

**p53-vermittelte Mechanismen der Differenzierung
und epigenetischen Regulation in
Karzinomstammzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)
am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von
Mark-Andreas Kluth
(Master of Science)
aus Herdecke

Hamburg 2011

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2008 bis Oktober 2011 am Heinrich-Pette-Institut (Martinistraße 52, 20251 Hamburg), Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie, in der Abteilung Tumorstudiologie von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert angefertigt und von Herrn Dr. Genrich Tolstonog betreut.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder werden veröffentlicht:

Wegwitz F.*, Kluth M.A.*, Mänz C.*, Otto B., Gruner K., Heinlein C., Kuhl M., Warnecke G., Schumacher U., Deppert W. and Tolstonog G. V. (2010). "Tumorigenic WAP-T Mouse Mammary Carcinoma Cells: A Model for a Self-Reproducing Homeostatic Cancer Cell System." **PLoS One** 5(8).

Altmeyden HC, Prox J, Puig B, Kluth MA, Bernreuther C, Thurm D, Jorissen E, Petrowitz B, Bartsch U, De Strooper B, Saftig P, Glatzel M. (2011). "Lack of a-disintegrin-and-metalloproteinase ADAM10 leads to intracellular accumulation and loss of shedding of the cellular prion protein in vivo". **Mol Neurodegener.** 27;6:36.

Kluth M.A., Hildebrand J., Symer D., Schumann G.G., Deppert W. and Tolstonog G.V. p53 secures a symbiotic relationship between LINE1 retrotransposons and the genome. **(Manuskript in Arbeit)**.

Kluth M.A., Reimer R., Hohenberg H., Deppert W. and Tolstonog G.V. Hierarchy and p53-dependent differentiation of embryonal stem/progenitor cells in mouse F9 teratocarcinoma cell line **(Manuskript in Arbeit)**.

* Gleichberechtigte Erstautorschaften

Gutachter:

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Deppert, Heinrich-Pette-Institut
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Hahn, Universität Hamburg

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt, keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet habe.

.....

Datum

Unterschrift

Meinen Eltern gewidmet

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	bacterial artificial chromosome
BLA	β-Laktamase
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	„copy“ DNA
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
CMV	Zytomegalie-Virus
C-Terminus	Carboxyl-terminus
dbcAMP	<i>Dibutyl cyclic Adenosine monophosphate</i>
DBD	DNA-Bindedomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxiribonukleotidtriphosphat
DR	direkte Repeats
ds	doppelsträngig
DSB	Doppelstrangbruch
E2F	eukaryotischer Transkriptionsfaktor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERV	endogene Retroviren
EtOH	Ethanol

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	Fötale Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz Energietransfer
FSC	<i>forward scatter</i>
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
h	Stunde
HDAC	Histondeacetylasen
HRP	Peroxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
ITR	invertierte terminale Repeats
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LINE	<i>long interspersed nucleotide elements</i>
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
LTR	Long terminal repeats
Lys	Lysin
M	Molar
mA	Milliampere
Mdm2	mouse double minute chromosome 2
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nt	Nukleotid
ncRNA	non-coding RNA (nicht kodierende RNA)
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
piRNA	Piwi interagierende RNA
qPCR	quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	Ribonukleopartikel
rpm	Umdrehungen pro Minute
RA	Retinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	short-hairpin RNA (RNA-Interferenz)
SINE	short interspersed nucleotide elements
siRNA	short-interfering RNA (RNA-Interferenz)
ss	einzelsträngig
SSC	side scatter
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat/EDTA Elektrophoresepuffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyldiamin
TPRT	target primed reverse transcription
U	Unit; Aktivitätseinheit
UTR	untranslated region
UV	ultraviolett
V	Volt
VNTR	variable number tandem repeats.
Vol.	Volumen
WCE	Whole Cell Extract
w/v	Gewicht pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen

II. INHALTSVERZEICHNIS

I. Abkürzungsverzeichnis	I-III
II. Inhaltsverzeichnis	IV-VIII
1. Zusammenfassung/Abstract	IX-XIII
2. Einleitung	1-17
2.1 Das Tumorsuppressorprotein p53	1-8
2.1.1 Regulation der p53-Stabilität durch Mdm2	2-3
2.1.2 Funktion des p53-Proteins unter nicht-Stressbedingungen	3
2.1.3 Funktion des p53-Proteins im Prozess der zellulären Differenzierung	3-6
2.1.4 Funktion des p53-Proteins während der Embryonalentwicklung und in ES-Zellen	6-8
2.2 Differenzierungsmodelle der frühen Embryogenese	8
2.3 F9-Zellen als Differenzierungsmodell der frühen Embryogenese	9
2.4 Das LINE1-Element	10-17
2.4.1 Transkriptionelle Regulation von L1-Retrotransposons	11-12
2.4.2 Replikationszyklus des L1-Elements	12-13
2.4.3 Die Mobilisierung von Retrotransposons und deren Auswirkungen	14-16
2.4.4 Zelluläre Abwehr gegen die transposable Aktivität von Retroelementen	16-17
2.4.4.1 Inhibition der L1-Aktivität durch APOBEC3-Proteine	17
3. Zielsetzung	18-19
4. Material	20-36
4.1 Chemikalien und andere Materialien	20-21
4.2 Puffer und Lösungen	21-25
4.3 Nährmedien für die Bakterienkultur	25
4.4 Bakterienstämme	25
4.5 Nährmedien für die Zellkultur	25
4.6 Eukaryotische Zelllinien	25-26
4.7 Verbrauchsmaterialien	26
4.8 Geräte	26-28
4.8.1 Waagen	26

4.8.2 Zentrifugen	26-27
4.8.3 Mikroskope	27
4.8.4 Gelsysteme	27
4.8.5 Geräte für Arbeiten im eukaryotischen System	27
4.8.6 Spannungsquellen	27
4.8.7 Weitere Geräte	27-28
4.9 Kits	28
4.10 Größenstandards	29
4.10.1 Protein-Größenstandards	29
4.10.2 DNA-Größenstandards	29
4.11 Plasmide	29
4.12 Oligonukleotide	29-33
4.13 siRNA	33
4.14 Antikörper	34-35
4.14.1 Primärantikörper	34
4.14.2 Sekundärantikörper	35
4.15 Software und Datenbanken	35-36
4.16 Enzyme/dNTPs	36
5. Methoden	37-73
5.1 Allgemeine Arbeiten im prokaryotischen System	37-38
5.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen	37
5.1.2 Transformation kompetenter Bakterienzellen mit Plasmid-DNA	37
5.1.3 Präparation von Plasmid-DNA	37-38
5.1.3.1 Plasmid Minipräparation	37
5.1.3.2 Plasmid Maxipräparation	37-38
5.1.3.3 Maxipräparation zur Isolation von BAC-Vektoren	38
5.2 Allgemeine Arbeiten im eukaryotischen System	38-41
5.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	38-39
5.2.2 Differenzierung von F9-Zellen	39
5.2.3 Bestimmung der Zellzahl eukaryotischer Zellen	39
5.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	39-40
5.2.5 Transiente und stabile Transfektion eukaryotischer Zellen	40-41
5.2.5.1 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA	40
5.2.5.2 Transiente Transfektion von siRNA	41
5.3 Zellbiologische Methoden	41-47
5.3.1 Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	41-44
5.3.1.1 Probenvorbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie	41-42
5.3.1.2 FRET-basierte durchflusszytometrische Analyse der β-Lactamase Reporteraktivität	42-43

INHALTSVERZEICHNIS

5.3.1.3 Aldefluor™ Assay	43
5.3.1.4 Nachweis und Isolation Hoechst33342-negativer Stammzellen	44
5.3.1.5 Färbung von intrazellulären Proteinen für die Zellsortierung	44
5.3.2 Zellkultur basierter Retrotranspositionsassay	44-46
5.3.3 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung	46-47
5.3.4 Markierung der Zellen mit den visualisierbaren Farbstoffen Dil und CFSE	47
5.4 Biochemische Arbeiten	47-50
5.4.1 Herstellung eukaryotischer Zellysate	47
5.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	48
5.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48-49
5.4.4 Western Blot Analyse	49-50
5.4.4.1 Quantitativer Western Blot	49-50
5.4.4.2 Herkömmlicher Western Blot	50
5.5 Allgemeine Molekularbiologische Arbeiten	51-58
5.5.1 Isolierung genomischer DNA	51
5.5.2 Isolierung von RNA	51
5.5.3 Quantitative Erfassung der Nukleinsäure-Konzentration	51-52
5.5.4 Reverse Transkription	52-54
5.5.4.1 Reverse Transkriptase Reaktion von Gesamt-RNA	52-53
5.5.4.2 Reverse Transkriptase Reaktion zur Analyse von Transkriptions-Startstellen und Detektion von sense und antisense Transkripten	53-54
5.5.5 Bestimmung der RNA-Stabilität: ActinomycinD-Behandlung	54
5.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	54-56
5.5.7 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	56-58
5.5.7.1 Datenanalyse der qPCR (relative Genexpression)	57-58
5.6 Klonierungsarbeiten	58-66
5.6.1 Restriktionsverdau von DNA	58
5.6.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	58-59
5.6.3 DNA-Isolierung aus Agarosegelen	59-60
5.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten	60
5.6.5 Sequenzierung von DNA-Fragmenten	60
5.6.6 Klonierung des pGL3-GFP Vektors	60-62
5.6.7 Klonierung der L1 <i>Md</i> -A/T_5UTR-forward und -revers Vektoren zur Detektion der L1 5'-UTR sense und antisense Promotoraktivität	62-65
5.6.8 Klonierung des L1 <i>Md</i> -T_Dab2 Vektors zur Detektion der L1 5'-UTR sense und antisense Promotoraktivität des individuellen L1-Elements	65-66
5.7 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	66-72
5.7.1 Immunpräzipitation der Protein/DNA-Komplexe	68
5.7.2 Waschen, Elution und Auflösen der Vernetzung	68
5.7.3 Verdau der zellulären Proteine und RNAs	69

INHALTSVERZEICHNIS

5.7.4 Amplifikation der immunpräzipitierten DNA-Fragmente	69-70
5.7.5 Analyse von ChIP-DNA auf einem Mikroarray (ChIP-chip)	71
5.7.5.1 Design des NimbleGen 12x135k Custom Mikroarrays	71-72
5.7.5.2 Bioinformatische Analyse der NimbleGen 12x135k Custom Mikroarrays	72
5.8 Bioinformatik	72-73
5.8.1 Mappen von LINE1-Sequenzen im Mausgenom	72-73
5.8.2 Genexpression Mikroarray-Analyse	73
6. Ergebnisse	74-137
6.1 Analyse der p53-Expression im Vergleich zwischen undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen	74-82
6.2 Untersuchungen der zellulären Heterogenität von F9-Zellen	82-88
6.3 Untersuchung von Vorläuferzellen innerhalb der F9-Zellkultur	89-95
6.4 Untersuchung der Beteiligung von p53 am Prozess der zellulären Differenzierung	96-97
6.5 Bioinformatische Analyse: Zusammenhang zwischen Differenzierung und FL-L1-Elementen	97-99
6.6 Analyse des Einflusses von p53 auf die Aktivität des L1Md 5'-UTR Promotors	99-128
6.6.1 Analyse der LINE-Expression in F9-Zellen	100-105
6.6.1.1 Untersuchung der SP- und ASP-Aktivität des L1Md-T und L1Md-A 5'-UTRs und deren Regulation durch p53	105-107
6.6.1.2 Untersuchung der Promotoraktivität interner L1-Regionen und deren Regulation durch p53	107-111
6.6.2 Untersuchung der endogenen L1 ASP-Aktivität und dessen Regulation durch p53	111-112
6.6.2.1 Analyse der intronischen FL-L1-Elemente innerhalb von differenzierungsspezifischen Genen	112-115
6.6.2.2 Untersuchung der L1 ASP-Aktivität im <i>Egflam</i> -Gen	115-121
6.6.2.3 Analyse revers orientierter L1Md-T Elemente <i>upstream</i> des <i>Dab2</i> -Gens	121-128
6.7 Untersuchung des Einflusses muriner APOBEC-Proteine auf die L1-Retrotransposition	128-137
7. Diskussion	138-153
7.1 p53 ist in F9-Zellen transkriptionell aktiv	138-139
7.2 Phänotypische Heterogenität innerhalb der F9-Kultur	139-140
7.3 Das p53-Protein in Alde^{bright} Zellen reguliert deren Differenzierung	141-143
7.4 p53 und die Regulation der Transkription von FL-L1-Elementen	143-146
7.5 p53-regulierte antisense Transkription aus FL-L1-Elementen und Regulation	146-152

der Genexpression während der Differenzierung	
7.6 Das p53-Protein verhindert die L1 Retrotransposition durch die transkriptionelle Aktivierung der APOBEC-Proteinfamilie	152-153
8. Literatur	154-171
9. Anhang	172-181
9.1 Plasmidkarten	172-173
9.1.1 pGL3_Basic	173
9.1.2 pEGFP_N2	173-174
9.1.3 pGL3-GFP	174
9.2 Sicherheitstechnische Daten	173-177
9.2.1 Verzeichnis der R-Sätze (Gefahrenhinweise)	173-174
9.2.2 Kombination der R-Sätze	174-175
9.2.3 Verzeichnis der S-Sätze (Sicherheitsratschläge)	175-176
9.2.4 Kombination der S-Sätze	176
9.2.5 Gefahrenstoffe	177
9.3 Liste der im Agilent Mikroarray Genexpressionsanalyse regulierten Gene	178-179
9.3 Abbildungsverzeichnis	180-181
9.4 Tabellenverzeichnis	181
A. Lebenslauf	182
B. Danksagung	183-184

1. ZUSAMMENFASSUNG

Embryonale Karzinomzellen zeigen vergleichbare Eigenschaften zu den Zellen der inneren Zellmasse des frühen Embryos und zeichnen sich *in vitro* durch ihre definierte und gut charakterisierte Differenzierbarkeit aus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die F9-Zellkultur als gut-beschriebenes Differenzierungsmodell verwendet, um die Funktion des Tumorsuppressors p53 im komplexen Prozess der Differenzierung zu untersuchen. Dabei ließ sich durch gezielte Markierung und Trennung der Zellen anhand ihrer Aldehyd-Dehydrogenaseaktivität (AldefluorTM) eine hierarchische Organisation von Zellen mit Stammzeleigenschaften innerhalb der Gesamtkultur nachweisen. Die Analyse des Stammzellkompartiments zeigte die Anreicherung von p53 innerhalb dieser stark-proliferierenden Zellen und Depletions- sowie Überexpressionsanalysen bestätigten einen direkten Zusammenhang zwischen dem Erhalt der Stammzeleigenschaften und der Expression des p53-Proteins. Nach der Retinsäure-induzierten Differenzierung der F9-Zellen kommt es zur Abnahme der p53-Proteinexpression sowie morphologischen und expressionellen Veränderungen. Die stabile Reduktion des p53-Proteins durch p53-spezifische shRNA führte zu einer verminderten Differenzierbarkeit der Zellen, was die Funktion des Proteins im Prozess der embryonalen Differenzierung unterstreicht. In embryonalen Stammzellen und embryonalen Karzinomzellen findet sich eine starke Expression von LINE1-Elementen (*Long Interspersed Nucleotide Element*, L1), die einen Großteil des Mausgenoms ausmachen und für die eine Beteiligung an der Regulation der Genexpression vorgeschlagen wird. Mithilfe einer bioinformatischen Analyse ließ sich die Anzahl von „full length“ LINE1-Elementen (FL-L1) innerhalb des Mausgenoms bestimmen. Durch Mikroarray-basierte Genexpressionsstudien von F9-Zellen wurden die Gene identifiziert, deren Transkription im Verlauf der Differenzierung signifikant zunimmt. Einige dieser Gene sind mit den FL-L1-Elementen, welche entweder in der intergenen oder intronischen DNA liegen, assoziiert. Aufgrund der in humanen Zellen beschriebenen Aktivierung der L1-Promotoraktivität durch p53 wurde der mögliche Zusammenhang auch in F9-Zellen untersucht. Dazu wurde die Bidirektionalität des Maus-L1-Promotors und dessen Abhängigkeit von p53 getestet. Während das p53-Protein die L1 sense- und antisense Promotoraktivität der Gesamtheit aller L1-Elemente nicht signifikant beeinflusst, wird vor allem die antisense L1-

Promotoraktivität Gen-assoziiertes FL-L1-Elemente von p53 stimuliert. Diese L1-initiierte antisense-Transkription vermittelt in F9-Zellen das offene Chromatin der während der Differenzierung aktivierten Gene. Im Falle der intronischen FL-L1-Elemente, z.B. im *Egflam*-Gen, steht diese antisense-Transkription in Konkurrenz zu der basalen Transkription des entsprechenden Gens, so dass sich von einer transkriptionellen Interferenz sprechen lässt. Das L1-initiierte antisense Transkript aus intergenen FL-L1-Elementen vermittelt die p53-abhängige transkriptionelle Kompetenz der Genumgebung, wie z.B. im Falle des *Dab2*-Gens. Durch die p53-regulierte antisense Transkription aus dem Maus-L1-Promotor, die eine wichtige Komponente der epigenetischen Regulation der differenzierungsspezifischen Gentranskription darstellt, liefert diese Arbeit erstmalig Hinweise auf eine neuartige Funktion von p53 in nicht-gestressten Zellen. Die schädigenden Seiteneffekte der sense Transkription retrotranspositionskompetenter FL-L1-Sequenzen werden durch die p53-abhängige Expression der Apobec-Proteinfamilie supprimiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen den Zusammenhang zwischen L1-Retrotransposons und dem Wirtsgenom und können zum besseren Verständnis der transkriptionellen Regulation von differenzierungsspezifischen Genen in embryonalen Stammzellen beitragen.

1. ABSTRACT

Embryonic carcinoma cells exhibit properties comparable to those of inner cell mass cells of the early embryo and they are characterized by a well-described *in vitro* differentiation. During this work the F9-cell culture, a well-characterized cell differentiation model was used to study the function of the tumor suppressor p53 during retinoic acid induced differentiation. FACS-separation of cells based on their Aldehyde dehydrogenase activity (Aldefluor™) enables the identification of hierarchically organized cells within the F9 cell culture. Furthermore, characterization of the stem cell compartment revealed an enrichment of p53 protein within the fast-proliferating cells and p53 depletion or ectopic expression of p53 established a link between p53 expression and stemness of F9 cells. The treatment of cells with retinoic acid induces cell differentiation resulting in several morphological and phenotypic changes. However, stable depletion of p53 mediated by p53-specific shRNA reduced the potential of cells to differentiate. These results demonstrate the function of p53 during embryonic differentiation. The expression of LINE1-elements (*Long Interspersed Nucleotide Elements*, L1) is highly increased in stem and carcinoma cells. L1 sequences build up a major part of the mouse genome and they are presumed to participate in regulating cell differentiation. Bioinformatic analysis enables the mapping of full length LINE1-elements (FL-L1) within the mouse genome. Microarray analysis of F9-cells revealed the enrichment of FL-L1 elements localized either to intronic or intergenic regions in respect to the transcriptional start site of genes which are regulated during cell differentiation. For humans, a p53-dependent stimulation of L1 promoter activity has already been described. Therefore, the p53-dependent regulation of L1 promoter activity was determined in mouse F9 cells. The data revealed that while p53 is not involved in regulating overall L1 sense and antisense promoter activity, it regulates both activities of individual FL-L1 elements localized within differentially regulated genes. This antisense L1-initiated transcription contributes the maintenance of a transcriptionally competent chromatin state of genes up-regulated during differentiation. In the case of intronic FL-L1 elements, for example in the *Egflam* gene, the antisense transcript competes (transcriptional interference) with the transcript generated by basal gene transcription. The antisense L1-initiated transcription of intergenic FL-L1 elements

ABSTRACT

mediates the p53-dependent transcriptional competence of neighboring genes, as in the case of the *Dab2* gene. This work provide evidence for a novel function of p53 in non-stressed cells by demonstrating that p53-dependent anti-sense transcription from mouse L1 promoters is an important component of the epigenetic regulation of differentiation-specific gene transcription. The deleterious side effects of sense transcription of retrotransposition-competent FL-L1 sequences are suppressed by p53-dependent expression of the Apobec protein family. This is the first demonstration of a symbiotic relationship between LINE1 retrotransposons and the host genome, which will have profound impact on understanding transcriptional regulation of differentiation-specific genes in embryonic stem cells.

2. EINLEITUNG

Die Fähigkeit zur Differenzierung von Zellen ist eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung höherer Organismen. Eine strikte Kontrolle ist dabei die entscheidende Voraussetzung für die korrekte Entwicklung eines jeden Individuums. Genetisch bedingte Fehler in Differenzierungsprozessen können zu zahlreichen Erkrankungen führen, die neben Funktionsstörungen von Organen auch Tumorerkrankungen umfassen. Die Differenzierung beschreibt die Entstehung von unterschiedlich spezialisierten Zelltypen aus einer einzigen befruchteten Eizelle, was letztlich erst zur Bildung funktionsfähiger Gewebe und Organe führt. Aus pluripotenten Stammzellen beispielsweise entstehen durch Differenzierung Zellen mit eng umschriebenem Aufgabenbereich wie z.B. Epithelzellen, Neurone, Myozyten, Chondrozyten und eine Vielzahl weiterer Zellformen. Am komplexen Prozess der Zelldifferenzierung ist gewebespezifisch eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine involviert, deren Expression strikten Kontrollen unterliegt. Eines der Proteine, für die eine prominente Rolle an verschiedenen Prozessen der Differenzierung beschrieben wurde, ist das p53-Protein.

2.1 Das Tumorsuppressorprotein p53

Das p53-Protein ist der wichtigste Tumorsuppressor der Zelle und steht aufgrund seiner wichtigen Funktion als „Wächter des Genoms“ (Kastan, Onyekwere et al. 1991; Lane 1992) – mit fast 57.000 Publikationen – seit nunmehr drei Jahrzehnten im Mittelpunkt der weltweiten Krebsforschung. Die Entdeckung des Proteins gelang 1979 im Komplex mit dem viralen T-Antigen in SV-40 transformierten Zellen (DeLeo et al., 1979; Kress et al., 1979; Lane and Crawford, 1979; Linzer et al., 1979). Das p53-Protein lässt sich in vier verschiedene funktionelle Bereiche unterteilen, die sich durch unterschiedliche Strukturelemente und biochemische Aktivitäten voneinander abgrenzen:

1. Einen N-terminalen Bereich mit einer Transaktivierungsdomäne (Fields und Jang, 1990), die gleichzeitig auch die Mdm2-Bindestelle enthält.

2. Eine Prolin-reiche Domäne, die unter Stressbedingungen eine Rolle bei der Schadensvermeidung durch Apoptose spielt.
3. Eine spezifische DNA-Bindungsdomäne, die in vielen Tumoren mindestens eine Mutation aufweist.
4. Einen C-terminalen Bereich mit einer Oligomerisierungsdomäne, welche die Tetramerisierung von vier p53-Monomeren vermittelt. Hier finden sich auch nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) sowie zwei nukleäre Export-Sequenzen (NES).

Bei der Maus ist das *p53*-Gen (*Trp53*) auf dem Chromosom 11q21-q22 lokalisiert und kodiert für 390 Aminosäuren (Czosnek et al., 1984; Le Beau et al., 1985; Rotter et al., 1984).

Allgemein fungiert das Protein als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor (Kern et al., 1991) mit einer Vielzahl von Zielgenen (Kannan et al., 2001; Zhao et al., 2000). Für die DNA-Bindung des Proteins sind neben einer definierten p53-Bindungsstelle auch konformationelle Einflüsse der DNA-Struktur entscheidend (Anderson et al., 1997; Cho et al., 1994; el-Deiry et al., 1992; Funk et al., 1992). Für gewöhnlich ist das Protein nur kurzlebig, allerdings wird nach stressbedingter Aktivierung eine gesteigerte Lebensdauer erreicht (Lavin and Gueven, 2006; Maltzman and Czyzyk, 1984). Nach Aktivierung durch Stressbedingungen kann das p53-Protein eine Vielzahl an Reaktionen vermitteln, wobei alle Signalwege nur einem Ziel folgen: dem Schutz des Genoms vor schädlichen Veränderungen (zusammengefasst von (Lane and Levine, 2010)).

2.1.1 Regulation der p53-Stabilität durch Mdm2

Eine erhöhte Expression des p53-Proteins in normal proliferierenden Zellen hätte dramatische, toxische Effekte, da p53 die Zellzyklus-Progression, DNA-Replikation und letztendlich die Zellproliferation inhibiert. Dadurch ist eine regulierte p53-Degradation essentielle Voraussetzung für eine funktionelle Zellproliferation. Der zelluläre p53-Proteinspiegel wird über das 26S Proteasom durch Ubiquitylierung gesteuert (Bond et al., 2005). Dabei fungiert das Protein Mdm2 (*murine double minute 2*) als E3 Ubiquitin-Ligase für p53 und vermittelt dessen Degradation (Bond et al., 2005; Kussie et al., 1996). Unter normalen Bedingungen korreliert die Konzentration von p53 direkt mit der Aktivität von Mdm2. Durch die Bindung von

Mdm2 an p53 wird dieses für den proteolytischen Abbau durch das 26S Proteasom markiert. Eine geringe Mdm2-Aktivität bewirkt durch Mono-Ubiquitinylierung den nukleären Export und die cytoplasmatische Proteolyse des Proteins. Hingegen katalysiert eine hohe Mdm2-Aktivität die Poly-Ubiquitinierung von p53, was die nukleäre Proteolyse zur Folge hat (Li et al., 2003; Shmueli and Oren, 2004). Wu *et al.* konnten zeigen, dass die Konzentration des Tumorsuppressors p53 und des Onkogens Mdm2 durch eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife (*autoregulatory feedback loop*) kontrolliert wird (Wu et al., 1993). Dabei reguliert p53 durch Bindung als Transkriptionsfaktor an die entsprechenden DNA-Elemente direkt die Expression von *Mdm2* (Zauberman et al., 1995).

2.1.2 Funktion des p53-Proteins unter nicht-Stressbedingungen

Neben den wichtigen regulatorischen Funktionen von p53 unter Stressbedingungen wurde in den vergangenen 30 Jahren auch dessen Funktion unter physiologischen nicht-gestressten Bedingungen untersucht. Erst kürzlich beschrieben Gottlieb und Vousden die p53-vermittelte Regulation metabolischer Stoffwechselprozesse (Gottlieb and Vousden, 2010). Feng et al. zeigten eine Beteiligung an der Regulation des IGF- (*Insulin like Growth Factor*) und mTOR- (*mammalian Target Of Rapamycin*) Signalwegs (Feng, 2010; Feng and Levine, 2010). Darüber hinaus wurde eine Beteiligung von p53 an der Regulation des endosomalen Kompartiments (Feng and Levine, 2010), der zellulären Alterung (Donehower et al., 1992), der Regulation von miRNAs (He et al., 2007), der Polarität bei der Selbsterneuerung von Stammzellen (Cicalese et al., 2009) sowie der Synthese des LIF-Cytokins (*Leukemia Inhibitory Factor*), das bei der Implantation befruchteter Embryonen in den Uterus beteiligt ist (Hu, 2009), beschrieben. Darüber hinaus ist das p53-Protein an einer Reihe von Differenzierungsvorgängen involviert.

2.1.3 Funktion des p53-Proteins im Prozess der zellulären Differenzierung

Die Beteiligung des p53-Proteins am Prozess der Differenzierung wurde mittlerweile in zahlreichen Publikationen beschrieben und die Arbeitsgruppe um Varda Rotter betitelte das p53-Protein sogar als „guardian of differentiation“ („Wächter der Differenzierung“) (Molchadsky et al., 2008). Das Fehlen von p53 bei der neuronalen Entwicklung resultiert bei ca. jedem vierten p53-*Knockout* (KO) Embryo in einer

Exenzephalie (Armstrong et al., 1995; Sah et al., 1995), wobei das partielle Auftreten der Fehlbildung für einen kompensatorischen Effekt durch andere Mitglieder der p53-Familie spricht. Auf zellulärer Ebene ist das Protein an der Regulation der Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen, der Vermittlung der neuronalen Reifung und dem axonalen Wachstum sowie dessen Regenerierung nach neuronalen Verletzungen beteiligt (Tedeschi and Di Giovanni, 2009). Darüber hinaus scheint das Protein essentieller Faktor bei der Kontrolle der Selbsterneuerung, Differenzierung und der Überwachung des tumorigenen Potenzials neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen zu sein (Wang et al., 2010; Zheng et al., 2008).

