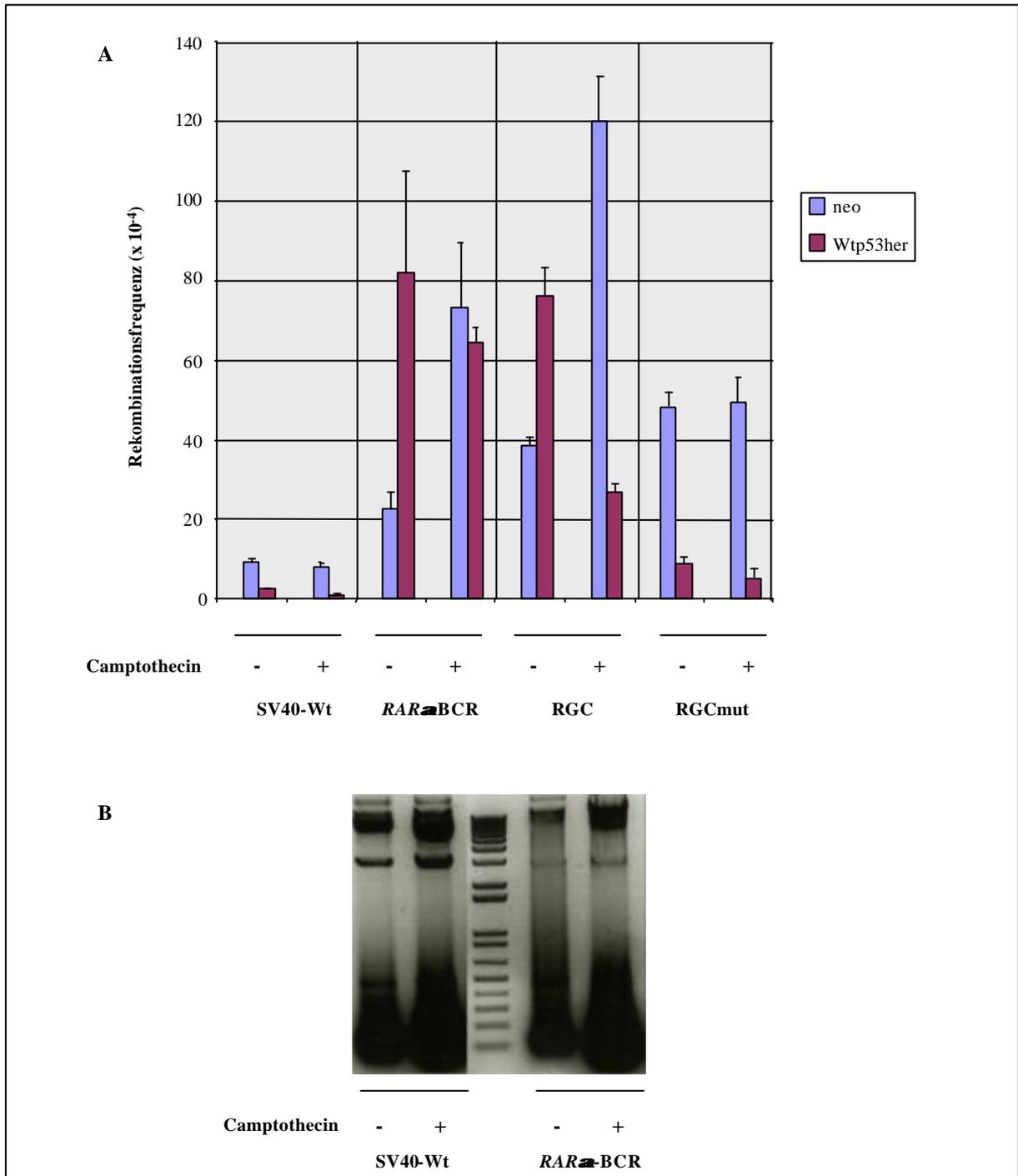


Abbildung 3.30: Rekombinationsfrequenzen von SV40-Wt- und Cla-*Linker*-BCR-Viren unter Applikation von Camptothecin. In (A) sind die Daten für LLC-MK₂(neo)-Zellen (neo) und LLC-MK₂(p53her)-17/-21-Zellen (Wtp53her) für den SV40-Wt- (SV40-Wt), den Cla-Wt-RAR α -BCR- (RAR α -BCR), den Cla-RGC- und den Cla-RGCmut-Satz gezeigt. Nach Infektion wurden die Zellen zunächst in Medium bei 39°C mit 1 μ M Östradiol bis 12 h nach Infektion inkubiert, danach wurde das Medium mit DMSO (- Camptothecin) bzw. 300 nM Camptothecin (+Camptothecin) versetzt und die Zellen 1 h weiter inkubiert. Nach Entfernung des supplementieren Mediums und Waschen wurden die Zellen in Medium mit 1 μ M Östradiol weitere 72 h inkubiert. Es sind die Ergebnisse von 23 Einzelversuchen mit Standardfehlern aufgeführt. In (B) ist die episomale DNA nach SV40-Wt- bzw. Cla-Wt-RAR α -BCR-Viren-Infektion von CV1-Zellen unter Behandlung mit DMSO (-Camptothecin) und mit 300 nM Camptothecin (+ Camptothecin) in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel dargestellt. Die Schwarz-Weiß-Darstellung ist invertiert.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden kurze Sequenzen, für die eine Involvierung in pathogene genetische Veränderungen postuliert wurden, in Bezug auf ihr Potential, Rekombinationsprozesse in *cis* zu regulieren, charakterisiert. Weiterhin wurde die Rolle von p53 (alleine und im Zusammenspiel mit PARP-1) als auf diese Regulation in *trans* wirkenden Faktor analysiert.

4.1 Entwicklung eines auf SV40 basierenden Testsystems zur Untersuchung der Rolle von DNA *cis*-Elementen bei der homologen Rekombination und des Einflusses von in *trans* wirkenden Faktoren

Das bereits etablierte, auf SV40 basierende Testsystem zur Messung von homologen Rekombinationsereignissen (Wiesmüller *et al.*, 1996) bot grundsätzlich die Möglichkeit, in *cis* wirkende DNA-Elemente zu untersuchen. Ein entscheidender Schritt zu dieser erweiterten Anwendung musste die Modifikation der SV40-Genome sein, damit interessante Fremdsequenzen aufgenommen werden konnten. Dies geschah zunächst durch Verkleinerung des Genoms und anschließend durch Einführung multipler Klonierungsstellen für die Aufnahme der Fremdsequenzen. Die Deletion von *st*, für das bereits gezeigt werden konnte, dass es weder für die virale Replikation noch für die Virusproduktion essentiell ist, bot sich für die Verkleinerung der Genome an. Die Einführung von multiplen Klonierungsstellen wurde an zwei verschiedenen Positionen innerhalb des Virengenoms vorgenommen, um einen möglichen Einfluss der Lage der Fremdsequenzen auf die Rekombination mit berücksichtigen zu können. Der *Cla-Linker* wurde in die Nachbarschaft der Rekombinations-Marker und der Replikations-Terminations-Region, also zwischen den Genen kodierend für T-Ag und VP-1, zwischen früh und spät exprimierten Genen, eingeführt. Der *Bgl-Linker* wurde in Nachbarschaft des Replikations-Ursprungs inseriert. Um die Einfügung des *Cla-Linkers* zu erreichen, war eine Verdopplung von 150 bp der überlappend transkribierten Bereiche von *T-Ag* und *VP1* über die unten beschriebene PCR-Klonierungsstrategie in zuvor verkleinerte *st*-Genome notwendig. Die MOI-Werte waren sowohl in dem *Cla-Linker* ohne Fremdsequenz als auch mit eingeführten Fremdsequenzen nach Konzentrierung so hoch, dass sich diese modifizierten *Cla*-Viren-Sätze (Wt, Mut1, Mut2), für den Einsatz in Rekombinationsmessungen eigneten. Außerdem deutete die hohe Virenausbeute auf eine ungestörte virale Replikation hin, wie auch weiter durch Agarosegelanalysen von reisolierter DNA gezeigt werden konnte. Der *Bgl*-Wt-Virus dagegen wies selbst nach Konzentrierung so geringe MOI-Werte auf, dass von einer gestörten Virusreplikation auszugehen war. Im Gegensatz zum *Cla*-

Linker, bei dem eine Duplikation von überlappend transkribierten Bereichen und eine Deletion der *st*-Region notwendig war, konnte beim Bgl-Linker direkt ein Bereich von 252 bp aus dem Intronbereich von *T-Ag* deletiert werden und gleichzeitig die Klonierungsstellen eingeführt werden. Obwohl die Spleiß-Akzeptor- und -Donorsequenzen durch diese Klonierungsstrategie vollständig erhalten blieben, führte die Manipulation zu einer Störung der normalen Virusbiologie. Eine mögliche Erklärung ist in einer Störung des RNA-Spleißens zu suchen. Da die Deletion innerhalb des *T-Ag*-Introns beim Cla-*Linker* sogar größer war (269 bp zu 252 bp beim Bgl-Linker) sollte die Deletion an sich keinen Einfluss zeigen, ein weiteres Indiz dafür, dass der Grund in fehlerhaftem Spleißen der RNA zu suchen ist. Sollte dadurch die Expression von T-Ag gestört worden sein, hätte dies fatale Folgen für die DNA-Replikation gehabt, für die T-Ag essentiell ist (Kalderon *et al.*, 1984). So wären die zellulären Gene, die unter anderem direkt an der DNA-Replikation beteiligt sind (Postel, 1976) nicht aktiviert worden, ebenso wenig wie eine Regulation des frühen und späten Promotors nicht möglich gewesen wäre. Dies könnte erklären, warum die Zellen kaum transformiert wurden und kaum Virus freigesetzt wurde.

Um zu überprüfen, ob Rekombination in Nachbarschaft dieser *cis*-Elemente durch Proteine wie p53 und PARP-1 in *trans* beeinflusst wird, sollten Primatenzell-Klone eingesetzt werden, die sich hinsichtlich ihres p53- als auch ihres PARP-1-Status unterschieden. Die LLC-MK₂-Zellen tragen endogen ein Mutp53, das eine Deletion der Aminosäuren 237-239 aufweist und u.a. durch eine verlängerte Halbwertszeit und Verlust der T-Ag-Bindung gekennzeichnet ist (von der Weth & Deppert, 1993; Dudenhöffer *et al.*, 1998). Da in Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass dieses Mutp53 die homologe Rekombination nicht beeinflusst (Wiesmüller *et al.*, 1996; Dudenhöffer *et al.*, 1998), war dieses Zellsystem prädestiniert für Untersuchungen mit dem auf SV40 basierenden Testsystem.

Neben den schon etablierten LLC-MK₂-Klonen mit funktionell anschaltbarem Wtp53, also Wtp53her (Dudenhöffer *et al.*, 1998), und einem Wtp53- und/oder PARP-1-exprimierenden Zellsystem (LMV2-p53her-K18, LMV2-PARP-K13, LMV2-p53herPARP-K11) konnten in dieser Arbeit drei weitere Wtp53 exprimierende LLC-MK₂-Klone, von denen zwei für Rekombinationsmessungen verwendet wurden, und zwei p53(138V) exprimierende Klone etabliert und charakterisiert werden. Die Untersuchung der Proteinmengen in den verschiedenen Klonen ergab, dass das Wtp53her-Protein die höchste Expression im Klon -21 zeigte (130% im Vergleich zu LLC-MK₂(p53her)-17). Der zweite untersuchte Wtp53her-exprimierende Klon -5 zeigte dagegen eine sehr viel niedrigere *steady state* Proteinmenge. Insgesamt lag die Expression von Wtp53her in allen Klonen auf dem physiologischen Niveau

(vgl. Dudenhöffer *et al.*, 1998). Die Unterdrückung der homologen Rekombination zwischen den eingesetzten Viren konnte für Klon -21 am deutlichsten gezeigt werden, während in Klon -5 die Inhibition oftmals weniger deutlich zu detektieren war. Möglicherweise ist hier ein Einfluss der Wtp53her-Proteinmenge auf das Ausmaß der Inhibition zu verzeichnen. In der Arbeit von Dudenhöffer *et al.*, 1998, konnte gezeigt werden, dass Wtp53her schon in geringsten Mengen die homologe Rekombination wirksam unterdrückt, ein Einfluss der Menge konnte hier aber nicht ermittelt werden. Neuere Untersuchungen zeigten aber, dass es sehr wohl eine Dosisabhängigkeit der Rekombinationsinhibition durch p53 gibt (Akyüz *et al.*, 2002), wobei aber auch hier schon geringste Menge für eine Inhibition sorgten. In den LLC-MK₂(p53her)-5-Zellen war die Menge an Wtp53her jedoch so gering, dass die Detektierbarkeit an der Nachweisgrenze lag und in der Folge auch die Rekombinationsinhibition oftmals kaum vom Rauschen zu unterscheiden war. Die Generationszeiten im Klon -21 waren im Vergleich zu den anderen Wtp53her-exprimierenden Klonen nach Östradiolgabe am längsten, was wiederum für die volle Funktionsfähigkeit von Wtp53 in diesem Klon spricht. Das p53her-Protein war in den Zellen eindeutig funktionell als transkriptioneller Transaktivator und Wachstumsregulator durch Östradiol anschaltbar. Eine Verlängerung der Generationszeit bereits in Abwesenheit von Östradiol deutete jedoch darauf hin, dass ein Teil des p53her-Proteins auch ohne Induktion durch Östradiol konstitutiv aktiv war. Dies stand in Einklang mit früheren Daten, die mit p53her-Varianten tragenden Zellen erhoben worden waren (Dudenhöffer *et al.*, 1998). Es wurde jedoch bereits in diesen früheren Arbeiten festgestellt, dass selbst geringe Mengen an aktivem p53her-Protein vor Östradiolgabe inhibierend auf die homologe Rekombination wirken, weshalb mit und ohne Östradiolgabe keine deutlichen Unterschiede zwischen den Rekombinationsfrequenzen in p53her exprimierenden Zellen mit und ohne Östradiol nachweisbar waren. Dies war auch der Grund, weshalb Rekombination grundsätzlich in Gegenwart von Östradiol studiert wurde. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Unterschiede zwischen Kontrollzellen und p53her exprimierenden Zellen klonale Charakteristika reflektieren, wurden deshalb zu Beginn der Analysen jeweils mindestens zwei voneinander unabhängige Zellklone untersucht.

Für fortführende Studien wurde vor allem der neu etablierte LLC-MK₂(p53her)-21-Klon herangezogen, da er deutlich alle für Wtp53 geforderten Eigenschaften, wie eine verlangsamte Generationszeit, eine deutliche Inhibition der Rekombination für z.B. SV40-Wt-Viren (5,4fach) und eine Transaktivierung von p21^{Waf1/Cip1} aufzeigte.

Die beiden p53(138V)her-exprimierenden Klone LLC-MK₂[p53(138V)her]-4 und -7 zeigten Generationszeiten, die in etwa denen von LLC-MK₂(neo)-Zellen entsprachen und inhibierten

die Rekombination nur etwas schwächer als Wtp53her (für SV40-Wt-Viren im Durchschnitt 3,7fach versus 3,1fach). Die Transaktivierung von p21^{Waf1/Cip1} war in etwa vergleichbar mit der in LLC-MK₂(neo)-Zellen, im Klon LLC-MK₂[p53(138V)her]-4 konnte allerdings eine geringfügig höhere Expression von p21^{Waf1/Cip1} verzeichnet werden. Ein Einfluss von residualem p53(138V)her in Wtp53her-Konformation (Ziegler, 1998) könnte die verbliebene Transaktivierungsaktivität von Klon LLC-MK₂[p53(138V)her]-4 in diesen Versuchen erklären. Der residuale Wtp53-Anteil hat aber nur geringe Auswirkungen auf das Wachstum, was die nur minimal verlängerten Generationszeiten belegen. Diese Ergebnisse sprechen eindeutig dafür, dass die Klone zwar transaktivierungsdefizient sind, aber auf Rekombinationsereignisse inhibierend wirken können, ein Befund, der bereits schon in früheren Studien aufgenommen wurde (Akyüz *et al.*, 2002; Willers *et al.*, 2000).

Die Etablierung von LLC-MK₂-Zellen, die die Mutante p53(15A) stabil exprimieren sollten, gelang trotz Testung von 24 isolierten, neomycinresistenten Klonen, nicht. Diese Anzahl an getesteten Klonen hätte ausreichen sollen, um wenigstens einen p53(15A)-exprimierenden Klon zu erhalten, da bei der Etablierung von LLC-MK₂(p53her)-Zellen von 18 getesteten Klonen drei positiv waren und von 19 getesteten LLC-MK₂[p53(138V)her]-Klonen zwei positiv waren. Die strahleninduzierte Phosphorylierung von p53 an Serin-15 wird vornehmlich durch die ATM-Kinase vermittelt, wodurch es vermutlich zur Aktivierung von p53 als *checkpoint*-Faktor kommt und ein G1-Arrest ausgelöst wird (Banin *et al.*, 1998; Canman *et al.*, 1998). Zellen, die eine p53-Mutante tragen, die der Phosphorylierung nicht zugänglich ist, wie die p53(15A)-Mutante, sind empfindlich in der schadensinduzierten Regulation ihres Zellzyklus gestört. Möglicherweise sind Zellen, die p53 mit dieser Mutation exprimieren, deshalb schwerer zu etablieren. Allerdings spricht dagegen, dass die Phosphorylierung von Ser15 insbesondere nach Strahlenexposition auftritt und diese Noxe während der Etablierung nicht einwirkte. Alternativ wäre vorstellbar, dass tatsächlich p53(15A)her-positive Zellklone etabliert wurden, jedoch die Proteinexpression aufgrund einer verringerten Stabilität ohne Phosphat an Position 15 nicht nachweisbar war. Es wurde beschrieben, dass MDM2 nicht mit an Ser15-phosphoryliertem p53 Komplexe bilden kann, und demzufolge p53 nicht dem ubiquitin-vermittelten Abbau zuführen kann (Shieh *et al.*, 1997; Pise-Masison *et al.*, 1998).

Zusammenfassend konnte das auf SV40 basierende und in dieser Arbeit modifizierte System für die Untersuchung der Rolle von in *cis* wirkenden Elementen unter Betrachtung von in *trans* wirkenden Faktoren aufgebaut und erfolgreich genutzt werden.

4.2 Identifizierung von *cis*-regulatorischen Sequenzen bei der homologen Rekombination

Für die Untersuchungen wurden DNA-*cis*-Elemente ausgewählt, zu denen sowohl Fragmente aus Bruchpunktregionen mit ursächlicher Beteiligung an der Entstehung von Leukämien (*MLL*, *TAL1*, *LMO2*, *RAR α* ; siehe Reichel *et al.*, 1999; Boehm *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1990; Alcalay *et al.*, 1991) als auch zwei *MAR*-Sequenzen (Boulikas & Kong, 1994; Will *et al.*, 1998a, b) und repetitive DNAs (*CTG-repeat*; siehe Bowater *et al.*, 1996) inklusive einer *RGC*-Sequenz mit 13 Kopien einer Wtp53-Erkennungssequenz (Kern *et al.*, 1992) und deren mutiertes Gegenstück gehören.

Frühere Studien von *LMO2*-Translokationen führten zur Kartierung einer 2 kb großen Bruchpunktregion in der Nähe einer heptamerähnlichen Sequenz, in der sechs von sieben Nukleotiden mit dem Konsensussignal der V(D)J-Rekombinase übereinstimmen (Boehm *et al.*, 1989). Darüber hinaus treten chromosomale Verschmelzungen, welche das *TAL1*-Gen bei t(1;14)-Translokationen betreffen und solche, die das *LMO2*-Gen involvieren bei t(11;14)-Translokationen, in Verbindung mit dem *TCR α / δ* -Lokus auf (Bernard, *et al.*, 1990; Boehm *et al.*, 1989; Breit *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1990). Deshalb liegt der Schluss nahe, dass illegitime Rearrangements, die in den *TAL1*- und *LMO2*-Bruchpunktregionen auftreten, durch die V(D)J-Maschinerie, die normalerweise für die T-Zellrezeptorgen-Umordnungen verantwortlich ist, initiiert wurden. Tatsächlich konnte in früheren Arbeiten demonstriert werden, dass heptamer-/nonamerähnliche Signalsequenzen innerhalb fragiler Sequenzen der *LMO2*- und des *TAL1*-Gene als schwache Rekombinationssignale fungieren (Raghavan *et al.*, 2001; Marculescu *et al.*, 2002). Ebenso könnte die Integration eines Retrovirus sowohl in das *TAL1*- als auch ins *LMO2*-Gen (Stocking *et al.*, 1993) durch das Wirken einer spezifischen Rekombinase vermittelt werden, besonders, da die durch das Virus kodierte Integrase im Zusammenspiel mit Doppelstrangbruchreparatur-Komponenten der Wirtszelle arbeitet (Taganov *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den myeloiden Vorläuferzelllinien, in denen die retroviralen Integrationsorte identifiziert wurden (Stocking *et al.*, 1993), sollte die V(D)J-Rekombination in den SV40-infizierbaren Affennierenzellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, nicht erwartet werden. Dies könnte erklären, warum sich die Rekombinationsfrequenzen nach Aufnahme der *TAL1*-BCR- und *LMO2*-BCR-Fragmente in die SV40-Genome nicht deutlich änderten. Interessanterweise wurde erst kürzlich berichtet, dass während der erfolgreichen gentherapeutischen Behandlung von elf Kindern mit SCID die provirale Integration im *LMO2*-Lokus bei zwei Fällen auftrat (Hacein-Bey-Abina *et al.*,

2003), die als Konsequenz dieser Insertions-Mutagenese bei einem Jungen zur Ausbildung einer Leukämie führten.

In der Absicht, alternative Mechanismen der Instabilität dieser Loci aufzuklären, zeigten Untersuchungen, dass bei den *TAL1*-Deletionen diese DNA-Regionen mit Ausnahme einer CpG-Insel, in vollständig demethylierter Form vorlagen (Breit *et al.*, 1994), also eine lokale Chromatinzugänglichkeit aufwiesen. Bei der *LMO2*-Bruchpunktregion treten ausgedehnte Purin-Pyrimidin-Sequenzen auf, die, da sie wahrscheinlich in der Z-DNA-Form auftreten, ebenfalls eine offene Chromatinstruktur verursachen. Diese Öffnung der Chromatinstruktur führt zu einer Zugänglichkeit für homologe Rekombinationsprozesse, das NHEJ, das V(D)J-*joining* und die retrovirale Insertion und verursacht damit indirekt genomische Instabilität. Da in dieser Arbeit eher die Rolle von in *cis* wirkenden Faktoren mithilfe des SV40-Testsystems und nicht die Rolle von epigenetischen Mechanismen untersucht werden konnte, konnte hier auch kein bemerkbarer destabilisierender Effekt weder für das *TAL1*- noch für das *LMO2*-BCR-Fragment beobachtet werden. Zusammengefasst konnte ein *cis*-regulatorischer, von der V(D)J-Rekombinase unabhängiger Effekt durch *TAL1*- und *LMO2*-Bruchpunktregionen auf die genomische Instabilität in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die für *TAL1* und *LMO2* erzielt wurden, konnte mithilfe des auf SV40 basierenden Systems deutlich eine Stimulierung der Rekombination durch die *MLL*-BCR-Sequenz außerhalb des zellulären Chromatinkontextes nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuten klar auf einen in *cis* wirkenden Mechanismus des *MLL*-BCR-Fragmentes während spontanen DNA-Austauschereignissen und noch weit dramatischer während durch das Zytostatikum Etoposid induzierten Ereignissen hin, die durch das vermehrte Auftreten von Brüchen in dieser Region erklärt werden können (Sim & Liu, 2001). *MLL* ist eines der am häufigsten und in den verschiedensten Formen der akuten Leukämie translozierten Gene und die Translokationspunkte treten ausschließlich in einer 8,3 kb großen Region auf (Vogelstein & Kinzler, 2002; Ziemer-van der Postel *et al.*, 1991). Ein besonders interessanter Aspekt der Translokationen, in die *MLL* involviert ist, betrifft die Generierung sekundärer Leukämien nach Chemotherapie. Bei 85% der Patienten, die nach Chemotherapie mit Topoisomerase II-Inhibitoren, wie Etoposid, eine sekundäre Leukämie entwickeln, finden sich Translokationen, die die Chromosomenregion 11q23 betreffen. *MLL* ist somit ein *hot spot* für chromosomale Rearrangements nach Behandlung mit Epipodophylotoxinen wie Etoposid (Pui *et al.*, 1989).

Das in dieser Arbeit ausgewählte 418 bp große *MLL*-BCR-Fragment stellt einen weiter eingegrenzten *hot spot* dar, der bei Kindern unter einem Jahr beschrieben wurde und in dem

eine Häufung von DNA-Brüchen nach Behandlung mit Topoisomerase II-Inhibitoren kartiert wurden (Sim & Liu, 2001; Stanulla *et al.*, 1997; 2001). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte in dieser Arbeit eine durch Etoposid verursachte Desintegration der viralen Genome, die das *MLL*-BCR-Fragment tragen, nach agarosegelelektrophoretischer Auftrennung beobachtet werden, obwohl das untersuchte *MLL*-BCR-Fragment keine Topoisomerase II-Erkennungssequenz (Strissel *et al.*, 1996) enthält. Eine Erklärung für seine Fragilität könnte in der Tatsache liegen, dass es im Zentrum einer hochaffinen MAR kartiert wurde und eine Korrelation zwischen der Dichte der *MLL*-Translokationspunkte und der Assoziation mit der nukleären Matrix beschrieben wurde (Hensel *et al.*, 2001). Somit könnte *MLL* das Ziel von Nukleasen während der frühen Stadien der Apoptose, die als Antwort auf chemotherapeutische Behandlung ausgelöst wird, sein (Sim & Liu, 2001; Stanulla *et al.*, 1997; 2001). Alternativ dazu könnte Topoisomerase II präferentiell an *MLL*-BCR-Sequenzen nach Behandlung mit Topoisomerase II-Inhibitoren Doppelstrangbrüche verursachen, da dieses Enzym an MAR-Sequenzen angereichert zu sein scheint (Boulikas, 1995).

In den Experimenten mit *IgHE*- und *PARP*-MAR Elementen, die aufgrund ihrer Eigenschaft, an die nukleäre Matrix zu binden (Boulikas, 1995; Staudt & Lenardo, 1991), ausgewählt wurden, konnte eine dramatische Stimulation der Rekombinationsfrequenzen ($50,9$ und $209,9 \times 10^{-4}$ versus $9,7 \times 10^{-4}$) demonstriert werden. Es wurde bereits lange vermutet, dass MARs rekombinogen wirken (Boulikas, 1995). Dies ist die erste Arbeit, die eine *cis*-stimulatorische Rolle in der homologen Rekombination für isolierte MAR-Sequenzen unabhängig vom Chromatikontext der zellulären Chromosomen beschreibt. Diese Ergebnisse stimmen darüber hinaus mit der bereits oben erwähnten Zugänglichkeit von MARs für Nukleasen und andere DNA-modifizierender Enzyme überein. Des weiteren enthält das *PARP*-MAR-Fragment destabilisierende Elemente wie lange GT-Folgen, intrinsisch gebogene, geknickte und palindromische DNA-Sequenzen. Letztere könnten rekombinogen wirken durch die Ausbildung von kruziformen DNA-Strukturen (Boulikas & Kong, 1993; Will *et al.*, 1998a; 1998b). Das klassische *IgHE*-MAR ist AT-reich und enthält ein DNA-*unwinding*-Element. Für diese DNA-*unwinding*-Elemente wird eine rekombinationssteigernde Wirkung vermutet, indem sie strukturelle Veränderungen des Chromatins durch regionales *base-unpairing* verursachen (Staudt & Lenardo, 1991; Boulikas, 1995; Will *et al.*, 1998b).

Sequenzmotive wie gebogene DNA, Palindrome und lange AT-Folgen finden sich außerdem in DNA-Replikationsursprüngen. Die in dieser Arbeit durchgeführten *de novo* DNA-Syntheseuntersuchungen zeigten, dass *IgHE*- und *PARP*-MAR-Elemente die SV40-

Replikation leicht erhöhten, ein Ergebnis, dass von einer weiteren Arbeitsgruppe mit einem anderen SV40-Modellsystem ebenfalls erzielt werden konnte (Ariizumi *et al.*, 1993).

Im Gegensatz hierzu war die *MLL*-BCR-Virus-DNA-Synthese leicht herabreguliert, obwohl das *MLL*-BCR-Element eine Stimulation der Rekombination verursachte.

Zusammengenommen konnte die Virusreplikation qualitativ nur in einigen Fällen, nämlich bei *IgHE*- und *PARP*-MAR, mit der Rekombination korreliert werden. Es konnte jedoch auch in diesen Fällen keine quantitative Korrelation festgestellt werden, was vermuten lässt, dass die Stimulation der Replikation in diesen Fällen nicht mit der Steigerung der Rekombinationsfrequenzen mechanistisch verknüpft ist.

Eine Erhöhung der Rekombinationsfrequenzen konnte auch für den *CTG98-repeat* festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Studien überein, die homologe Rekombination als Ursache für die Instabilitäten, die im MD-Lokus auftreten, vorschlagen (Richard & Paques, 2000). Für repetitive Sequenzen konnte gezeigt werden, dass sie durch Bildung von Sekundärstrukturen die homologe Rekombination erhöhen, ein Ergebnis, das auch in dieser Arbeit mit der repetitiven RGC- und RGCmut-Sequenz erzielt wurde. Mit dem *CTG98-repeat* wurde jedoch eine nur 3fache Stimulation beobachtet, während nach Einführung der *PARP*-MAR-DNA eine 22fache Zunahme der Rekombinationsfrequenz zu verzeichnen war. Diese Ergebnisse scheinen gegensätzlich zu denen einer anderen Gruppe zu sein, die mit einem auf *E. coli* basierenden Plasmidsystem eine Erhöhung der intermolekularen Rekombination von ein bis zwei Größenordnungen durch die gleiche $(CTG-CAG)_{98}$ -Sequenz beobachten konnten (Pluciennik *et al.*, 2002). Es gibt aber eine Reihe von möglichen Erklärungen für diese Diskrepanz. Erstens könnte die während der an dem *CTG98-repeat* stattfindenden Doppelstrangbruchreparatur auftretende Veränderung der *repeat*-Länge ein Hindernis für die Virusamplifikation darstellen. Zweitens vermitteln $(CTG-CAG)$ -repeats die Ausbildung von Haarnadelstrukturen, die an die Reparatur gekoppelte Replikationsvorgänge behindern können (Richard *et al.*, 2000). In Hefe wird die resultierende Reparatur-Inhibition durch den Mre11-Rad50p-Xrs2p-Komplex, der dem SbcC-SbcD-Komplex in *E. coli* entspricht, abgeschwächt. Für SV40-T-Ag wird angenommen, dass es Mre11, Rad50 und Nbs1 dereguliert, so dass eine *CTG98*-vermittelte Zunahme der Rekombinationsfrequenz damit in einem auf SV40 basierenden System weniger wahrscheinlich scheint (Lanson *et al.*, 2000). Drittens konnte gezeigt werden, dass die $(CTG-CAG)_{98}$ -Rekombinationsfrequenzen stark durch Replikationsvorgänge beeinflusst werden, wenn die *repeat*-Sequenz in der Nähe von Replikationsursprüngen lokalisiert ist (Panigrahi *et al.*, 2002; Pluciennik *et al.*, 2002). In

dieser Arbeit wurde das CTG98-Fragment 2,5 kb distal des SV40-Oris inseriert, was zu keiner signifikanten Veränderung in der DNA-Syntheserate führte. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass diese Sequenz einen weniger ausgeprägten Einfluss auf das Anhalten der Replikationsgabel in unserem System ausübt.