Auch an der osteogenen Differenzierung ist p53 involviert. Osteoblasten differenzieren aus mesenchymalen Vorläufern. Diese Transition basiert auf der Aktivität eines Netzwerks aus Transkriptionsfaktoren, von denen Runx2 und Osterix eine Schlüsselfunktion bei der Regulation der Differenzierung einnehmen (Franceschi et al., 2007; Nakashima et al., 2002). Interessanterweise nimmt das p53-Protein während der Entwicklung gegenläufige Rollen ein: auf der einen Seite vermindert das Protein die Knochenformierung und Differenzierung osteogener Vorläuferzellen, vermittelt aber auf der anderen Seite die terminale Differenzierung tumorbildender osteogener Zellen (Armesilla-Diaz et al., 2009; Lengner et al., 2006; Radinsky et al., 1994; Tataria et al., 2006; Wang et al., 2006).

Desweiteren wurde eine Beteiligung von p53 an der myogenen Differenzierung beschrieben. Zwar scheint sich die Skelettmuskulatur von p53-KO Tieren normal zu entwickeln (Donehower et al., 1992; White et al., 2002), doch zeigten weitere Studien eine essentielle Funktion des Proteins unter *in vitro* Bedingungen. So resultierte das Einbringen eines dominant-negativen p53-Peptids in einer Inhibition der Differenzierung von immortalisierten und primären Myoblasten (Mazzaro et al., 1999; Soddu et al., 1996). Porrello et al. zeigten später, dass das Protein für die gesteigerte Expression des pRb-Proteins verantwortlich ist, welches zusammen mit weiteren regulatorischen Faktoren für die Induktion der Muskeldifferenzierung entscheidend ist (Cam et al., 2006; Porrello et al., 2000; Stiewe, 2007; Tamir and Bengal, 1998).

Das Einbringen von p53 in p53-defiziente prä-B-Tumorzellen induzierte die Differenzierung und reduzierte sowohl die Tumorinzidenz als auch Aggressivität *in vivo* (Shaulsky et al., 1991; Slatter et al., 2009). Mittlerweile ist bekannt, dass sogenannte „*long-term*“ HSCs (Hämatopoetische Stammzellen) hohe mRNA-Level

an p53 haben. Diese "long-term" HSCs sind in der Lage, in ein breites Spektrum reifer Blutzellen zu differenzieren und definieren sich durch eine relative Quieszenz, welche diese Zellen möglicherweise gegen die schädlichen Wirkungen der reaktiven oxygenen Spezies (ROS) und toxischen Metaboliten schützt. P53 spielt bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität dieser Zellen eine entscheidende Rolle (Forsberg et al., 2005) und das Fehlen des Proteins resultiert in einer gestörten Quieszenz (Liu et al., 2009). Damit vermittelt das Protein zum einen die korrekte Reifung hämatopoetischer Zellen und schützt sie vor der malignen Transformation, auf der anderen Seite kontrolliert p53 die Quieszenz der Stammzellpopulation.

Obwohl erste Beobachtungen eine reduzierte Expression und Aktivität von p53 nach adipogener Differenzierung von prä-Adipozyten beschrieben (Constance et al., 1996), konnten nachfolgende Studien diese Reduktion nicht bestätigen und zeigten neben konstanten Expressionsleveln sogar eine gesteigerte Aktivität in späteren Differenzierungsstadien. Weitere Untersuchungen zeigten ein gesteigertes adipogenes Differenzierungspotenzial in p53-Null mesenchymalen Stammzellpopulationen (Armesilla-Diaz et al., 2009; Hallenborg et al., 2009; Molchadsky et al., 2008). Dabei scheint die p53-vermittelte Inhibition der Adipogenese durch Repression des Schlüsselfaktors PPAR gamma (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) vermittelt zu werden.

Neuste Arbeiten zeigen, dass das p53-Protein der Reprogrammierung somatischer Zellen in iPS-Zellen (iPS: induzierte pluripotente Stammzellen) entgegen wirkt (Banito and Gil, 2010; Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Li et al., 2009; Zhao et al., 2008). Folglich resultiert die Reduktion der p53-Aktivität in einer gesteigerten Reprogrammierungseffizienz. Offenbar schafft der p53-Signalweg nicht nur eine Barriere für die Tumorgenese, sondern auch für die Reprogrammierung somatischer Zellen. Diese Barriere scheint durch den Ink4a/Arf-Lokus vermittelt, der sowohl für das p16 als auch den ARF-Tumorsuppressor kodiert und während dieses Prozesses stillgelegt wird (Banito and Gil, 2010; Li et al., 2009; Utikal et al., 2009). Diese Beobachtung verknüpft die Funktion von p53 auch mit der Regulation der Reprogrammierung, da eine der ersten Funktionen von ARF die Inaktivierung von Mdm2 und folglich die Aktivierung von p53 ist (Meek, 2009). Marion et al. führten den Prozess der p53-abhängigen Apoptose während der Reprogrammierung auf die überwachende Funktion von p53 zurück, welche die Reprogrammierung von fehlerhaften Zellen verhindert (Marion et al., 2009).

Zusammenfassend ist das p53-Protein an einer Vielzahl von unterschiedlichen Differenzierungsprozessen bis hin zur Rückhaltung reifer somatischer Zellen im Prozess der iPS-Generierung beteiligt. Dabei sind die Funktionen des Proteins abhängig vom individuellen Zelltyp und des zellulären Schicksals: so kann das Protein z.B. die Differenzierung in Stammzellpopulationen inhibieren, wohingegen es die Differenzierung von Vorläuferzellen induzieren kann.

2.1.4 Funktion des p53-Proteins während der Embryonalentwicklung und in ES-Zellen

Sowohl in Mäusen als auch in Hühnern kommt es während der Embryogenese zu einer signifikanten Abnahme der p53 mRNA-Menge (Louis et al., 1988; Rogel et al., 1985; Schmid et al., 1991). *In situ* Hybridisierungen an Mausembryonen zeigten eine starke Expression von p53-Transkripten in allen Geweben während der Gestation, wohingegen die verfügbare Menge an mRNA in den differenzierten Geweben deutlich reduziert war (Schmid et al., 1991). In den folgenden Jahren wurden verschiedenste Vektoren generiert, welche die Expression von Reportergenen unter Kontrolle von *p53-Responsive Elements* ermöglichten (Gottlieb et al., 1997; Komarova et al., 1997; MacCallum et al., 1996). Übereinstimmend mit den bis *dato* publizierten Beobachtungen zeigten die Untersuchungen ein unterschiedliches Expressionsmuster: innerhalb des frühen Embryos ließen sich starke Reporteraktivitäten in allen Geweben nachweisen, wohingegen diese im Verlauf der weiteren Entwicklung zunächst signifikant abnahmen und sich anschließend heterogen, gewebespezifisch und auf unterschiedliche Differenzierungsstadien aufteilten. Eine hohe Reporteraktivität zeigte sich vor allem innerhalb des Nervensystems während späterer Stadien der Embryonalentwicklung. Die Etablierung transgener p53-KO Mäuse (Donehower et al., 1992) lieferte zunächst allerdings keine unterstützenden Daten. Zwar entwickelten die p53-KO Tiere – übereinstimmend mit der Funktion des Proteins als Tumorsuppressor – eine Vielzahl an Tumoren mit geringem Alter (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994; Purdie et al., 1994), die Euphorie der Entwicklungsbiologen wurde aber gebremst, nachdem sich auf den ersten Blick keine Defekte während der frühen Entwicklung beobachten ließen. Erst durch spätere, detailliertere Studien konnten eine Vielzahl an Entwicklungsdefekten nach p53-KO identifiziert werden. So resultierte beispielsweise der KO bei weiblichen Tieren in einer häufig auftretenden Exenzephalie (Armstrong

et al., 1995; Sah et al., 1995). Weitere Entwicklungsdefekte umfassten Okularanomalitäten, Polydaktylie der Hinterbeine, Defekte bei der Formation der oberen Schneidezähne (Armstrong et al., 1995) und eine reduzierte Fertilität beider Geschlechter durch Defekte während der Spermatogenese (Beumer et al., 1998; Rotter et al., 1993) oder Beeinträchtigung während der Embryoimplantation (Hu et al., 2007). Die Tatsache, dass der p53-KO nicht embryonal letal ist und sich die Mäuse scheinbar normal entwickeln und lebend geboren werden, sprechen möglicherweise für kompensatorische Mechanismen bei der Maus. Der KO von p53 in *Xenopus laevis* resultiert beispielsweise in der Inhibition der mesodermalen Differenzierung mit einhergehenden schweren Gastrulationsdefekten (Cordenonsi et al., 2003). Interessanterweise werden die beiden anderen Mitglieder der p53-Familie, p63 und p73, im Gegensatz zur murinen Embryogenese während der frühen Entwicklungsstadien des Frosches nicht exprimiert. Daher wäre es denkbar, dass beide Proteine den Verlust von p53 kompensieren könnten (Danilova et al., 2008; Stiewe, 2007). Neben den Untersuchungen am *Xenopus laevis* wurde die Wichtigkeit von p53 am Prozess der embryonalen Entwicklung auch an anderen Vertebraten, wie dem Zebrafisch, gezeigt (Campbell et al., 2006; Chen et al., 2005). Die Inhibition der p53-Expression in Salamandern resultiert beispielsweise in einer Inhibition der Extremitätenregeneration (Villiard et al., 2007). Die Beteiligung von p53 an der Entwicklung wurde auch über einen reversen Weg, der Stabilisierung des Proteins in Mdm2- und Mdm4-KO Mäusen gezeigt. Sowohl der Mdm2- als auch der Mdm4-KO war embryonal letal und auf eine fehlende Degradation des p53-Proteins während der Gastrulation zurückzuführen. Die parallele Deletion von p53 hob hingegen den embryonal letalen Effekt des Mdm2- bzw. Mdm4-KO vollständig auf (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995; Parant et al., 2001). Die präzise Regulation des p53-Spiegels und die Aktivität des Proteins sind für eine normale Entwicklung entlang verschiedenster Entwicklungsstadien entscheidend.

Aufgrund des Selbsterneuerungspotenzials von Stammzellen könnte genau in diesen Zellen die gut charakterisierte Funktion des Proteins als „Wächter des Genoms“ von zentraler Bedeutung sein. Tatsächlich hat sich in den vergangenen Jahren die Meinung durchgesetzt, dass das p53-Protein eine zentrale Bedeutung in Stammzellen – embryonalen wie auch adulten Stammzellen – einnimmt. P53 wurde z.B. erst kürzlich als Regulator der Polarität bei der Teilung von Mamma-Stammzellen beschrieben (Cicalese et al., 2009), in adulten neuronalen Stammzellen

scheint es die Proliferation und Selbsterneuerung negativ zu regulieren (Nagao et al., 2008; Zheng et al., 2008) und auch in HSCs ist p53 an der Regulation der Selbsterneuerung und Quieszenz beteiligt (Liu et al., 2009; van Os et al., 2009). In murinen ES-Zellen bindet p53 an den *Nanog*-Promotor, ein Schlüsselgen, das für die ESC-Selbsterneuerung entscheidend ist. In Folge eines DNA-Schadens wird dessen Expression supprimiert (Lin et al., 2005). Die reduzierte Expression von Nanog resultiert in der ESC-Differenzierung, dem Zellzyklus-Arrest und einer nachfolgenden Reparatur der beschädigten DNA bzw. der Apoptose. Die Aktivierung von p53 durch Nutlin, einem Inhibitor der p53-Mdm2 Interaktion (Vassilev, 2004), verhindert in humanen ESCs den S-Phase Eintritt und resultiert somit im Zellzyklus-Arrest (Maimets et al., 2008). Für Keimzellen wurde sogar eine spontane Reprogrammierung in Abwesenheit von p53 beschrieben (Kanatsu-Shinohara et al., 2004).

Die Aufklärung weiterer mechanistischer Aspekte der p53-vermittelten Regulation früher Entwicklungsvorgänge erfordert neue, gut charakterisierte und etablierte Modellsysteme.

2.2 Differenzierungsmodelle der frühen Embryonalentwicklung

Noch in den 70er Jahren waren Untersuchungen an der embryonalen Entwicklung langwierig, mühsam und hoch kompliziert. Die damals zur Verfügung stehenden Vertebraten-Modellsysteme ermöglichten nur eine geringe Vergleichbarkeit mit dem wesentlich komplexeren Säugetierembryonen. Erst die Entwicklung verschiedener molekularbiologischer Techniken, wie der rekombinanten DNA-Technologie oder auch transgenen Techniken, führten zu verbesserten Modellsystemen. Trotz der großen Herausforderung gelang es Wissenschaftlern durch Chimären-basierte Studien embryonale und extraembryonale Zelllinien der Maus zur Untersuchung embryonaler Differenzierungsvorgänge zu etablieren (Gardner, 1983; Rossant and Papaioannou, 1977). Die Einführung von murinen Teratokarzinom- oder embryonalen Karzinom-Stammzellen (EC) und später embryonalen Stammzellen (zusammengefasst von (Robertson and Bradley, 1986)) führte zu unschätzbar wertvollem experimentellen Material für die Untersuchungen der frühen embryonalen Entwicklung in vitro.

2.3 F9-Zellen als Differenzierungsmodell der frühen Embryogenese

F9-Zellen wurden 1973 von Bernstine et al. aus einer Sublinie des Maus-Teratokarzinoms OTT6050 isoliert (Bernstine et al., 1973). Im undifferenzierten Zustand zeigen F9-Zellen charakteristische Merkmale der inneren Zellmasse von Blastozysten (Sleigh, 1992). Bei Behandlung mit Retinsäure (*Retinoic Acid*, RA) beginnen sie in primitives Endoderm zu differenzieren. Durch die kombinatorische Zugabe von dbcAMP (*Dibutryl Cyclic AMP*) wird parietales Endoderm gebildet (Strickland and Mahdavi, 1978; Strickland et al., 1980). Dabei kommt es bei der Transition in einen differenzierten Phänotyp neben morphologischen Veränderungen auch zu einer Veränderung der Expression einer Vielzahl von Genen (zusammengefasst von (Sleigh, 1992)). F9-Zellen zeichnen sich durch die Expression des p53-Proteins in Wildtyp-Konformation aus, die im Verlauf der Differenzierung signifikant reduziert wird (Dony et al., 1985; Oren et al., 1982; Reich et al., 1983).

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von EC- und ES-Zellen ist die starke Expression von LINE1-Retrotransposons (L1) (Martin and Branciforte, 1993). In F9-Zellen konnten sense Transkripte der jüngeren L1Md-A Familie in nukleären und zytoplasmatischen Fraktionen nachgewiesen werden (Schichman et al., 1992). Die Transkripte beinhalteten funktionelle Sequenzen der vollständigen L1-Region inklusive des 5'-Monomers des Promotors (Martin, 1991). Im Verlauf der Differenzierung von F9-Zellen kommt es – übereinstimmend mit der Expression des p53-Proteins – zur Reduktion der L1-Transkripte (Martin and Branciforte, 1993). Eine genomweite Studie über die Position von p53-Bindungsstellen zeigte, dass sich diese auch innerhalb humaner L1-Elemente finden lassen. Entgegen der Erwartungen, dass das p53-Protein die schädigende L1-Retrotransposition durch direkte Repression des L1-Promotors unterbindet, ließ sich die p53-Bindung und Aktivierung des humanen L1-Promotors zeigen (Harris et al., 2009).

Aufgrund der gut-beschriebenen Differenzierbarkeit der F9-Zellkultur, dem embryonalen Hintergrund und der Expression von Wildtyp p53 erfüllt die F9-Zellkultur alle erforderlichen Kriterien, die für eine grundlegende Untersuchung der Beteiligung von L1-Elementen am Prozess der Differenzierung im Kontext zur p53-Expression entscheidend sind. Im Folgenden soll hier kurz auf die Biologie der L1-Elemente eingegangen werden.

2.4 Das LINE1-Element

L1-Elemente (Abb. 2.1) sind die bislang einzigen aktiven, autonomen nicht-LTR Retrotransposons beim Menschen und haben evolutionär betrachtet eine 160 Millionen Jahre alte Geschichte hinter sich. Die Expansion von L1-Elementen war im Verlauf der evolutionären Entwicklung enorm und so finden sich heute ca. 500.000 Kopien innerhalb des humanen Genoms, was in etwa 21% des Genoms entspricht (Lander et al., 2001). Im Falle des Mausgenoms machen L1-Elemente ca. 20% am Gesamtgenom aus (Church et al., 2009; Cordaux and Batzer, 2009; Waterston et al., 2003). Vor mehr als 25 Millionen Jahren nahm die Expansion durch Mobilisierung stetig ab und die meisten Insertionen sind heute nur noch molekulare Fossilien – trunziert, umgeordnet oder mutiert – und daher nicht mehr in der Lage, weitere Retrotranspositionereignisse zu durchlaufen. Allerdings existiert auch eine geringe Anzahl noch aktiver FL-L1-Elemente innerhalb des Genoms verschiedener Säugetiere. Schätzungen vermuten, dass in etwa 80-100 noch zur Retrotransposition befähigter FL-L1-Elemente im diploiden humanen Genom bzw. bis zu 3.000 innerhalb des diploiden Maus-Genoms enthalten sind (Brouha et al., 2003; Goodier et al., 2001; Lee et al., 2009).

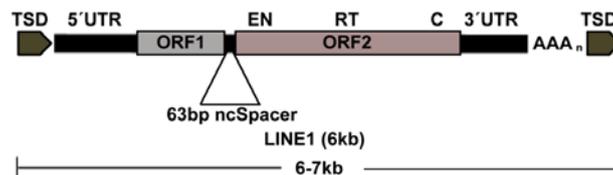


Abbildung 2.1: Darstellung eines autonomen nicht-LTR L1-Retrotransposons. RT: reverse Transkriptase Domäne; TSD: variable *target site duplications*; EN: Endonuklease Domäne; C: C-terminale Zn²⁺ Domäne; AAA_n: poly(A); Die Anzahl der ungefähren Basenpaarspanne ist unterhalb der Graphik dargestellt (Modifiziert nach (Babushok and Kazazian, 2007; Goodier and Kazazian, 2008)).

Das 6.0kb *full length* murine L1-Element besitzt eine 5'-untranslatierte Region (UTR, *5' untranslated region*), die aus tandemartigen Wiederholungen (*tandem repeats*) besteht, welche sich aus multiplen 208-212nt langen Monomeren zusammensetzt (Furano, 2000). Das humane FL-L1 besitzt hingegen eine 910 Nukleotide umfassende 5'-UTR Region. An die 5'-UTR Region, welche als interner Promotor fungiert, schließen sich zwei offene Leseraster ORF1 und ORF2 (ORF, *open reading frame*) an, die durch eine 63bp umfassende inter-ORF Linker-Region getrennt sind. Dieser folgt eine kurze 205bp umfassende 3'-UTR Region, die mit einem poly(A)-

Signal endet und folglich nach Transkription einen poly(A)-Schwanz aufweist. In der Regel sind L1s durch kurze direkte Wiederholungen (TSD, *target site duplications*) von 2-20bp flankiert (Dombroski et al., 1991; Scott et al., 1987; Szak et al., 2002). Sowohl ORF1 als auch ORF2 sind für die Retrotransposition erforderlich (Moran et al., 1996). ORF1 kodiert für ein 40kDa Protein (p40 oder ORF1p) das mit basischen Aminosäuren angereichert ist und eine Leucin-Zipper Domäne beinhaltet (Holmes et al., 1992). Analysen über die direkte RNA-Bindungsfähigkeit *in vitro* zeigten eine nicht sequenzspezifische RNA-Bindungseigenschaft für das murine ORF1p (Hohjoh and Singer, 1997; Khazina and Weichenrieder, 2009; Kolosha and Martin, 1997; Kolosha and Martin, 2003; Martin *et al.*, 2000). Sowohl das murine als auch humane ORF1p besitzen eine Nukleinsäure-Chaperon-Aktivität, die unabhängig von der RNA-Bindungsaffinität ist und für die L1-Retrotransposition benötigt wird. ORF1p beschleunigt das Zusammenlagern komplementärer Stränge und erleichtert das Schmelzen und die Strang-Ablösung in fehlgepaarten DNA-Duplexen (Kulpa and Moran, 2005; Martin, 2006; Martin and Bushman, 2001; Martin et al., 2005b).

ORF2 wird durch einen unkonventionellen Terminations-/Reinitiationsmechanismus translatiert und kodiert für ein 150kDa Protein (ORF2p) mit einer konservierten Endonuklease (EN) (Feng et al., 1996), reversen Transkriptase (RT) (Alisch et al., 2006; Mathias et al., 1991) und einer C-terminalen Cystein-reichen Domäne (Fanning and Singer, 1987). Datenbankanalysen über L1- und Alu-Integrationen sowie Studien an *de novo* Integraten identifizierten eine EN-Spaltungs-Konsensussequenz 5'-TTTT^AA 3', welche die Interaktion mit der DNA unterstützt (Berry et al., 2006; Cost et al., 2002; Feng et al., 1996; Jurka, 1997; Morrish et al., 2002). Die RT-Domäne ist durch 11 konservierte Sequenzblöcke definiert und in allen nicht-LTR Retrotransposons vorhanden. Die Existenz von nicht-LTR Elementen während des Präkambriums ist auf diese RT-Domäne zurückzuführen. Damit sind nicht-LTR Elemente älter als Eukaryonten (Malik et al., 1999).

2.4.1 Transkriptionelle Regulation von L1-Retrotransposons

Der 5'-UTR des humanen L1 enthält innerhalb der ersten 100-150bp einen internen Promotor. Weitere Sequenzen in den ersten 670bp vermitteln die transkriptionelle Aktivität des L1-Elements (Minakami et al., 1992; Singer et al., 1993; Swergold, 1990). Dieser interne Promotor initiiert die Transkription innerhalb einer kurzen Region von -9 bis +14 des L1-Elements (Lavie et al., 2004). Speek zeigte (Speek,

2001), dass der humane L1 5'-UTR zusätzlich zu der internen Promotoraktivität auch eine antisense Promotoraktivität (ASP) besitzt, welche die Kotranskription des L1 5'-UTRs und *upstream* lokalisierter genomischer Regionen ermöglicht. Datenbankanalysen zeigten, dass der ASP in vielen Geweben aktiv ist und möglicherweise am epigenetischen „*Silencing*“ (Stilllegen) zellulärer Gene (Soifer and Rossi, 2006; Yang and Kazazian, 2006), als auch des L1-Elements selber beteiligt ist (Matlik et al., 2006; Nigumann et al., 2002). Yang und Kazazian vermuteten sogar, dass die L1-Retrotransposition selber durch einen RNA-Interferenz Effekt (RNAi) der bidirektionalen Transkription des L1 5'-UTR supprimiert werden könnte (Yang and Kazazian, 2006). Für das murine L1-Element ist bislang keine ASP-Aktivität bekannt, trotz allem wurde in murinen Keimbahnzellen eine 20-24nt kleine, zu L1-Sequenzen komplementäre siRNA gefunden. Womöglich spielt die RNAi eine wichtige mechanistische Rolle beim supprimieren der L1-Elemente (Watanabe et al., 2006). Transkriptionsfaktor-Bindungsstudien des L1-Promotors identifizierten einige Proteine, die an Sequenzen innerhalb des L1- 5'-UTR binden und dessen Promotor-Aktivität beeinflussen können. Für den Transkriptionsfaktor Yin Yang-1 (YY1) wurde gezeigt, dass er die Promotor-Aktivität steigert (Athanihar et al., 2004; Becker et al., 1993; Kurose et al., 1995; Minakami et al., 1992; Singer et al., 1993). Zwei Bindungsstellen für Mitglieder der SOX-Familie wurden ebenfalls im L1 5'-UTR als funktionell identifiziert (Tchenio et al., 2000). Weiter wurden RUNX3-Bindungsstellen nachgewiesen. Für die erste Bindungsstelle wurde eine Aktivierung der L1-Transkription und Retrotransposition in Überexpressionsstudien bestätigt. Mutationen innerhalb der zweiten RUNX3-Bindungsstelle zeigten, dass RUNX3 an der Modulation der L1 ASP-Aktivität mitwirkt (Yang and Kazazian, 2006; Yang et al., 2003).

2.4.2 Replikationszyklus des L1-Elements

Nach Transkription der L1-kodierten Gene ORF1 und ORF2 wird die bicistronische L1-RNA in das Zytoplasma exportiert, wo die ORF1 und ORF2 kodierten Proteine (ORF1p/ORF2p) translatiert und in Ribonukleopartikel mit der L1-RNA eingebunden werden (Abb. 2.2). Der entstandene RNP-Komplex wird anschließend in den Kern transportiert, wo die L1-Integration in das Genom durch einen als „target-primed reverse transcription“ (TPRT) bezeichneten Prozess erfolgt (zusammengefasst von (Babushok and Kazazian, 2007)). Bei diesem Modell vermittelt die innerhalb des

ORF2-kodierte Endonuklease (EN) DNA-Brüche innerhalb der Wirtschromosomen. Anschließend wird die entstandene freie 3'-Hydroxygruppe als Primer für die L1-RT verwendet, welche die cDNA-Kopie direkt an der Wirts-DNA polymerisiert. Danach folgt die Zweitstrang-Synthese, die möglicherweise durch ein zweites ORF2p-Molekül initiiert wird (Eickbush and Jamburuthugoda, 2008).

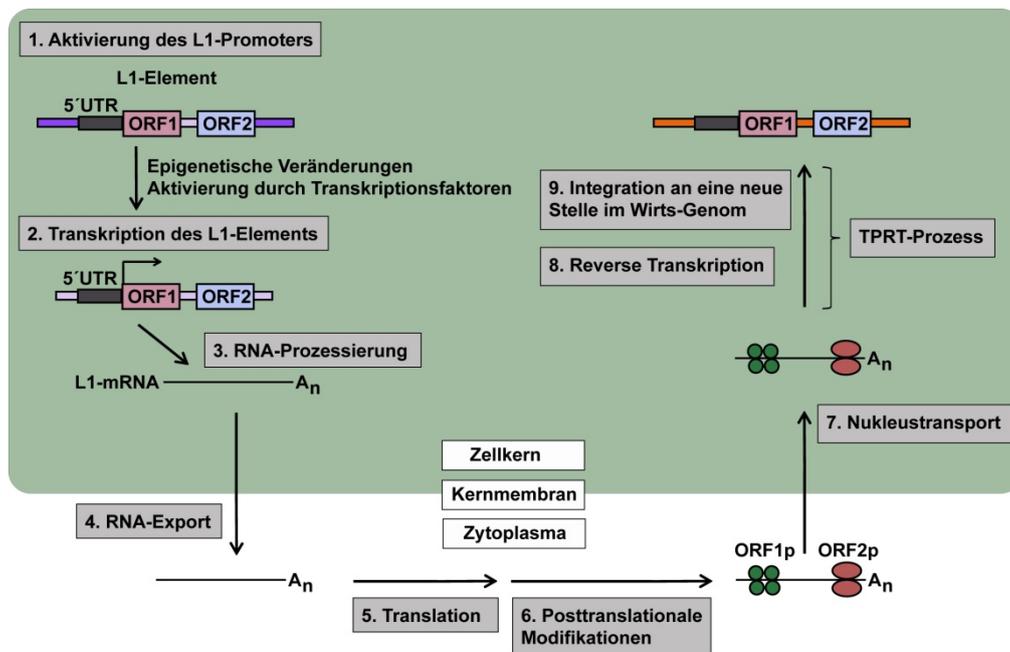


Abbildung 2.2: Replikationszyklus aktiver L1-Elemente. (1) In Folge epigenetischer Veränderungen, z.B. der Hypermethylierung von transposablen Elementen, oder Aktivierung durch die Bindung von aktivierenden Transkriptionsfaktoren (z.B. YY1) kommt es zur (2) Aktivierung bzw. Steigerung der transkriptionellen Aktivität (sense- und antisense Promotoraktivität; antisense Aktivität nicht dargestellt). (3) Anschließend erfolgen die Prozessierung des L1-Transkripts (4) und der nukleäre Export der prozessierten mRNA (5). Durch die zytoplasmatische Translation entstehen die L1-mRNA kodierten Proteine ORF1p und ORF2p (6) und die Ausbildung eines RNP-Komplexes durch die Bindung von ORF1p/ORF2p an ihre kodierende RNA (cis-Präferenz). Durch die Bindung in trans ist in diesem Schritt die Mobilisierung zellulärer mRNAs oder SINE- und SVA-RNAs möglich. (7) Nach anschließendem Transport der L1-RNA in den Zellkern vermittelt das L1-kodierte Protein ORF2p die reverse Transkription (8) der mRNA an der Wirts-DNA (9) sowie die Integration (9) an eine neue Stelle innerhalb des Wirts-Genoms. Die Schritte (8) und (9) lassen sich als TPRT-Prozess zusammenfassen (Modifiziert nach (Carnell and Goodman, 2003; Cost et al., 2002; Dewannieux and Heidmann, 2005; Ostertag and Kazazian, 2001; Zingler et al., 2005)).