4.3 Die sequenzunabhängige Inhibition der homologen Rekombination durch p53

Für p53 konnte gezeigt werden, dass es die homologe Rekombination und das NHEJ wirksam zu inhibieren vermag, welches möglicherweise durch die Erkennung von Sequenzabweichungen durch p53 vermittelt wird (Akyüz *et al.*, 2002; Bertrand *et al.*, 1997; Dudenhöffer *et al.*, 1998; Mekeel *et al.*, 1997; Wiesmüller *et al.*, 1996). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte in dieser Arbeit eine Herabregulierung von interchromosomalen homologen Rekombinationsereignissen in Wtp53her-exprimierenden Zellen für *TAL1*-BCR-, *LMO2*-BCR- und *MLL*-BCR-Fragmente beobachtet werden. In diesen Wtp53-positiven Zellen blieben die Rekombinationsfrequenzen selbst dann niedrig, wenn durch Gabe von Topoisomerase II-Inhibitoren eine dramatische Zunahme von Doppelstrangbrüchen für das *MLL*-BCR-Fragment zu erwarten waren. Dies ist besonders interessant, da die Rearrangements, die den *MLL*-Lokus betreffen, oft nach Chemotherapie auftreten (Strissel *et al.*, 1996) und in engem Zusammenhang mit Mutationen im *p53*-Gen stehen (Andersen *et al.*, 2001). Dies bedeutet, dass die Mutation von p53 das Leukämie-Risiko steigert, unter anderem, da p53 nicht mehr in der Lage ist, die Doppelstrangbruchreparatur am *MLL*-Lokus zu kontrollieren.

Die hier vorgestellten Ergebnisse, die mit den in *cis* wirkenden MAR-Sequenzen erzielt werden konnten, liefern einen weiteren wichtigen Hinweis auf die Ausübung eines antirekombinogenen Effektes durch p53. Interessanterweise assoziieren sowohl Wtp53 als auch Strukturmutanten von p53 mit der nukleären Matrix (Jiang *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass sowohl Kontakt- als auch Konformations-Mutanten von p53 direkt an *IgHE*- und *PARP*-MAR-Elemente binden (Will *et al.*, 1998a; 1998b). Dieser Befund war mit dem Funktionsgewinn einiger p53-Mutanten während der Tumorentstehung in Verbindung gebracht worden (Roemer, 1999), da die MAR-Bindung bezüglich dieser Elemente für Mutp53 spezifisch schien. Mit diesem SV40 Testsystem konnte gezeigt werden, dass in den Parentalzellen, die endogen die Konformationsmutante p53(Δ 237-239) tragen, die

MAR-abhängigen Rekombinationsfrequenzen drastisch gesteigert waren, was mit einem *MAR*-spezifischen Funktionsgewinn dieser Mutante kompatibel wäre. Ein dominanter, *trans*-regulatorischer Effekt von p53(Δ 237-239) kann nach den hier erhobenen Daten jedoch als eher unwahrscheinlich angesehen werden, da das ektopisch exprimierte Wtp53 in diesen Zellen eine ähnlich hohe Rekombinationsinhibition wie für die anderen untersuchten Elemente verursacht, trotz des hohen Überschusses an endogenem Mutp53. Weitere Studien mit anderen klassischen onkogenen p53-Mutanten, wie p53(248W), p53(175H) oder auch p53(273H) sollten zur genaueren Aufklärung möglicher durch *MARs* verursachter Funktionsgewinne von Mutp53 bei der Destabilisierung des Genoms im Verlauf der Tumorgenese beitragen.

p53 wird mit Mikrosatelliten in letzter Zeit zunehmend in Verbindung gebracht. Apoptose-induzierende p53-Varianten binden einen polymorphen, d.h. bei verschiedenen Individuen mit unterschiedlicher *repeat*-Zahl auftretenden Mikrosatelliten im Promotor des *PIG3*-Gens, eines an der Apoptose beteiligten Faktors. Dieser Mikrosatellit stellt außerdem das erste p53-responsible Element dar, das polymorph ist und könnte somit durch Vererbung die Krebs susceptibility beeinflussen (Contente *et al.*, 2001; Polyak *et al.*, 1997). Weiterhin konnte in Haut-, Blasen- und Lungenkrebsformen die Instabilität von Mikrosatelliten mit dem Auftreten von p53-Mutationen assoziiert werden (Ahrendt *et al.*, 2000; Danaee *et al.*, 2002). Kritische Determinanten für das Auftreten von *repeat*-Expansionen und -Kontraktionen sind Komponenten der Replikations- und Rekombinations-Maschinerie (Usdin & Grabczyk, 2000). Die in dieser Arbeit mit dem CTG98- und RGCmut-Fragmenten erhaltenen Ergebnisse schlossen aber einen hauptsächlichlichen Einfluss von p53 auf die Replikation der *repeats* aus, indizierten aber einen antirekombinogenen Effekt. Letzteres stimmt mit einer Studie über die p53-abhängige Inhibition von Deletionsereignissen zwischen *Alu-repeats* (Gebow *et al.*, 2000) überein. Das Ausmaß der Rekombinationsunterdrückung durch die CTG98-Sequenz war ähnlich wie für das *MLL-BCR*-Fragment. Beide Fragmente verursachten in LLC-MK₂(neo)-Zellen vergleichbar hohe Frequenzen von 29 bzw. 34 x 10⁻⁴. Dieses Ergebnis spricht gegen einen von p53 ausgeübten inhibitorischen Mechanismus, der spezifisch für die Struktur des CTG98-Fragmentes ist.

p53(138V) ist eine *separation-of-function*-Mutante, die zwar keine Kontrolle über den Zellzyklus ausüben kann und transaktivierungsdefizient ist, aber die Fähigkeit beibehalten hat, die homologe Rekombination zu unterdrücken (Akyüz *et al.*, 2002; Willers *et al.*, 2000). Wie erwartet, waren die in dieser Arbeit neu etablierten p53(138V)her-exprimierenden Zellen

in der Lage, die interchromosomale Rekombination zwischen *TAL1*-BCR-, *LMO2*-BCR-, *MLL*-BCR-, *IgHE*-MAR-, *PARP*-MAR-, CTG98- und RGCmut-Virengenomen zu unterdrücken. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Wtp53 direkt die Rekombination kontrolliert (Dudenhöffer *et al.*, 1999; Saintigny *et al.*, 1999; Willers *et al.*, 2000). Drei Mechanismen könnten die Fähigkeit von p53, die Rekombination zu inhibieren, erklären. Erstens könnte p53 in Analogie zu MSH2 durch Bindung an Intermediate der homologen Rekombination den Strangaustausch durch die Rekombinase Rad51 blockieren (Stürzbecher *et al.*, 1996; Süsse *et al.*, 2000). Zweitens könnte das exonukleolytische *proof-reading* von fehlgepaarten Heteroduplexen die Rekombinationsverbindungen auflösen (Janz *et al.*, 2002; Süsse *et al.*, 2000). Drittens konnte nachgewiesen werden, dass BLM, eine RecQ-DNA-Helikase, potentiell rekombinogene Moleküle, die an Stellen der fehlerhaften Prozessierung von DNA-Replikations-Intermediaten auftreten, auflöst, und mit p53 interagiert (Wang *et al.*, 2001). Dies könnte bedeuten, dass p53 antirekombinogen via Modulation von BLM-Funktionen wirkt.

4.4 Die sequenzabhängige Steigerung der homologen Rekombination durch p53

Der wohl überraschendste Befund dieser Arbeit war, dass im Gegensatz zu den bisher diskutierten Ergebnissen p53 bei bestimmten DNA-*cis*-Elementen auch rekombinationsstimulierend wirken kann. So zeigte sich für den RGC-*repeat* und das RAR α -BCR-Fragment eine 4- bis 5fache Steigerung der Rekombinationsfrequenz.

Der auffällige Unterschied zwischen den Daten zu RGC und seinem mutierten Gegenstück, RGCmut, legt die Vermutung nahe, dass es zu einer Komplexbildung zwischen p53 und seiner Bindungssequenz RGC kommt (Kern *et al.*, 1991), während dies für RGCmut nicht der Fall ist. Im Einklang hierzu zeigte sich die transaktivierungsdefiziente Mutante p53(138V) signifikant weniger stimulatorisch als Wtp53. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass RGC-*repeats* die Replikation eines auf Polyomaviren basierenden Episoms *in vitro* in einer von p53 abhängigen Weise inhibieren (Miller *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu berichtete eine andere Arbeitsgruppe, dass Wtp53 die DNA-Replikation eines Polyomavirus in einer sequenzspezifischen Weise stimuliert (Kanda *et al.*, 1994). In dieser Arbeit konnte interessanterweise für die virale Replikation in Abhängigkeit von dieser Sequenz eine signifikant gesteigerte Replikationsaktivität, allerdings mit einem verzögerten Maximum bei 36 Stunden nach Infektion beobachtet werden. Dies bedeutet, dass für diese p53-

Erkennungssequenz nicht nur eine Steigerung der Rekombination, sondern auch der Replikation zu verzeichnen war. Vor allem jedoch kann eine Korrelation zwischen DNA-Bindung durch p53 und Replikationsretardation angenommen werden, da es sich hier um ein spezifisch mit RGC-, nicht aber mit RGCmut-Viren zu verzeichnendes Ergebnis handelte. Es wird allgemein angenommen, dass das Anhalten der Replikationsgabel zu erhöhten Rekombinationsaktivitäten führt (Flores-Rozas & Kolodner, 2000; Saintigny *et al.*, 2001), so dass in diesem Fall diese Ereignisse mechanistisch verknüpft zu sein scheinen. Eine generelle Erklärung für die Steigerung der Rekombinationsfrequenzen als Antwort auf Wtp53 liefert diese Interpretation aber dennoch nicht, da die Replikationskurve für den *RAR α* -BCR-Virus sich von z.B. den Kurven von *TALI*- und *LMO2*-BCR-Viren nicht unterscheidet. Anders als mit dem RGC-Fragment wurde das *RAR α* -BCR-Fragment nicht von Wtp53 stabil komplexiert. Die Erkennung einer spezifischen DNA-Sequenz war bei diesem Fragment also nicht der ausschlaggebende Grund für die Erhöhung der Rekombination durch p53. Das *RAR α* -Fragment enthält keine p53-, wohl aber zwei Topoisomerase I Erkennungssequenzen nach den stringenten Kriterien von sowohl Jaxel *et al.*, 1988 als auch Tsui *et al.*, 1989. In den Versuchen, bei denen der Topoisomerase I-Inhibitor Camptothecin auf die Parentalzelllinie LLC-MK₂(neo) appliziert wurde, konnte ein *RAR α* -BCR-abhängiger Anstieg in den Rekombinationsfrequenzen beobachtet werden, der durch das Auftreten von durch Camptothecin verursachten Doppelstrangbrüchen erklärt werden kann. Dagegen konnten in Wtp53her-positiven Zellen die gleichen Rekombinationsfrequenzen mit und ohne Camptothecin-Behandlung gemessen werden. Die Kombination von Camptothecin und Wtp53 scheint den rekombinationsstimulierenden Effekt von Camptothecin alleine nicht zu übertreffen, was einen epistatischen Mechanismus der Rekombinationserhöhung durch Topoisomerase I-Inhibition und Wtp53 wahrscheinlich macht. Interessanterweise zeigten neueste Untersuchungen, dass p53 die Bildung eines zweifach schneidenden, aus zwei Topoisomerase I-Molekülen bestehenden, Komplexes stimuliert (Soe *et al.*, 2002). Dieser Komplex hinterlässt eine Lücke von ca. 13 Nukleotiden, die die DNA-Rekombination unterstützt, welche durch das zweite Topoisomerase I-Molekül vermittelt wird (Stephan *et al.*, 2002). Folglich stabilisieren sowohl Camptothecin als auch p53 die kovalenten DNA-Topoisomerase I-Komplexe und könnten so DNA-Brüche und Rekombination durch das gleiche Enzym verursachen (Gobert *et al.*, 1996).

Überraschenderweise führten Versuche mit dem RGC-Virus in LLC-MK₂(neo)-Zellen nach Camptothecin-Behandlung auch zu einer Erhöhung der Rekombinationsfrequenzen, obwohl

dieses Fragment keine perfekte Topoisomerase I-Erkennungssequenz enthält. Camptothecin soll aber präferentiell das Schneiden an TG-Nukleotiden ohne flankierende Konsensussequenzen stimulieren (Kjeldsen *et al.*, 1988), was erklären könnte, warum Camptothecin eher die Rekombination des RGC-Fragmentes mit vier TG-Nukleotiden im Gegensatz zu RGCmut mit zwei TG-Nukleotiden pro Wiederholung beeinflusste. Wtp53 unterdrückte deutlich die durch Camptothecin induzierte Rekombination zwischen den RGC-Viren, was vermuten lässt, dass Camptothecin und DNA-gebundenes p53 die Rekombination über verschiedene Wege stimuliert. Daraufhin könnte man annehmen, dass p53 die Topoisomerase I nur durch eine perfekte Konsensussequenz wie im *RAR α* -BCR-Fragment aktiviert. Brazdova *et al.*, 2002 schlossen aus ihren Untersuchungen, dass oligomeres p53 Filamente an hochspiralisierter DNA formiert und diese Bildung den Rad51-vermittelten Strangaustausch reguliert. Interessanterweise fördert die gleiche C-terminale Region von p53, die diese Aktivität ausführt, auch das DNA-*reannealing* (Bakalkin *et al.*, 1994). Demnach wäre es auch denkbar, dass es sich hier um einen replikationsunabhängigen Mechanismus, der hohe Rekombinationsfrequenzen in Verbindung mit dem RGC-Fragment verursacht und der von der Filamentbildung von p53 abhängt, handelt.

Überdies lassen die Daten darauf schließen, dass die sequenzunabhängige Inhibition der Rekombinationsaktivität von p53 dominant ist im Vergleich zum stimulatorischen Effekt durch sequenzspezifische p53-Bindung, sobald rekombinative Reparatur innerhalb der Erkennungssequenz durch Doppelstrangbrüche inhibiert wurde. Unterstützt wird diese Forderung dadurch, dass gezeigt wurde, dass schon geringste p53-Proteinmengen ausreichen, um die Rekombination zu inhibieren und dass p53 eine extrem hohe Affinität für die DNA-Intermediate der Rekombination zeigt (Akyüz *et al.*, 2002; Dudenhöffer *et al.*, 1998; 1999).

4.5 Die Rolle von PARP-1 im Zusammenspiel mit p53 bei der homologen Rekombination

Für PARP-1 wird angenommen, dass es die Effektivität der p53-vermittelten DNA-Schadens-Antwort modifiziert (Valenzuela *et al.*, 2002) und dadurch genomstabilisierend wirkt.

Versuche mit einem PARP-1/p53her-Zellsystem zeigten in dieser Arbeit, dass die Rekombinationsfrequenzen für SV40-Wt-Viren von überexprimierter PARP-1 alleine ebenso wie in p53her-exprimierenden Zellen unterdrückt wurden.

Überraschenderweise zeigte sich eine fehlende Inhibition der Rekombination in der exogen PARP-1 und p53her koexprimierenden Zelllinie LMV2-p53herPARP-K11. Dieser Befund widerspricht in gewisser Weise der für PARP-1 postulierten antirekombinogenen Rolle, da in mehreren Studien von einem Anstieg der homologen Rekombination nach PARP-1-Inhibition berichtet wurde (Magnusson & Ramel, 1990; Waldmann & Waldmann, 1991). Als Erklärung kann weder eine ergänzende Rekombinations-Inhibition über molekulare Wechselwirkungen mit den DNA-Brüchen (PARP-1)- bzw. Rekombinations-Intermediaten (p53) noch eine durch PARP-1 vermittelte p53-Aktivierung und damit einer Rekombinations-Inhibition herangezogen werden, wie dies in den Zellsystemen mit Überexpression von PARP-1 ohne p53her und p53her ohne PARP-1-Überexpression (LMV2-PARP-K13, LMV2p53her-K18) zutrifft. Da die LMV2-p53herPARP-K11-Zellen morphologische Auffälligkeiten zeigten, die auf eine Einleitung der Apoptose nach Östradiolaktivierung von p53her und nach Überexpression von PARP-1 hindeuteten, wurden sie daraufhin von Fr. Dipl.-Biol. S. Süße näher untersucht. Es zeigte sich, dass ca. 10% der LMV2-p53herPARP-K11-Zellen tatsächlich apoptotisch waren (S. Süße, pers. Mitteilung). Durch die Aktivierung des apoptotischen Programms in diesen Zellen scheint es durchaus wahrscheinlich, dass die Zahl der DNA-Strangbrüche erhöht wurde (Sim & Liu, 2001). In Unterstützung dieser Annahme zeigten Versuche von Fr. Dipl.-Biol. S. Süße mit einem spezifischen Caspase-Inhibitor, dass dieser Rekombinationsfrequenzen in den LMV2-p53herPARP-K11-Zellen herabsetzte. Daraus lässt sich ableiten, dass apoptotische Prozesse, durch Koexpression von PARP-1 und Wtp53 verursacht werden und die damit verbundenen Signalübertragungsvorgänge rekombinationsstimulierend wirken. Dies deutet darauf hin, dass ähnlich wie für das *MLL*-Fragment postuliert, Apoptose-Induktion genomische Instabilität verursachen kann. Anzumerken ist hier, dass die LMV2-p53herPARP-K11-Zellen zwar in die Apoptose geleitet werden, aber in den Rekombinations-Assays aufgrund der stets parallel zur Doppelinfektion durchgeführten Infektion mit SV40-Wt-Virus nur vitale, nicht abgestorbene Zellen einbezogen wurden. Dadurch können also Fehler aufgrund von unterschiedlichen Zytotoxizitäten ausgeschlossen werden.

In dieser Arbeit wurden die Versuche mit dem PARP-1/p53her überexprimierenden Zellsystem auf die Fragmente *MLL*-BCR, *RAR α* -BCR und *PARP*-MAR ausgeweitet. Überraschenderweise konnte mit dem *PARP*-MAR-Fragment eine Unterdrückung der Rekombination in LMV2-p53herPARP-K11-Zellen beobachtet werden. Die Vermutung liegt nahe, dass im Falle des Ergebnisses für den *PARP*-MAR-Virus in LMV2-p53herPARP-K11-Zellen möglicherweise aufgrund der Bindung von PARP-1 an MAR-Sequenzen (Galande &

Kohwi-Shigematsu, 2000) in seiner proapoptotischen Aktivität durch Poly-ADP-Ribosylierung von p53 gestört ist. Der stärkere Unterdrückungsfaktor im Gegensatz zu SV40-Wt-Viren deutet darauf hin, dass PARP-1 in Bezug auf das *PARP*-MAR-Fragment spezifisch in *trans* wirkt. Vorstellbar ist wegen der beschriebenen hohen Affinität von PARP-1 für MARs, dass PARP-1 in großen Konzentrationen stabil an Duplexregionen gebunden vorliegt. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit ist, dass zwar die Apoptose durch die kombinierte Wirkung von PARP-1 und Wtp53 induziert wird, aber in diesen Zellen ein deutlicher synergistischer Effekt zwischen p53 und PARP-1 bezüglich der Rekombinationsunterdrückung vorliegt, der selbst noch dieser durch die Apoptose vermittelten Stimulierung entgegenwirkt. Auch in diesem Zusammenhang könnte die hochaffine Bindung von PARP-1 an MAR-Sequenzen eine Rolle spielen, d.h. es könnte für Rekombinationsenzyme wie Rad51 die Zugänglichkeit zum Rekombinationssubstrat blockieren. Diese Beobachtung zeigt auch, dass die Bindung von Proteinen an das *cis*-Element nicht notwendigerweise zu einer Steigerung der Rekombinationsfrequenz führt, wie es für RGC und p53 beobachtet wurde.

Für das *RAR α* -BCR-Fragment lässt sich in Bezug auf PARP-1 in Anwesenheit von Wtp53 (LMV2-p53herPARP-K11) festhalten, dass es anders als Wtp53 alleine keine Stimulierung der Rekombination verursacht, jedoch auch keine Unterdrückung ausgeübt wird. Dies lässt vermuten, dass PARP-1 durch Poly-ADP-Ribosylierung keine Stimulierung der Topoisomerase I auslöst wie dies für p53 mittels molekularer Wechselwirkung (Albor *et al.*, 1998; Gobert *et al.*, 1996; 1999; Soe *et al.*, 2002) angenommen wird. Unklar bleibt jedoch, wieso PARP-1 in Abwesenheit von Wtp53 keine deutliche Inhibition der Rekombination wie z.B. mit Kontrollviren ohne Fremdsequenz zeigte. Hier kann darüber spekuliert werden, ob z.B. an das *RAR α* -BCR-Fragment gebundene Topoisomerase I die Zugänglichkeit für PARP-1 reduzierte. Jedoch kann PARP-1 den durch die p53-Topoisomerase I Wechselwirkung bedingten Stimulierungseffekt neutralisieren (LMV2-p53herPARP-K11), so dass möglicherweise eine Poly(ADP)-Ribosylierung durch PARP-1 die Wechselwirkung zwischen p53 und Topoisomerase I stört oder die Aktivität von Topoisomerase I reduziert, wie dies tatsächlich bereits aufgrund von biochemischen Experimenten von einer anderen Gruppe gefordert wurde (Smith & Grosovsky, 1999).

Eine Abweichung von der mit den Kontrollfragmenten beobachteten Rekombinationsregulation durch PARP-1 zeigt sich auch nach Überexpression von PARP-1 (in LMV2-PARP-K13-Zellen) und Messung der Rekombinationsfrequenzen am *MLL*-BCR-

Fragment. Mit Ausnahme der Zellen mit p53her-Expression ohne PARP-1-Überexpression (LMV2-p53her-K18) konnte in dieser Arbeit für dieses *cis*-Element generell eine Steigerung der Rekombinationsaktivitäten beobachtet werden. Dieses Fragment zeichnet sich im Vergleich zu den anderen in Bezug auf PARP-1 analysierten *cis*-Elementen durch eine hohe Fragilität aus, d.h. es entstehen spontan Doppelstrangbrüche (Sim & Liu, 2001), wie auch durch die Analyse der isolierten viralen DNA in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Da PARP-1 als DNA-Einzel- und Doppelstrangbruch-Sensor beschrieben wurde, muss also von einer Überaktivierung von PARP-1 in Gegenwart von replikativ amplifizierten *MLL*-BCR-Sequenzen ausgegangen werden. Die Überaktivierung von PARP-1 verursacht jedoch NAD^+ -Depletionen und hat so zytotoxische Auswirkungen (Bürkle, 2001), so dass unter diesen Bedingungen ähnlich wie für PARP-1- und p53-Koexpression (LMV2-p53herPARP-K11) eine genomische Destabilisierung als Folge von Nekrose- oder Apoptose-vermittelnden Prozessen vorstellbar ist.

Zusammenfassend kann die Wirkung von Wtp53 und PARP-1 auf die homologe Rekombination dergestalt beschrieben werden, dass isoliert beide Proteine vermutlich durch molekulare Wechselwirkungen mit dem DNA-Strangbruch bzw. dem Rekombinations-Intermediat inhibierend wirken. In Kombination jedoch, oder auch nach Überaktivierung von PARP-1 durch die Präsentation von zahlreichen DNA-Strangbrüchen, werden Mechanismen des aktiven Zelltods angeschaltet, wodurch indirekt die Fragilität genomischer Sequenzen erhöht und dadurch DNA-Austausch-Prozesse in der Nachbarschaft stimuliert werden.

5 Zusammenfassung

Genetische Instabilität, d.h. die Veränderung einzelner Nukleotide (Punktmutationen) und/oder ganzer Chromosomen (Deletion, Amplifikation, Translokation) kann zur Entwicklung eines Tumors führen, wenn im Verlauf dieses Prozesses Onkogene aktiviert oder Tumorsuppressoren inaktiviert werden (Vogelstein & Kinzler, 1993). Der Entstehung eines Tumors geht die Veränderung tausender von Genen voraus (Loeb & Loeb, 2000), wobei exogene Noxen sowie endogene Suszeptibilitäts-Faktoren eine entscheidende Rolle bei der DNA-Schadensakkumulation und damit der Entstehung von Krebs spielen.

Rekombinationsprozesse sind der letztmögliche und unersetzliche Reparaturmechanismus, wenn DNA-Quervernetzungen, DNA-Doppelstrangbrüche oder DNA-Lücken es nicht erlauben, die fehlende Information vom komplementären Strang zu übertragen (Nicolas *et al.*, 1989; Szostak *et al.*, 1983). Darüber hinaus müssen Einzelstrangbrüche oder noch unreparierte Läsionen an der Replikationsgabel, also während der DNA-Synthese in proliferierenden Zellen, ebenfalls rekombinativ beseitigt werden (Haber, 1999; Cox, 2000). Aus diesen Gründen sind Rekombinationsprozesse essentiell für das Überleben von tierischen Zellen sowie für die Vermeidung von Tumoren in Säugtieren (Lim & Hasty, 1996; Tsuzuki *et al.*, 1996; Thompson & Schild, 2001).

Neben der zunehmenden Bedeutung, welche die Rekombination durch die Entdeckung von Krebs susceptibilitäts-Genen erlangte, deuten auch die in Tumorzellen meist beobachteten chromosomalen Veränderungen und hyperrekombinativen Phänotypen auf eine fundamentale Stellung bei der Krebsentstehung hin.

Das auf der Rekonstitution von SV40-Viren basierende Testsystem zur Quantifizierung homologer Rekombinationsereignisse (Wiesmüller *et al.*, 1996) konnte bereits erfolgreich zur Analyse von p53 als einen in *trans* auf die Rekombination wirkenden Faktor eingesetzt werden (Wiesmüller *et al.*, 1996; Dudenhöffer *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurden zur Bestimmung von Rekombination an krebsassoziierten Chromosomenabschnitten die als Testsystem fungierenden SV40-Vireng Genome dergestalt modifiziert, dass sie in der Lage waren, Fremdsequenzen aufzunehmen. Für die Untersuchungen wurden DNA-*cis*-Elemente ausgewählt, zu denen sowohl Fragmente aus Bruchpunktregionen mit ursächlicher Beteiligung an der Entstehung von Leukämien (*MLL*, *TALI*, *LMO2*, *RAR α* siehe Reichel *et al.*, 1999; Boehm *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1990; Alcalay *et al.*, 1991), aus zwei *MAR*-Sequenzen (Boulikas & Kong, 1994; Will *et al.*, 1998a; 1998b) und aus repetitiver DNA (*CTG-repeat*, siehe Bowater *et al.*, 1996) sowie einer künstlichen Wiederholungssequenz mit

13 Kopien einer Wtp53-Erkennungssequenz (Kern *et al.*, 1992) und deren mutiertes Gegenstück, gehören. Mit dieser Auswahl an rekombinanten Viren war es nun möglich zu untersuchen, inwieweit DNA-Elemente Rekombinationsprozesse in *cis* modulieren.

Neben den schon etablierten LLC-MK₂-Klonen mit funktionell anschaltbarem Wtp53 (Dudenhöffer *et al.*, 1998) und einem Wtp53- und/oder PARP-exprimierenden Zellsystem (LMV2-p53her-K18, LMV2-PARP-K13, LMV2-p53herPARP-K11) wurden drei weitere Wtp53 exprimierende und zwei p53(138V) exprimierende LLC-MK₂-Klone etabliert und charakterisiert. Damit war die Möglichkeit der Untersuchung von krebsrelevanten chromosomalen Sequenzen auf die homologe Rekombination in *cis* unter Betrachtung des Tumorsuppressors p53 in *trans* gegeben.

In der Tat konnten mehr als dreifache Zunahmen in den spontanen Rekombinationsfrequenzen außerhalb des zellulären Chromatinkontextes für ein Fragment aus dem *MLL*-Gen, die *IgHE*- und *PARP*-MAR-Elemente und die repetitiven Sequenzen beobachtet werden. In Fortführung der Ergebnisse, welche für die gesamte 8,3 kb-lange *MLL*-Bruchpunktregion erzielt wurden, konnte in dieser Arbeit weiter eine deutlich gesteigerte rekombinationsstimulierende Wirkung für das nur 0,4 kb kleine *MLL*-BCR-Subfragment in Abhängigkeit des Zytostatikums Etoposid beschrieben werden, welche durch das vermehrte Auftreten von DNA-Brüchen in dieser Region erklärt werden kann. Für all diese Elemente wurde eine Unterdrückung der spontanen bzw. durch Etoposid stimulierten Rekombination durch p53 beobachtet, welche auch mit Kontrollsequenzen festgestellt wurde. Diese Befunde unterstützen die Vorstellung, dass die Rekombinationskontrolle durch p53 eine tumorsupprimierende Wirkung hat. Die Forderung, dass es sich bei dieser Tumorsuppressoraktivität um eine von der Wachstumskontrolle unabhängige handelt, wurde durch parallele Analysen mit der temperatursensitiven Mutante p53(138V) unterstützt. Während p53(138V) bei der nicht-permissiven Temperatur das zelluläre Wachstum unbeeinflusst ließ, wurde die Rekombination qualitativ und quantitativ wie durch Wtp53 reguliert.

Der wohl überraschendste Befund dieser Arbeit war, dass p53 in Bezug auf bestimmte DNA-*cis*-Elemente auch rekombinationsstimulierend wirken kann. So zeigte sich für den RGC-*repeat* ein rekombinationsstimulierender Effekt durch Wtp53, nicht jedoch durch Mutp53. Dieser Effekt könnte einerseits damit in Zusammenhang gebracht werden, dass Wtp53, nicht jedoch Mutp53, wie in dieser Arbeit gezeigt, an diese Sequenz bindet. Interessanterweise konnte für die virale Replikation in Abhängigkeit von dieser Sequenz parallel dazu eine signifikant gesteigerte Replikationsaktivität mit verzögertem Maximum beobachtet werden,

so dass für diese Wtp53-Erkennungssequenz nicht nur eine Steigerung der Rekombinationsfrequenz, sondern auch der replikativen Eigenschaften zu verzeichnen war. Besonders deutlich wurde ein durch das Zusammenwirken von p53 und Topoisomerase I bedingter Effekt für das *RAR α* -BCR-Subfragment. Hier wurde trotz Fehlens einer spezifischen DNA-Bindung durch p53 (keine distinkten Banden in der Gelretardationsanalyse) eine Stimulierung der Rekombination durch p53 verursacht, welche in gleichem Masse auch durch eine Behandlung von Kontrollzellen mit und ohne p53 mit dem Topoisomerase I-Inhibitor Camptothecin erzielt werden konnte. Im Gegensatz dazu verlor Wtp53 in Gegenwart von Camptothecin seine stimulierende Wirkung auf die Rekombination in Nachbarschaft des RGC-*repeats* und unterdrückte wie gewohnt den DNA-Austausch, so dass im Falle vom *RAR α* -BCR-Fragment von einem bezüglich Topoisomerase I epistatischen Reaktionsweg ausgegangen werden kann, wohingegen im Falle vom RGC-*repeat* Topoisomerase I und p53 zumindest teilweise mechanistisch unterschiedlich auf die Rekombination stimulierend wirken.