Obwohl die L1-kodierenden Proteine primär mit eigener L1-RNA interagieren (cis-Präferenz) (Wei et al., 2001), können sie auch nicht-autonome Sequenzen in „trans“ mobilisieren (Dewannieux and Heidmann, 2005; Esnault et al., 2000; Ostertag et al., 2003; Sheng et al., 2000; Smit, 1999). Ausschließlich die Retrotranspositions-Ereignisse, die in Keimbahnzellen oder während der frühen Embryonalentwicklung ablaufen, können an die nachfolgende Generation weitergegeben werden und sich somit im Genom manifestieren.

2.4.3 Die Mobilisierung von Retrotransposons und deren Auswirkungen

Die Mehrheit aller L1-vermittelten Insertionen ist in intergenen Regionen lokalisiert und angereichert. Nur ein geringer Anteil lässt sich für gewöhnlich als Teil eines Introns entweder in 3'- oder 5'-Orientierung innerhalb von Genen finden. Ungefähr 79% aller humanen Gene beinhalten mindestens ein Fragment eines L1-Elements innerhalb der Transkriptionseinheit (Han et al., 2004). Die L1-vermittelten Insertionen sind dabei die Hauptursache von Insertionsmutagenesen und können die Zielgen-Expression und -Funktion auf unterschiedlichste Weise beeinflussen. Der häufigste Weg ist dabei die Insertion in funktionelle Sequenzen (Promotor, Exons, Enhancer, Silencer, etc.), wodurch diese regulatorischen Einheiten zerstört werden können. Auch die Insertion in ein Intron kann sich auf die Funktionalität der Exons auswirken, beispielsweise durch ein resultierendes alternatives Spleißen oder eine Verminderung der Transkription des entsprechenden Gens. L1-Elemente beinhalten innerhalb ihrer Sequenzen in beiden Orientierungen eine Vielzahl kryptischer Polyadenylierungssignale. Kommt es zur Integration eines L1-Elements innerhalb eines Gens, so kann dies zur Bildung trunkierter RNA-Transkripte führen. Für humane L1-Elemente konnte sowohl eine sense als auch antisense Promotoraktivität innerhalb des 5'-UTR gezeigt werden. Dadurch ist ein FL-L1-Element in der Lage, die Transkription ausgehend vom 5'-UTR in beide Orientierungen zu vermitteln, was zu einer potentiellen Expression des benachbarten Gens führen kann. Datenbankanalysen ergaben, dass viele Transkripte aus der antisense Promotoraktivität des L1-Elements hervorgehen und auf diese Weise die gewebespezifische Expression einiger Gene regulieren (Matlik et al., 2006). Tatsächlich zeigten Untersuchungen an cDNA-Enden, dass tausende von antisense Transkripten ihren Ursprung in transposablen Elementen haben, die innerhalb von Genen lokalisiert sind (Conley et al., 2008).

Die hohe Kopienzahl und das weitverbreitete Vorkommen der L1-Elemente schafft die Grundlage für homologe Rekombinationsereignisse an nicht-allelischen Stellen und resultiert folglich in der Umordnung von Chromosomen, in Translokationen, Gen-Duplikationen und möglicherweise auch dem Verlust von ganzen Genabschnitten. Die L1-vermittelte Retrotransposition konnte bislang einer Vielzahl genetischer Erkrankungen zugeordnet werden. Insgesamt sind rund 65 humane

krankheitsauslösende L1-/Alu- und SVA-Insertionen bekannt (zusammengefasst von (Belancio et al., 2008; Medstrand et al., 2005)).

Trotz der Möglichkeit, das Genom erheblich schädigen zu können, hat sich der Wirt scheinbar mit der L1-vermittelten Retrotransposition arrangiert und nutzt diese als Rohmaterial zur Generierung neuer Gene (Abb. 2.3). Sequenzen von transposablen Elementen können in einem als Exonisation bezeichneten Prozess in die mRNA eines Gens inkorporiert werden. Einmal integriert, besitzen sie das Potential, sich zu funktionellen Modulen zu exaptieren (Exaptation beschreibt in der Evolutionsbiologie die Nutzbarmachung einer Eigenschaft für eine Funktion); z.B. als Proteinkodierende Domänen durch alternatives Spleißen. Damit erhöht der Prozess der Exonisation die Vielseitigkeit von Proteinen (zusammengefasst von (Hasler et al., 2007; Sela et al., 2010)).

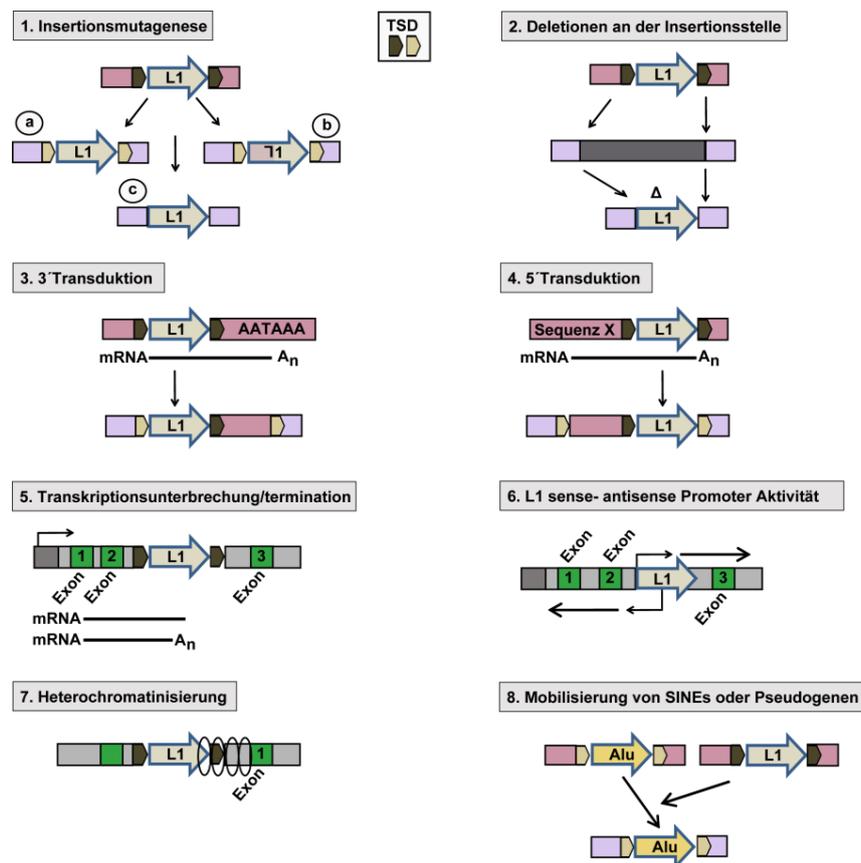


Abbildung 2.3: Möglicher Einfluss der Retrotransposons auf die Genomstruktur der Zelle. Insertionen an neuen Lokalisationen können „full length“ oder 5' trunziert (1a) sein. Zusätzlich können sie Inversionen oder Deletionen enthalten (1b). Endonuklease-unabhängige Insertionen können ebenfalls mit einer geringen Frequenz stattfinden (1c). Insertionen können von Deletionen an der Insertionsstelle begleitet sein (2). Flankierende Sequenzen, entweder 3' oder 5' von L1s, können durch die Retrotransposition mitgetragen werden ((3) und (4)). Innerhalb der Retrotransposon-Sequenzen kann es zu transkriptionellen Unterbrechungen kommen und poly(A)-Signale innerhalb der L1-Elemente können eine frühzeitige Termination der Transkription verursachen (Han et al., 2004;

Perepelitsa-Belancio and Deininger, 2003). (5). Der antisense Promotor im L1 5'-UTR kann neue Transkriptionsstarts für Gene *upstream* des L1-Elements auf dem entgegengesetzten Strang generieren (6). L1s können die Chromatinstruktur verändern und dabei die Genexpression beeinflussen (7). Die reverse Transkription von L1s kann zur Mobilisierung von Alu-Elementen, SVAs, mRNAs und kleinen nicht-kodierenden RNAs führen und zur weiteren Expansion des Genoms beitragen (8) (Modifiziert nach (Goodier and Kazazian, 2008)).

2.4.4 Zelluläre Abwehr gegen die transposable Aktivität von Retroelementen

Retroelemente können das Genom auf verschiedenen Wegen beeinflussen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Zelle unterschiedlichste Strategien entwickelte, um deren Aktivität regulieren zu können. Dazu gehört die Regulation der L1-Expression durch DNA-Methylierung (Montoya-Durango et al., 2009; Yu et al., 2001), die Regulation durch Chromatinkondensation (zusammengefasst von (Carnell and Goodman, 2003)), die Regulation durch RNAi, die Modulation der L1-Aktivität durch piRNAs, die Modulation der L1-Effekte durch Aggregation in Stress-Granula (zusammengefasst von (Goodier and Kazazian, 2008)) sowie die Inhibition der L1-Aktivität durch APOBEC3-Proteine (Abb. 2.4), auf die hier detailreicher eingegangen werden soll.

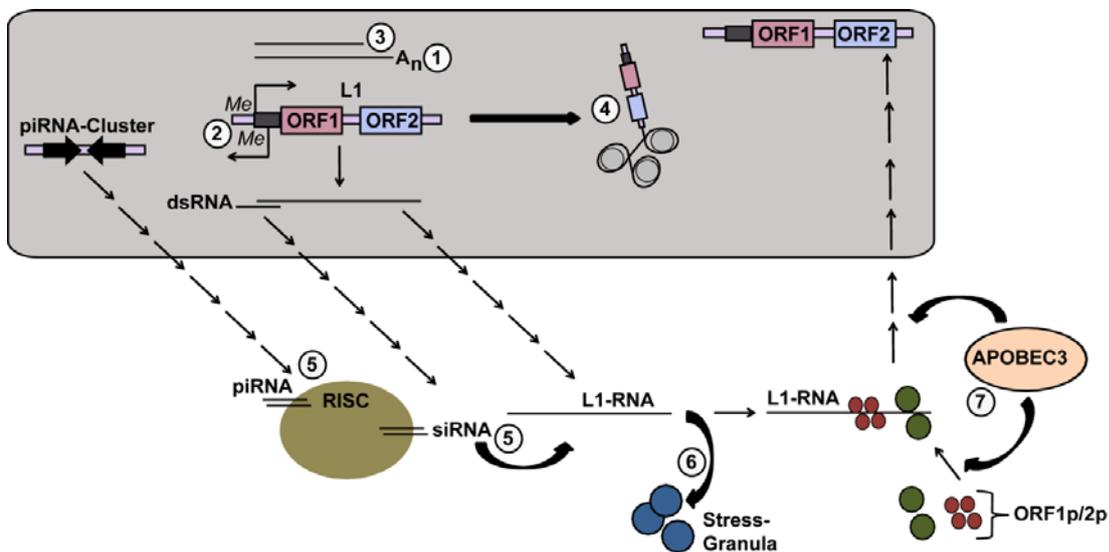


Abbildung 2.4: Zelluläre Abwehr gegen die transposable Aktivität von Retroelementen. Trunkierungen, Mutationen und Umstrukturierungen inaktivieren L1-Elemente (1). Die Methylierung des L1 5'-UTR inhibiert dessen Expression (2). Aussetzung und frühzeitige Termination inhibieren die L1-Expression (3). Die Heterochromatinisierung von L1s supprimiert die Expression (4). Doppelsträngige RNA, die aufgrund der sense und antisense Promotoraktivität produziert wird, könnte die L1-Retrotransposition durch RNAi (RNA-Interferenz) inhibieren (5). Kleine piRNA (*Piwi-interacting RNA*) inhibiert die L1-Expression in Keimzellen (5). ORF1-Proteine und L1-RNA können in Stress-Granula im Zytoplasma akkumulieren (6). Verschiedene APOBEC3-Proteine reduzieren die L1 Retrotransposition in der Zellkultur über Cytosin-Deaminierung; bislang ist noch nicht eindeutig geklärt, ob dieser Effekt im Zytoplasma oder im Kern stattfindet (7) (Modifiziert nach (Carnell and Goodman, 2003; Soifer and Rossi, 2006)).

2.4.4.1 Inhibition der L1-Aktivität durch APOBEC3-Proteine

Charakteristisch für die Mitglieder der APOBEC-Proteinfamilie (*Apo B mRNA Editing Enzyme Catalytic Polypeptid*) ist das stark konservierte Aminosäuremotiv, bestehend aus His-Xaa-Glu-Xaa₂₃₋₂₈-Pro-Cys-Xaa₂₋₄-His. Dieses Motiv definiert die Deaminasedomäne und ist für die RNA- bzw. DNA-editierende Eigenschaft der Proteine verantwortlich, die in der hydrolytischen Deaminierung der C4-Position eines Cytosins resultiert (Blanc and Davidson, 2010; Harris and Liddament, 2004; Xie et al., 2004). Erste Erkenntnisse über die Funktionalität der APOBEC-Proteine wurden durch die Interaktion des HIV-kodierten Proteins Vif mit dem humanen A3G (APOBEC3G) gewonnen. Während einer HIV-Infektion bindet das Vif-Protein an A3G und vermittelt auf diese Weise die 26S-proteasomale Degradation des A3G-Proteins (Marin et al., 2003), wohingegen A3G in Vif-defizienten Virusmutanten während der Virusassemblierung in das HIV-Partikel inkorporiert wird (Mariani et al., 2003; Soros et al., 2007). Daher wurde die antivirale Aktivität erstmals in HIV Δ vif Lentiviren entdeckt, bei denen das A3G-Protein die Replikation der Viren durch Deaminierung von Cytosinen während der Minusstrangsynthese der reversen Transkription inhibiert (Sheehy et al., 2002). Aufgrund des HIV-ähnlichen Replikationszyklus von L1-Elementen über eine reverse Transkription wurde der inhibitorische Effekt der humanen APOBEC3-Proteinfamilie auch auf die L1-vermittelte Retrotransposition untersucht. Tatsächlich zeigten L1-Retrotranspositionsassays einen inhibitorischen Effekt auf die Propagation von humanen L1-Elementen: A3A reduzierte die L1-Aktivität um 95% (MacDuff et al., 2009; Muckenfuss et al., 2006), A3D um 30% (Kinomoto et al., 2007), A3G um 90% (Kinomoto et al., 2007; MacDuff et al., 2009) und A3H um bis zu 80% (OhAinle et al., 2008). Für weitere Mitglieder der APOBEC3-Familie, A3B, A3C und A3F, wurde eine Hemmung der Retrotransposition zwischen 60-80% beschrieben (Muckenfuss et al., 2006; Stenglein and Harris, 2006). Dabei scheint die Deaminasedomäne bei der Inhibition der L1-Aktivität von zentraler Bedeutung zu sein, denn das Einbringen von Mutationen in dem konservierten Sequenzmotiv führte zu einer Auflösung des inhibitorischen Effekts (MacDuff et al., 2009; Muckenfuss et al., 2006). Für APOBEC3-Enzyme vermutet man, dass sie die zytoplasmatische Sequestration der L1-RNA oder Proteine vermitteln oder die enzymatische Aktivität von L1 direkt inhibieren können (Bogerd et al., 2006; Muckenfuss et al., 2006; Stenglein and Harris, 2006).

3. ZIELSETZUNG

Das p53-Protein ist an einer Vielzahl unterschiedlicher Differenzierungsvorgänge beteiligt. Auch während der frühen Embryogenese und in embryonalen Stammzellen scheint das Protein funktionell zu sein und wird im Verlauf des Differenzierungsprozesses differenziell exprimiert. Aktuelle Arbeiten verknüpfen L1-Elemente mit dem Prozess der Differenzierung und konnten zudem eine aktivierende Funktion von p53 auf die Promotoraktivitäten dieser repetitiven Elemente beim Menschen zeigen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Funktion des p53-Proteins im Prozess der Differenzierung und dessen Verknüpfung zur L1-Transkription während der frühen Embryogenese der Maus. Als Zellkulturmodell werden dafür F9-Zellen verwendet, die sich durch eine definierte Differenzierbarkeit und der Expression von p53 sowie unterschiedlichen L1-Familien auszeichnen. Zu Beginn wird das Expressionsprofil des p53-Proteins während der F9-Differenzierung untersucht und dessen Funktionalität durch Bindung an die regulatorischen Sequenzen seiner Zielgene *Cdkn1a* und *Mdm2* durch ChIP-chip-Versuche analysiert. Aufgrund des embryonalen Hintergrunds der F9-Zellkultur werden verschiedene Methoden zum Nachweis von Vorläuferzellen eingesetzt, um mögliche Subpopulationen innerhalb der Zellkultur nachzuweisen. Weiter wird der Untersuchung der Expression verschiedener Differenzierungsmarker-Gene und der Verteilung des p53-Proteins zwischen den Subpopulationen eine Rolle zukommen. Durch die stabile Depletion von p53 durch eine p53-spezifische shRNA soll die Beteiligung des p53-Proteins am Differenzierungsprozess studiert werden. Zur Untersuchung der Abhängigkeit des bidirektionalen L1-Promotors von p53 werden Vektoren hergestellt, die die durchflusszytometrische Analyse der eGFP-Fluoreszenz unter Kontrolle des Maus-L1-Promotors ermöglichen. Die gesamt L1- und familienspezifische L1-Expression wird zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen verglichen und der Einfluss von p53 auf deren Expression durch transiente p53-Depletion untersucht. Um die L1-Elemente mit den differenzierungsregulierten Genen in Verbindung zu bringen, werden bioinformatische Analysen eingesetzt, um die Position von „full length“ LINE1-Elementen (FL-L1) im Kontext zu den differenzierungsregulierten Genen zu untersuchen. Die weiteren Versuche werden sich auf genau diese FL-L1-Elemente

beziehen und den Einfluss von p53 an der Regulation des bidirektionalen Promotors und dem daraus resultierenden Effekt auf das Chromatin der benachbarten Gene und Wirts-Gene studieren. ChIP-chip Analysen sollen Klarheit über das epigenetische Profil der mit FL-L1-Elementen assoziierten Gene sowie deren Änderung im Differenzierungsprozess schaffen. Durch Transfektion der F9-Zellen mit Retrotranspositionsreporterkonstrukten wird der Einfluss von Apobec-Proteinen, beschriebenen L1-„Antidots“, sowie des p53-Proteins auf den Prozess der Retrotransposition untersucht.

4. MATERIAL

4.1 Chemikalien und andere Materialien

Die handelsüblichen Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Darüber hinaus wurden weitere Chemikalien von folgenden Herstellern verwendet:

Actinomycin D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
30% Acrylamid/Bisacrylamid (37, 5:1)	National Diagnostics, USA
Ampicillin	USB, Cleveland, USA
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Borsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA, Fraktion V	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DRAQ5™	Biostatus, Shepshed UK
Dynabeads® Protein G	Invitrogen, Darmstadt
dbcAMP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Geneticin-Sulfat (G418)	Gibco BRL Life, Freiburg
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
Glykogen	Roche, Basel, Schweiz
Hepes	Serva, Heidelberg
Hygromycin	Serva, Heidelberg
Isopentan	Riedel de Haen, Seelze

MATERIAL

Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Luminol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	Neuform, Lüneburg
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Mowiol® 4-88 Reagent	Merck, Darmstadt
Nutlin-3	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium-Desoxycholat	Merck, Darmstadt
OptiMEM®I	Invitrogen, Darmstadt
Paracumaric acid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pepstatin A	Biomol, Hamburg
PefaBlock	Biomol, Hamburg
Penicillin/Streptavidin	PAA, Pasching, Österreich
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Biomol, Hamburg
Retinoic acid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TO-PRO®-3 Iodide	Invitrogen, Darmstadt
Trasylol	Bayer, Leverkusen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vectashield® H-1000	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid	Fluka, Neu-Ulm

4.2 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lösungen mit Milli-Q-Wasser angesetzt und durch Autoklavieren, oder bei Hitzeempfindlichkeit durch Sterilfiltration (Membranfilter, Porengröße 0,2µm), sterilisiert.

Ampicillin 2000x

100mg/ml in H₂O

Block-Lösung (ChIP)

10ml 10xPBS, 90ml ddH₂O, 500mg BSA

Bottom Gel Stammlösung 4x

1.5M Tris-HCl, pH 8.8, 0,4% SDS, Lagerung bei 4 °C

Calciumchlorid-Stocklösung (ChIP)

300mM CaCl₂ in 10mM Tris pH 8.0

DbcAMP-Stock (Dibutyryl-cyclic Adenosinmonophosphat)

100mM dbcAMP in DMEM, steril filtrieren, Lagerung bei -20°C

DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat)

0.01% (w/v) DEPC, über Nacht stehen lassen, autoklavieren

DMEM

133.8 g DMEM Pulver, 37g NaHCO₃, ad 10 L Zellkulturwasser, pH 7.1 (HCl), steril filtrieren, Lagerung: 4 °C

Einfriermedium

10% DMSO, 50% FCS, 40% DMEM

Elutionspuffer (ChIP)

5ml 1M Tris-HCl pH 8.0, 2ml 0.5 M EDTA pH 8.0, 10 ml 10% SDS, ad 100 ml ddH₂O

Ethidiumbromidlösung

100mg/100 ml

Extraktionspuffer für DNA-Isolierung

10mM Tris-HCl pH 8.0; 0.01mM EDTA; 0.5% SDS; 200µg/ml Proteinase K

Formaldehyd-Lösung (ChIP)

2.5ml 1M HEPES-KOH pH 7.5, 1.0 ml 5M NaCl, 100 µl 0.5 M EDTA pH 8.0, 50µl 0.5 M EGTA pH 8.0, 14.9 ml 37% Formaldehyd, ad 50 ml ddH₂O

G418[®]

50mg/ml in PBS

Kristallviolett-Lösung

0.1% Kristallviolett in Aqua dest.

Ladepuffer (10x DNA-Ladepuffer)

0.1% Xylencyanol, 50% Glycerin, 10xTAE, 0.1M EDTA, 0.1% SDS

Leupeptin

5mg/ml Glycerin/H₂O 1:1, Lagerung bei -20°C

Luminol-Stock

250mM Luminol in DMSO, Lagerung bei -20°C

Lysepuffer-I (LB1) (ChIP)

5ml 1M Hepes-KOH pH 7.5, 2.8ml 5M NaCl, 0.2ml 0.5M EDTA, 30ml 50% Glycerol, 2.5ml 10% Triton X-100, 5ml 10% NP-40, ad 100 ml ddH₂O

Lysepuffer-II (LB2) (ChIP)

1ml 1M Tris-HCl pH 8.0, 4ml 5M NaCl, 0.2 ml 0.5M EDTA pH 8.0, 0.1ml 0.5M EGTA pH 8.0, ad 100 ml ddH₂O

Lysepuffer-III (LB3) (ChIP)

1ml 1M Tris-HCl pH 8.0, 2ml 5M NaCl, 0.2 ml 0.5M EDTA pH 8.0, 0.1ml 0.5M EGTA pH 8.0, 1ml 10% Na-Deoxychololat, 2.5ml 20% N-Lauroylsarconin, ad 100 ml ddH₂O

MACS-Puffer

0.5% BSA, 2mM EDTA in PBS

Na-Deoxychololat-Lösung

2% Na-Deoxychololat in Aqua dest.

Paracumaric acid-Stock

90mM Paracumaric acid in DMSO, Lagerung bei -20°C

PBS

137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH 7.4 (HCl), autoklavieren

PBS/EDTA

0.1% (w/v) EDTA in PBS

Pepstatin A

1mg/ml in Methanol oder DMSO

PefaBlock® SC

25mg/ml in Glycerol/H₂O 1:1

Pepstatin A 1000x

1mg/ml in Methanol

Proteaseinhibitoren (ChIP)

5µg/ml PepA, 125µg/ml PefaBlock, 5µg/ml Leupeptin, 10µl Trasylol (=Aprotinin, Infusionslösung = 500.000 KIE d.h. ca. 1,4mg/ml), ad 1 ml ddH₂O

Retinoic acid-Stock

100µM Retinoic acid in DMSO, Lagerung bei -20°C

SDS-Laufpuffer

25mM Trizma Base (Tris), 200mM Glycin (pH 8.3), 0.1% SDS

6xSDS-Probenpuffer (Lysepuffer)

130mM Tris-HCl (pH 8.0), 20% Glycerin, 4.6% SDS, 10% β-Mercaptoethanol, 0.2g Bromphenolblau

SDS-Sammelgel

3.75ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid, 6.25ml Upper Gel Stammlösung, 15ml Aqua dest., 150µl 10% APS, 50µl TEMED

SDS-Trenngel (10 %)

13.25ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid, 10ml Bottom Gel Stammlösung, 16.75ml Aqua dest., 200µl 10% APS, 20µl TEMED

TAE 50x

2M Tris-HCl pH 8.0; 1M Eisessig, 0.05M EDTA

TBS-Puffer (10X)

10% 1M Tris/HCl (pH 8.0), 30% 5M NaCl, 60% Aqua dest.

TBST-Puffer (Western Blot-Waschpuffer)

10% 10XTBS-Puffer, 90% Aqua dest., 0.1% Tween-20

TE-Puffer (ChIP)

10mM Tris-HCl pH 7.5 oder 8.0; 1mM EDTA

Trypsin-Lösung

2% (v/v) Trypsin-Stammlösung, 5mM EDTA in PBS (pH 8.0)

Upper Gel Stammlösung 8x

1M Tris-HCl (pH 6.8), 0.8% SDS

Waschpuffer (ChIP)(RIPA)

12.5ml 1M HEPES-KOH pH 7.6, 25ml 5M LiCl, 0.5ml 0.5M EDTA pH 8.0, 25ml 10% NP-40, 17.5ml 10% Na-Deoxycholat, ad 250ml ddH₂O

Western Blot-Blockpuffer

5% Magermilchpulver in TBST

Western Blot-Transferpuffer (10X)

292.8g Glycin, 121.1g Trizma Base (Tris)

LiCl-Puffer

250mM LiCl; 10mM Tris-HCl pH 8.0; 1mM EDTA; 0.5% Na-Deoxycholat; 0.5% Nonident P-40

4.3 Nährmedien für die Bakterienkultur

LB- (*Luria Bertani*) Medium

10g Bacto-Trypton; 5g Bacto-Yeast-Extrakt; 10g NaCl; ad 1000ml H₂O;
pH 7.5; autoklavieren

SOB-Medium

20g Bacto-Trypton; 5g Bacto-Yeast-Extrakt; 0.5g NaCl; ad 1000ml H₂O;
autoklavieren; vor Gebrauch Zugabe von 10ml 1M MgSO₄

SOC-Medium

SOB-Medium mit 2ml sterilfiltrierter 20% (w/v) Glucose auf 100ml

4.4 Bakterienstämme

XL1 Blue

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*; Stratagene, La Jolla, USA

4.5 Nährmedien für die Zellkultur

Medium für die Zelllinien 3T3/3T3SV und HeLa

10% (v/v) FCS; 1xPen/Strep

Medium für die Zelllinie F9

10% (v/v) FCS; 1xPen/Strep; 2mM L-Glutamin

4.6 Eukaryotische Zelllinien

F9: Aus einem Maus-Teratokarzinom isolierte nullipotente embryonale Karzinomazelllinie, die sich durch die Expression von p53 auszeichnet und in Endoderm differenzierbar ist (Bernstine et al., 1973). Bezugsquelle: DSMZ.

3T3: Aus Balb/c Mausembryofibroblasten gewonnene, spontan immortalisierte Zelllinie mit intaktem Wildtyp p53 (Aaronson and Todaro, 1968) ATCC: #CCL163.

3T3SV: SV40 transformierte Balb/c 3T3 Zellen (Deppert et al., 1987).

HeLa: immortalisierte humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms ohne funktionelles p53 (ATCC, Cat. No. CCL-2)

4.7 Verbrauchsmaterialien

Bakterienschalen	Nunc, Wiesbaden
Deckgläser (18x18mm)	Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, USA
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher und Schüll, Dassel
Falcon [®] -Röhrchen 15ml	Becton Dickinson, USA
Falcon [®] -Röhrchen 50ml	Becton Dickinson, USA
Membranfilter (0.2µm)	Sartorius, Göttingen
Nitrozellulosemembran	Amersham Biosciences, GB
Objektträger	Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig
Parafilm „M“	American National Can, Greenwich
PCR Reaktionsgefäß (200µl)	Biozym, Oldendorf
Reaktionsgefäße (1.5 und 2.0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden

4.8 Geräte

4.8.1 Waagen

Feinwaage H54AR	Mettler-Toledo, Gießen
Oberschalenwaage PE360	Mettler-Toledo, Gießen

4.8.2 Zentrifugen

Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge Omnifuge 2.0RS	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Zentrifuge Rotana 96	Hettrich Zentrifugen, Tuttlingen

4.8.3 Mikroskope

Fluoreszenzmikroskop DMRA	Leica, Solms
Fluoreszenzmikroskop DMI 6000 B	Leica, Solms
Konfokales Fluoreszenzmikroskop LSM 510	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar
Mikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg

4.8.4 Gelsysteme

Geldokumentation BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
---------------------------------	---------------------

4.8.5 Geräte für Arbeiten im eukaryotischen System

Brutschrank (Begasung) Hera cell	Heraeus, Hanau
Sterilbank Hera safe	Heraeus, Hanau

4.8.6 Spannungsquellen

Power Pac 200	BioRad, München
Power Pac 3000	BioRad, München

4.8.7 Weitere Geräte

Bioruptor Ultraschallgerät UCD-200	Diagenode, Liège (Belgien)
Elisa Reader SUNRISE	TECAN AG, Männedorf, Schweiz
FACS Aria	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Canto	BD Biosciences, Heidelberg
Gelgießstand Hoefer® Dual Gel Caster	GE healthcare, GB
Heizblock Dri-Block DB-2A	Techne, Cambridge, UK
Heizblock compact	Eppendorf, Hamburg
Horizontalschüttler 3015	GFI, Haake, Karlsruhe
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Milli-Q Wasser	MilliPore, Eschborn

Odyssey® Western Blot System	LI-COR® Biosciences, Bad Homburg
Orbitalschüttler Polymax 2040	Heidolph, Kelheim
PCR Cycler PTC 200	MJ Research, Massachusetts, USA
pH-Meter SevenEasy	Mettler-Toledo, Giessen
Real-Time PCR 7500 Fast System	Applied Biosystems, Darmstadt
Rollenschüttler RollerMixer SRT1	Stuart Scientific, Staffordshire UK
Spektrophotometer DU® 800	Beckman Coulter, USA
Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tankblotapparatur Mini Trans Blot	BioRad, München
Wasserbad	GFI, Haake, Karlsruhe

4.9 Kits

Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche, Basel, Schweiz
Effectene™ Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
First-Choice RLM-RACE-Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
GeneBLAzer®	Invitrogen, Darmstadt
GenomePlex® Complete Whole Genome Amp.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit™	Applied Biosystem, Darmstadt
NucleoBond® BAC100	MACHEREY-NAGEL, Düren
NucleoBond® PC500	MACHEREY-NAGEL, Düren
NucleoSpin® Extract II Kit	Clontech, Mountain View, USA
Oligofectamine™ Transfection Reagent	Invitrogen, Darmstadt
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Purification Kit	Qiagen, Hilden
Aldefluor®-Kit	STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich
WGA Reamplification Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MACS® Lineage Cell Depletion Kit	Miltenyi Biotec

4.10 Größenstandards

4.10.1 Protein-Größenstandards

Prestained SDS Molecular Weight Marker
(SDS-7B) Sigma-Aldrich, Taufkirchen

4.10.2 DNA-Größenstandards

Gene RulerTM 100bp DNA Ladder MBI Fermentas, Heidelberg
Gene RulerTM 1kb DNA Ladder MBI Fermentas, Heidelberg

4.11 Plasmide

L1 _{RP} -EGFP*	(Ostertag et al., 2000)
pJM101/L1 _{RP} *	(Moran et al., 1996)
pBLAK-Serie*	Dr. D. Symer, Ohio, USA
pCIneo	Promega, Mannheim
pCIneo-wtp53	Doktorarbeit, Karine David
pDB135*	(Martin et al., 2005a)
pEGFP-N1	Clontech, Mountain View, USA
pGL3-Basic	Promega, Mannheim
pLKO.1_shGFP	OpenBiosystems, Genome Way, Schweiz
pLKO.1_shApo3	OpenBiosystems, Genome Way, Schweiz
pLKO.1_shYY1	OpenBiosystems, Genome Way, Schweiz
pSUPERIOR.neo_GFP	OligoEngine, Seattle, WA, USA
pSUPscr	Doktorarbeit, Annette März
pSUPshp53	Doktorarbeit, Annette März

*zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schumann, Paul-Ehrlich-Institut, Langen

4.12 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Invitrogen GmbH (Darmstadt) synthetisiert. Die nachfolgenden Tabellen 4.1-4.6 fassen die genspezifischen Primer (4.1), die Primer zur L1-Detektion (4.2), die Primer zur Detektion nicht-kodierender RNAs (4.3), die ChIP-spezifischen Primer (4.4), die Klonierungsprimer (4.5) sowie die sonstigen verwendeten Primer (4.6) zusammen:

MATERIAL

Tabelle 4.1: Genspezifische Primer für die qPCR. Aufgeführt sind die Namen der Gene, die im Rahmen der Arbeit verwendeten Primerbezeichnungen sowie die Sequenzen der Primer. *Apobec3*: apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3; *Cdkn1a*: cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Col4a1*: collagen, type IV, alpha 1; *Dab2*: disabled homolog 2 (Drosophila); *Egflam*: EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains; *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Lama1*: Laminin, alpha 1; *Mdm2*: transformed mouse 3T3 cell double minute 2; *Trp53*: transformation related protein 53.

Gen	Primername	Sequenz
Apobec3	Apobec3-Q1	CAGTTTACTGACTGCTGGACAA
	Apobec3-Q2	CCAAGCTGTAGGTTTCCAAAGT
Cdkn1a	Cdkn1a-Q1	GATCCACAGCGATATCCAGAC
	Cdkn1a-Q2	ACCGAAGAGACAACGGCACAC
Col4a1	ColIV-Q1	CTGGCACAAAAGGGACGAG
	ColIV-Q2	ACGTGGCCGAGAATTTCCACC
Dab2	Dab2-Q1	ACAACCAATGGCCAGCCTGAC
	Dab2-Q2	ACCGATTAGCTTGGCCTTGT
Egflam	Egflam-Q1	AATGCTCACGGCTTCAGTCC
	Egflam-Q2	TCCAGGTCCAGTTCGTCTTC
Gapdh	Gapdh-Q1	GGTGAAGGTCGGTGTGAAC
	Gapdh-Q2	GGGGTCTCGCTCCTGGAA
Lama1	Laminin-Q1	CAGCGCCAATGCTACCTGT
	Laminin-Q2	GGATTCTGACTGTTACCGTCACA
Mdm2	<i>Mdm2</i> -Q1	TGTCTGTGTCTACCGAGGGTG
	<i>Mdm2</i> -Q2	TCCAACGGACTTTAACAACCTCA
Trp53	<i>Trp53</i> -Q1	TGGAGAGTATTTACCCCTCAAGA
	<i>Trp53</i> -Q2	CTCCTCTGTAGCATGGGCATC

Tabelle 4.2: Primer für die qPCR/PCR zur Detektion von L1-Sequenzen. Aufgeführt sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten Primerbezeichnungen sowie die Sequenzen der Primer. *Bmper*: BMP-binding endothelial regulator; *Egflam*: EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains; *Gpr126*: G protein-coupled receptor 126; *Raet1e*: retinoic acid early transcript 1E; *Rarb*: retinoic acid receptor, beta; *Robo2*: roundabout homolog 2 (Drosophila); *Ndn*: necdin; *Robo2*: roundabout homolog 2 (Drosophila).

Name/Gen	Primername	Sequenz
L1Md-T Bmper-1	<i>Bmper</i> _L1T-Q1	CGGACATTCTCTTGCCTACCA
	<i>Bmper</i> _L1T-Q2	TCGCCTCCCCATGTAATGT
L1Md-T Bmper-2	<i>Bmper</i> _L1T-Q3	GCAGACAATCGCATTAAACC
	<i>Bmper</i> _L1T-Q4	CTGCTGAGGCTGAGATGGAT
L1Md-T Bmper-3	<i>Bmper</i> _L1T-Q5	ACACGCAGACTTTGTGTGCC
	<i>Bmper</i> _L1T-Q6	GCCCATAGACAACAATGCTGGT
L1Md-A Egflam-1	<i>Egflam</i> _L1A-Q1	CACCCATGATGTTATCAGTCTCC
	<i>Egflam</i> _L1A-Q2	GGCTCTGTGCTTCTGACTGT
L1Md-A Egflam-2	<i>Egflam</i> _L1A-Q3	CTAGTCGGCCATCACTGGAA
	<i>Egflam</i> _L1A-Q4	GGCATGATCACTACCACACTC
L1Md-A Epha3	<i>Epha3</i> _L1A-Q1	GCACCCAGATTACCTCAATCA
	<i>Epha3</i> _L1A-Q2	GACTCTGCTCGCAATCAAAG

MATERIAL

Fortsetzung Tabelle 4.2

Name/Gen	Primername	Sequenz
L1A	<i>L1A-Q1</i>	ACACAACCTTCTGCCAGGAGTC
	<i>L1A-Q2</i>	ATTCTCTGCAGGCAAGCTCTC
L1Md-A Egflam-1	<i>L1-Egflam-as1</i>	GTAGCCCGGAGCTCGAGTCT
	<i>L1-Egflam-as2</i>	GTAAAGCCCTAACTAAGTGGTGC
L1Md-A Egflam	<i>L1-Egflam-as2</i>	GTAAAGCCCTAACTAAGTGGTGC
	<i>Line1-Q2</i>	TTCTCTGCAGGCAAGCTCTC
L1T	<i>L1T-Q1</i>	GATATCTGCGCACCTTCCCT
	<i>L1T-Q2</i>	TCAGCAGACCTGGGAGACAGA
LINE	<i>Line1-Q1</i>	ACACAACCTTCTGCCAGGAGTC
	<i>Line1-Q2</i>	TTCTCTGCAGGCAAGCTCTC
L1Md-T Robo2	<i>Robo2_L1T-Q1</i>	TGGTTTAACATGGCCCTTGAC
	<i>Robo2_L1T-Q2</i>	CTGCTGCTGTCTCACCACAAC
L1Md-T Dab2 as1	<i>L1-Dab2-as4</i>	TGATGATGGTGAGTAGTCCTG
	<i>L1-Dab2-as6</i>	GTTGCTTGGTGAGATCTGGAC
L1Md-A Egflam	<i>L1-Egflam-as2</i>	GTAAAGCCCTAACTAAGTGGTGC
	<i>Line1-Q2</i>	TTCTCTGCAGGCAAGCTCTC
L1Md-T Plagl1	<i>L1-Plagl1-P1</i>	TCAACCGTATCGTGCTGAAG
	<i>L1-Sox17-P2</i>	CGCCATCTGGTAATCTCTGGA
L1Md-T Dab2 as2	<i>L1-Dab2-as1</i>	TTGTCTGGAGCCGGAATGGT
	<i>L1-Dab2-as6</i>	GTTGCTTGGTGAGATCTGGAC
L1Md-T Dab2 as3	<i>L1-Dab2-as3</i>	TCCTCCTGGCGGAAGATGAAG
	<i>L1-Dab2-as6</i>	GTTGCTTGGTGAGATCTGGAC
L1Md-T Dab2 as4	<i>L1-Dab2-as5</i>	GATGCTCGCATCTATGGTTCC
	<i>L1-Dab2-as6</i>	GTTGCTTGGTGAGATCTGGAC
L1Md-A Gpr126-1	<i>Gpr126-L1A-Q1</i>	GTCCGTGGCACTTGAGTACA
	<i>Gpr126-L1A-Q2</i>	GTGTTTCCCTTGGCAGGTTTC
L1Md-A Gpr126-2	<i>Gpr126_L1A-Q3</i>	CCCTCCTTAGATTTGGGAACA
	<i>Gpr126_L1A-Q4</i>	CCTTCATCTCGCAGGAGGTT
L1Md-T Raet1e-1	<i>Raet1e_L1T-Q1</i>	CCAAGGTA TAGGAGGACGTT
	<i>Raet1e_L1T-Q2</i>	CCTCTGTGTTCCACACTCTC
L1Md-T Raet1e-2	<i>Raet1e_L1T-Q3</i>	CTAGTCGGCCATCACTGGAA
	<i>Raet1e_L1T-Q4</i>	GGCTACAGCACGTTCTGGTAA
L1Md-F2 Rarb 1	<i>Rarb_L1F2-Q1</i>	CCTGTCCTTACTACCGTCTGTC
	<i>Rarb_L1F2-Q2</i>	CCGGTGCTGGAGTCAATCAT

Fortsetzung Tabelle 4.2

Name/Gen	Primername	Sequenz
L1Md-F2 Rarb 2	<i>Rarb_L1F2-Q3</i>	CACATACCACACCTCCACTCA
	<i>Rarb_L1F2-Q4</i>	GTGCTGCTCAGACCGAAAG
L1Md-F2 Rarb 3	<i>Rarb_L1F2-Q5</i>	AGAGAGGCCATTGGATTTG
	<i>Rarb_L1F2-Q6</i>	CAGGAGAGCGACCTTATCAGA
L1Md-T Sema6d-1	<i>Sema6d_L1T-Q1</i>	TCCTTACAGAAAGCCCACCT
	<i>Sema6d_L1T-Q2</i>	CCGGACCAAGATAAGGTCAA
L1Md-T Sema6d-2	<i>Sema6d_L1T-Q4</i>	GGGATACCCACCACAAATCAT
	<i>Bmper_L1T-Q5</i>	ACACGCAGACTTTGTGTGCC

Tabelle 4.3: Primer zur Detektion ncRNAs. Aufgeführt sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten Primerbezeichnungen sowie die Sequenzen der Primer. *Egflam*: EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains; *Dab2*: disabled homolog 2 (Drosophila).

Name	Primername	Sequenz
Egflam_ncRNA-1	Egflam_ncRNA-Q1	GAAGCGCCAGATGATGTCAAG
	Egflam_ncRNA-Q2	CGCACAGGTTAGATGGTCTAC
Egflam_ncRNA-2	Egflam_ncRNA-Q3	AATTCACAGCCACCGGCCATC
	Egflam_ncRNA-Q4	GCCTTCCTTGGACAGATGGCT
Egflam_ncRNA-3	Egflam_ncRNA-Q5	TCCTTGCTGTTCGCATCAGAG
	Egflam_ncRNA-Q6	CCTTGTGGGCTCATTTACATCC
Dab2_ncRNA-1	Dab2_ncRNA-Q7	TCCTTCGACTTGGCCAGTTAC
	Dab2_ncRNA-Q8	GCTGGTCTCACTTTCTGGCAT
Dab2_ncRNA-2	Dab2_ncRNA-Q9	CATCTCAACGCCATCCAACAG
	Dab2_ncRNA-Q10	GTCTTGCCAGGTCCAAGTTGT
Dab2_ncRNA-3	Dab2_ncRNA-Q3	AATAACGGGTCATGCCATTTG
	Dab2_ncRNA-Q4	TTGTCGTGGTTGGACTGACTC

Tabelle 4.4: Primer für die qRT-basierte ChIP-Analyse. Aufgeführt sind die Namen der Gene, die im Rahmen der Arbeit verwendeten Primerbezeichnungen sowie die Sequenzen der Primer. *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Gen	Primername	Sequenz
L1-Dab2_qChIP-1	L1-Dab2_qChIP-Q1	GTACAGGAGCTCGGAGCATCA
	L1-Dab2_qChIP-Q2	CAGCGAATCACCTGCTGAGAG
Dab2/Dab2-qChIP-1	Dab2-qChIP-Q1	CTGTGCCTCCGAGGAGCTATT
	Dab2-qChIP-Q2	ACAGCATTCAAACGCTTCACG

Tabelle 4.5: Primer für die PCR-Klonierung. Aufgeführt sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten Primerbezeichnungen sowie die Sequenzen der Primer.

Primername	Sequenz
L1-A-5P1-EcoRI	CCTGAATTCTATGGTGGCGCTTGAGAGTGAC
L1-A-5P1-HindIII	CCTAAGCTTTATGGTGGCGCTTGAGAGTGAC
L1-A-ORF1-EcoRI	CACGAATTCTGCGTTCTGATGGTGGTGAGTG
L1-A-ORF1-HindIII	CACAAGCTTTGCGTTCTGATGGTGGTGAGTG
L1-T-5P1-EcoRI	CCTGAATTCGACTGAGTGCAGACACAGTAG
L1-T-5P1-HindIII	CCTAAGCTTGACTGAGTGCAGACACAGTAG
L1-T-ORF1-EcoRI	CACGAATTCTGGTGATGGTGAGTGGTCTT
L1-T-ORF1-HindIII	CACAAGCTTTGGTGATGGTGAGTGGTCTT
pGL3-P1	CAAGTGCAGGTGCCAGAACAT
pGL3-GFP-P2	GGTACCGTCGACTGCAGAAT
L1-Dab2-as4-HindIII	CCCAAGCTTGATGATGGTGAGTAGTCCTG
L1-Dab2-as6-EcoRII	CCCGAATTCGTTGCTTGGTGAGATCTGGAC
L1-Dab2-as4-EcoRII	CCCGAATTCGATGATGGTGAGTAGTCCTG
L1-Dab2-as6-HindIII	CCCAAGCTTGTTGCTTGGTGAGATCTGGAC

Tabelle 4.6: Sonstige verwendete Primer. Aufgeführt sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten Primerbezeichnungen sowie die Sequenzen der Primer.

Primername	Sequenz
PCR-CDS	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT
P1cap	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCrGrGrG

4.13 siRNA

Alle siRNAs wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

Tabelle 4.7: Auflistung aller siRNAs mit den dazugehörigen Sequenzen.

Name/Gen	Sequenz
Si_Scr	5'-CGAACUUUUGGACGCGCAC(TT)-3'
siP53/Trp53	5'-GACUCCAGUGGGAACCUUC(TT)-3'
siApo1/Apobec1	5'-ACACCAGAUGCUCCAUUAAC(TT)-3'
siApo2/Apobec2	5'-AUCAUGCCUUCUGUAAUAC(TT)-3'

4.14 Antikörper

4.14.1 Primärantikörper

p53 (FL-393)-G

Anti-p53, polyklonaler Antikörper (gesamtes murines und humanes p53-Protein) aus der Ziege (sc-6243-G; SantaCruz, Heidelberg)

p53 (FL-393)

Anti-p53, polyklonaler Antikörper (gesamtes murines und humanes p53-Protein) aus dem Kaninchen (sc-6243; SantaCruz, Heidelberg)

HSC70

Anti-HSC70, polyklonaler Antikörper aus der Ziege (sc-1059; SantaCruz, Heidelberg)

α -Tubulin (YL1/2)

Anti-Tubulin, monoklonaler Antikörper aus der Ratte (sc-53029; SantaCruz, Heidelberg)

H3K27me1

Anti-Monomethyl-Histon (Lys27), polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (#07-448; MilliPore/Upstate; Billerica, MA, USA)

H3K4me3

Anti-Trimethyl-Histon (Lys4), polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (39159; Active Motif, Carlsbad, USA)

H3K27me3

Anti-Trimethyl-Histon (Lys27), monoklonaler Antikörper aus der Maus (39535 [LP Bio#AM-0174-200]; Active Motif; Rixensart, Belgien)

RNA Polymerase II-Ser5 Phosphorylierung

Anti-RNA-Polymerase II CTD-Repeat YSPTSPS (phosphoryliertes Serin 5), polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (ab5131, Abcam, USA)

Ser18-Phosphorylierung

Anti-p53 Ser18-Phosphorylierung aus der Ratte, polyklonal (22059, R&D Systems)

4.14.2 Sekundärantikörper

HRP-konjugierte Sekundärantikörper für die Detektion im Western Blot

Esel-anti-Ziege IgG-HRP (705-035-147, Dianova, Hamburg)

Esel-anti-Kaninchen IgG-HRP (711-035-152, Dianova, Hamburg)

Esel-anti-Ratte IgG-HRP (712-035-150, Dianova, Hamburg)

IRDye®-konjugierte Sekundärantikörper für die Detektion im Western Blot

Esel-anti-Kaninchen IgG (H+L) IRDye800CW (926-32213, LICOR, Lincoln, Nebraska, USA)

Esel-anti-Ziege IgG (H+L) IRDye680 (926-32224, LICOR, Lincoln, Nebraska, USA)

Fluorochrom-konjugierte Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Esel-anti-Ziege IgG Alexa568 (A-11057, Molecular Probes/Invitrogen, Darmstadt)

4.15 Software und Datenbanken

MS Office (Word, Excel)	Microsoft, USA
7500 Fast System v1.4.0	Applied Biosystems, USA
LSM 5 Image Browser	Zeiss, Göttingen
Genome Browser	UCSC Genome Bioinformatics
PubMed NCBI	U.S. National Library of Medicine and National Institutes of Health
Clone Manager 5	Scientific & Educational Software, USA
Imaris	Bitplane, Scientific Solutions, USA
Huygens Essential	Scientific Volume Imaging, USA
Adobe Photoshop	Adobe, USA
Adobe Illustrator	Adobe, USA
PlasMapper	http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/
PatSearch	http://www.hsls.pitt.edu/obrc/index
PrimerBank	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/
NimbleScan Software (Version 2.6.0)	Roche, Germany
GALAXY/IFOM IEO Server	http://main.g2.bx.psu.edu/
Integrative Genomics Viewer (IGV)	Version 2, http://broadinstitute.org/igv/
Biomart-Datenbank	http://biomart.org/

dChip-Software

<http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/>

4.16 Enzyme/dNTPs

Taq DNA-Polymerase

5 Prime, Hamburg

T4 DNA-Ligase

BioLabs, Hamburg

T4 DNA-Polymerase

BioLabs, Hamburg

dNTPs

Eppendorf, Hamburg

FastDigest[®] Restriktionsenzyme

MBI Fermentas, Heidelberg

Proteinase K

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

RNaseA

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

RNaseH

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

5. **METHODEN**

5.1 **Allgemeine Arbeiten im prokaryotischen System**

5.1.1 **Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen**

Bakterien besitzen die Eigenschaft zirkuläre Fremd-DNA aufzunehmen und sich damit einen genetischen Vorteil, z.B. Resistenz gegenüber Antibiotika, zu verschaffen. Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurde nach der Methode von Hanahan durchgeführt, die später von Inoue et al. modifiziert wurde (Inoue et al., 1990).

5.1.2 **Transformation kompetenter Bakterienzellen mit Plasmid-DNA**

Die Transformation ist als nicht-virale Aufnahme von freier DNA in kompetente Bakterienzellen definiert. Die Transformation wurde basierend auf den publizierten Beobachtungen von Cohen (Cohen and Chang, 1973) sowie Mandel und Higa (Mandel and Higa, 1970) durchgeführt.

5.1.3 **Präparation von Plasmid-DNA**

5.1.3.1 **Plasmid Minipräparation**

Die Minipräparation eignet sich zur Gewinnung von Plasmid-DNA in geringen Mengen (<60µg Plasmid-DNA). Dabei diente die Isolation der Überprüfung der durchgeführten Klonierungsarbeiten, z.B. durch den Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 5.6.1). Der Mini-Ansatz kann anschließend zur Gewinnung größerer Plasmid-Mengen in der Maxipräparation (siehe Abschnitt 5.1.3.2) genutzt werden. Die Präparation wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.1.3.2 **Plasmid Maxipräparation**

Die Maxipräparation diente der Gewinnung von Plasmid-DNA (>500µg) nach erfolgreicher Überprüfung der Klonierung nach Minipräparation. Die nach Aufreinigung hochreine DNA wurde anschließend für *in vitro* Analysen in

eukaryotischen Zellen (siehe Abschnitt 5.2.5) eingesetzt. Für die Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das NucleoBond[®] PC500 Kit von Macherey-Nagel laut Herstellerangaben verwendet.

5.1.3.3 Maxipräparation zur Isolation von BAC-Vektoren

Zur Isolation der BAC-DNA (*Bacterial Artificial Chromosome*) wurde das NucleoBond[®] BAC Kit von Macherey-Nagel verwendet. Das Kit eignet sich dabei vor allem für die Isolation von größeren Konstrukten (>300kbp). Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben.

5.2 Allgemeine Arbeiten im eukaryotischen System

5.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen unter Verwendung einer Sterilbank (Heraeus, HERA safe) durchgeführt. Die Teratokarzinom-Zelllinie F9 wurde in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit einem Zusatz von 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin (100X) und 2mM L-Glutamin kultiviert. Alle bei F9-Zellen zum Einsatz gekommenen Zellkulturschalen wurden vor Beginn der Arbeiten für zwei Stunden mit steriler 0.5%iger Gelatinelösung bei 4°C beschichtet und anschließend zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Alle weiteren verwendeten Zelllinien (3T3, 3T3SV, HeLa) wurden in DMEM +10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (100X) ohne L-Glutamin und ohne Vorbehandlung der Zellkulturschalen mit Gelatine kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% im Brutschrank. Die adhärent wachsenden Zellen wurden alle 3-4 Tage bzw. nach dem Erreichen einer 80%igen Konfluenz im Verhältnis von 1:4-1:8 passagiert, für die indirekte Immunfluoreszenz auf Deckgläsern ausplattiert (siehe Abschnitt 5.3.3), eingefroren (Abschnitt 5.2.4), für FACS-Analysen entnommen (siehe Abschnitt 5.3.1), zur RNA-Isolation verwendet (siehe Abschnitt 5.5.2), für den quantitativen Western-Blot geerntet oder mit einer bestimmten Zellzahl für Transfektionsexperimente (siehe Abschnitt 5.2.5) verwendet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit 3ml vorgewärmten PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2ml Trypsin/EDTA-Lösung (0.05% Trypsin und 0.53mM EDTA) und eine kurze Inkubation im Brutschrank bis sich der Zellrasen löste. Die proteolytische Wirkung

des Enzyms wurde durch Zugabe von 8ml FCS-haltigem Medium gestoppt und die Zellen bei 300xg für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurden die Pellets in vorgewärmtem Medium resuspendiert und je nach Fragestellung für weitere Versuche verwendet. Die Ernte der Zelllysate für die Isolierung von RNA bzw. dem Western-Blot erfolgte durch das Abschaben der adhärennten Zellen (siehe Abschnitt 5.4.4/5.5.2) mit einem Silikonspatel.

5.2.2 Differenzierung von F9-Zellen

Zur Differenzierung wurden F9-Zellen für 72h mit 10^{-3} M dbcAMP und 10^{-7} M RA versetzt. Das Medium mit Differenzierungsreagenzien wurde täglich bis zur vollständigen Differenzierung der F9-Zellen gewechselt.

5.2.3 Bestimmung der Zellzahl eukaryotischer Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 μ l der trypsinieren und in einem definierten Volumen an Medium resuspendierten Zellen in eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer überführt. Mikroskopisch wurden 4 Großquadrate bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt und der resultierende Mittelwert zur Berechnung der Zellzahl pro ml verwendet:

$$N = n \times F \times 10^4$$

mit

N: Zellzahl/ml

n: Mittelwert der gezählten Zellen der 4 Großquadrate

F: Verdünnungsfaktor

5.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren eukaryotischer Zellen wurden diese pelletiert in 1ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert dabei die Bildung von Eiskristallen während des Kühlungsprozesses. Zur Minimierung des mechanischen Stresses der beim Einfrieren entsteht, wurden die Zellen in einer Styropor-Box vorerst bei -80°C gelagert. Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt (-196°C).

Zum Auftauen der Zellen wurden diese bei 37°C im Wasserbad möglichst schnell erwärmt um der schädigenden Wirkung des DMSO vorzubeugen. Zur Entfernung des DMSO wurde die Zellsuspension in 10ml Medium aufgenommen und bei 300xg für 5 Minuten bei 20°C gewaschen.

5.2.5 Transiente und stabile Transfektion eukaryotischer Zellen

Unter der transienten Transfektion von eukaryotischen Zellen versteht man das temporäre Einschleusen von fremder DNA in die Zelle. Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurde das *Effectene™ Transfection Reagent* der Firma Qiagen zur Transfektion von Plasmid-DNA verwendet. Zur Transfektion von siRNA wurde das Oligofectamine™-Reagenz der Firma Invitrogen verwendet, dass sich für RNAi-Studien in HeLa-Zellen als effektiv erwies (Elbashir et al., 2001; Harborth et al., 2001).

5.2.5.1 Transiente und stabile Transfektion von Plasmid-DNA

Die *Effectene™*-Transfektion wurde laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Falle von Kotransfektionen wurden die Volumina der Reagenzien abhängig von der Anzahl der zu transfizierenden DNA-Konstrukte angepasst. Die nachfolgende Tabelle fasst die benötigten Komponenten in Abhängigkeit des eingesetzten Kulturformats zusammen.

Tabelle 5.1: *Effectene™*-Transfektion. Zusammenfassung der benötigten Reagenzien-Volumina für eine optimale *Effectene™* Transfektion adhärenter Zellen in Abhängigkeit des eingesetzten Kulturformats.