Im Gegensatz zu p53 ist die inhibitorische Wirkung von PARP-1 auf die Rekombination durch zahlreiche Faktoren modulierbar, so z.B. durch das Auftauchen von Doppelstrangbrüchen, das Vorliegen von MAR-Bindungssequenzen und die PARP-1 nachgeschalteten Prozesse des aktiven Zelltods.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Bedeutung von p53 bei der Stabilisierung von Translokationsregionen in einer von der Wachstumsregulation unabhängigen Weise herausgearbeitet werden. Die Entdeckung von einzelnen DNA-Sequenzen, welche eine gegensätzliche Wirkungsweise von p53 auslösen und die Beschreibung der Modulation dieser Wirkungsweise durch Behandlung mit Zytostatika demonstrierten die Notwendigkeit der Entwicklung individualisierter Krebstherapien, d.h. des individuellen Zusammenstellens des Therapeutika-Cocktails nach Kenntnis des funktionellen Status von p53 und anderen Tumorsuppressoren.

6 Literatur

Ahrendt, S.A., Decker, P.A., Doffek, K., Wang, B., Xu, L., Demeure, M.J., Jen, J., and Sidransky, D. (2000). Microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats is associated with p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 60, 2488-2491.

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

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

Albor, A., Kaku, S., and Kulesz-Martin, M. (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.

Alcalay, M., Zangrilli, D., Pandolfi, P.P., Longo, L., Mencarelli, A., Giacomucci, A., Rocchi, M., Biondi, A., Rambaldi, A., Coco, F.L., Diverio, D., Donti, E., Grignani, F., and Pelicci, P.G. (1991). Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor alpha locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88, 1977-1981.

Andersen, M.K., Christiansen, D.H., Kirchoff, M., and Pedersen-Bjergaard, J. (2001). Duplication or amplification of chromosome band 11q23, including the unrearranged MLL gene, is a recurrent abnormality in therapy-related MDS and AML, and is closely related to mutation of the TP53 gene and to previous therapy with alkylating agents. *Genes Chromosomes Cancer* 31, 33-41.

Aplan, P.D., Lombardi, D.P., Ginsberg, A.M., Cossman, J., Bertness, V.L., Kirsch, I.R. (1990a). Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity. *Science* 250, 1426-1429.

Aplan, P.D., Begley, C.G., Bertness, V., Nussmeier, M., Ezquerra, A., Coligan, J., and Kirsch, I.R. (1990b). The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6426-6435.

Ariizumi, K., Ghosh, M.R., and Tucker, P.W. (1993). Elements in the immunoglobulin heavy-chain enhancer directly regulate Simian Virus 40 ori dependent DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5629-5636.

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

Baker, S.J., Markowitz, K., Fearon, E.R., Wilson, J.K.V., and Vogelstein, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249, 912-915.

Banin, S., Moyal, L., Shieh, S.Y., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281, 1674-1677.

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

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

Baum, C., 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.

Begley, C.G., Aplan, P.D., Denning, S.M., Haynes, B.F., Waldmann, T.A., Kirsch, I.R. (1989). The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* 86, 10128-10132.

- Bernard, O., Guglielmi, P., Jonveaux, P., Cherif, D., Gisselbrecht, S., Mauchauffé, M., Larsen, C.J., Berger, R., and Mathieu-Mahul, D. (1990). Two distinct mechanisms for the SCL gene activation in the t(1;14) translocation of T-cell leukemias. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1, 194-208.
- 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.
- Blander, G., Kipnis, J., Leal, J.F.M., Yu, C.E., Schellenberg, G.D., and Oren, M. (1999). Physical and functional interaction between p53 and the Werner's syndrome protein. *J. Biol. Chem.* 274, 29463-29469.
- Boehm, T., Mengle-Gaw, L., Kees, U.R., Spurr, N., Lavenir, I., Forster, A., and Rabbits, T.H. (1989). Alternating purine-pyrimidine tracts may promote chromosomal translocations seen in a variety of human lymphoid tumors. *EMBO J.* 8, 2621-2631.
- Boehm, T., Feroni, L., Kaneko, Y., Perutz, M.F., and Rabbits, T.H. (1991). The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4367-4371.
- Bohen, S.P., and Yamamoto, K.R. (1993). Isolation of Hsp90 mutants by screening for decreased steroid receptor function. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 90, 11424-11428.
- Boulikas, T. and Kong, C.F. (1994). A novel class of matrix attached regions (MARs) identified by random cloning and their implications in differentiation and carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* 2, 325-330.
- Boulikas, T. (1995). Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int. Rev. Cytol.* 162A, 279-388.
- Bowater, R.P., Rosche, W.A., Jaworski, A., Sinden, R.R., and Wells, R.D. (1996). Relationship between *Escherichia coli* growth and deletions of CTG-CAG triplet repeats in plasmids. *J. Mol. Biol.* 264, 82-96.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brain, R., and Jenkins, J.R. (1994). Human p53 directs DNA strand reassociation and is photolabelled by 8-azido ATP. *Oncogene* 9, 1775-1780.
- Brand, N.J., Petkovich, M., and Chambon, P. (1990). Characterization of a functional promoter for the human retinoic acid receptor-alpha (hRAR- α). *Nucleic Acids Res.* 18, 6799-6806.
- 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.
- Brazdova, M., Palecek, J., Cherny, D.I., Billova, S., Fojta, M., Pecinka, P., Vojtesek, B., Jovin, T.M., and Palecek, E. (2002). Role of tumor suppressor p53 domains in selective binding to supercoiled DNA. *Nucleic Acids Res.* 30, 4966-4974.
- Breit, T.M., Wolvers-Tettero, I.L.M., and van Dongen, J.J.M. (1994). Lineage specific demethylation of tal-1 gene breakpoint region determines the frequency of tal-1 deletions in $\alpha\beta$ lineage T-cells. *Oncogene* 9, 1847-1853.
- 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.
- Bürkle, A. (2001). Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *BioEssays* 23, 795-806.
- Burden, A.D., and Osheroff, N. (1998). Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1400, 139-154.
- Butler, L. H., Slany, R., Cui, X., Cleary, M. L, Mason, D. Y. (1997). The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures. *Blood* 89, 3361-3370.

- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677-1679.
- Charlesworth, B., Sniegowski, P., and Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eucaryotes. *Nature* 371, 215-220.
- Chen, Q., Yang, C.Y.C., Tsan, J.T., Xia, Y., Ragab, A.H., Peiper, S.C., Carroll, A., and Baer, R. (1990). Coding sequences of the tal-1 gene are disrupted by chromosome translocation in human t cell leukemia. *J. Exp. Med.* 172, 1403-1408.
- Chen J, Marechal V, Levine AJ. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol.* 13, 4107-4114.
- 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.
- 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., d'Auriol, L., Betermier, M., Cottarel, G., Jacquier, A., Galibert F., and Dujon B. (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.
- Conde, C., Mark, M., Oliver, F.J., de Murcia, G., and Ménessier-de Murcia, J. (2001). Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. *EMBO J.* 20, 3535-3543.
- Cox M.M., Goodman M.F., Kreuzer K.N., Sherratt D.J., Sandler S.J., and Marians K.J. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404, 37-41.
- Danaee, H., Nelson, H.H., Karagas, M.R., Schned, A.R., Ashok, T.D.S., Hirao, T., Perry, A.E., and Kelsey, K.T. (2002). Microsatellite instability at tetranucleotide repeats in skin and bladder cancer. *Oncogene* 21, 4894-4899.
- Danesi, R., Figg, W.D., Reed, E., and Meyers, C.E. (1995). Paclitaxel (taxol) inhibits protein isoprenylation and induces apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Mol Pharmacol.* 47, 1106-1111.
- 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, 187-202.
- Djabali, M., Selleri, L., Parry, P., Bower, M., Young, B. D., Evans, G. A. (1992). A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nature Genet.* 2, 113-118.
- de Thé, H., Chomienne, C., Lanotte, M., Degos, L., and Dejean, A. (1990). The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukemia fuses the retinoic acid receptor gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347, 558-561.
- de Thé, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675-684.
- Donehower LA, Bradley A. (1993). The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta.* 1155, 181-205.
- Dronkert, M. D. G., Beverloo, H. B., Johnson, R. D., Hoeijmakers, J. H. J., Jasin M., and Kanaar R.. (2000). Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol. Cell. Biol.* Vol 20, 8096-8106.

- Dudenhöffer, C. (1998). Mechanismen der Kontrolle der homologen Rekombination durch den Tumorsuppressor p53. Dissertation, Universität Philipps-Universität Marburg.
- 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.
- Durocher, D., and Jackson, S.P. (2001). DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 225-231.
- 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.
- Fiers, W., Contreras, R., Haegemann, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G., and Ysebaert, M. (1978). Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* 273, 113-120.
- Finger, L.R., Kagan, J., Christopher, G., Kurtzberg, J., Hershfield, M.S., Nowell, P.C., Croce, C.M. (1989). Involvement of the *TCL5* gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86, 5039-43.
- Flores-Rozas, H., and Kolodner, R.D. (2000). Links between replication, recombination and genome instability. *Trends Biochem. Sci.* 25, 196-200.
- Galande, S., and Kohwi-Shigematsu, T. (2000). Caught in the act: binding of Ku and PARP to MARs reveals novel aspects of their functional interaction. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 10, 63-72.
- Gebow, D., Miselis, N., and Liber H.L. (2000). Homologous and nonhomologous recombination resulting in deletion: effects of p53 status, microhomology, and repetitive DNA length and orientation. *Mol. Cell Biol.* 20, 4028-4035.
- Gluzmann, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.
- Gobert, C., Bracco, L., Rossi, F., Olivier, M., Tazi, J., Lavelle, F., Larsen, A.K., and Riou, J.-F. (1996). Modulation of DNA topoisomerase I activity by p53. *Biochemistry* 35, 5778-5786.
- Gobert, C., Skladanowski, A., and Larsen, A.K. (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.
- Gradwohl, G, Menissier-de Murcia J.M., Molinete, M., Simonin, F., Koken, M., Hoeijmakers, J.H., de Murcia, G. (1990). The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3481-3485.
- Graham, F.L., and van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
- Grimwade D., Gorman P., Duprez E., Howe K., Langabeer S., Oliver F., Walker H., Culligan D., Waters J., Pomfret M., Goldstone A., Burnett A., Freemont P., Sheer D., and Solomon E (1997). Characterization of cryptic rearrangements and variant translocations in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 12, 4876-4885.
- Gu, Y., Nakamura, T., Alder H., Prasad, R., Canaani, O., Cimino, G., Croce, C.M., and Cananni, E. (1992). *t(4;11)* chromosome translocation of human acute leukemias fuses the *ALL-1* gene, related to *Drosophila trithorax*, to the *AF-4* gene. *Cell* 71, 701708.

- Gu, B.W., Xiong, H., Zhou, Y., Chen, B., Wang, L., Dong, S., Yu, Z.Y., Lu, L.F., Zhong, M., Yin, H.F., Zhu, G.F., Huang, W., Ren, S.X., Gallagher, R.E., Waxman, S., Chen, G.Q., Wang, Z.G., Chen, Z., Fu, G., and Chen, S.J. (2002). Variant-type PML-RAR α fusion transcript in acute promyelocytic leukemia: use of a cryptic coding sequence from intron 2 of the RAR α gene and identification of a new clinical subtype resistant to retinoic acid therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7640-7645.
- Gurney, E.G., Tamowski, S., and Deppert, W. (1986). Antigenic binding sites of monoclonal antibodies specific for simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* 57, 1168-1172.
- Haber, J.E. (1999). DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem. Sci.* 24, 271-275.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J.-L., Cavazzana-Calvo, M., and Fischer, A. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 348, 255-256.
- Harlow, E., Crawford, L.V., Pim, D.C., and Williamson, N.M. (1981). Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumor antigens. *J. Virol.* 39, 861-869.
- 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):305-311.
- Hensel, J.P., Gillert, E., Fey, G.H., and Marschalek, R. (2001). Breakpoints of t(4;11) translocations in the human MLL and AF4 genes in ALL patients are preferentially clustered outside of high-affinity matrix attachment regions. *J. Cell. Biochem.* 82, 299-309.
- Hess, J.L., and Korsmeyer, S.J. (1998). Life, death and nuclear spots. *Nat. Genet.* 20, 220
- Hoeijmakers, J.H.J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411: 366-374.
- Hull, R.N., Cherry, W.R., and Johnson, I.S. (1956). *Anat. Rec.* 124, 490.
- Hollstein, M., Sidransky, B., Vogelstein, and C.C. Harris. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.
- 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., and Lane, D. P. (1993). Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53. *Nucleic Acids Res.* 21, 3167-3174.
- Jabbur, J.R., Huang P., Zhang W. (2000). DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and Mdm-2 induction in vivo. *Oncogene* 19, 6203-6208.
- Jackson, S.P. (2002). Sensing and repairing double strand breaks. *Carcinogenesis* 23, 687-696.
- Janz, C., Süsse, S., and Wiesmüller, L. (2002). p53 and recombination intermediates: role of tetramerization at DNA junctions in complex formation and exonucleolytic degradation. *Oncogene* 21, 2130-2140.
- Janz, C., and Wiesmüller, L. (2002). Wild-type p53 inhibits replication-associated homologous recombination. *Oncogene* 21, 5929-5933.
- Jaxel, C., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1988.) Topoisomerase I interaction with SV40 DNA in the presence and absence of camptothecin. *Nucleic Acids Res.* 16, 11157-11170.
- Jiang, H., Xie, P., Houston, K., Stemke-Hale, U. H., Mortensen, R., Rothstein and T. Kodadek (1996). Direct association between the yeast Rad51 and Rad54 recombination proteins. *J. Bio. Chem.* 271, 33181-33186.
- Jiang, M., Axe, T., Holgate, R., Rubbi, C.P., Okorokov, A.L., Mee, T., and Milner, J. (2001). p53 binds the nuclear matrix in normal cells: binding involves the prolin-rich domain of p53 and increases following genotoxic stress. *Oncogene* 20, 5449-5458.

- Jones, R.S., and Gelbart, W.M. (1993). The Drosophila Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol Cell Biol.* 13, 6357-6366.
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F., and Smith, A.E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311, 33-38.
- Kanda, T., Segawa, K., Ohuchi, N., Mori, S., and Ito, Y. (1994). Stimulation of polyomavirus DNA replication by wild-type p53 through the DNA-binding site. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2651-2663.
- 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., Zhan Q., el-Deiry W.S., Carrier F., Jacks T., Walsh W.V., Plunkett B.S., Vogelstein B., Fornace A.J. Jr. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71, 587-597.
- Kern S., E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., and Vogelstein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252, 1708-1711.
- Khanna, K.K., and Jackson, S.P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genet.* 27, 247-254.
- Kinzler K. W., and Vogelstein B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386, 761-763.
- Kjeldsen, E., Mollerup, S., Thomsen, B., Bonven, B.J., Bolund, L., and Westergard, O. (1988). Sequence-dependent effect of camptothecin on human topoisomerase I DNA cleavage. *J. Mol. Biol.* 202, 333-342.
- Ko, L.J., and Prives, C.. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes and Dev.* 10, 1054-1072.
- Kowalczykowski, S.C. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem. Sci.* 25, 156-165.
- Laker, C., Stocking, C., Bergholz, U., Hess, N., De Lamarter, J.F., and Ostertag, W. (1987). Autocrine stimulation after transfer of the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor gene and autonomous growth are distinct but independent steps in the oncogenic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8458-8562.
- 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.
- Landel, C.C., Kushner, P.J., and Greene, G.L. (1994). The interaction of human estrogen receptor with DNA is modulated by receptor-associated proteins. *Mol. Endocrinol* 8, 1407-1419.
- Lane, D. P., und Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.
- Lane, D.P. (1992). Cancer: p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.
- Lanson, N.A. Jr., Egeland, D.B., Royals, B.A., and Claycomb, W.C. (2000). The MRE11-NBS1-RAD50 pathway is perturbed in SV40 large T antigen-immortalized AT-1, AT-2 and HL-1 cardiomyocytes. *Nucleic Acids Res.* 28, 2882-2892.
- Le Rhun, Y., Kirkland, J.B., and Shah, G.M. (1998). Cellular responses to DNA damage in the absence of Poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 1-10.
- 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.

- 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.
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, TL., and Harrison, S.C (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature*, 54, 278-284.
- Lim, D.S., and Hastay, P. (1996). A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7133-7143.
- Lindahl, T., Satoh, M.S., Poirier, G.G., and Klungland, A. (1995). Posttranslational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem. Sci.* 20, 405-411.
- Loeb, K.R., and Loeb, L.A. (2000). Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 21, 379-385.
- Look, A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278, 1059.
- 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. *Nature* 362, 847-9.
- Magnusson, J. and Ramel, C. (1990). Inhibitor of poly(ADP-ribose) transferase potentiates the recombinogenic but not the mutagenic action of alkylating agents in somatic cells in vivo in *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 5, 511-514.
- Manteuil, S., Pages, J., Stehelin, D., and Girard, M. (1973). Replication of simian virus 40 deoxyribonucleic acid : analysis of the one-step growth cycle. *J. Virol.* 11, 98-106.
- Mazo, A.M., Huang, D.H., Mozer, B.A., and Dawid, I.B. (1990). The trithorax gene, a trans-acting regulator of the bithorax complex in *Drosophila*, encodes a protein with zinc-binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87, 2112-2116.
- McMurray, C.T. (1999). DNA secondary structure: a common and causative factor for expansion in human disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1823-1825.
- 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.
- Melle, C., and Nasheuer, H.P. (2002). Physical and functional interactions of the tumor suppressor protein p53 and DNA polymerase α -primase. *Nucleic Acids Res* 30, 1493-1499.
- Melnick, A., and Licht, J.D. (1999). Deconstructing a disease: RAR α , its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93, 3167-3215.
- Mercer, W.E., Shields, M.T., Lin, D. Apella, E., and Ullrich, S.J. (1991). Growth suppression induced by p53 wild-type protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating cell nuclear antigen expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1958-1962.
- Meyers, S., and Hiebert, S.W. (2000). Alterations in subnuclear trafficking of nuclear regulatory factors in acute leukemia. *J. Cell Biochem. Suppl* 2000, 93-98.
- Milas, L., Hunter, N.R., Kurdoglu, B., Mason, K.A., Meyn, R.E., Stephens, L.C., Peters, L.J. (1995). Kinetics of mitotic arrest and apoptosis in murine mammary and ovarian tumors treated with taxol. *Cancer Chemother Pharmacol.* 35, 297-303.

- Miller, S.D., Farmer, G., and Prives, C. (1995). p53 inhibits DNA replication in vitro in a DNA-binding-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6554-6560.
- Moynahan, M. E. and Jasin, M. (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, 511-518.
- 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.
- 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, 9391-9398.
- Ng, S.C., Behm, M., and Bina, M. (1985). DNA sequence alterations responsible for the synthesis of thermosensitive VP1 in temperature-sensitive BC mutants of simian virus 40. *J. Virol.* 54, 646-649.
- Nicolas A, Treco D, Schultes NP, Szostak JW. (1989). An initiation site for meiotic gene conversion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 338, 35-39.
- Nilson, I., Löchner, K., Siegler, G., Greil, J., Beck, J.D., Fey, G.H., and Marschalek, R. (1996). Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukemias. *Brit. J. Hematol.* 93, 966-972.
- Oberosler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., und Stahl, H. (1993). p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *EMBO J.* 12, 2389-2396.
- 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.
- Ouchi, T., Monteiro, A.N.A., August, A., Aaronson, S.A., and Hanafusa, H. (1998). BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2302-2306.
- 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.
- Parekh, H., and Simpkins, H. (1997). The transport and binding of taxol. *Gen. Pharmacol* 29, 167-172.
- Patschinsky, T., und Deppert, W. (1990). Phosphorylation of p53 in primary, immortalized, and transformed Balb/c mouse cells. *Oncogene* 5, 1071-1076.
- Perrin, A., Buckle M., and Dujon B.. (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.
- Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330, 444-450.
- Petukhova, G., S. Stratton und P. Sung (1998). Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature.* 393, 91-94.
- Pise-Masison, C., Radonovich, M., Sakaguchi, K., Appella, E., and Brady, J.N. (1998). Phosphorylation of p53: a novel pathway für p53 inactivation in human T-cell lymphotropic virus type 1-transformed cells. *J. Virol.* 72, 6348-6355.
- Pluciennik, A., Iyer, R.R., Napierala, M., Larson, J.E., Filutowicz, M., and Wells, R.D. (2002). Long CTG-CAG repeats from Myotonic Dystrophy are preferred sites for intermolecular recombination. *J. Biol. Chem.* 277, 34074-34086.
- Porcher, C., Swat, W., Rockwell, K., Fujiwara, Y., Alt, F.W., and Orkin, S.H. (1996). The t cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86, 47-57.

- Prives, C., and Hall, P.A. (1999). The p53-pathway. *J. Pathol.* 187, 112-126.
- Pui, C.H., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Dodge, R.K., George, S.L., Rivera, G.K., Mirro, J. Jr., Kalwinsky, D.K., Dahl, G.V., and Murphy S.B. (1989). Secondary acute myeloid leukemia in children treated for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 321, 136-142.
- Rabbits, T.H. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372, 143-149.
- Rabbits, T.H. (2001). Chromosomal translocation master genes, mouse models and experimental therapeutics. *Oncogene* 20, 5763-5777.
- Raghavan, S.C., Kirsch, I.R., and Lieber, M.R. (2001). Analysis of the V(D)J recombination efficiency at lymphoid chromosomal translocation breakpoints. *J. Biol. Chem.* 276, 29126-29133.
- Reeves, R., and Nissen, M.S. (1990). The A-T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal protein. *J. Biol. Chem.* 265, 8573-8582.
- Reichel, M., Gillert, E., Angermüller, S., Hensel, J.P., Heidel, F., Lode, M., Leis, T., Biondi, A., Haas, O.A., Strehl, S., Panzer-Grümayer, E.R., Griesinger, F., Beck, J.D., Greil, J., Fey, G.H. Uckun, F.M., and Marschalek, R. (2001). Biased distribution of chromosomal breakpoints involving the *MLL* gene in infants versus children and adults with t(4;11) ALL. *Oncogene* 20, 2900-2907.
- Richard, G.F., and Paques, F. (2000). Mini- and microsatellite expansion: the recombination connection. *EMBO reports* 1, 122-126.
- Richard, G.F., Goellner, G.M., McMurray, C.T., and Haber, J.E. (2000). Recombination-induced CAG trinucleotide repeat expansions in yeast involve the *MRE11-RAD50-XRS2* complex. *EMBO J.* 19, 2381-2390.
- Richardson, C., and Jasin, M. (2000). Coupled homologous and non-homologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 20, 9068-9075.
- Roemer, K., and Mueller-Lantzsch, N. (1996). p53 transactivation domain mutant Q22, S23 is impaired for repression of promoters and mediation of apoptosis. *Oncogene* 12, 2069-2079.
- Roemer, K., and 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.
- Roemer, K. (1999). Mutant p53: Gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol. Chem.* 380, 879-887.
- 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.* 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.
- Ryan, A.J., Squires, S., Strutt, H.L., and Johnson, R.T. (1991). Camptothecin cytotoxicity in mammalian cells is associated with the induction of persistent double strand breaks in replicating DNA. *Nucleic Acids Res.* 19, 3295-3300.
- Ryan, J. J., Danish, R., Gottlieb, C. A., and Clarke, M. F. (1993). Cell cycle analysis of p53-induced cell death in murine erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 13, 711-719.
- Sáenz-Robles, M.T., Sullivan, C.S., and Pipas, J.M. (2001). Transforming functions of simian virus 40. *Oncogene* 20, 7899-7907.
- Saintigny, Y., D. Rouillard, B. Chaput, T. Soussi, and 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.

- Saintigny, Y., Delacote, F., Vares, G., Petitot, F., Lambert, S., Averbek, D., and Lopez, B. (2001). Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J.* 20, 3861-3870.
- Saintigny, Y., and Lopez, B.S. (2002). Homologous recombination induced by replication inhibition, is stimulated by expression of mutant p53. *Oncogene* 21, 488-492.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, und T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schaffner, D.L., Chevez-Barrios, P., Huang, S.L., Barrios, R., Dickey, B.F., Shaker, M.R., Rajagopalan, S., Habib, G.M., Leibovitz, R.M., and Liebermann, M.W. (1996). Retention of p53val135 wild-type function in transgenic mice. *Lab. Invest.* 74, 722-728.
- Scheidig, K. (1998). Die Rolle des SV40 17kDa Tumorantigens in der produktiven SV40 Infektion und der SV40-vermittelten Zelltransformation. Dissertation, Universität Hamburg.
- Scherrer, LC., Picard, D., Massa, E., Harmon, J.M., Simons, S.S., Jr., Yamamoto, K.R., and Pratt, W.B. (1993). Evidence that the hormone binding protein domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90. *Biochemistry* 32, 5381-5386.
- Schirmbeck, R. (1989). Subnukleäre Topographie der SV40 Replikation. Dissertation, Universität Ulm.
- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., und Livingston, D. M. (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265-275.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V. (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6565-6577.
- Shieh, Y.S., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334.
- Smith, H.M., and Grosovsky, A.J. (1999). PolyADP-ribose-mediated regulation of p53 complexed with topoisomerase I following ionizing radiation. *Carcinogenesis* 20, 1439-43.
- Soe, K., Hartmann, H., Schlott, B., Stevensner, T., and Grosse, F. (2002). The tumor suppressor protein p53 stimulates the formation of the human topoisomerase I double cleavage complex *in vitro*. *Oncogene* 21, 6614-6623.
- Sonoda E., Takata, M., Yamashita, Y.M., Morrison C., and Takeda, S. (2001). Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(15):8388-8394.
- Sorger, P.K., Dobles, M., Tournebize, R., Hyman, A.A. (1997). Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 807-814.
- Sperry, A.O., Blasquez, V.C., and Garrard, W.T. (1989). Dysfunction of chromosomal loop attachment sites: illegitimate recombination linked to matrix association regions and topoisomerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 5497-501.
- Stanulla, M., Wang, J., Chervinsky, D.S., Thandla, S., and Aplan, P.D. (1997). DNA cleavage within the *MLL* breakpoint cluster region is a specific event which occurs as part of higher-order chromatin fragmentation during the initial stages of apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4070-4079.
- Stanulla, M., Pradheepkumar, C., Wang, J., Jani-Sait, S.N., and Aplan P.D. (2001). Mechanisms of *MLL* gene rearrangement: site-specific DNA cleavage within the breakpoint cluster region is independent of chromosomal context. *Hum. Mol. Gen.* 10, 2481-2491.
- Stephan, H., Grosse, F., and Soe, K. (2002). Human topoisomerase I cleavage complexes are repaired by a p53-stimulated recombination-like reaction *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 30, 5087-5093.
- Steinmeyer, K., und Deppert, W. (1988). DNA binding properties of murine p53. *Oncogene* 3, 501-507.

Stocking, C., Bergholz, U., Friel, J., Klingler, K., Wagener, T., Starke, C., Kitamura, T., Miyajima, A., and Ostertag, W. (1993). Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line. *Growth Factors* 8, 197-209.

Strissel Broeker, P.L., Super, H.G., Thirman, M.J., Pomykala, H., Yonebayashi, Y., Tanabe, S., Zeleznik-Le, N., and Rowley J.D. (1996). Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* 87, 1912-1922.

Strudwick, S., and Borden, K.L.B. (2002). Finding a role for PML in APL pathogenesis: a critical assessment of potential PML activities. *Leukemia* 16, 1906-1917.

Stürzbecher, H.-W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U., and Buchhop, S. (1996). p53 is linked directly to homologous recombination processive RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J.* 15, 1992-2002.

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

Sullivan, C.S., and Pipas, J.M. (2002). T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 179-202.

Sutherland, G.R., and Richards, R.I. (1995). Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3636-3641.

Sweet, B.H., and Hilleman, M.R. (1960). The vacuolatin virus, SV40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 420-427.

Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., Stahl, F.W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33, 25-35.

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.

Tegtmeyer, P., and Ozer, H.L. (1971). Temperature-sensitive mutants of simian virus 40: infection of permissive cells. *J. Virol.* 8, 516-524.

Thompson, L.H., Schild, D. (2001). Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat. Res.* 477, 131-153.

Tkachuk, D.C., Kohler, S., and Cleary, M.L. (1992). Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 71, 691-700.

Tong, W.M., Hande, M.P., Lansdorp, P.M., and Wang, Z.Q. (2001a). DNA strand break-sensing molecule Poly(ADP-ribose) polymerase cooperates with p53 in telomere function, chromosome stability, and tumor suppression. *Mol. Cell Biol.* 21, 4046-4054.

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

Tsui, S., Anderson, M.E., and Tegtmeyer, P. (1989). Topoisomerase I sites cluster asymmetrically at the ends of the simian virus 40 core origin of replication. *J. Virol.* 63, 175-183.

Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., Morita, T. (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93, 6236-40.

Uchida, K., Morita, T., Sato, T., Ogura, T., Yamashita, R., Noguchi, S., Suzuki, H., Nyunoya, H., Miwa, M., Sugimura, T. (1987). Nucleotide sequence of a full-length cDNA for human fibroblast poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 617-622.

- Uchida, K., Hanai, S., Ishikawa, K., Ozawa, Y., Uchida, M., Sugimura, T., Miwa, M. (1993). Cloning of cDNA encoding *Drosophila* poly(ADP-ribose) polymerase: leucine zipper in the auto-modification domain. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* 90, 3481-3485.
- Usdin, K., and Grabczyk, E. (2000). DNA repeat expansions and human disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 914-931.
- van den Bosch, M., Lohmann, P.H., and Pastink, A. (2002). DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biol. Chem.* 383, 873-892.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9, 138-141.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2002). *The genetic basis of human cancer*. McGraw-Hill, 2. Auflage.
- Vojtesek, B., Bartek, J., Midgley, C.A., and Lane, D.P. (1992). An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J. Immunol. Methods* 151, 237-244.
- Von der Weth, A., and Deppert, W. (1993). Wild-type p53 is not a negative regulator of simian virus 40 DNA replication in infected monkey cells. *J. Virol.* 67, 886-893.
- Wagener, C. (1999). *Molekulare Onkologie*. Georg Thieme Verlag, 2. Auflage.
- 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. *Nature* 369, 574-8.
- Waldman, A.S., and Waldman, B.C. (1991). Stimulation of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells by an inhibitor of poly(ADP-ribosylation). *Nucleic Acids Res.* 19, 5943-5947.
- Wang, Z.Q., Stingl, C., Morrison, C., Jantsch, M., Los, M., Schulze-Osthoff, K., and Wagner, E.F. (1997). PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev.* 11, 2347-2358.
- Wang, X.W., A. Tseng, N.A. Ellis, E.A. Spillare, S.P. Linke, A.I. Robles, H. Seker, Q. Yang, P. Hu, S. Beresten, N.A. Bemmels, S. Garfield, and C.C. Harris. (2001). Functional interaction of p53 and BLM DNA helicase in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 32948-32955.
- Wiesmüller, L., Cammenga, J., and Deppert W. (1996). In vivo assay of p53 function in homologous recombination between Simian Virus 40 chromosomes. *J. Virol.* 70, 737-744.
- Wiesmüller, L. (2001). Genetic stabilization by p53 involves growth regulatory and repair pathways. *J. Biomed. Biotechnol.* 1, 7-10.
- Wiley, S.R., Krauss, R.J., Zuo, F., Murray, E.E., Loritz, K., and Mertz, J.E. (1993). SV40 early-to-late switch involves titration of cellular transcriptional repressors. *Genes Dev.* 7, 2206-2219.
- Will, K., Warnecke, G., Albrechtsen, N., and Deppert, W. (1998a). High affinity MAR-DNA binding is a common property of murine and human mutant p53. *J. Cell. Biochem.* 69, 260-270.
- Will, K., Warnecke, G., Wiesmüller, L., and Deppert, W. (1998b). Specific interaction of mutant p53 with regions of MARs with a high potential for base-unpairing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13681-13686.
- 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.
- Wu, Y., Bayle, J.H., Olson, D., and Levine, A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7, 1126-1132.