Kulturformat	DNA (µg)	Enhancer (µl)	Endvolumen DNA in EC-Puffer (µl)	<i>Effectene™</i> (µl)	Volumen an Medium-Vorlage (ml)
6 Loch-Platte	0.4	3,2	100	10	0.6
10 cm Schale	2.0	16,0	300	60	3.0

Im Falle der stabilen Transfektion wurden die Zellen 1-2 Tage nach Transfektion mit dem Selektionsantibiotika (Konzentration LD₁₀₀: die Dosis, bei der 100% der nicht resistenten Zellen sterben) kultiviert.

5.2.5.2 Transiente Transfektion von siRNA

Die RNA-Interferenz (RNAi) stellt eine wirkungsvolle und schnelle Methode zur gezielten post-transkriptionellen Beeinflussung von Zielgenen dar. RNAi ist ein evolutionär erprobter Mechanismus eukaryotischer Zellen, bei dem die Expression der Gene nach deren Transkription durch sogenannte *small interfering RNAs* (siRNA) supprimiert wird (Fire et al., 1998; Hutvagner and Zamore, 2002).

Alle siRNA-Transfektionen wurden mit dem OligofectaminTM Reagenz in Opti-MEM[®] I Medium laut Herstellerangaben durchgeführt. Bei der Kotransfektion von Plasmid-DNA (EffecteneTM) mit siRNA wurde ebenfalls auf FCS-haltiges Medium verzichtet.

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Die Durchflusszytometrie bietet zusammen mit der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS; *fluorescence-activated cell sorters*) die Möglichkeit, Zellen anhand von spezifischen Antigenen oder Fluoreszenzemissionen intrazellulärer Farbstoffe oder Reporter zu quantifizieren, zu unterscheiden und zu sortieren. Dabei werden die zu analysierenden Zellen z.B. mit einem spezifischen fluoreszierenden Antikörper gegen ein klassifizierendes Oberflächenantigen markiert und durch einen laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen Laserstrahl geführt. Aufgrund von charakteristischen Eigenschaften der Zellen wie der Größe, der Form, der Membranoberfläche und intrazellulären granulären Bestandteilen kommt es zu einer Streuung des Lichts. Diese Streuung wird von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht, engl. *forward scatter*, FSC) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht, engl. *sideward scatter*, SSC) Linse gesammelt und photometrisch detektiert. Das Vorwärtsstreulicht wird im Wesentlichen durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Anhand dieser Kriterien wird die gewünschte Zellpopulation ausgewählt und im Folgenden weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht.

5.3.1.1 Probenvorbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Die zu analysierenden Zellen wurden nach individueller Markierung zentrifugiert und in ca. 500µl MACS-Puffer aufgenommen. Um verklumpte Zellen aus der

Zellsuspension zu entfernen, wurde diese vor der Überführung in ein steriles FACS-Röhrchen durch ein Nylongitter gepresst. Das im MACS-Puffer enthaltene EDTA verhindert dabei eine spätere Zusammenlagerung der zu analysierenden Zellen.

5.3.1.2 FRET-basierte durchflusszytometrische Analyse der β -Lactamase Reporteraktivität

Die FRET-basierte Detektion der β -Laktamase Aktivität wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um Informationen über den Einfluss von p53 an der Stimulation der sense- und antisense-Promotoraktivität von L1 Fragmenten zu erhalten. Zum Nachweis des β -Laktamase Reporters wurde das GeneBLAzer™ System von Invitrogen verwendet, das sich durch den Einsatz von zwei Komponenten auszeichnet: (1) Das β -Laktamase Reporterogen. Dieses wird mit der zu untersuchenden Promotorsequenz fusioniert, so dass die Expression des *BLA*-Gens direkt mit der Aktivität des Promotors korreliert; (2) der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ermöglicht den Nachweis des β -Laktamasereporters. Die FRET-Reaktion vermittelt die Energieübertragung innerhalb des Substrats CCF2, was sich in einer Fluoreszenzemission bei 520nm äußert (CFP). Kommt es zur Expression der β -Laktamase, spaltet das Enzym das CCF2-Substrat. Infolge kann die FRET-Reaktion nicht mehr stattfinden und die Emission der Fluoreszenz lässt sich nun bei 447nm detektieren (CFP). Durch den Vergleich der blauen zu grünen Fluoreszenzverhältnisse mit einer Negativkontrolle sind eine quantitative Aussage über die Genexpression und der damit verbundenen Promotoraktivitäten möglich.

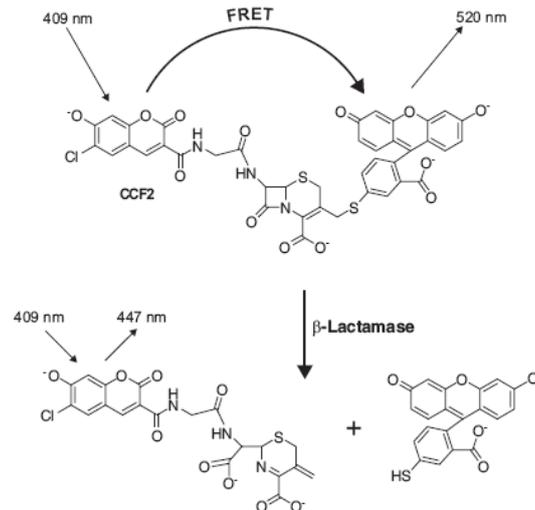


Abbildung 5.1: FRET-basierte Detektion der β -Laktamaseaktivität. CCF2 ist ein fluoreszierendes Substrat der β -Laktamase und setzt sich aus einem Cephalosporin-Kerngerüst, verknüpft mit zwei Fluorochromen, 7-Hydroxycoumarin und Fluorescein, zusammen. In Abwesenheit der β -Laktamase ist das Molekül intakt und die Lichtabsorption des Coumarin bei 409nm wird über das FRET-Prinzip auf das Fluorescein-Molekül übertragen. Dieser Energietransfer resultiert in der grünen Emission des Fluorescein bei 520nm. In Anwesenheit der β -Laktamase kommt es zur Spaltung des Substrats und damit zur Aufhebung des Energietransfers. Die Lichtabsorption des Coumarin bei 409nm resultiert nun in der Emission von blauem Licht bei 447nm, so dass anhand der Emission eine Trennung zwischen β -Laktamase positiven und β -Laktamase negativen Zellen möglich ist.

Zum Nachweis der sense und antisense Promotoraktivität wurden 1×10^4 F9-Zellen in 6-Well Platten ausplattiert und mit den zu untersuchenden Konstrukten transient transfiziert (siehe Abschnitt 5.2.5.1). Die Analyse der β -Laktamaseaktivität erfolgte 48h nach Transfektion laut Angaben des Herstellers. Für die FACS-Analyse der CFP- und YFP-Fluoreszenzen wurde ein 407nm Violett-Laser mit folgenden optischen Filtern verwendet: HQ460/50nm (blau) und HQ535/40nm (grün) Bandpassfilter.

5.3.1.3 Aldefluor® Assay

Der Aldefluor® Assay basiert auf dem durch Storms et al. entwickelten BODIPY-Aminoacetaldehyd (Storms et al., 1999) und ermöglicht die Isolation von Stammzellen und CSC (*Cancer Stem Cells*) anhand ihrer Aldehyddehydrogenase-Aktivität (zusammengefasst von (Marcato et al., 2011)).

Zum Nachweis von Aldefluor®-positiven Zellen wurde das Aldefluor®-Kit von STEMCELLS (Grenoble, Frankreich) laut Protokoll des Herstellers verwendet.

5.3.1.4 Nachweis und Isolation der *Side Population*

Die Drug-transportierende Eigenschaft von Stammzellen durch ABC-Transporter (*ATP Binding Cassette*) wird heute als ein wichtiger Marker für die Isolierung und Analyse von Stammzellen verwendet. Die meisten Zellen akkumulieren den fluoreszierenden Farbstoff Hoechst33342. Stammzellen sind aufgrund der Expression von ABCG2 (BCRP1, *breast cancer resistant protein*) in der Lage, den Farbstoffe aktiv aus der Zelle zu transportieren. Aufgrund dessen, dass sie diese Fluoreszenzfarbstoffe nicht akkumulieren, lassen sich Stammzellen (Goodell et al., 1996), die nur ein geringes Level an Hoechst33342-Fluoreszenz zeigen, von der übrigen Population an Hoechst-positiven Zellen im FACS trennen. Diese Zellen werden als sogenannte SP-Zellen (*side population*) bezeichnet. Der Ausdruck *side population* leitet sich daraus ab, dass sich diese Zellen während einer FACS-Analyse als nicht gefärbte, seitlich liegende Population neben einer Hauptpopulation an positiven Zellen im Dotplot Histogramm visualisieren lässt. Die H33342-Färbung wurde nach dem publizierten Protokoll durchgeführt (Goodell et al., 1996). Der H33342-Farbstoff wurde mit einem UV-Laser bei 350nm angeregt und die Emission mit einem 450/20 BP-Filter und einem 675 EFLP optischen Filter gemessen.

5.3.1.5 Färbung von intrazellulären Proteinen für die Zellsortierung

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurde die Intrazellulärfärbung zur FACS-Sortierung von p53-positiven und negativen Zellen eingesetzt. Dazu wurden 10^6 Zellen einer undifferenzierten (siehe Abschnitt 5.2.1) bzw. differenzierten (siehe Abschnitt 5.2.2) Kultur mit eiskaltem 80%igen EtOH fixiert, mit 0.5% BSA (10% EtOH) blockiert und das p53-Protein mit einem direkt-markierten polyklonalen Antikörper nachgewiesen. Die FACS-Sortierung der Zellen erfolgte bei 4°C in 10% EtOH/PBS. Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNA-Micro Kit (Qiagen) durchgeführt (siehe Abschnitt 5.5.2).

5.3.2 Zellkultur basierter Retrotranspositionsassay

Eine elegante Möglichkeit zum Nachweis von L1-Retrotranspositionseignissen wurde erstmals von Moran et al. beschrieben (Moran et al., 1996). Die Arbeitsgruppe entwickelte einen zellkulturbasierten Retrotranspositionsassay. Der Assay basiert dabei auf dem pJM101/L1_{RP} Vektor, der eine funktionelle Retrotranspositionskassette

beinhalten und sich von dem pCEP4-Vektor (Invitrogen) ableitet. Die Retrotranspositionskassette umfasst das zentrale humane L1-Element L1_{RP} (Kimberland et al., 1999; Schwahn et al., 1998) unter Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors. Zur Selektion von Retrotranspositionseignissen befindet sich innerhalb des pJM101/L1_{RP} ein Neomycin-Phosphotransferase Gen (Neo) unter Kontrolle eines zweiten CMV-Promotors. Dabei liegt der Selektionsmarker im 3'-UTR in umgekehrter Orientierung zum L1-Element. Zusätzlich ist das Neo-Gen durch das Intron 2 des γ -Globin Gens unterbrochen, welches wiederum in reverser Orientierung zum Neo-Gen angeordnet ist und eine erfolgreiche Prozessierung des Primärtranskripts verhindert. Kommt es innerhalb des Genoms zu einem Retrotranspositionseignis, also zu einer Transkription des gesamten L1-Elements, resultiert dies im Spleißen des Intron 2 des γ -Globin Gens. Durch eine reverse Transkription des L1-Transkripts und der Reintegration der gebildeten cDNA in das Genom der Zelle ist nun eine erfolgreiche Transkription der Selektionskassette unter Kontrolle des zweiten CMV-Promotors möglich. Damit sind Retrotranspositionseignisse über die G418-Selektion nachweisbar.

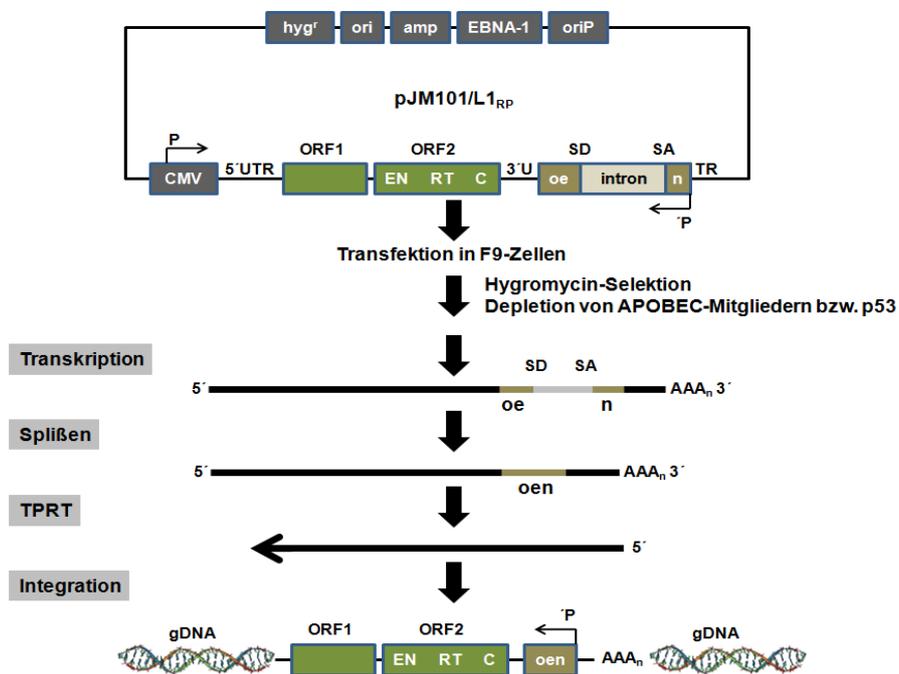


Abbildung 5.2: Mechanismus des Zellkultur basierten Retrotranspositions-Assays sowie dem prinzipiellen Aufbau des pJM101/L1_{RP} Konstrukts. Der pJM101/L1_{RP} Vektor wurde durch die Klonierung des humanen L1_{RP}-Element in den episomal replizierenden pCEP4-Vektor (Invitrogen) generiert. Dabei steht das Retrotranspositionselement unter Kontrolle des CMV-Promotors. Zur Detektion von Retrotranspositionseignissen dient die im 3'-UTR lokalisierte Neomycin-Kassette (Neomycin-Phosphotransferase Gen). Das Neo-Gen steht dabei ebenfalls unter der Kontrolle eines zweiten CMV-Promotors und liegt in antisense Orientierung zum L1_{RP}-Element. Allerdings ist die Translation des Neo-Gens ohne ein Retrotranspositionsevent nicht möglich, da dieses durch das in

sense zum L1-Element lokalisierte zweite Intron des γ -Globin Gens unterbrochen wird. Erst im Zuge der Retrotransposition, also der Transkription des L1-Elements, Prozessierung des Transkripts und der TPRT und Integration ist aufgrund des Spleißens des Introns eine funktionelle *Neomycin*-Resistenzkassette innerhalb der genomischen DNA die Konsequenz. Die nun resultierenden Transkripte des *Neo*-Gens sind translatierbar und führen zu einer funktionellen Neomycin-Phosphotransferase. Folglich korreliert die Retrotransposition mit der G418-Resistenz (Modifiziert nach (Moran et al., 1996)).

In Abhängigkeit des eingesetzten Plasmids wurden die zu transfizierenden Zellen unterschiedlich behandelt: (1) Im Falle des pJM101/L1_{RP} und pDB135-Konstrukts wurden die Zellen mit dem EffecteneTM Reagenz transfiziert (siehe Abschnitt 5.2.5) und mit Hilfe von Hygromycin B bzw. Puromycin 48h nach Transfektion über einen Zeitraum von 2 Wochen bis zur Etablierung einer stabilen Zelllinie selektioniert. Anschließend wurden die selektionierten Zellen trypsiniert (siehe Abschnitt 5.2.1), gezählt (siehe Abschnitt 5.2.3) und 1×10^4 Zellen/6-Well zur weiteren Kultivierung unter Selektionsdruck ausplattiert. Einen Tag nach dem Aussähen der Zellen wurden diese mit shRNA bzw. siRNA gegen verschiedene Apobec-Mitglieder und/oder p53 mit Hilfe des EffecteneTM bzw. OligofectamineTM Reagenz transfiziert. Als Kontrolle wurden Scr-Sequenzen verwendet. Zur Identifizierung von Retrotranspositionseignissen wurden die Zellen 24h nach Transfektion mit G418 selektioniert und bis zu 10 Tage unter Selektionsdruck kultiviert. Die resultierenden Klone wurden mit PBS gewaschen und mit 1ml Kristallviolett für 20min. gefärbt, mehrmals gewaschen, getrocknet und zu Dokumentationszwecken eingescannt. (2) Hingegen der aufwendigen Selektion stabiler Klone nach pJM101/L1_{RP} Transfektion wurden die Zellen nach L1_{RP}-GFP Transfektion nicht selektioniert (Austausch der *Neo*-Genkassette gegen die *GFP*-kodierende Sequenz). Die Transfektion des Konstrukts erfolgt direkt mit der Kotransfektion der shRNA bzw. siRNA in 6-Well Platten. Durch die visualisierbare Fluoreszenz des GFP-Reproterkonstrukts, welches nach einem Transpositions-Event detektierbar ist, erfolgte die Auswertung nach Trypsinierung der Zellen bereits 24h-72h nach Transfektion durch die Durchflusszytometrie.

5.3.3 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz ermöglicht den Nachweis von zellulären Proteinen mit Hilfe von Antikörpern (Primärantikörper) und wurde zum Nachweis des p53-Proteins genutzt. Alle Arbeitsschritte wurden wie publiziert

durchgeführt (Brazdova et al., 2009; Hartig et al., 1998) und die Färbungen mithilfe der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) aufgenommen (Brazdova et al., 2009). Die digitalen Aufnahmen wurden mit Hilfe der LSM-Software ausgewertet. Die Rohdaten der Bilder wurden in die Huygens Essential Software (Version 2.7.2p0, Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, NL; <http://www.svi.nl>) exportiert, um die Dekonvolution unter Anwendung des *Maximum Likelihood Estimation* (MLE) Algorithmus durchzuführen. Die dekonvoluierten Daten wurden dann mit Hilfe des Imaris Software Pakets (Version 4.1.3, Bitplane AG, Switzerland; <http://www.bitplane.com>) bearbeitet (Tonwertkorrektur inkl. Schwellenwertanpassung und Gammakorrektur) und 3D-rekonstruiert.

5.3.4 Markierung der Zellen mit den visualisierbaren Farbstoffen Dil und CFSE

Sowohl CFSE als auch Dil (Invitrogen, Karlsruhe) wurden im Rahmen der Arbeiten zum Nachweis und zur Unterscheidung von proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen eingesetzt. Die Markierung der Zellen erfolgte laut Protokoll des Herstellers.

5.4 Biochemische Arbeiten

5.4.1 Herstellung eukaryotischer Zelllysate

Adhärent wachsende Zellen (80-90% Konfluenz) wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend nach Zugabe von 500µl kaltem PBS auf Eis vorsichtig mit einem Kunststoffschaber abgeschabt. Für den Nachweis phosphorylierter Proteine erfolgte das Abschaben mit PBS+Phosphataseinhibitoren (siehe Material, Western Blot-Phosphataseinhibitoren). Danach wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1000xg in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert, mit PBS gewaschen, der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in Trockeneis/Ethanol schockgefroren. Für die proteinbiochemische Analyse wurde das Zellpellet in 1 Volumen 2x SDS-Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol resuspendiert, mit Benzonase[®]-Endonuklease (100U) versetzt, 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 5 Minuten aufgekocht. Für eine absolute Quantifizierung von Proteinproben ist eine Bestimmung der Proteinkonzentration erforderlich. Aufgrund des störenden Einflusses von SDS und Bromphenolblau bei der Bradford-Analyse (siehe Abschnitt 5.4.2) kam anstelle des SDS-Probenpuffers ein alternativer NP-40 Lysepuffer zum Einsatz.

5.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde über die Bradford-Analyse durchgeführt (Bradford, 1976). Dazu wurde das Bradford-Reagenz 1:5 mit Milli-Q Wasser verdünnt, so dass für jede zu messende Probe ein Volumen von 1ml zur Verfügung stand. Die BSA-Eichgerade wurde ausgehend einer BSA-Stammlösung zwischen 0 und 10µg BSA angesetzt und mit 1ml des verdünnten Bradford-Reagenz in einer Einmalküvette versetzt. Analog wurde mit 2µl der Proteinprobe vorgegangen. Nach einer 5 minütigen Inkubation im Dunkeln wurden die BSA-Verdünnungen spektralphotometrisch gemessen und anschließend die unbekannt Proteinproben anhand der Standardreihe bestimmt.

5.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch den Einsatz der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine unabhängig der Nettoladung nach ihrer Masse auftrennen (Laemmli, 1970). Nach Denaturierung der Proteine in SDS-haltiger Lösung und Reduktion der Disulfidbrücken, bindet sich proportional zur Masse des Polypeptids eine bestimmte Anzahl SDS-Anionen an das Protein. Dadurch ist die Nettoladung des Komplexes aus Protein und SDS unabhängig von der Eigenladung des Proteins, so dass die Trennung im elektrischen Feld überwiegend nach der Masse erfolgt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Protein-SDS-Komplexe im elektrischen Feld ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der molekularen Masse des Proteins. Die denaturierten Proteine wandern in einem elektrischen Feld durch ein Polyacrylamid-Netzwerk mit konstanter Porengröße. Die Polymerisation dieses Netzwerkes unter der Kontrolle des Quervernetzlers N,N'-Methylenbisacrylamid erfolgt durch Zugabe von Ammoniumperoxidsulfat (APS, Radikalbilder) und N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED, Radikalstabilisator).

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten kam eine vertikale Flachgel-Elektrophoreseapparatur zum Einsatz. Um eine gute Trennleistung der Elektrophorese zu erreichen, wurden die aufgetragenen Proteine, bevor sie in einem Trenngel separiert wurden, in einem Sammelgel fokussiert. Zu diesem Zweck wurde ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet, bei dem das Sammelgel eine geringere Acrylamidkonzentration und einen niedrigeren pH-Wert aufweist als das Trenngel.

Zur Herstellung der SDS-PAGE Gele wurde das SDS-Trenngel in die vorbereitete Apparatur bis ca. 3cm unterhalb des Randes der Glasplatte gegossen und für die Bildung einer scharfen Trennlinie mit 1ml Isopropanol beschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel bis zum Rand der Glasplatte gegossen und der Probenkamm luftblasenfrei in das Sammelgel eingebracht. Die Proben wurden bis zur gewünschten Konzentration in SDS-Lysepuffer verdünnt und mit einem Gesamtvolumen von 20µl auf das komplett polymerisierte Gel aufgetragen. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden 5µl eines Protein-Größenmarkers als Standard aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in einer Elektrophoreseapparatur mit SDS-Laufpuffer bei konstanter Stromstärke von 60mV (Sammelgel) bzw. 100mV (Trenngel).

5.4.4 Western Blot Analyse

Unter Blotten versteht man den Transfer von Makromolekülen aus einem Gel auf eine immobilisierende Membran. Das Verfahren wurde für den Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulose eingeführt (Southern, 1975), der entsprechende Transfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel (Renart et al., 1979) wird Western-Blot genannt und elektrophoretisch im Tankblot durchgeführt (Towbin et al., 1992).

5.4.4.1 Quantitativer Western Blot

Beim quantitativen Western Blot erfolgt die Detektion von Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern über das Li-COR Odyssey Infrared Imaging Systems. Eine direkte Infrarot-Detektion ermöglicht dabei eine quantitative Analyse und eine breite lineare Dynamik. Dadurch lassen sich kleine und große Proteine ohne die Unsicherheit von Mehrfachbelichtungen auf dem gleichen Blot nachweisen. Die Detektion von infraroten Farbstoffen ist über zwei Laser möglich (Ex.: 680-700nm/780-800nm) und gewährleistet eine hocheffiziente, für zwei Proteine gleichzeitig anwendbare und exakt quantifizierbare Technik.

Für das Blotten wurde eine PVDF-(Polyvinylidenfluorid) Membran eingesetzt, die zuvor durch eine 1 minütige Inkubation mit Methanol aktiviert wurde. Alle anderen Komponenten, mit Ausnahme des SDS-Gels, wurden für einige Minuten in Western-Blot Transferpuffer getränkt. Nach Äquilibration der Membran in Transferpuffer

wurde diese auf dem Proteingel platziert und beidseitig mit zwei Whatman-Papieren und einem Schwamm umlagert und in die mit Transferpuffer befüllte und auf Eis gekühlte Blot-Kammer überführt. Anschließend erfolgte der Transfer bei einer konstanten Spannung von 100V für 70 Minuten. Zum Blockieren freier Bindungsstellen auf der Membran wurde diese über Nacht mit einer Blockierlösung (5% w/v Magermilchpulver in TBST-Puffer) auf einem Orbitalschüttler bei 4°C inkubiert. Die Inkubation der Antikörper erfolgte für 2h in Blockierlösung. Soweit die nachzuweisenden Proteine unterschiedlicher Spezies waren, wurden unabhängig des Molekulargewichts grundsätzlich zwei Primärantikörper parallel inkubiert (z.B. das nachzuweisende Protein und das *housekeeping* Protein). Anschließend wurde die Membran dreimal für je 15 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und mit den in Blockierlösung verdünnten Sekundärantikörpern für 1h bei RT unter Lichtausschluss auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Die verwendeten Sekundärantikörper sind mit Infrarotfarbstoffen markiert (IRDye800CW bzw. IRDye680) und ließen sich dadurch über das Li-COR Odyssey Infrared Imaging System detektieren. Die Auswertung erfolgte dabei entweder anhand der Emissionswerte einer Standardkurve (absolute Quantifizierung anhand eines rekombinanten, FPLC-aufgereinigten p53-Proteins) oder relativ zur Emission eines parallel aufgetragenen „*housekeeping*“ Proteins (relative Quantifizierung).

5.4.4.2 Herkömmlicher Western Blot

Alle Arbeitsschritte bis zum Sekundärantikörper wurden analog zum quantitativen Western Blot durchgeführt (siehe Abschnitt 5.4.4.1). Die verwendeten Sekundärantikörper sind hingegen HRP-konjugiert (*Horse Radish Peroxydase*), die Detektion erfolgt über die Chemolumineszenz.

Die Chemolumineszenz- (ECL-) Methode basiert auf der Detektion von Lichtemissionen. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (Durrant, 1990). Nach der Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper wurde die Membran 1 Minute bei Raumtemperatur mit ECL-Lösung (10ml Lösung A + 10ml Lösung B) inkubiert und die Lichtemission durch Röntgenfilmentwicklung während einer Zeitspanne von Sekunden bis hin zu 20 Minuten im Dunkeln detektiert.

5.5 Allgemeine Molekularbiologische Arbeiten

5.5.1 Isolierung genomischer DNA

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurde die genomische DNA als Kontrolle zur Etablierung von ChIP-Primern und Klonierungszwecken verwendet. Dazu wurden 1×10^8 Zellen nach Trypsinieren (siehe Abschnitt 5.2.1) und Pelletieren einmal mit PBS gewaschen, das Pellet in 2ml Extraktionspuffer resuspendiert und bei 55°C für 2 Stunden inkubiert. Zur Entfernung von Proteinen und Zellbestandteilen erfolgte ein Proteinase K Verdau und eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Dabei wurde das Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) in einem Volumenverhältnis von 1:1 zugegeben, gevortext und bei $>11.000 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde die obere, wässrige und DNA-enhaltende Phase entnommen, in ein neues 1.5ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2 Volumen eiskaltem 100%igen Ethanol, 1/10 Volumen 3M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2) und 1µl 10µg/µl Glykogen gefällt. Nach 30minütiger Inkubation bei -80°C wurde die DNA durch Zentrifugation ($>11.000 \times g$, 10min., 4°C) pelletiert, mit 70% EtOH gewaschen und nach Trocknung in TE-Puffer resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des NanoDrop® (siehe Abschnitt 5.5.3).

5.5.2 Isolierung von RNA

Zur Isolierung zellulärer RNAs wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen laut Herstellerangaben verwendet. Die RNA-Isolierung beinhaltet dabei den optionalen DNaseI-Verdau. Die Elution erfolgte in einem Volumen von 30µl mit RNase-freiem Wasser, die Lagerung der RNA bei -80°C. Die Konzentration wurde mit dem NanoDrop® (siehe Abschnitt 5.5.3) bestimmt. Bei FACS-sortierten Proben wurde das RNeasy Micro Kit von Qiagen laut Herstellerangaben verwendet.

5.5.3 Quantitative Erfassung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration der isolierten RNA (siehe Abschnitt 5.5.2) wurde photometrisch über die Messung der Adsorption bei 260nm und 280nm am Spektrophotometer ND11000 (Nano Drop) bestimmt. Bei der Ermittlung der Reinheit sollte der Quotient der Adsorption zwischen 260nm und 280nm Werte oberhalb von 1.6 nicht überschreiten. Die Kalibrierung des Geräts wurde mit RNase-freiem Wasser

vorgenommen und der Blankwert mit DEPC-behandeltem Wasser eingestellt. Anschließend wurden 2µl der RNA-Lösung in den Messstrahl des Nano Drop pipettiert. Die Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration lässt sich anhand der Adsorptionswerte nach folgender Formel berechnen:

$$\begin{aligned}
 \text{cRNA} &= A_{260} \times F \times Y \\
 A_{260} &= \text{Adsorption bei 260nm} \\
 F &= 40 \mu\text{g für RNA}/50 \mu\text{g für DNA} \\
 Y &= \text{Verdünnungsfaktor}
 \end{aligned}$$

5.5.4 Reverse Transkription

5.5.4.1 Reverse Transkriptase Reaktion von Gesamt-RNA

Für die cDNA Synthese wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit™* von Applied Biosystems verwendet. Die cDNA-Synthese ist notwendig, um die Transkription einzelner Gene oder nicht-kodierender RNAs aus verschiedenen Zellproben mit Hilfe einer quantitativen PCR (siehe Abschnitt 5.5.7) vergleichen zu können. Für die reverse Transkription wurde 1µg der isolierten RNA in einem Gesamtvolumen von 10µl mit DEPC-Wasser für die cDNA-Synthese eingesetzt. Das Gesamtvolumen der Reaktion inklusive Mastermix betrug 20µl und setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 5.2: Übersicht über die zur cDNA-Synthese benötigten Komponenten. Der zweifach konzentrierte Mastermix wurde separat angesetzt und 10µl des Mastermix mit 10µl der in DEPC-Wasser verdünnten RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt.

Komponenten	Volumen (µl)
10 X RT-Puffer	2
25 X dNTP-Mix (100mM)	0,8
10 X RT-Random Primer	2
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1
RNase-Inhibitor (20 U/µl, Fermentas)	1
RNase-free water (DEPC-Wasser)	3,2
RNA (1 µg/10µl in DEPC-Wasser)	10
Gesamtvolumen	20

Die Reverse Transkription wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Tabelle 5.3 fasst die Reaktionsbedingungen zusammen:

Tabelle 5.3: Reaktionsbedingungen der cDNA-Synthese

Parameter	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Zeit (min)	10 min	120 min	5 sec	∞

Um nach abgeschlossener cDNA-Synthese RNA zu entfernen, wurde ein RNase H Verdau durchgeführt. Die RNase H ist eine unspezifische Endoribonuklease und spaltet RNA-DNA Heteroduplexe. Der RNase H Verdau wurde für 20 Minuten bei 37°C mit 1U RNase inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch eine 10 minütige Inkubation bei 70°C.

5.5.4.2 Reverse Transkriptase Reaktion zur Analyse von Transkriptionsstartstellen und dem Nachweis von sense und antisense Transkripten

Zur Untersuchung des Transkriptionsstarts wurde die cDNA-Synthese mit einem genspezifischen Primer und einem P1Cap-CDS Primer mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits™* von Applied Biosystems durchgeführt (1). Zum Nachweis von genspezifischen sense und antisense Transkripten wurde das *ThermoScript™* RT-PCR-System von Invitrogen verwendet (2).

(1) Dabei bedient man sich der Eigenschaft der Reversen Transkriptase während der cDNA-Synthese beim Erreichen der 5'-Cap-Struktur des mRNA-Templates mehrere Cytosine an das 3'-Ende der resultierenden cDNA anzufügen. Diese Eigenschaft ist auf die intrinsische terminale Desoxynukleotidtransferase des Enzyms zurückzuführen. Die Sequenz des P1Cap-CDS Primers ist so synthetisiert, dass er am 3'-Ende drei Guanin-Basen aufweist, die mit den Cytosinen am 3'-Ende hybridisieren können. Diese Hybridisierung initiiert einen Templatewechsel und resultiert in der Inkorporierung des Oligonukleotids. Ergebnis der cDNA-Synthese ist eine cDNA mit der Sequenz des Oligonukleotids (P1Cap-CDS) am 3'-Ende (Chen and Patton, 2001). Zur Aufklärung von transkriptionellen Startstellen wurde ein zweiter, innerhalb des zu analysierenden Abschnitts liegender Primer für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die Volumina der entsprechenden Komponenten sind Tabelle 5.2 zu entnehmen, wobei die RT-Primer gegen 1µl des P1Cap-CDS und des spezifischen Primers ersetzt wurden (Endkonzentration: 5µM).

(2) Zum Nachweis von sense- und antisense orientierten Transkripten wurden die genspezifischen Primer in (+)- und (-)-Strang Orientierung für separate Reverse

Transkriptionen eingesetzt. Für die spätere Quantifizierung wurde der (-)-Strang *Gapdh*-Primer jeder Reaktion zugesetzt. Zu Beginn wurden 10µM der genspezifischen Primer mit der entsprechenden Orientierung, 1µg RNA und 10mM dNTP-Mix pipettiert und mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 12µl eingestellt. Zur Denaturierung der RNA und der Primer wurden diese in einem Thermocycler für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gebracht. Parallel wurde ein Master-Mix, bestehend aus 4µl 5xcDNA Synthese-Puffer, 1µl 0.1M DTT, 1µl RNaseOUT™ (40U/µl), 1µl DEPC-Wasser und 1µl ThermoScript™ RT (15U/µl) angesetzt und zu jedem cDNA-Ansatz pipettiert. Die cDNA-Synthese erfolgte für 45 Minuten bei 50°C-60°C. Terminiert wurde die Reaktion durch eine anschließende 5-minütige Inkubation bei 85°C. Zur Eliminierung der verbleibenden RNA wurden die Proben mit 1µl RNase H für 20 Minuten bei 37°C verdaut.

5.5.5 Bestimmung der RNA-Stabilität: Actinomycin D-Behandlung

Die Bestimmung der RNA-Stabilität wurde verwendet, um die Stabilität nicht-kodierender Transkripte zu analysieren. Dazu wurden Zellen in An- und Abwesenheit von Actinomycin D kultiviert. Actinomycin D ist ein zytotoxisches Antibiotikum, das durch Bindung an die DNA die RNA-Synthese inhibiert. Dadurch lässt sich die Stabilität der noch vorhandenen Transkripte untersuchen (Wu and Yung, 1994). Dazu wurde die RNA aus Actinomycin D behandelten bzw. unbehandelten Zellen über einen Zeitraum von 7 Stunden isoliert (0h/0.5h/1h/2h/3.5h/7h) (siehe Abschnitt 5.5.5), in cDNA umgeschrieben (siehe Abschnitt 5.5.4) und die Existenz der Transkripte nach PCR (siehe Abschnitt 5.5.6) gelelektrophoretisch nachgewiesen (siehe Abschnitt 5.6.2).

5.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion wurde 1983 von Kary Banks Mullis etabliert (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1985) und dient der *in vitro* Amplifizierung kurzer DNA-Sequenzen ausgehend von einer gegebenen DNA-Matrize. Die PCR-Reaktion basiert auf dem Einsatz sequenzspezifischer Oligonukleotidprimer, die in der Lage sind, unter bestimmten Temperaturbedingungen mit komplementären Bereichen einer DNA-Zielsequenz zu hybridisieren. Initialer Schritt einer jeden PCR-Reaktion ist die Denaturierung des

DNA-Templates (95°C), gefolgt von dem spezifischen Anlagern (Annealing) der sequenzspezifischen Primerpaare (ca. 60°C) und der spezifischen Amplifikation durch die hitzestabile *Taq* DNA-Polymerase während der Elongationsphase (72°C). Grundlage der spezifischen Amplifikation des Zielabschnitts der DNA ist der Einsatz von sequenz- und orientierungsspezifischen Oligonukleotidprimern, die bei einer definierten Temperatur mit den einzelsträngigen Zielsequenzen hybridisieren. Dabei lässt sich die individuelle Annealingtemperatur durch Subtraktion von 5°C der Schmelztemperatur berechnen. Die Schmelztemperatur wird wiederum durch die Konsensussequenz der Primer definiert und lässt sich formal unter Berücksichtigung der Wasserstoffbrückenbindungen wie folgt definieren (Wu et al., 1991):

$$\Sigma (2 \times A + 2 \times T + 4 \times G + 4 \times C) \text{ } ^\circ\text{C} = T_m \text{ in } ^\circ\text{C}$$

A - Anzahl der Adenosine

T - Anzahl der Thymidine

G - Anzahl der Guanosine

C - Anzahl der Cytosine

Um eine ausreichende Amplifikation der Zielsequenz zu gewährleisten, wird die PCR-Reaktion zyklisch wiederholt. Die nachfolgende Tabelle fasst das Reaktionsschema einer normalen PCR zusammen.

Tabelle 5.4: Thermisches und zeitliches Reaktionsschema einer PCR-Reaktion

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	95°C	10
Denaturierung	95°C	0.5
Annealing	T _m Primer	0.5
Elongation	72°C	0.5-2*
Termination	72°C	8
Abkühlung	4°C	∞

} **Repetition**
35-40 Zyklen

*Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Allgemein ist die relative Amplifikationsgeschwindigkeit der *Taq* DNA-Polymerase auf 500-1000bp/min definiert.

Das Volumen einer PCR ist variable (10µl-100µl) und richtet sich oftmals nach der individuellen Fragestellung. Für Klonierungszwecke (siehe Abschnitt 5.6) wurden meist mehrere 100µl Ansätze verwendet, für das PCR-basierte Screening von DNA-Plasmiden lag das Volumen nur bei 10µl. Für die meisten in dieser Arbeit zu

klärenden Fragestellungen wurde das PCR-Volumen standardmäßig auf 50µl begrenzt. Die Menge an Ausgangs-DNA (Template-DNA) ist ebenfalls variabel (0.1-1ng), wohingegen die Primer mit einer definierten Endkonzentration von 0.1mM eingesetzt wurden. Die Endkonzentration der dNTPs lag bei 0.2mM, die eingesetzte Menge der verwendeten Taq DNA-Polymerase bei 1U.

5.5.7 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die qPCR ermöglicht eine direkte und quantitative Erfassung der Genexpression. Im Gegensatz zur konventionellen Endpunkt PCR mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt hier die Detektion während der Amplifikation. Aufgrund dessen, dass die Amplifikation und Detektion in einem geschlossenen System stattfinden, lässt sich das Kontaminationsrisiko und der Zeitaufwand reduzieren. Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten kam das SYBR[®] Green I Detektionsprinzip (7500 Fast Real-Time PCR Gerät von Applied Biosystems) zum Einsatz, bei dem die Intensität der Fluoreszenz nach Bindung von SYBR[®] Green I (Absorptionsmaximum: 480nm, Emmisionsmaximum: 537nm) in die kleine Furche der dsDNA (dopplesträngige DNA) detektiert und gemessen wird (Simpson et al., 2000). Bei dieser Methode entfällt einerseits die kostenintensive Synthese und Markierung von sequenzspezifischen Sonden und sie ist universell einsetzbar. Andererseits lagern sich die Farbstoffe an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle, also auch an Primer-Dimere oder nicht-spezifische PCR-Produkte an und weisen deshalb nur eine geringe Spezifität auf. Aufgrund der Tatsache, dass aber jedes PCR-Produkt wegen der Länge und des individuellen GC-Gehaltes bei einer charakteristischen Temperatur schmilzt (denaturiert), lassen sich anhand der resultierenden Schmelzkurven verschiedene PCR-Produkte differenzieren. Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgt über die ermittelten Fluoreszenzdaten der linearen Amplifikationsphase (Fluoreszenz steigt hier proportional zum Amplikon). Eine entscheidende Bedeutung kommt dabei dem Ct-Wert ("*threshold cycle*") zu, der die Zyklenanzahl angibt, bei der es zum ersten Mal zu einem Anstieg der Fluoreszenz über das Grundrauschen kommt.

Zum Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen RNA-Isolaten nach cDNA-Synthese wurde die relative Quantifizierung zur Bestimmung des relativen Expressionsunterschieds verwendet. Die zu vergleichenden Proben wurden dabei anhand des konstitutiv exprimierten *housekeeping* Gens *Glycerinaldehyd-3-*

phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Die Sequenzen für die spezifischen Primer wurden mit Hilfe der Software CloneManager unter Verwendung bekannter Gensequenzen generiert oder aus einer Online-Datenbank (<http://pga.mgh.harvard.edu/cgi-bin/primerbank/>) entnommen. Die nachfolgende Tabelle fasst die Mengen- bzw. Volumenverteilungen der Einzelkomponenten für einen qPCR Ansatz zusammen. Das Gesamtvolumen eines jeden Ansatzes betrug 40µl; von diesem wurden pro Loch einer 96-Loch PCR-Platte 10µl pipettiert (Triplikate).

Tabelle 5.5: Mengen- bzw. Volumina der Einzelkomponenten für eine als Triplikat angesetzte qRT-Probe

Komponente (Endkonzentration)	Volumen (µl)
2x Power SYBR® Green PCR Master Mix	20
Autoklaviertes DEPC-Wasser	8
Primer A (100 nM)	4
Primer B (100 nM)	4
cDNA (0.5 ng)*	4
Gesamtvolumen	40

*Als Negativkontrolle (NTC=*no template control*) wurde anstelle der cDNA nur DEPC-Wasser eingesetzt und die Primerpaare des *housekeeping* Gens *Gapdh* verwendet.

Die nachfolgende Tabelle 5.6 gibt Überblick über das Reaktionsschema der qPCR:

Tabelle 5.6: Allgemeines Reaktionsschema der qPCR

	Schritt 1	Schritt 2*	Schritt 3**				
Temperatur (°C)	95	95	60	95	60	95	60
Zeit	10	15	60	15	60	15	15

*Schritt 2 wurde zyklisch zwischen 40-55mal wiederholt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte bei 60°C. **Schritt 3 diente der Ermittlung der Dissoziationskurve.

5.5.7.1 Datenanalyse der qPCR (relative Genexpression)

Die Auswertung der qPCR Daten wurde im Falle einer relativen Quantifizierung nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode durchgeführt (Livak and Schmittgen, 2001). Prinzip dieser Methode ist die Kalibrierung von Ct-Werten unterschiedlicher

Genexpressionszustände auf den Ct-Wert einer endogenen Kontrolle, so dass ein relativer Vergleich der Proben zueinander möglich wird. Als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet. Zunächst wird die Differenz der Ct-Werte des Zielgens und der endogenen Kontrolle GAPDH (ΔCt) für die zu vergleichenden Proben A und B gebildet:

$$\Delta\text{Ct (Probe A)} = \text{Ct (Zielgen in Probe A)} - \text{Ct (GAPDH in Probe A)}$$

$$\Delta\text{Ct (Probe B)} = \text{Ct (Zielgen in Probe B)} - \text{Ct (GAPDH in Probe B)}$$

Anschließend wird die Differenz dieser ΔCt -Werte gebildet ($\Delta\Delta\text{Ct}$):

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (Probe A)} - \Delta\text{Ct (Probe B)}.$$

Geht man davon aus, dass sich in dem nachfolgenden PCR-Zyklus in der exponentiell verlaufenden Amplifikationsphase das PCR-Produkt verdoppelt, lässt sich die Expression des Zielgen-Transkripts in Probe A relativ zu dem in Probe B als relative Expression $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ definieren.

5.6 Klonierungsarbeiten

5.6.1 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die spezifische Nukleotidsequenzen erkennen und diese hydrolysieren können (Meselson and Yuan, 1968; Nathans and Smith, 1975). Dabei resultiert die Hydrolyse in Abhängigkeit des Enzyms in „glatten“ oder „klebrigen“ Überhängen der verdauten DNA. Durch den Einsatz definierter Enzyme ist eine passgenaue Klonierung möglich.

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurden die FastDigest® Enzyme der Firma Fermentas laut Angaben des Herstellers eingesetzt. In der Regel wurden die verdauten Fragmente zur Isolierung und Überprüfung gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 5.6.2) oder im Falle eines Restriktionsverdaus nach Agarosegel (siehe Abschnitt 5.6.3) direkt über das NucleoSpin Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel laut Herstellerprotokoll aufgereinigt.

5.6.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Agarosegele werden zur Bestimmung der Größe von Nukleinsäuren, zur Kontrolle von PCR-Reaktionen (analytisches Gel) als auch zur Aufreinigung verdauter DNA-Fragmente für weitere Klonierungsschritte (präparatives Gel) verwendet. Bei der Elektrophorese nutzt man die negativen Ladungseigenschaften der DNA-Moleküle

aus, die sich in einem elektrischen Feld in Richtung Anode bewegen. Folglich ist die gerichtete Bewegung von kleineren Fragmenten schneller als die größerer Fragmente. Diese Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren ist dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare (Helling et al., 1974; Meyers et al., 1976).

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten kamen nur 1%ige Gele zum Einsatz. Die Agarose wurde in 1xTBE-Puffer verdünnt und der Ansatz in der Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgeköcht. Nach Auffüllen des verdunsteten Volumens mit DEPC-Wasser und dem Zusatz von 10µg/ml Ethidiumbromid wurde die Agaroselösung in eine Gelkammer gegossen. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und ermöglicht die spätere Detektion der DNA-Banden unter dem Einfluss von UV-Licht (Sharp et al., 1973). Dem Gel wurden Plastikämme mit variabler Taschenzahl und Volumen zugesetzt und der Ansatz bis zur vollendeten Polymerisation stehen gelassen.

Das erstarrte Gel wurde mit 1xTAE-Puffer überschichtet und mit DNA-Proben sowie 2-5µl DNA-Marker beladen. Die DNA-Proben wurden dabei mit 1/5 des Volumens mit 6xLadepuffer versetzt. Der Elektrophoreselauf erfolgte zwischen 60-100 Volt und 40mA. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht nachgewiesen und das Gelbild photographisch festgehalten.

5.6.3 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Nach dem Verdau von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen (siehe Abschnitt 5.6.1) oder der Amplifizierung von PCR-Fragmenten für die Klonierung wurde zur Auftrennung ein präparatives Agarosegel eingesetzt (siehe Abschnitt 5.6.2). Nach Gellauf wurden die nach Größe aufgetrennten Fragmente unter UV-Licht für die weitere Verwendung mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in 1.5ml Reaktionsgefäße überführt. Zur Isolation der ausgeschnittenen DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurde das NucleoSpin Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel laut Protokoll des Herstellers verwendet. Nach der Elution der DNA-Fragmente wurde die Konzentration mit Hilfe des NanoDrop® photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 5.5.3) und die Eluate für weitere molekularbiologische Schritte wie der Ligation verwendet. Die für die PCR-Klonierung nach der PCR mit Restriktionsschnittstellen generierten Fragmente wurden nach Gelextraktion verdaut (siehe Abschnitt 5.6.1) und zur Entfernung der Enzym- und Nukleinsäurereste mit

dem NucleoSpin Extract II Kit aufgereinigt. Nach Konzentrationsbestimmung (siehe Abschnitt 5.5.3) wurden diese für die nachfolgende Ligation eingesetzt.

5.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Als Ligation definiert man die enzymkatalysierte Verknüpfung zweier DNA-Fragmente unter Ausbildung einer terminalen Phosphodiesterbindung, katalysiert durch die Ligase (Ferretti and Sgaramella, 1981).

Die verwendete T4 DNA-Ligase wurde von der Firma Fermentas bezogen. Eine Einheit (Unit) des Enzyms katalysiert dabei den Austausch von 1nmol ATP in 20 Minuten bei 37°C. Damit ist es möglich, ca. 1nmol Donor-DNA mit der äquivalenten Menge der Rezeptor-DNA zu ligieren. Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden 4µl 5xLigase Puffer, Vektor-DNA (0.03nmol), Insert-DNA (0.1nmol) und 0.5U T4 DNA-Ligase in einem Endvolumen von 20µl in sterilem Wasser angesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C. Anschließend wurde die ligierte DNA in kompetente Bakterienzellen transformiert (siehe Abschnitt 5.1.2).

5.6.5 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Basierend auf der erstmals von Sanger publizierten Kettenabbruch-Reaktion durch den Einsatz von Didesoxynukleotiden (Sanger et al., 1992) werden auch heutige Sequenzierungen durchgeführt. Dabei werden in aller Regel keine Desoxynukleotide, sondern mit Fluoreszenzfarbstoffen versehene Nukleotide eingesetzt, welche eine schnelle und präzise automatisierte Sequenzierung ermöglichen. Alle Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma MWG Eurofins Operon (Ebersberg) durchgeführt, die Probenvorbereitung erfolgte nach Herstellerangaben.

5.6.6 Klonierung des pGL3-GFP Vektors

Die beschriebenen Klonierungstechniken (siehe Abschnitt 5.6.1-5.6.5) wurden im Rahmen der durchgeführten Arbeiten zur Klonierung verschiedener Vektorsysteme zur Detektion der SP- und ASP-Aktivität des 5'-UTRs von L1Md-A und L1Md-T Elementen verwendet. Dabei sollte das Vektorsystem zwei Kriterien erfüllen, (i) zum einen sollte es eine handhabbare Größe für eine erfolgreiche Klonierung aufweisen, (ii) zum anderen keine eukaryotischen Promotor- und Enhancersequenzen beinhalten, welche die Expression des Reports später beeinflussen könnten.

Hinsichtlich der definierten Kriterien wurden die Klonierungsarbeiten daher im Hintergrund des 4.8kb großen pGL3-Basic Vektors von Promega durchgeführt. Dafür wurde die *Luziferase*-kodierende Sequenz durch die Sequenz des fluoreszierenden Reporters *eGFP* (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) ausgetauscht. Das eGFP-Protein ist eine mutierte Form des GFP-Proteins und zeichnet sich durch eine bis zu 35-fach gesteigerte Fluoreszenz aus (Cormack et al., 1996). Erste Schritte bestanden daher in der Umklonierung des kommerziellen pGL3-Basic Vektors zum pGL3-GFP Plasmid. Als Quelle für die eGFP-kodierende Sequenz wurde der pEGFP-N2 Vektor von Clontech verwendet.

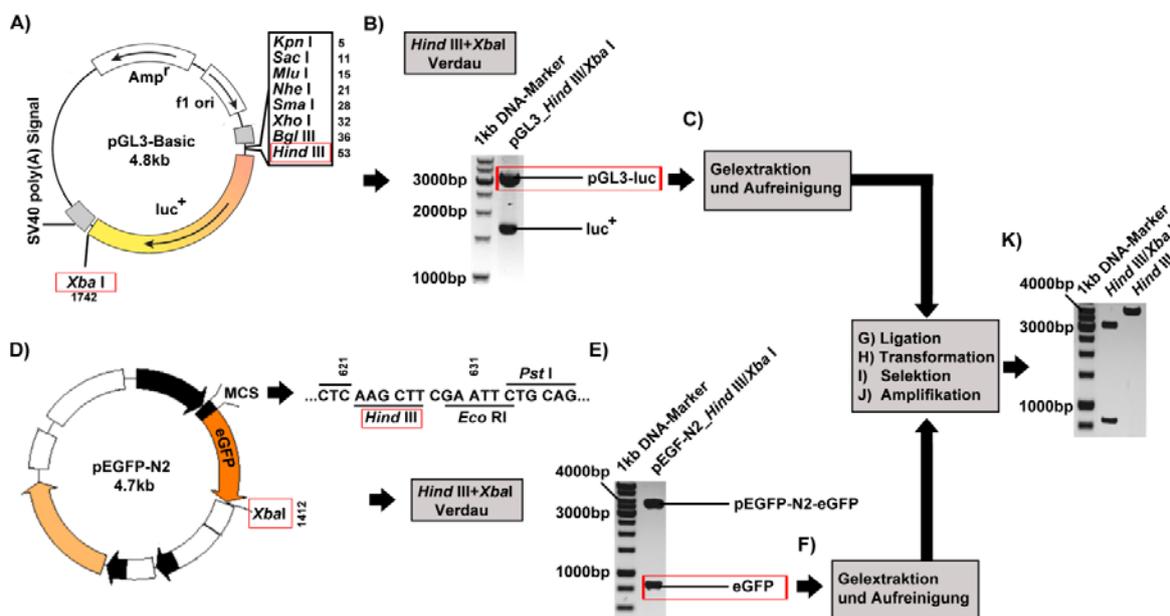


Abbildung 5.3: Konstruktion des pGL3-GFP Vektors. (A) Dargestellt ist die Plasmidkarte des pGL3-Basic Vektors (Promega), dabei ist die Darstellung auf die wesentlichen Details beschränkt (vollständige Plasmidkarte siehe Anhang 9.1.1). Zur Konstruktion des pGL3-GFP Vektors wurde die *Luziferase*-kodierende Sequenz mithilfe der FastDigest® (Fermentas) Restriktionsenzyme *HindIII* und *XbaI* (rote Kästen) ausgeschnitten. (B) Gelbild nach elektrophoretischer Auftrennung des verdauten pGL3-Vektors. (C) Durch Gelextraktion und Aufreinigung des pGL3-Fragments wurde ein kontaminationsfreies Fragment für die spätere Ligation gewonnen. Die Konzentration wurde mittels NanoDrop® (ThermoScientific) bestimmt und die Integrität des aufgereinigten Fragments durch ein quantitatives Gel kontrolliert (nicht dargestellt). (D) Zur Gewinnung der *eGFP*-kodierenden Sequenz wurde der pEGFP-N2 Vektor (Clontech) ebenfalls mit den FastDigest® Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* verdaut. Dargestellt ist die Plasmidkarte des Vektors, dabei ist die Darstellung auf die wesentlichen Details beschränkt (vollständige Plasmidkarte siehe Anhang 9.1.2). Hervorzuheben ist der skizzierte Ausschnitt der MCS (*Multiple Cloning Site*); nur wenige Basen aufwärts der *HindIII*-Schnittstelle ist eine *EcoRI*-Schnittstelle lokalisiert, die bei den späteren L1 5'-UTR Klonierungen zum Einsatz kam. (E) Gelbild nach elektrophoretischer Auftrennung des verdauten pEGFP-N2 Vektors. (F) Gelextraktion und Aufreinigung des eGFP-Fragments sowie Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop® (ThermoScientific) und Integritätstest des aufgereinigten Fragments durch ein quantitatives Gel (nicht dargestellt). (G) Aufgrund der identischen Restriktionsspaltungen wurden die aufgereinigten Fragmente über Nacht ligiert. (H) Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte anschließend in kompetente XL1blue *E.coli*-Zellen (*Escherichia coli*). (I) Zur Selektion positiver Klone

wurden diese auf ampicillinhaltigen (Amp) Agarplatte ausplattiert und über Nacht inkubiert. Antibiotika resistente Kolonien wurden gepickt und in Amp-haltigem LB-Medium über Nacht kultiviert. **(J)** Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte über eine Plasmid Minipräparation. **(K)** Zur Überprüfung des Klonierungserfolgs wurde der Vektor erneut mit *Hind* III und *Xba*I verdaut, sowie zur Überprüfung der Gesamtgröße mit *Hind*III linearisiert. Dargestellt ist das Bild der Fragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung nach Restriktionsverdau (Plasmidkarte pGL3-GFP siehe Anhang 9.1.3).

5.6.7 Klonierung der L1Md-A/T_5UTR-forward und -revers Vektoren zur Detektion der L1 5'-UTR SP und ASP Aktivität

In Folge der Umklonierung (Abschnitt 5.6.6) wurde ein Teil der *upstream* des *eGFP* lokalisierten MCS (*Multiple Cloning Site*) vom pEGFP-N2 Vektor in den pGL3-GFP Vektor eingebracht. Diese Sequenz charakterisiert sich durch eine nur einmal vorkommende *Eco*RI-Schnittstelle. Mithilfe dieser *Eco*RI-Schnittstelle und der bereits vorhandenen *Hind*III-Erkennungssequenz, wurden anschließend die den L1Md-Promotor beinhaltenden 5'-UTR Regionen in sense (Leserichtung parallel zu *eGFP*) und antisense Orientierung (Leserichtung entgegengesetzt zu *eGFP*) kloniert.