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.

Yu, B.D., Hess, J.L., Horning, S.E., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 378, 505-508.

Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.F., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259-263.

Zhang, H., Somasundram, K., Peng, Y., Tian, H., Zhang, H., Bi, D., Weber, B.L., and El-Deiry, W.S. (1998). BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene* 16, 1713-1721.

Ziegler, C. (1998). Der Tumorsuppressor p53 als auxiliäres Onkogen in der Simian Virus 40-induzierten Zelltransformation. Dissertation, Universität Hamburg, 1998

Ziemin-van der Poel, S., McCabe, N. R., Gill, H. J., Espinosa, R., III, Patel, Y., Harden, A., Rubinelli, P., Smith, S. D., Le Beau, M. M., Rowley, J. D., Diaz, M. O. (1991). Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88, 10735-10739.

Zink, D., C. Mayr, C. Janz, and L. Wiesmüller. (2002). Association of p53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S-phase. *Oncogene* 21, 4788-4800.

Zhou, B.B., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408, 433-433.

Zuo, F., Krauss, R.J., Gulick, T., Moore, D.D., and Mertz, J.E. (1997). Direct modulation of simian virus 40 late gene expression by thyroid hormone and its receptor. *J. Virol.* 71, 427-436.

7 Anhang

7.1 Absolute Rekombinationsfrequenzen der in dieser Arbeit eingesetzten Viren in den Wtp53her- und p53(138V)her-Klonen

Zellen	SV40-Wt	Cla-Linker	Tal1-BCR	LMO2-BCR	RAR-a-BCR	MLL-BCR
LLC-MK ₂ (neo)/LMV2	9,7	10,4	17,5	21,2	18,8	33,6
LLC-MK ₂ [p53(138V)her]-4	2,6	3,9	12,1	8,8	74,1	8,4
LLC-MK ₂ [p53(138V)her]-7	3,1	3,8	10,5	16,1	36,1	12,9
LLC-MK ₂ (p53her)-5	4,3	4,9	17,3	8,4	34,6	24,1
LLC-MK ₂ (p53her)-21	1,8	3,0	4,5	9,1	92,7	9,5
LMV2-p53her-Kl8	2,2	2,9	11,8	10,2	79,2	15,3
LLC-MK ₂ (p53her)-17	1,9	3,3	4,2	10,9	88,0	5,4

Standardfehler						
LLC-MK ₂ (neo)/LMV2	1,3	3,1	2,3	3,2	5,0	5,3
LLC-MK ₂ [p53(138V)her]-4	0,8	0,5	2,7	0,0	0,3	0,3
LLC-MK ₂ [p53(138V)her]-7	0,8	1,8	4,0	n=1	9,0	1,8
LLC-MK ₂ (p53her)-5	0,9	2,7	0,2	1,7	3,8	5,9
LLC-MK ₂ (p53her)-21	0,2	0,8	1,6	0,0	17,9	6,6
LMV2-p53her-Kl8	0,4	1,0	0,1	0,1	18,8	2,6
LLC-MK ₂ (p53her)-17	0,3	1,4	1,0	4,1	60,0	0,7

Zellen	IgHE-MAR	PARP-MAR	CTG98	RGC	RGCmut	SceRS
LLC-MK ₂ (neo)/LMV2	50,9	209,9	29,0	45,1	45,0	12,5
LLC-MK ₂ [p53(138V)her]-4	28,5	73,7	7,6	85,3	15,8	n.b.
LLC-MK ₂ [p53(138V)her]-7	26,8	110,0	8,7	52,5	15,2	n.b.
LLC-MK ₂ (p53her)-5	44,0	187,2	13,4	83,8	33,0	n.b.
LLC-MK ₂ (p53her)-21	12,6	47,2	14,0	159,9	13,7	n.b.
LMV2-p53her-Kl8	34,4	62,8	6,6	113,4	16,2	n.b.
LLC-MK ₂ (p53her)-17	26,2	119,0	10,0	176,6	23,4	n.b.

Standardfehler						
LLC-MK ₂ (neo)/LMV2	6,0	49,6	3,4	11,7	11,8	2,5
LLC-MK ₂ [p53(138V)her]-4	0,4	6,1	2,5	8,8	6,1	n.b.
LLC-MK ₂ [p53(138V)her]-7	4,9	89,4	1,9	9,5	1,3	n.b.
LLC-MK ₂ (p53her)-5	10,0	34,8	2,9	8,7	4,1	n.b.
LLC-MK ₂ (p53her)-21	1,9	6,3	2,8	11,8	3,7	n.b.
LMV2-p53her-Kl8	2,5	21,0	1,3	11,8	1,7	n.b.
LLC-MK ₂ (p53her)-17	5,5	17,6	1,4	83,8	7,2	n.b.

Tabelle 7.1: Absolute Rekombinationsfrequenzen der in dieser Arbeit eingesetzten Viren in den Wtp53her-, p53(138V)her- und den LLC-MK₂(neo)/LMV2-Klonen. Angegeben sind die Viren-Sätze mit der jeweiligen Fremdsequenz und ohne Fremdsequenz (Cla-Linker) und der SV40-Wt-Viren-Satz. Die Rekombinationsfrequenzen wurden in zwei bis 20 unabhängigen Einzelmessungen mit je Doppel- (Wt-Viren) bzw. Vierfachansätzen (Mut-Viren) bestimmt (Ausnahmen: n=1, s. LMO2-BCR in LLC-MK₂[p53(138V)her]-7) und sind jeweils mit dem Standardfehler angegeben. Der Wert für das SceRS-Fragment wurde in Kooperation mit Fr. Dipl.-Lebensmittel-Chem. A. Restle ermittelt. n.b. steht für nicht bestimmt.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Σ	Summe von
°C	Grad Celsius
μ	mikro
μF	mikro-Farad
A	Adenin
abs	Absorption
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische (lymphoblastische) Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
ANLL	akute nichtlymphatische Leukämie
APL	akute promyelozytäre Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	<i>alternative reading frame</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia Teleangiectasia mutated</i>
B-ALL	B-Zell-ALL
bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C'	Carboxy-Terminus
ca.	circa
cfu	<i>colony forming unit</i>
Cdk	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
CK1	<i>casein 1-like kinase</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalie Virus
cpm	<i>counts per minute</i>
CREB	<i>cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein</i>
d.h.	das heißt
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	dsDNA-aktivierte Protein-Kinase
dNTPs	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Phosphate
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Dinatriumsalz)
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FACS	<i>fluorescent activated cell sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTU	<i>Geneticin transfer unit</i>
h	Stunde/Stunden

HLH	Helix-Loop-Helix
hpi	hours post infection
HR	homologe Rekombination
IgHE	immune globuline heavy chain enhancer region
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
kHR	konservative homologe Rekombination
l	Liter
LB	Luria-Broth
LIM	LIN-11, ISL 1, MEC-3
LMO2	LIM-domain Only
LTR	Long Terminal Repeat
m	milli
M	molar
mA	Milli-Ampere
MAR	matrix attachment region
MDM2	mouse double minute 2
MEM	minimal essentielles Medium
min	Minuten
MLL	mixed-lineage leukemia
MMR	mismatch repair
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSH2	MutS-Homolog 2
MSV	Moloney mouse sarkoma virus
mut	mutated, mutiert
n	nano
N'	Amino-Terminus
NBS	Nijmegen breakage syndrom
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NES	Kern-Exportsignal
NHEJ	nicht-homologes End-Joining
nkHR	nicht-konservative homologe Rekombination
NLS	Kern-Lokalisationssignal
nm	nano-Meter
nM	nano-molar
OD	Optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
ori	origin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
pBS	pBlueScriptII KS ^(+/-)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	plaque forming unit
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidiumjodid
PML	promyelozytäre Leukämie
p	piko
Puro	Puromycin-Resistenz-Gen
RAR α	Retinsäurerezeptor α
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	replication protein A
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.	siehe
s.a.	siehe auch
ss	einzelsträngig
s.u.	siehe unten
SAP	shrimp alkaline phosphatase

SCE	<i>sister chromatid exchange</i>
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SSA	<i>single strand annealing</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
st	<i>small T</i> (Kleines T-Antigen)
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T-Ag	großes T-Antigen
t-Ag	kleines T-Antigen
Tal-1	<i>T-cell acute leukemia 1</i>
T-ALL	T-Zell-ALL
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TC	<i>tissue culture</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N, N, N', N-Tetraethylmethyldiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIIH
Thr	Threonin
T _m	Schmelztemperatur
TOPOI	Topoisomerase I
TOPOII	Topoisomerase II
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
ts	Temperatursensitiv
U	<i>unit</i>
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
vgl.	vergleiche
VP	Virion-Protein
W	Watt
WRN	Werner's Syndrom
wt	Wild-Typ
Xrcc4	<i>X-ray cross complementing 4</i>
z.B.	zum Beispiel

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung der p53-Domänen.....	6
Abbildung 1.2:	Die SV40-Genomstruktur.....	17
Abbildung 3.1:	Auf SV40-Infektion und Virusfreisetzung basierendes Testsystem zur quantitativen Messung von homologen Rekombinationsereignissen.....	54
Abbildung 3.2:	Testsystem für die Rekombination in Nachbarschaft von DNA-Fremdsequenzen in SV40-Chromosomen.....	55
Abbildung 3.3:	Klonierung der Vektoren pUC-SV40-sf , pUC-SV40-tsVP1(H196Y)-sf , pUC-SV40-tsVP1(P286S)-sf und pUC-SV40-tsVP1(K290T)-sf	56
Abbildung 3.4:	Klonierung des Plasmids pUC-SV40-tsVP1(H196Y)-sf-Cla (kurz pUC-Cla-Mut2).....	57
Abbildung 3.5:	Klonierung des Plasmids pUC-Kpn-SV40-sf-Cla-Wt (pUC-Cla-Wt).....	59
Abbildung 3.6:	Klonierung des Plasmids pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-sf-Cla (pUC-Cla-Mut1).....	60
Abbildung 3.7:	Klonierung der Plasmide pBS-Kpn-SV40-sf-Bgl (kurz pBS-Bgl-Wt), pUC-Kpn-SV40-tsVP1(H196Y)-sf-Bgl (kurz pUC-Bgl-Mut2) und pUC-Kpn-SV40-tsVP1(K290T)-sf-Bgl (kurz pUC-Bgl-Mut1) und pUC-Kpn-SV40-sf-Bgl (kurz pUC-Bgl-Wt).....	61
Abbildung 3.8:	Klonierungsstrategien für die zu untersuchenden DNA- <i>cis</i> -Elemente.....	63
Abbildung 3.9:	Genomische Organisation des <i>MLL</i> -Gens und durch PCR amplifiziertes Fragment <i>MLL</i> -BCR.....	65
Abbildung 3.10:	Genomische Organisation des <i>RARα</i> -Gens und durch PCR amplifiziertes Fragment <i>RARα</i> -BCR.....	66
Abbildung 3.11:	Genomische Organisation des <i>TAL1</i> -Gens und durch PCR amplifiziertes Fragment <i>TAL1</i> -BCR.....	68
Abbildung 3.12:	Schematische Organisation des <i>LMO2</i> -Gens und durch PCR amplifiziertes Fragment <i>LMO2</i> -BCR.....	69
Abbildung 3.13:	Analyse der Stabilität der viralen Cla-Wt- <i>MLL</i> -BCR-DNA.....	76
Abbildung 3.14:	Analyse der Stabilität der viralen Cla-Wt- <i>RARα</i> -BCR-DNA.....	77
Abbildung 3.15:	Analyse der Stabilität der viralen Cla-Wt- <i>TAL1</i> -BCR-DNA.....	78
Abbildung 3.16:	Analyse der Stabilität der viralen Cla-Wt- <i>LMO2</i> -BCR-DNA.....	79
Abbildung 3.17:	Klonierung des Expressionsplasmids pSV53(15A)her	83
Abbildung 3.18:	<i>Western-Blot</i> -Analyse der LLC-MK ₂ -Klone mit stabil integriertem pM5Neo - und pSV53her -bzw. pSV53(138V)her -Plasmid.....	84
Abbildung 3.19:	Generationszeiten der p53her-Varianten exprimierenden Zelllinien (Mittelwerte von Duplikaten).....	86
Abbildung 3.20:	<i>Western-Blot</i> -Analyse zur p21 ^{Waf1/Cip1} -Expression in LLC-MK ₂ (p53her) und -[p53(138V)her]-Klonen.....	88
Abbildung 3.21:	Einfluss von DNA- <i>cis</i> -Elementen auf die relativen Rekombinationsfrequenzen in LLC-MK ₂ -Zellen mit Wtp53her oder p53(138V)her.....	94

Abbildung 3.22: Rekombinationsfrequenzen in Wtp53her- und PARP-1-exprimierenden Zellen.....	96
Abbildung 3.23: <i>De novo</i> DNA-Synthese der rekombinanten SV40-Viren unter Rekombinations-Assay-Bedingungen.....	99
Abbildung 3.24: <i>De novo</i> DNA-Synthese der rekombinanten SV40-Viren unter Rekombinations-Assay-Bedingungen nach Expression von Wtp53her- und PARP-1	101
Abbildung 3.25: Analyse der Aufreinigung von Wtp53, p53(248P) und p53(273P).....	104
Abbildung 3.26: Gelretardationsanalyse mit dem RGC-Fragment.....	106
Abbildung 3.27: Gelretardationsanalyse mit dem CTG98-Fragment	107
Abbildung 3.28: Gelretardationsanalyse mit dem <i>RAR a</i> -Fragment	109
Abbildung 3.29: Rekombinationsfrequenzen von SV40-Wt- und Cla- <i>Linker</i> -BCR-Viren unter Applikation von Etoposid.....	112
Abbildung 3.30: Rekombinationsfrequenzen von SV40-Wt- und Cla- <i>Linker</i> -BCR-Viren unter Applikation von Camptothecin.....	114

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Aufstellung der an der homologen Rekombination beteiligten Proteine in <i>E.coli</i> , Hefen und Säugern.....	3
Tabelle 3.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten DNA - <i>cis</i> -Elemente mit Insertion ins SV40-Genom via Cla- <i>Linker</i>	74
Tabelle 3.2: Klonierungsstatistik zur Etablierung von LLC-MK ₂ -Zelllinien, die stabil ins Genom integrierte p53her-Expressionsplasmid-Varianten tragen.....	84
Tabelle 3.3: Absolute Rekombinationsfrequenzen in LLC-MK ₂ (neo)- und LMV2-Zellen	92
Tabelle 3.4: Liste der in den radioaktiven PCR-Reaktionen verwendeten Matrizen und Oligonukleotide.....	105
Tabelle 7.1: Absolute Rekombinationsfrequenzen der in dieser Arbeit eingesetzten Viren in den Wtp53her- und p53(138V)her- und den LLC-MK ₂ (neo)/LMV2-Klonen.....	147

7.5 Nukleotidsequenzen der verwendeten DNA-*cis*-Elemente

7.5.1 PCR-Fragmente und ihre Orientierung im SV40-Genom

Schwarze Buchstaben kennzeichnen die jeweiligen Sequenzen, Oligonukleotide sind unterstrichen dargestellt. Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *Cla*I sind grün, die für *Bgl*II gelb, die für *Bam*HI violett und die für *Sce*I türkis dargestellt. In Grau sind „Abstandshalter“-Sequenzen dargestellt. DNA-Topoisomerase I-Erkennungssequenzen sind durch blaue Kästen hervorgehoben. Bruchpunkte sind durch vertikale rote Striche, retrovirale Insertionsorte durch einen grünen vertikalen Strich, heptamerähnliche Sequenzen durch einen violetten Kasten gekennzeichnet. Intronsequenzen sind als Kleinbuchstaben, Exon- bzw. Plasmid-Sequenzen sind durch Großbuchstaben dargestellt. Rote Buchstaben zeigen Austausche zu der publizierten Sequenz an. Ein rotes Sternchen zeigt eine Deletion einer Base (t) an. Dargestellt ist die Nukleotidfolge, wie sie nach DNA-Sequenzierung vorlag (ausgenommen: nach Klonierung weggefallene Nukleotide und Restriktionsschnittstellen in Klammern). Angrenzende *Cla*-Linker-Sequenzen sind in über bzw. unter der jeweiligen Fragmentsequenz in schwarz und fett angegeben (CCCGGG bzw. GGGCCC bezeichnet die *Sma*I-Schnittstelle der MCS des Linkers, AGATC bzw. CTAGA die deletierte *Bam*HI-Erkennungssequenz).