Zur PCR-Klonierung der 5'-UTR Regionen der L1-A und L1-T Familie wurden Primerpaare generiert, die den intakten L1-Promotor flankieren. Dabei wurde der *forward* Primer am Beginn der 5'-UTR Region mit Überlappung auf nicht-L1 gDNA (genomische DNA) gelegt und der *reverse* Primer am Beginn der ORF1-Sequenz platziert. Auf diese Weise ist gewährleistet, dass eine vollständige, funktionelle Promotorsequenz amplifiziert werden kann. Eine Schwierigkeit bei der Generierung von Primern bestand in der Anzahl vorkommender repetitiver L1-Sequenzen, die über das gesamte Genom verteilt sind. Trotz präzisen Designs der Primer war es nicht möglich, die gewählten 5'-UTR Regionen durch PCR aus gDNA von F9-Zellen zu amplifizieren. Um die Anzahl an störenden repetitiven Sequenzen zu minimieren, wurden BAC-Klone (*Bacterial Artificial Chromosome*) als Ausgangsmaterial zur Amplifikation gewählt, die den entsprechenden Abschnitt der gDNA beinhalten. Dazu wurden die generierten Primerpaare zur spezifischen Amplifikation der 5'-UTR Regionen der L1Md-A und L1Md-T Familie im Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) mithilfe der „Blat“-Funktion gleichzeitig mit den verfügbaren BAC-Klonen im murinen Genom dargestellt. Das Ergebnis des Line-Alignments im Genome Browser sowie die möglichen BACs sind in der nachfolgenden Abbildung schematisch dargestellt:

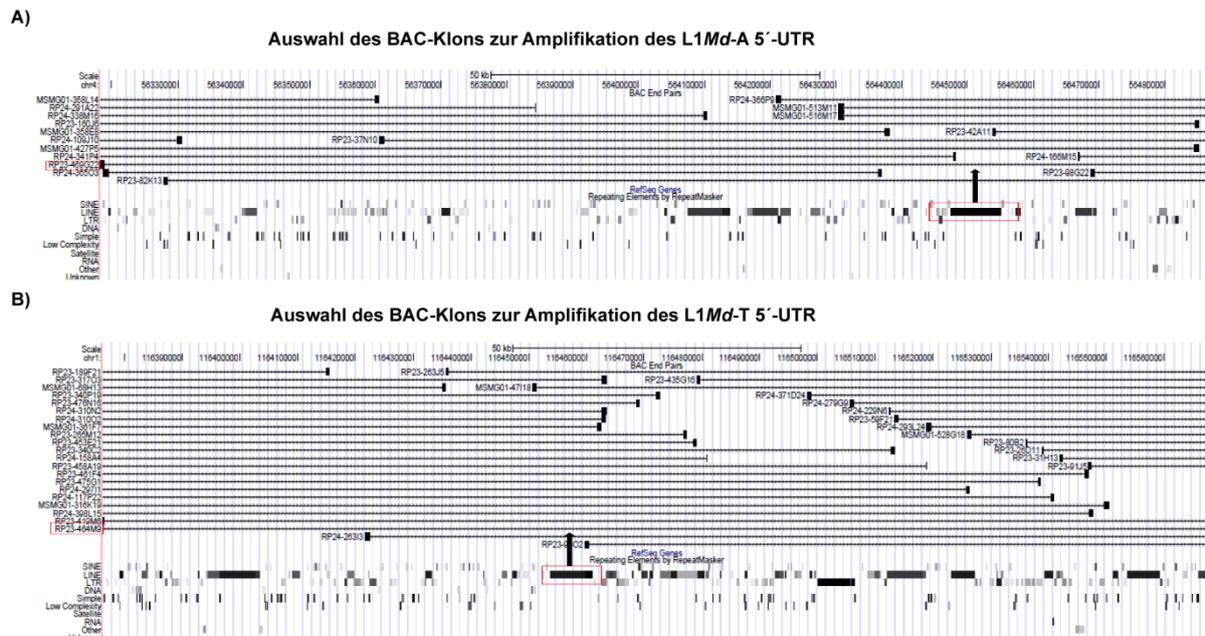


Abbildung 5.4: Darstellung des L1-Alignments im GenomeBrowser zur Auswahl geeigneter BAC-Klone für die L1Md 5'-UTR Amplifikation. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem Genome Browser. Die schwarzen Striche symbolisieren die passenden, die Sequenzen beinhaltenden BAC-Klone. **(A)** L1Md-A 5'-UTR Alignment. Als BAC-Klon wurde der RP23-469G22 Klon ausgewählt (ImaGenes: RPCIB731G22469Q; pBACe3.6). **(B)** L1Md-T 5'-UTR Alignment. Als BAC-Klon wurde der RP23-464M9 Klon ausgewählt (ImaGenes: RPCIB731M09464Q; pBACe3.6).

Mithilfe der BAC-Klone und der generierten Primerpaare war nun eine Amplifikation der L1Md-A bzw. -T 5'-UTR Bereiche über eine PCR möglich. Dazu wurden die generierten Primerpaare mit überhängenden, eine *Hind*III (cccAAGCTT-L1-Primer) bzw. *Eco*RI-Schnittstelle (cccGAATTC L1-Primer) beinhaltenden Nukleotiden modifiziert (die zusätzlich angefügten Nukleotide c_n gewährleisteten dabei eine >90%ige enzymatische Aktivität). Aufgrund der Anordnung der Schnittstellen in der Reihenfolge *Hind*III - *Eco*RI in der MCS des pGL3-GFP Vektors wurden je L1-Familie vier Primer eingesetzt, welche die gerichtete Ligation in sense- bzw. antisense Orientierung zum Reporter ermöglichten: L1Md-X *Hind*III/ L1Md-X *Eco*RI für die sense-Ligation, L1Md-X *Eco*RI/L1Md-X *Hind*III für die antisense Ligation im pGL3-GFP Konstrukt (X: L1-Familie-A oder -T). Die BAC-Klone wurden vorerst amplifiziert (siehe Abschnitt 5.1.3.3) und die L1-Zielsequenzen anschließend durch Verwendung der Primer mit Restriktionsschnittstellen über eine PCR-Reaktion gewonnen. Nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit *Hind*III und *Eco*RI wurden die 5'-UTR Regionen in entsprechender Orientierung abhängig der eingesetzten Primer in den pGL3-GFP Vektor ligiert. Das Resultat waren je L1-Familie zwei Konstrukte, die zur

Detektion der SP/ASP-Aktivität über die eGFP-Fluoreszenz verwendet wurden. Die detaillierten Klonierungsschritte sind in der nachfolgenden Abbildung zusammengefasst:

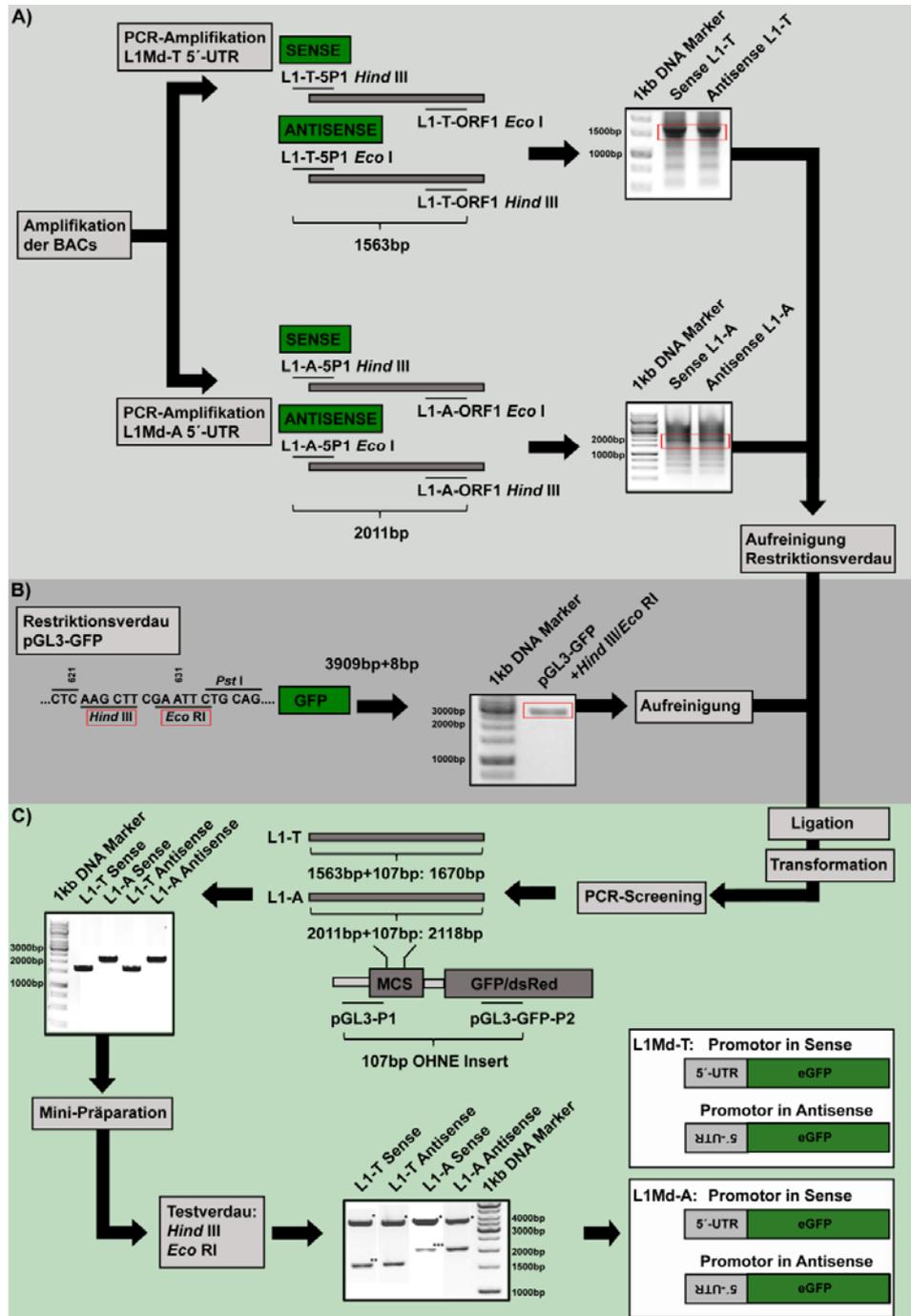


Abbildung 5.5: Übersichtsdarstellung zur Klonierung der L1Md 5'-UTR Regionen in das pGL3-GFP System zur Detektion der 5'-UTR SP- bzw. ASP-Aktivität. (A) Amplifikation der Zielsequenzen über PCR-Klonierung. Ausgehend von den amplifizierten BAC-Klonen (NucleoBond®BAC 100, Macherey-Nagel) wurde die BAC-DNA zur spezifischen Amplifikation der 5'-UTR Regionen der L1Md-T bzw. L1Md-A Familie über PCR verwendet. Dabei wurden für die spätere sense und antisense Klonierung je Familie zwei PCR-Reaktionen angesetzt. Für die sense Orientierung wurden die Primerpaare L1-T-5P1 *Hind*III/L1-T-ORF *Eco*RI und L1-A-5P1 *Hind*III/L1-A-ORF *Eco*RI eingesetzt.

Für die antisense Orientierung die Primer L1-T-5P1 *EcoRI*/ L1-T-ORF *HindIII* und L1-A-5P1 *EcoRI*/L1-A-ORF *HindIII*. Anschließend wurde der PCR-Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Banden mit den erwarteten Molekulargrößen über Gelextraktion isoliert (Gel Extraction Kit, Qiagen®). Die L1Md-T Fragmente (sense/antisense) hatten dabei eine erwartete Größe von 1563bp, die L1Md-A Fragmente (sense/antisense) von 2011 (siehe Gelbild; die entsprechenden Banden sind durch die roten Kästen markiert). Nach Aufreinigung der Banden aus dem Gel wurde die Konzentration photometrisch mithilfe des NanoDrop® (ThermoScientific) bestimmt und die Fragmente mit *HindIII* und *EcoRI* verdaut (FastDigest®-Enzyme, Fermentas). Die geschnittenen Fragmente wurden anschließend über eine Säule erneut aufgereinigt (Plasmid Purification Kit, Qiagen®). Die Integrität der Banden wurde über ein quantitatives Agarosegel überprüft. **(B)** Der pGL3-GFP Vektor wurde ebenfalls mit *HindIII* und *EcoRI* verdaut (FastDigest®-Enzyme, Fermentas); dabei wurde der Verdau zuerst nur mit *HindIII* gestartet und *EcoRI* erst nach 1 Stunde hinzugegeben. Dies war wichtig, da *HindIII* für eine >90%ige Aktivität einen Basenüberhang >3 benötigt. Durch den Kombinationsverdau mit beiden Enzymen wäre aufgrund der nur durch eine Base getrennten Schnittstellen (siehe Abbildung 5.2D) dies nicht mehr gegeben. Das *EcoRI*-Enzym arbeitet hingegen auch bei nur einer überhängenden Base mit einer >90%igen Aktivität. Der Verdau wurde elektrophoretisch aufgetrennt und die resultierende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (Gel Extraction Kit, Qiagen®) sowie die Konzentration photometrisch mithilfe des NanoDrop® (ThermoScientific) bestimmt. **(C)** Die verdauten 5'-UTR Fragmente aus (A) wurden mit dem aus (B) aufgereinigten Vektor ligiert. Nach Ligation über Nacht erfolgte die Transformation in kompetente X11blue *E.coli* Zellen. Zur Selektion positiver Klone wurde der Transformationsansatz anschließend auf ampicillinhaltigen (Amp) Agarplatte ausplattiert und über Nacht inkubiert. Antibiotika resistente Kolonien wurden gepickt und in einem PCR-basierten Screening elektrophoretisch analysiert. Durch die Wahl der Selektionsprimer pGL3-P1 und pGL3-GFP-P2 waren anhand der Fragmentgrößen erste Rückschlüsse auf ein positives Klonierungsereignis möglich. Durch die Auftragung der PCR-Ansätze konnten geeignete Zellklone für alle 4 Konstrukte identifiziert werden. Die analysierten Klone wurden erneut gepickt und zur abschließenden Kontrolle die Plasmid-DNA (NucleoBond®Mini Kit, Macherey-Nagel) nach über Nacht Inkubation in Amp-haltigen LB-Medium isoliert und mit *HindIII* und *EcoRI* verdaut. Nach elektrophoretischer Auftragung konnten die erwarteten Banden detektiert werden: *pGL3-GFP Fragment mit 3918bp; **L1-T sense bzw. antisense Fragmente mit 1563bp; ***L1-A sense bzw. antisense Fragmente mit 2011bp. Zur Amplifikation wurden alle klonierten Konstrukte als Maxi-Kultur angeimpft und die Plasmid-DNA nach Isolation (NucleoBond®Mini Kit, Macherey-Nagel) photometrisch mittels NanoDrop® vermessen. Eine schematische Übersicht der L1-5'-UTR Promotoren und deren Orientierung in Bezug auf das *eGFP*-Gen sind für die beiden L1-Familien zusammengestellt. Zur abschließenden Bestätigung der Korrektheit wurden alle klonierten Konstrukte sequenziert.

5.6.8 Klonierung des L1Md-T_Dab2 Vektors zur Detektion der L1 5'-UTR sense und antisense Promotoraktivität des individuellen L1-Elements

Der experimentelle Ablauf der Klonierung sowie die Klonierungsstrategie wurden analog der in Abschnitt 5.3/5.4 beschriebenen Klonierung der L1-A/T-5UTR-forward und L1-A/T-5UTR-revers Konstrukte gewählt. Die Klonierung des L1Md-T_Dab2 5'-UTRs ist nachfolgend grob zusammengefasst:

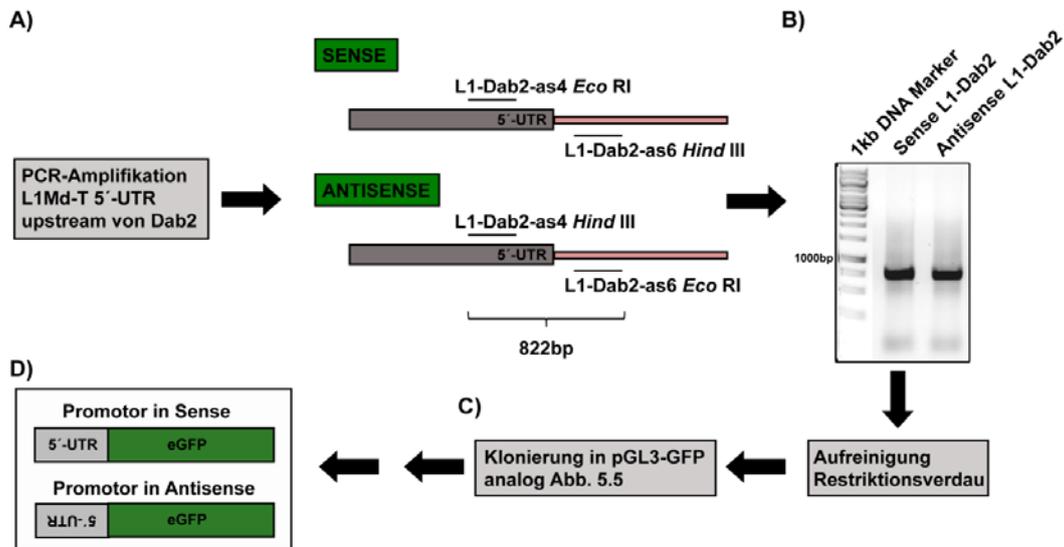


Abbildung 5.6: Klonierung des L1Md-T_Dab2 5'-UTRs in den pGL3-GFP Vektor zur Detektion der SP- und ASP-Aktivität. (A) Die Primer wurden so generiert, dass ein Primer innerhalb des L1-Elements, der andere in der intergenen Region *upstream* den 5'-UTR flankiert. Ausgehend von der genomischen DNA wurden die Primerpaare L1-Dab2-as4 *Eco*RI und L1-Dab2-as6 *Hind*III für die Klonierung in sense und die Primerpaare L1-Dab2-as4 *Hind*III und L1-Dab2-as6 *Eco*RI für die Klonierung in antisense verwendet. Die resultierenden Fragmente nach PCR-Amplifikation (B) wurden aufgereinigt, verdaut und anschließend in die ebenfalls geschnittenen Ziel-Vektoren kloniert (C). (D) Schematische Darstellung der klonierten Konstrukte: pGL3-GFP_L1Dab2-SP zur Detektion der L1 SP-Aktivität und pGL3-GFP_L1Dab2-ASP zur Detektion der L1 ASP-Aktivität.

5.7 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Mit Hilfe der ChIP kann die spezifische Interaktion von Proteinen und bestimmten DNA-Sequenzen nachgewiesen und analysiert werden (Solomon et al., 1988). Dafür ist die Kreuzvernetzung des Proteins mit dem Chromatin essentielle Voraussetzung. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Formaldehyd vernetzt kovalent exozyklische Aminogruppen und endozyklische Iminogruppen der DNA mit den α -Aminogruppen der Aminosäuren und den Stickstoffgruppen der Seitenketten von Lysin, Arginin und Histidin (McGhee and von Hippel, 1975a; McGhee and von Hippel, 1975b). Die ChIP wurde eingesetzt, um die transkriptionelle Transaktivierung von p53 in seiner Funktion als spezifischer Transkriptionsfaktor an ausgewählten Genen, den Status der Histonmodifikationen an bestimmten DNA-Abschnitten und die RNA-Pol II-S5 Phosphorylierung zu analysieren. Erste Arbeitsschritte bestanden daher in der Auswahl und Generierung spezifischer Primer. Das ChIP-Protokoll gliedert sich in mehrere grundlegende Schritte:

- 1) Kreuzvernetzung von Protein und DNA
- 2) Lyse der Zellen und Zerkleinerung des Chromatins
- 3) Aufreinigung der Protein/DNA Komplexe
- 4) Immunpräzipitation der Protein/DNA Komplexe
- 5) Elution der präzipitierten DNA und Auflösung der Vernetzung
- 6) Amplifizierung der immunpräzipitierten DNA-Fragmente
- 7) Spezifische PCR/ChIP-chip-Mikroarray

Für die Durchführung eines ChIP-Experiments wurden jeweils fünf dicht gewachsene 10cm Zellkulturschalen eingesetzt, um eine Zellzahl von etwa 1×10^8 Zellen zu gewährleisten. Pro Zellkulturschale wurde 1/10 des Gesamtvolumens frisch angesetzte 11%ige Formaldehydlösung pipettiert und die Kreuzreaktion nach einer Inkubationszeit von 10min durch die Zugabe von 1/20 Volumen 2.5M Glycinlösung gestoppt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 5ml kaltem PBS wurden diese mit Hilfe eines Silikonschabers auf Eis geerntet und bei 1.350xg für 5 Minuten und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach Resuspendieren in 10ml eiskaltem PBS durch Zentrifugation gewaschen (1.350xg; 5 Minuten; 4°C). Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellets in Trockeneis/Ethanol schockgefroren und optional bei -80°C gelagert.

Die Zellyse erfolgte in mehreren Schritten. Das Zellpellet wurde zuerst in 5ml Lysepuffer 1 (LB1) mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und bei 4°C für 10 Minuten auf einem Rollenschüttler inkubiert. Der Lyseansatz wurde durch Zentrifugation (1.350xg, 5 Minuten, 4°C) sedimentiert und das Pellets in 5ml Lysepuffer 2 (LB2+Protease-Inhibitoren) resuspendiert. Nach erneuter Inkubation für 10 Minuten auf einem Rollenschüttler bei 4°C wurde der Ansatz wieder zentrifugiert (1.350xg, 5 Minuten, 4°C). Danach wurde das Pellet in 3ml Lysepuffer 3 (LB3+Protease-Inhibitoren) resuspendiert, in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt und im Ultraschallgerät (Bioruptor UCD-200; Einstellungen: höchste Stufe, 30“ sonifizieren und 30“ Pause) für 15 Minuten sonifiziert. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde nach Sonifizierung 300µl 10% Triton-X-100 pipettiert und die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 20.000xg für 10 Minuten und 4°C sedimentiert. Die Protein/DNA-Komplexe befanden sich hingegen im Überstand. Vor der anschließenden Immunpräzipitation wurden 50µl Gesamtzellextrakt (WCE, *Whole Cell Extract*) für die spätere Vergleichsanalyse (Input) entnommen und bei -20°C gelagert.

5.7.1 Immunpräzipitation der Protein/DNA-Komplexe

Einen Tag vor der Immunpräzipitation wurde der entsprechende Antikörper an die mit Protein G gekoppelten Dynabeads gebunden. Alle nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden auf Eis in einem 4°C Kühlraum durchgeführt. Pro Antikörper wurden 100µl Dynabeads dreimal mit ChIP-Blockpuffer gewaschen. Dabei wurden sie mit 1ml ChIP-Blockpuffer vorsichtig gemischt und für 1-2 Minuten in einen Magnetständer gestellt. Nach der Bildung des Dynabead-Pellets wurde der Überstand mit einer Pipette entfernt und der Vorgang wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Dynabeads in 250µl ChIP-Blockpuffer resuspendiert und mit 10µg des Antikörpers über Nacht auf einem Rollschüttler bei 4°C inkubiert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne Antikörper nach dem gleichen Vorgehen hergestellt. Am Tag der Immunpräzipitation wurden die Dynabeads erneut dreimal mit 1ml ChIP-Blockpuffer gewaschen und in 100µl ChIP-Blockpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die präparierten Dynabeads zu den gewonnenen Lysaten gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Rollschüttler inkubiert.

5.7.2 Waschen, Elution und Auflösen der Vernetzung

Alle nachfolgend beschriebenen Waschschriffe wurden in einem 4°C Kühlraum durchgeführt. Die verwendeten Reaktionsgefäße und Puffer wurden vorgekühlt. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurden die Dynabeads vorerst siebenmal mit 1ml ChIP-Waschpuffer (RIPA) und anschließend mit 1ml TE-Puffer mit 50mM NaCl gewaschen. Anschließend wurden die Proben bei 4°C für 3 Minuten und 960xg zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die weiteren Elutionsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die präzipitierten Pellets wurden in 210µl Elutionspuffer aufgenommen und die Ansätze zur Elution 15 Minuten bei 65°C und 250rpm inkubiert. Danach erfolgte das Pelletieren der Dynabeads durch Zentrifugation bei 16.000xg für 1 Minute bei Raumtemperatur und die Entnahme von 200µl des Überstands und Überführung in ein neues 1.5ml Reaktionsgefäß. Zur Umkehrung der Quervernetzung wurden die Proben über Nacht bei 65°C inkubiert. Die eingefrorenen Gesamtextrakte wurden parallel aufgetaut, mit 150µl ChIP-Elutionspuffer versetzt und ebenfalls über Nacht bei 65°C inkubiert.

5.7.3 Verdau der zellulären Proteine und RNAs

Nach der Inkubation über Nacht wurden die Proben zur Entfernung restlicher RNA-Rückstände mit RNaseA verdaut. Zuvor erfolgte zur Verdünnung des SDS aus dem Elutionspuffer die Zugabe von 200µl TE-Puffer. Anschließend wurden 8µl 10mg/ml RNaseA (Endkonzentration: 0.2mg/ml) zu den Ansätzen pipettiert und der Verdau für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Dem RNaseA-Verdau folgte ein Proteinase K Verdau. Dazu wurden den Ansätzen 7µl CaCl₂ (300mM CaCl₂ in 10mM Tris pH 8,0) und 4µl 20mg/ml Proteinase K (Endkonzentration: 0.2mg/ml) zugegeben und diese für 30 Minuten bei 55°C inkubiert. Zur Sicherstellung, dass keine Proteinrückstände innerhalb der Präzipitationsproben zurückbleiben, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion angeschlossen. Dazu wurden 400µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol in jedes Reaktionsgefäß pipettiert und die Ansätze nach Durchmischung für 5 Minuten bei 16.000xg zentrifugiert, die wässrige Phase in ein 1.5ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 16µl 5M NaCl (Endkonzentration: 200mM), 1.5µl 20µg/µl Glykogen (Endmenge: 30µg) und 880µl EtOH die DNA gefällt. Der Fällungsansatz wurde 30 Minuten bei -80°C inkubiert, die DNA durch Zentrifugation (20.000xg, 10 Minuten, 4°C) pelletiert und mit 500µl 70%igem EtOH gewaschen. Die Trocknung des DNA-Pellets erfolgte im Heizblock bei 37°C für 10 Minuten. Danach wurde das Pellet in 70µl 10mM Tris-HCl (pH 8.0) resuspendiert, 15µl für spätere Verifikationen entnommen und die DNA-Konzentrationen der WCE-Proben photospektrometrisch mittels NanoDrop® (siehe Abschnitt 5.5.3) bestimmt und auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt.

5.7.4 Amplifikation der immunpräzipitierten DNA-Fragmente

Zur Amplifikation der ChIP-Proben kam der GenomePlex® *Complete Whole Genome Amplification* (WGA) Kit der Firma SIGMA zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um eine Methode zur Gesamtgenomamplifikation (WGA), die eine in etwa 500-fache Amplifikation der genomischen DNA-Fragmente ermöglicht. Diese Vervielfältigung basiert auf der zufälligen Fragmentierung genomischer DNA und der Umwandlung der resultierenden kleinen Fragmente in PCR-amplifizierbare OmniPlex® Bibliotheks-Moleküle, die sich durch flankierende, universelle Primersequenzen auszeichnen. Die PCR-basierte Amplifikation ist in ihrer Zyklenzahl auf den linearen Bereich reduziert und macht den Vergleich unterschiedlicher ChIP-Analysen in der folgenden

spezifischen qPCR möglich (Ng et al., 2008; Thorstenson et al., 1998). Ein weiterer Vorteil der Methodik ist die reduzierte Menge an DNA, die nur 10ng beträgt. Der WGA-Prozess lässt sich in den Fragmentierungsschritt, die Erstellung der OmniPlex-Bibliothek und die PCR-Amplifikation unterteilen.

Fragmentierung: Zur Fragmentierung wurden die ChIP-Proben auf eine Konzentration von 1ng/µl eingestellt, 1µl 10xFragmentierungspuffer zu 10µl ChIP-DNA pipettiert und der Ansatz im Thermocycler bei 95°C für 4 Minuten inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gekühlt und kurz abzentrifugiert. **Erstellung der Bibliothek:** Zu den fragmentierten ChIP-Ansätzen wurden 2µl Library Präparations-Puffer und 1µl Library Stabilisationspuffer pipettiert, die Proben gevortext, kurz zentrifugiert und 2 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis gekühlt, abzentrifugiert und mit 1µl Library Präparationsenzym versehen. Zum Abschluss der Library-Erstellung wurden die Tubes in den Thermocycler überführt und das folgende Temperaturprogramm verwendet:

16°C	20min
24°C	20min
37°C	20min
75°C	5min
4°C	halten

Nach kurzer Zentrifugation der Proben wurden diese auf Eis gelagert und die **PCR-Amplifikation** vorbereitet: Für jede zu amplifizierende Probe wurde ein Mastermix aus 7.5µl 10xAmplifikationsmastermix, 47.5µl nukleasefreiem Wasser und 5µl WGA DNA-Polymerase pipettiert und zu den auf Eis stehenden 15µl Proben gegeben. Die PCR wurde in einem Thermocycler mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	95°C für 3 Minuten
14 Zyklen PCR mit	
Denaturierung	94°C für 15 Sekunden
Annealing/Elongation	65°C für 5 Minuten

Nach der PCR wurde die DNA mit dem NucleoSpin® Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel laut Herstellerangaben aufgereinigt. Die Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrop® (ND1100) bestimmt (siehe Abschnitt 5.5.3). Die spezifische PCR der zu analysierenden präzipitierten DNA-Regionen wurde wie unter Abschnitt 5.5.6 beschrieben durchgeführt.