PCR-Fragment *MLL*-BCR (436 bp): *MLL*-Sequenz 399 bp (5'® 3')

```

...CCCGGG-T-
(aggaggagat ct)atcgatag ttacaactgt ttcgtatatt acagaaaacg tttaaacct
ccctatttcc cccacccac tcctttatat tcccatagct ctttgtttat accactctta
ggtcacttag catgttctgt taaatcttgt attatattta ttttgttact ttctatttcc
actggtatta ccactttagt actctgaatc tcccgcaatg tccaataactg tactttttta g→a
catagtcatt gcttaatgaa tatgtattga attaaatata tgccagtgga ctactaaaac
ccaaagtata taagaagggg atggttgatt atgtttttct acatattatt tgacataact
ctatcttccc atgttcttac tatagTTTGT GTATTGCCAA GTCTGTTGTG AGCCCTTCat
cgat(agatct agcagc)
  AGATC...

```

PCR-Fragment *RARα*-BCR (317 bp): *RARα*-Sequenz 281 bp (5'® 3')

```

...CCCGGG-T-
(aggaggagat ct)atcgatag tggccggcctt tgaatatacct gttgacccca gtttctctf
ccccagcctt atgtcctcct cctcctcctcc tcttcaagcg ttaad|cctt octaactcgg
ggggagaacg gggccaggcc gccacggggc aagagcttta gaatcagggt gacccccacc g→a
cctactccc aagcacagtc acggcacaca tacaatg|cg atg|gtttatc attgtatctt
tgtggtttg aaggtggggg tcctaggagt ccagaggag|t gatg|gggtgc tggaggctta
tcgat(agatc tagcagc)
  AGATC...

```

PCR-Fragment *TALI*-BCR (298 bp): *TALI*-Sequenz 261 bp (5'® 3')

```

... CCCGGG-T-
(aggaggagat ct)atcgat ac aagccccctt cccaactcca tttctgtagg aaagtacagc
ccctggaatt gggttctggt ttcgctttgg gctggagggt ggtggatggg ggtcagagag
agaatgaggt gggggggact tcaaggttct gtcccaccga ccagagtctg aagactattc
gcctttcca acacggacct cgccccacca gCCCCGGGAC TATCCCTTCG CGGTGTAGCG *t
GCAGCCGGAG ACCTGGCTGA GGAGGCAACC GCGTAGACAC atcgat(agat ct)agcagc)
\ -AGATC...

```

PCR-Fragment *LMO2*-BCR (465 bp): *LMO2*-Sequenz 429 bp (5'® 3')

```

... CTAGA-
(aggaggagat ct)atcgat TA AGTGGGCTTT GCTATT CACA AGGGCCTCTG GGTGTCTCTGG
CAGAGAGGGG AGATGGCACA GGCACCAGGT GCTAGGGTGC CAGGGCCTCC CGAGAAGGAA
CAGGTGCAAA GCAGGCAATT AGCCCAGAAG GTATCCGTGG GGCAGGCAGC CTAGATCTGA
TGGGGGAAGC CACCAGGATT ACATCATCTG CTGgtgagta ggcttcatta attctctgat
gaatggacga ttgcaagga acttttttca tcttcaagga gccagaagaa gtggtgatta
aattggtctt ttaaaataaa aagactccaa aggggtacaa gtcttcaagc ttcccctgtg
gtgttccggg cactctggct tctctttcgg agggaggaag agcatctatt cataggctgt
gacttggaga ggcc|ccacgg tg|agtcaatc gat(agatcta gcagc)
\ -T-GGGCCC...

```

PCR-Fragment *ScRS* (332 bp): pUC-PuroD-Sequenz 296 bp (5'® 3')

```

... CCCGGG-T-
(aggaggagat ct)atcgat GA CGTAAACGGC CACAAGTTCA GCGTGTCCGG CGAGGGCGAG
GGCGATGCCA CCTACGGCAA GCTGACCCTG AAGTTCATCT GCACCACCGG CAAGCTGCCC
GGAATTC TAG GGATAACAGG GTAATGCTTC AGCCGCTACC CCGACCACAT GAAGCAGCAC
GACTTCTTCA AGTCCGCCAT GCCCGAAGGC TACGTCCAGG AGCGCACCAT CTTCTTCAAG
GACGACGGCA ACTACAAGAC CCGCGCCGAG GTGAAGTTTC AGGGCGACAC CCTGGTGAAC
CGCATCGAGC TGAAatcgat (agatct)agca gc)
\ -AGATC...

```

7.5.2 Restriktionsfragmente und ihre Orientierung im SV40-Genom

Schwarze Buchstaben kennzeichnen die für das jeweilige *cis*-Element spezifischen Sequenzen. Reste der Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme nach Verdau und nach/ohne Behandlung mit dem Klenow-Fragment bzw. der *T4*-Polymerase sind in türkis dargestellt. Rote Buchstaben zeigen einen Basenaustausch bzw. eine Deletion oder einen Gewinn einer Base im Vergleich zu den Sequenzen der Plasmidkarten, soweit vorhanden, an (s. jeweilige Referenzen bzw. persönliche Mitteilung von W. Strätling, B. Vogelstein. Für *PARP*-MAR lag keine Plasmidkarte vor, hier wurde nur die in dieser Arbeit ermittelte Sequenz aufgeführt; für RGC bzw. RGCmut lagen lediglich die p53-Erkennungssequenz bzw. das mutierte Gegenstück als Sequenz vor, Reste der Vektoren nach Sequenzierung in dieser Arbeit). Eine DNA-Topoisomerase I-Erkennungssequenz ist durch

einen blauen Kasten hervorgehoben, ein DNA-*unwinding*-Motiv ist grün unterstrichen. Dargestellt ist die Nukleotidfolge, wie sie nach DNA-Sequenzierung vorlag. Angrenzende *Cla*-*Linker*-Sequenzen sind über bzw. unter der jeweiligen Fragmentsequenz in schwarz und fett angegeben (CCC bezeichnet die *Sma*I-Schnittstelle der MCS des Linkers nach Restriktionsverdau, GGG die andere Hälfte der *Sma*I-Schnittstelle nach Restriktionsverdau, T einen „Abstandshalter“, ATCGAT bzw. TAGCTA die Erkennungssequenz von *Cla*I).

Fragment RGC: 288 bp (5'® 3')

...CCC→

```

GACGGTATCG ATAAGCTTGA AGCCAGGCAA GTCCAGGCAG GCCAGGCAAG TCCAGGCAGG
CCAGGCAAGT CCAGGCAGGC CAGGCAAGTC CAGGCAGGCC AGGCAAGTCC AGGCAGGCCA
GGCAAGTCCA GGCAGGCCAG GCAAGTCCAG GCAGGCCAGG CAAGTCCAGG CAGGCCAGGC
AAGTCCAGGC AGGCCAGGCA AGTCCAGGCA GGCCAGGCAA GTCCAGGCAG GCCAGGCAAG
TCCAGGCAGG CCAGGCAAGT CCAGGCAGGA TNCAATTCCT TGCAGCCC

```

GGG-T-ATCGAT

Fragment RGCmut : 325 bp (5'® 3')

...CCC→

```

GACGGTATCG ATAAGCTTGA TCCTTAATGG ACTTTAATGGC CTTATGGAC TTTAATGGCC -A
TTAATGGACT TTAATGGCCT TAATGGACTT TAATGGCCTTA ATGGACTTT AATGGCCTTA
ATGGACTTTA ATGGCCTTAA TGGACTTTAA TGGCCTTAATG GACTTTAAT GGCCTTAATG
GACTTTAATG GCCTTAATGG ACTTTAATGG CCTTAATGGAC TTTAATGGC CTTAATGGAC
TTTAATGGCC TTAATGGACT TTAATGGCCT TAATGGACTTT AATGGCCTT AATGGACTTT
AATGGCCATC GAATTCCTGC AGCCC

```

GGG-T-ATCGAT

Fragment CTG98: 410 bp (5'® 3')

...TAGCTA-T-GGG-

```

AATTCGAGCT CCGTACCCGG GGATCCTCTA GAGTCGTCCT TGTAGCCGGG AATGCTGCTG
CTGCTGCTGC TGCTGCTGCT GCTGCTGCTG CTGCTGCTGC TGCTGCTGCT GCTGCTGCTG
CTGCTGCTGC TGCTGCTGCT GCTGCTGCTG CTGCTGCTGC TGCTGCTGGG GGATCACAGA
CCATTTCTTT CTTTCGGCCA GGCTGAGGCC GACCTGCAGG CATGCAAGCT

```

CCC...

Fragment *IgHE*-MAR: 376 bp (5'® 3')

...CCC>

```

GGTGTCTGG TTCTGATCGG CCATCTTGAC TCCAAC TCAA CATTGCTCAA TTCATTTAAA +c
AATATTTTAA ACTTAATTTA TTATTGTTAA AAGTCAGTTC TGAATAGGGT ATGAGAGAGC g→a
CTCACTCCCA TTCCTCGGT AAAC TTTAAG TAATGTCAGT TCTACACAAA CAAGACCTCA
AATTGATTGA CAAAAATTTT GGACATTTAA AAAAAATGAGT ACTTGAAAAC CCTCTCACAT
TTTAAAGTCA CAGTATTTAA CTATTTTCC TAGGAACCAA CTTAAGAGTA AAAGCAACAT
CTTCTAATAT TCCATACACA TACTTCTGTG TTCCTTTGAA AGCTGGACTT TTGCAGGCTT
CCACCAGACC TCTCTA
  \GGG-T-ATCGAT...

```

Fragment *PARP*-MAR: 398 bp (5'® 3')

...CCC>

```

AGCTTGGTTT TTTCCATAGG ACTAGTCTAT GCAACAGAAT CTCTCTCCAG CCTTTTCTCT
ATGTCAGTTT TATCTACCTG GCAAGAAAAA AAAAAACAA CCCCCAAACA ACCCCTCCCC
ACAGACACAA CAAAAACAA GGGACTTGAG AAGTTAGAGA AAACCTTTAA CACGTTTCTG
TAAAATCCTT TCTGAGGTGG TTTAGTACAG GTACTACCCA TCAGCAACTT ATCGGCCAGG
TGAGTTGGTG CAGAAGCGCT TCGGGTGAAT TCGGGTTTTA ACTAAAAATA AATGCTTAAC
ATCTTTCCAA AATCAAACT AAAGACGAAC ACTTAAAAAA GGGGAAGGGG ATTTTCTTTC
CCTGGGGAAA CCAGTAAGGC AGACATTCTA ACGAAGCT
  \GGG-T-ATCGAT

```

7.6 Eigene Veröffentlichungen

Boehden, G.S., Stocking, C., Marschalek, R., and Wiesmüller, L. (2003). Recombination at chromosomal sequences involved in pathogenic rearrangements is differentially regulated by p53. Eingereicht.

Boehden, G.S., Akyüz, N., Roemer, K., and Wiesmüller, L. (2003). p53 mutated in the transactivation domain retains regulatory functions in homology-directed double-strand break repair. *Oncogene*, im Druck.

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

Boehden, G.S., and Wiesmüller, L. (2001). Role of DNA-*cis*-elements in homologous recombination processes (Abstract). 04.-06. April 2001. AEK Symposium, Heidelberg, Deutschland.

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

7.7 Danksagung

Frau Prof. Dr. Lisa Wiesmüller danke ich sehr herzlich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung und ihre Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. H.-P. Mühlbach bedanke ich mich für die Bereitschaft zur Übernahme des Dissertationsgutachtens.

Herrn Prof. Dr. W. Deppert und Herrn Prof. Dr. Frank O. Fackelmayer danke ich für die Überlassung der Arbeitsplätze in ihren Abteilungen.

Frau Dr. Carol Stocking und Herrn Prof. Dr. W. Deppert danke ich für die Überlassung von Arbeitsmaterial.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Nuray Akyüz für ihre Freundschaft und unübertroffene Kollegialität.

Mein besonderer Dank auch an Herrn Dr. Maurice Reimann für seine Freundschaft und die hilfreichen Gespräche, ohne die ich so manchen Mittag wohl nicht heil überstanden hätte.

Ein herzlicher Dank an Frau Christine Janz und Frau Silke Süße für ihre Freundschaft, Unterstützung und Unterbringung gerade im fernen Ulm. Vielen Dank auch Herrn Dr. Lars Behrend für das Bergauftransportieren der Grundlebensmittel.

Frau Evelyn Bendrat danke ich für die Unterstützung bei den Klonierungen, Frau Doris Weidemann und Frau Gabriele Warnecke für ihre große Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Heinrich-Pette-Instituts, besonders denen der Abteilungen Tumorstudiologie, sowie den Mitarbeitern des EOL und des Histologischen Labors an der Universitätsfrauenklinik in Ulm.

Den „Kellerkindern“ mit Anhängen danke ich für ihre Freundschaft und so manchen ...fröhlichen und der mentalen Gesunderhaltung dienenden Abend.

Ich danke allen meinen Freunden, besonders jedoch Frau Dr. Birgit Engeland und Frau Dr. Andrea Wulf, für ihr immer offenes Ohr.

Meiner Familie danke ich für ihre Hilfe und immerwährende Unterstützung.

Und schließlich bedanke ich mich bei Herrn Jens Kollas für die vor allem seelische Unterstützung und seine nie endende Geduld.

Wissenschaftlicher Werdegang

- WS 90/91-SS 97 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Hauptfach Zoologie, Nebenfächer Mikrobiologie, Biochemie
27.08.1997 Diplom
- 08/96-07/97 Anfertigung der Diplomarbeit „Untersuchungen zur Genregulation antimikrobiell wirkender Peptide der Haut“ unter der Leitung von Prof. Dr. J.-M. Schröder an der Klinik für Venerologie, Allergologie und Dermatologie des Universitätsklinikums zu Kiel
- 11/97-06/98 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie am Universitätskrankenhaus Eppendorf in Hamburg
- 07/98-06/02 Praktische Durchführung der Doktorarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. L. Wiesmüller in der Abteilung Tumorstudiologie am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg und an der Universitätsfrauenklinik in Ulm, Sektion Gynäkologische Onkologie, mit dem Thema: „Analyse der Rolle von DNA-*cis*-Elementen bei der homologen Rekombination“
27.06.2003 Abschlussprüfung zur Promotion

Þetta er ágætis byrjun
(*Sigur Rós*)