5.7.5 Analyse von ChIP-DNA auf einem Mikroarray (ChIP-chip)

Im Vergleich zu der spezifischen PCR (siehe Abschnitt 5.5.3) mit der ChIP-DNA ermöglicht der anschließende Mikroarray die Analyse der Bindung von Proteinen über einen großen genomischen Bereich. Die Messung bei der PCR konzentriert sich auf die Detektion eines Amplikon, mithilfe des Arrays lassen sich hingegen mehrere tausend bp lange Regionen gleichzeitig abdecken. Dabei wird die zu untersuchende Region durch 50bp lange DNA-Sonden abgedeckt. Die DNA-Fragmente nach ChIP werden durch Fluoreszenz markiert und anschließend auf den Array hybridisiert. Anschließend ist für jede Sondenposition die individuelle Fluoreszenz messbar; dabei korreliert die Zunahme des Fluoreszenzsignals direkt mit der Anzahl präzipitierter DNA-Fragmente. Dadurch lässt sich über das Fluoreszenzsignal direkt auf die Menge DNA-interagierender Proteine schließen. Aufgrund der benötigten Menge an DNA für die Hybridisierung auf dem Mikroarray wurde die über das WGA-Kit angereicherte DNA (siehe Abschnitt 5.7.4) reamplifiziert. Dazu wurden 10ng der WGA-amplifizierten DNA für die Reamplifikation eingesetzt. Die Reamplifikation wurde mit dem *WGA Reamplification Kit* der Firma Sigma-Aldrich® laut Herstellerangaben durchgeführt. Nach Amplifikation wurde die DNA mit dem NucleoBond Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel nach Protokoll des Herstellers für eine Aufreinigung von PCR-Fragmenten aufgearbeitet und am Ende in 50µl Elutionspuffer eluiert. Durch die folgende Zugabe von 2µl 5M NaCl (200nM final), 1.5µl 20µg/µl Glykogen (30µg total) und 125µl eiskaltem 100%igen Ethanol wurde die DNA durch mind. 30 Minuten Inkubation bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 20.000xg für 10 Minuten bei 4°C wurde das DNA-Pellet mit 1ml 70%igen EtOH gewaschen. Nach Trocknung wurde die DNA in 50µl H₂O resuspendiert und die Konzentration über den NanoDrop® bestimmt (siehe Abschnitt 5.5.3).

5.7.5.1 Design des NimbleGen 12x135k Custom Mikroarrays

Der NimbleGen 135k Array (OID35498) wurde entworfen, um 6266 genomische Intervalle abzudecken, die insgesamt 234 Protein-kodierende Gene und flankierende Regionen (mit einer Länge von 1kb) von 4.846 FL-L1-Elementen und 186 IAP-Sequenzen (intrazisternale A-Typ Partikel) beinhalten. Für die Auswahl der FL-L1- und IAP-flankierenden Regionen wurde ein Vorkommen an repetitiven Sequenzen unterhalb von 30% als Obergrenze gesetzt, um das Sondendesign zu ermöglichen.

Insgesamt sind 905 FL-L1-Sequenzen beiderseitig mit Sonden abgedeckt, 3.941 FL-L1-Sequenzen sind entweder auf der flankierenden 5'-Seite (2.755) oder 3'-Seite (1.186) mit Sonden abgedeckt. Die Koordinaten (mm9) der Protein-kodierenden Gene inklusive flankierender Regionen mit einer Länge von 1.500bp wurden aus der Biomart-Datenbank (<http://biomart.org>) gewonnen. Für 26 Gene wurden die Koordinaten so verlängert, dass sie Sequenzen zwischen benachbarten FL-L1-Elementen und dem Genbeginn beinhalten. 70 Gene beinhalten einfache oder multiple intronische FL-L1-Sequenzen. Der mittlere Probenabstand für diesen Custom-Array beträgt 111bp. 12 ChIP-Proben wurden auf einem 12x135k Array analysiert. Die Herstellung von 50-mer Oligonukleotidarrays, das Markieren der DNA, die Hybridisierung und die anfängliche Verarbeitung der Daten wurde von der Firma Source BioScience imaGenes (Berlin) durchgeführt.

5.7.5.2 Bioinformatische Analyse der NimbleGen 12x135k Custom Mikroarrays

Die Log₂-Ratio (Cy5-IP/Cy3-WCE) wurde mithilfe der NimbleScan Software (Version 2.6.0) eingestellt. Die NimbleGen GFF-Dateien wurden auf den GALAXY/IFOM IEO Server (Cesaroni et al., 2008) hochgeladen. Die Ergebnisse der ChIP-Replikate wurden durch die „*Bi-weight*“ Funktion für die Normalisierung verarbeitet und die gemittelten Werte für die Auswertungen verwendet. Die nicht-statistische Methode im PeakPicker-Tool wurde verwendet, um die Peaks zur Darstellung der ChIP-Anreicherung zu bestimmen. Die Annotation der identifizierten Peaks wurde durch das GALAXY-Tool umgesetzt. Die Datendarstellung erfolgte mit der *Integrative Genomics Viewer* (IGV) Software (Version 2) (Robinson et al., 2011).

5.8 Bioinformatik

5.8.1 Mappen von LINE1-Sequenzen im Mausgenom

Die genomischen Koordinaten von 35 Maus-LINE1-Familien (*Mus musculus* und Repeats der Vorfahren) wurden aus dem Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) der NCBI37/mm9 Mausgenom-Assemblierung gewonnen. Die 15.398 Elemente die länger als 5.000nt waren, wurden für die weiteren Analysen verwendet. Die Gen-Koordinaten von 22.463 Protein-kodierenden Ensemble-Genen und deren Annotation wurden aus der Biomart-Datenbank (<http://www.biomart.org>) durch Verwendung von Martview gewonnen und dann in die GALAXY-Software geladen

(<http://main.g2.bx.psu.edu/>) (Blankenberg et al., 2010). Das *GALAXY Interval Operation* Tool wurde verwendet, um die Überschneidung der Ensemble Genkoordinaten mit den L1-Koordinaten zu bestimmen. Überlappende Peaks von Intervallen (mit nicht weniger als 4.999nt) wurden annotiert und für weitere Analysen verwendet. Es wurde zwischen revers und korrekt orientierten FL-L1-Elementen in Bezug auf die TSS-Orientierung des Gens unterschieden.

5.8.2 Genexpression Mikroarray-Analyse

Die Gesamt-RNA aus undifferenzierten, differenzierten, Alde^{bright}- und Alde^{dim}-sortierten Zellen wurde isoliert und mit RNase-freier DNase I verdaut (siehe Abschnitt 5.5.2). Alle weiteren Arbeiten, wie die Markierung, Hybridisierung und Scannen der Arrays wurden von der Firma BioScience imaGenes (Berlin) durchgeführt. Die Mikroarray-Hybridisierung wurde auf Agilent *Two-Color Whole Mouse Genome Microarray 4x44K* Chips durchgeführt. Zur Identifikation der differenziell exprimierten Gene und zum hierarchischen Clustern dieser wurde die dChip-Software verwendet (<http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/>).

6. ERGEBNISSE

F9-Zellen sind embryonale Karzinomazellen und zeigen im undifferenzierten Zustand charakteristische Merkmale der inneren Zellmasse der Blastozyste (Sleigh, 1992). Aufgrund ihrer gut charakterisierten Differenzierbarkeit wurde die Zelllinie in einer Vielzahl von Publikationen zum Studium der frühen embryonalen Entwicklung eingesetzt (Lehtonen et al., 1989). Erst durch die definierte Zugabe von Induktoren (Strickland and Mahdavi, 1978) differenzieren die Zellen in parietales Endoderm. Dabei kommt es neben morphologischen Veränderungen während der Differenzierung auch zu einer Veränderung der Expression differenziell regulierter Gene (zusammengefasst von (Sleigh, 1992)). Wie einleitend beschrieben, eignen sich F9-Zellen als ideales Modell zur Untersuchung der Beteiligung des p53-Proteins und muriner L1-Elemente am Prozess der Differenzierung (siehe Einleitung 2.3). Das erste Kapitel dieser Arbeit befasst sich mit der funktionellen Charakterisierung des p53-Proteins in der F9-Kultur.

6.1 Analyse der p53-Expression im Vergleich zwischen undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen

In Folge der Behandlung mit Retinsäure und dbcAMP lässt sich die Differenzierung der F9-Zellen induzieren und es kommt neben phänotypischen Veränderungen auch zur Reduktion des p53-Proteins. Die Abnahme der p53-Proteinmenge wurde in der Literatur mit der Reduktion der verfügbaren p53-mRNA Menge und nicht mit einer verringerten Proteinstabilität beschrieben (Dony et al., 1985; Oren et al., 1982; Reich et al., 1983). Zur Validierung der Daten wurde der p53 mRNA-Spiegel mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR (qPCR) bestimmt (Abb. 6.1). Dafür wurden F9-Zellen auf mit Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen in An- und Abwesenheit beider Induktoren über einen Zeitraum von 72h kultiviert.

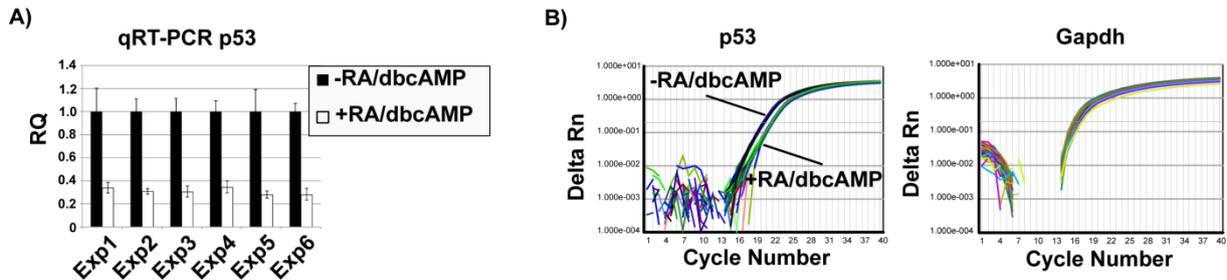


Abbildung 6.1: Quantifizierung der p53-Transkriptmenge im Vergleich zwischen differenzierten und undifferenzierten F9-Zellen. (A) Ergebnisse der qPCR-Analyse der p53-mRNA nach relativer Quantifizierung von sechs unterschiedlichen biologischen Proben. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* eingesetzt. Die Normierung der Proben erfolgte auf die p53-mRNA Mengen der jeweiligen undifferenzierten Zellen. RQ: Relative Quantifizierung. **(B)** Darstellung der aus der qPCR resultierenden Amplifikationskurven im Vergleich zwischen unbehandelten und 72h mit RA/dbcAMP behandelten F9-Zellen der *p53*- (links) und *Gapdh*-mRNA (rechts). Aufgetragen sind die Delta R_n -Werte gegen die Zyklenzahl.

Übereinstimmend mit den publizierten Daten kommt es im Verlauf der Differenzierung von F9-Zellen zur Reduktion der verfügbaren p53 mRNA-Menge. Dabei ist die Transkription des *p53*-Gens im Vergleich zu unbehandelten Zellen um den Faktor 3-5 nach RA/dbcAMP-Behandlung reduziert (Abb. 6.1A). Aus Abbildung 6.1B ist diese Abnahme anhand der Amplifikationskurven deutlich ersichtlich, wohingegen die *Gapdh*-Expression auch nach Differenzierung konstant bleibt. Um die p53-Reduktion auf Proteinebene zu testen, wurden Zelllysate undifferenzierter und differenzierter F9-Zellen gewonnen (siehe Abschnitt 5.4.1) und die p53-Proteinmenge anhand einer Standardreihe mit humanem rekombinanten p53-Protein im quantitativen Western Blot (qWB) analysiert.

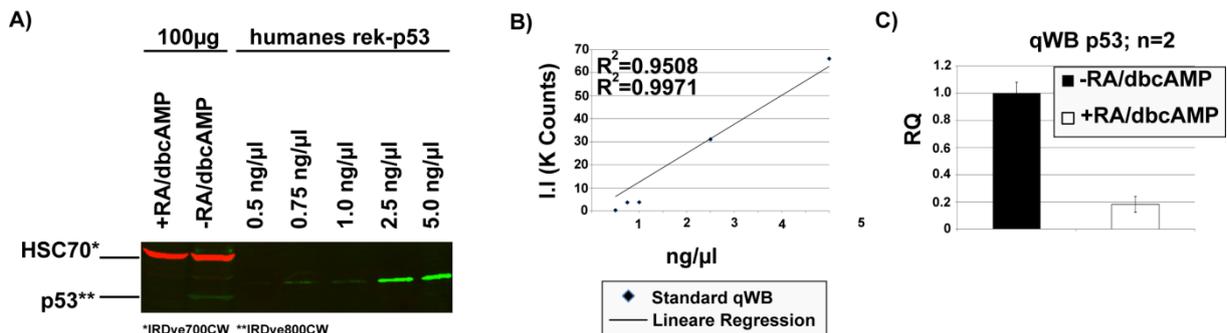


Abbildung 6.2: Quantifizierung des p53-Proteins im Vergleich zwischen differenzierten und undifferenzierten F9-Zellen. (A) Quantitativer Western Blot zur absoluten Quantifizierung von p53 anhand einer Standardreihe mit einem humanen rekombinanten p53-Protein. Aufgetragen wurden 100μg des Gesamtzell-extrakts aus zwei unabhängigen Experimenten. Das rekombinante p53-Protein wurde in einer Verdünnung von 5μg/μl-0.5μg/μl aufgetragen. Zum Nachweis des p53-Proteins wurde ein polyklonaler rabbit-anti p53-Antikörper verwendet. Zur Detektion im LI-COR Odyssey-System kam ein anti-rabbit gerichteter IRDye800CW-Sekundärantikörper zum Einsatz. Zur Normierung wurde das HSC70-Protein als *housekeeping* Protein mit einem polyklonalen goat-anti HSC70 und einem anti-

goat IRDye700CW-Sekundärantikörper nachgewiesen (n=2). **(B)** Darstellung der Standardreihe des qWB nach graphischer Auftragung der Messpunkte und Hintergrundsubtraktion. Aufgetragen sind die I.I K Counts (*Integrated Intensity*) gegen die Proteinmenge [ng/μl] des humanen rekombinanten p53-Proteins. R^2 gibt den Korrelationskoeffizienten nach linearer Regression an. **(C)** Graphische Darstellung der zusammengefassten Ergebnisse (n=2) im Vergleich zwischen undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen nach absoluter Quantifizierung anhand des humanen rekombinanten p53-Proteins und relativer Quantifizierung (RQ) durch Normierung auf das HSC70-Protein. Die Normierung erfolgte auf die Probe aus undifferenzierten F9-Zellen; t=72h.

Die Ergebnisse des qWBs zeigten ebenfalls eine deutliche Reduktion der p53-Proteinmenge nach RA/dbcAMP-induzierter Differenzierung (Abb. 6.2). So ließ sich eine mit der mRNA-Menge korrelierende Abnahme (vgl. Abb. 6.1A) der Proteinmenge um den Faktor 5 (Abb. 6.2C) nachweisen.

Aufgrund der relativ geringen Expression der p53-Zielgene *Cdkn1a* (Cyclin dependent kinase inhibitor, *p21^{Waf1/CIP1}*) und *Mdm2* (*murine double minute*) wurde ein inaktiver, latenter Zustand des nukleären p53-Proteins postuliert, der sich allerdings durch genotoxische Substanzen und Bestrahlung der Zellen revertieren ließe (Lutzker and Levine, 1996; Malashicheva et al., 2000; Mayo and Berberich, 1996; Zamble et al., 1998). Zur Prüfung der transkriptionellen Aktivierbarkeit von p53 wurden F9-Zellen daher mit den genotoxischen Substanzen Camptothecin, 5-Fluorouracil (5FU) und Doxorubicin behandelt, für die eine direkte oder indirekte Aktivierung des p53-Proteins beschrieben wurden (Bunz et al., 1999; Kaeser et al., 2004; Watcharasit et al., 2002; Yeh et al., 2004; Yeh et al., 2001). Dazu wurden undifferenzierte F9-Zellen über einen Zeitraum von 4h mit den Substanzen kultiviert und anschließend Proben in Anwesenheit von Protease- und Phosphataseinhibitoren gesammelt. Der Nachweis des aktivierten p53-Proteins erfolgte anhand der spezifischen Proteinphosphorylierung über den qWB. Analog zur human charakterisierten Ser-15 (Serin) Phosphorylierung im Zuge der transkriptionellen Aktivierung von p53 (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998), korreliert die Ser18-Phosphorylierung in der Maus mit der Aktivierung des Proteins (Chao et al., 2000). Zusätzlich wurde die p53-Proteinmenge nach Behandlung der Zellen bestimmt.

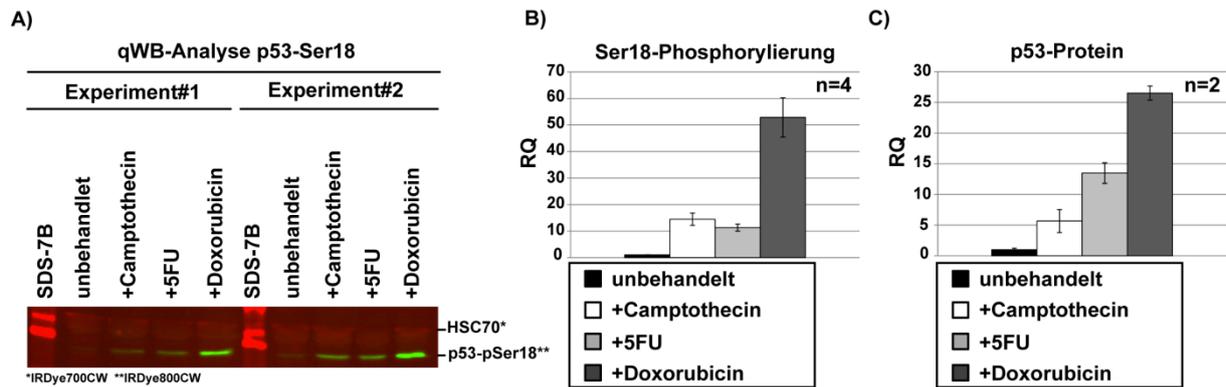


Abbildung 6.3: Nachweis der Ser18-Phosphorylierung von p53 nach Behandlung mit genotoxischen Substanzen. (A) Quantitativer Western Blot nach Detektion im Odyssey-System. Aufgetragen sind die Zelllysate aus unbehandelten und behandelten (10µM Camptothecin, 10µg/ml 5FU, 0.1µg/ml Doxorubicin) F9-Zellen. Der Nachweis des HSC70-Proteins erfolgte über einen fluoreszierenden IRDye700CW-Antikörper, der Nachweis des Ser18-phosphorylierten p53-Proteins über einen fluoreszierenden IRDye800CW-Antikörper. Dargestellt sind zwei unabhängige biologische Replikate (n=2). SDS-7B: Proteinmarker (Sigma-Aldrich®). Aufgetragen wurden 50µg Gesamtzelleextrakt. **(B-C)** Graphische Darstellung der relativen Quantifizierung (RQ) der Ser18-Phosphorylierung von p53 (B) und p53-Menge (C) anhand der HSC70-Proteinmenge und Normierung auf die Probe aus unbehandelten F9-Zellen.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen ließ sich eine signifikant gesteigerte Ser18-Phosphorylierung nachweisen (Abb. 6.3A). So nahm der relative Anteil an phosphorylierten p53-Molekülen nach Camptothecin-Behandlung um den Faktor 14, nach 5FU-Zugabe um den Faktor 10 und durch Doxorubicin sogar um den Faktor >50 zu (Abb. 6.3B). Damit resultierte die Behandlung mit genotoxischen Substanzen zwar in der erwarteten Zunahme der Ser18-Phosphorylierung, schließt aber nicht aus, dass der unter physiologischen Bedingungen ebenfalls zu erwartende geringere Anteil an p53-Protein eine transkriptionelle Aktivität besitzt. Zudem wirkte sich die Behandlung der Zellen auf die p53-Gesamtproteinmenge aus; so resultierte die Camptothecin-Behandlung in einer >5-fachen Zunahme des p53-Proteins, 5FU und Doxorubicin erhöhten die verfügbare Menge im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen sogar um das 14 bzw. >25-fache (Abb. 6.3C). Entgegen den Erwartungen ließen sich aber auch unter physiologischen Bedingungen in unbehandelten Zellen geringe Mengen an phosphoryliertem p53 nachweisen (Abb. 6.3A). Diese Ergebnisse deuten auf eine basale transkriptionelle Aktivität des p53-Proteins hin, wobei die Behandlung der Zellen mit genotoxischen Substanzen zu einer weiteren Aktivierung und Stabilisierung führt. Zwei Versuchsstrategien wurden gewählt, um diese mögliche basale Aktivität des Proteins in F9-Zellen nachzuweisen: (i) in Folge der RA/dbcAMP-induzierten Differenzierung kommt es zur Reduktion der

p53-Expression (siehe Abb. 6.1A); folglich sollte diese Abnahme auch mit der Reduktion der Expression der p53-Zielgene *Cdkn1a* und *Mdm2* korrelieren. Daher wurde die Expression beider Gene im Vergleich zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen über qPCR analysiert. (ii) Wenn das p53-Protein unter physiologischen Bedingungen transkriptionell aktiv ist, sollte es möglich sein, dessen Interaktionen mit den regulatorischen Regionen seiner Zielgene nachweisen zu können. Desweiteren sollten sich auch die Chromatinmodifikationen beider p53-Zielgene nach Differenzierung ändern.

Zur Untersuchung der Expression der p53-Zielgene *Cdkn1a* und *Mdm2* wurden RNA-Proben mithilfe der qPCR analysiert.

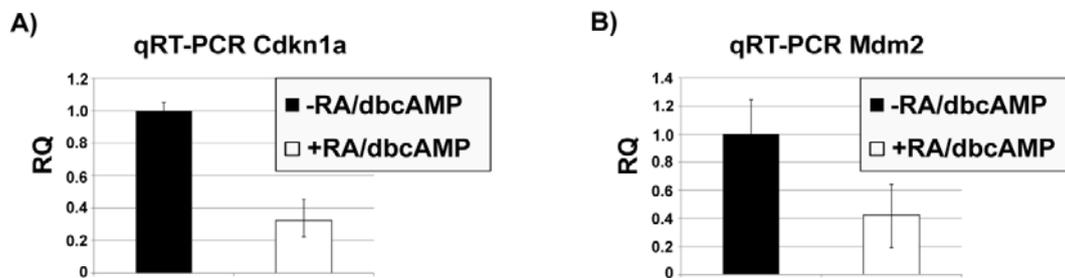


Abbildung 6.4: Untersuchung der p53-regulierten Gene vergleichend zwischen undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse der qPCR-Analyse der p53 regulierten Gene *Cdkn1a* (A) und *Mdm2* (B). Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet; n=2, t=72h.

Übereinstimmend mit den publizierten Daten (Lutzker and Levine, 1996) ließ sich in F9-Zellen anhand der RQ-Werte nur eine relativ schwache *Cdkn1a*- und *Mdm2*-Expression nachweisen. Vergleicht man allerdings die Transkriptmengen zwischen undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen, so resultierte die RA/dbcAMP-Behandlung der Zellen in einer um den Faktor 3 bzw. 2.5 reduzierten Expression von *Cdkn1a* (Abb. 6.4A) bzw. *Mdm2* (Abb. 6.4B). Diese Reduktion korreliert mit der transkriptionellen Abnahme von p53 (siehe Abb. 6.1A) und zeigt, übereinstimmend mit der Ser18-Phosphorylierung, eine funktionelle Aktivität des Proteins in undifferenzierten Zellen. Allerdings stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu publizierten Daten, die eine transkriptionelle Zunahme beider Gene nach Differenzierung beschreiben (Lutzker and Levine, 1996). Wie lässt sich diese Diskrepanz erklären? Bei lichtmikroskopischer Beobachtung von F9-Zellen zeigen sich deutlich variable Wachstumseigenschaften in Abhängigkeit der Anzahl an kultivierten Zellen, vor allem ein langsames Wachstum der zu dünn ausplattierten

Zellen. Sind die Zellen in einer zu geringen Dichte ausplattiert, gelingt keine erfolgreiche Expansion innerhalb von 72 Stunden. Es wäre also durchaus denkbar, dass eine zu geringe Zelldichte im zellulären „Stress“ resultiert, was zu einer Aktivierung des p53-Proteins und folglich gesteigerten *Cdkn1a*- und *Mdm2*-Expression führen könnte. Daher wurde die Expression beider p53-regulierter Gene nach Zelldifferenzierung in Abhängigkeit der Zelldichte analysiert.

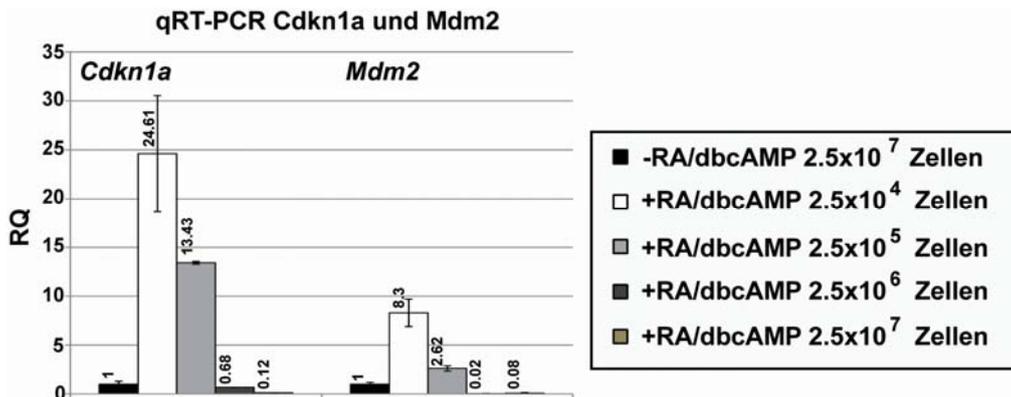


Abbildung 6.5: Analyse der zelllichteabhängigen Expression des *Cdkn1a*- und *Mdm2*-Gens im Vergleich zwischen undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen. (A) Dargestellt sind die Ergebnisse der qPCR-Analyse der p53 regulierten Gene *Cdkn1a* und *Mdm2* in Abhängigkeit der Zelldichte. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. Die Normierung erfolgte auf die Proben aus undifferenzierten Zellen (t=72h). Die Zellzahlen beziehen sich auf den Versuchsbeginn; durchgeführt in 10cm-Schalen.

Die zelllichteabhängige Analyse zeigte eine deutliche Varianz der *Cdkn1a*- und *Mdm2*-Expression nach Differenzierung. Übereinstimmend mit den in Abbildung 6.4 dargestellten Ergebnissen (1x10⁷ Zellen/10cm Platte) resultierte die RA/dbcAMP-Zugabe im Falle von 2.5x10⁶ bzw. 2.5x10⁷ Zellen pro 10cm Platte in der Abnahme der Expression beider Gene (Abb. 6.5). Auf der anderen Seite nahm sowohl die *Cdkn1a*- als auch die *Mdm2*-Expression bei geringeren Zellzahlen signifikant zu (Abb. 6.5). Diese Zunahme korrelierte mit der Anzahl eingesetzter Zellen: 24-facher bzw. 13-facher Anstieg der *Cdkn1a*-Expression bei 2.5x10⁴ bzw. 2.5x10⁵ Zellen, sowie eine 8-fache bzw. 3-fache Zunahme der detektierten *Mdm2*-Transkriptmenge bei 2.5x10⁴ bzw. 2.5x10⁵ Zellen pro 10cm Platte. Damit lässt sich der Widerspruch zu den publizierten Daten anhand der eingesetzten Zellzahlen erklären.

Um die Bindung von p53 an die DNA seiner Zielgene zu überprüfen, und um die Histonmodifikationen der *Cdkn1a*- und *Mdm2*-Genumgebung zwischen undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen zu vergleichen, wurden ChIP-chip

Analysen durchgeführt (siehe Abschnitt 5.7.5). Neben der p53-ChIP (Chromatin-Immunpräzipitation) von undifferenzierten Zellen wurden Antikörper zur Präzipitation von H3K4me3 (Histon H3, Lysin K4, Trimethylierung me3) und H3K27me3 (Histon H3, Lysin K27, Trimethylierung me3) aus undifferenzierten und RA/dbcAMP-behandelten Zellen eingesetzt. Die H3K4me3 wird vorrangig für aktiv transkribierte Promotoren und die Region um den Transkriptionsstart transkribierter Gene beschrieben (Ebert et al., 2006). Die Trimethylierung von Histon H3 Lysin 27 (H3K27me3) ist hingegen mit der transkriptionellen Repression verbunden (Ebert et al., 2006).

ERGEBNISSE

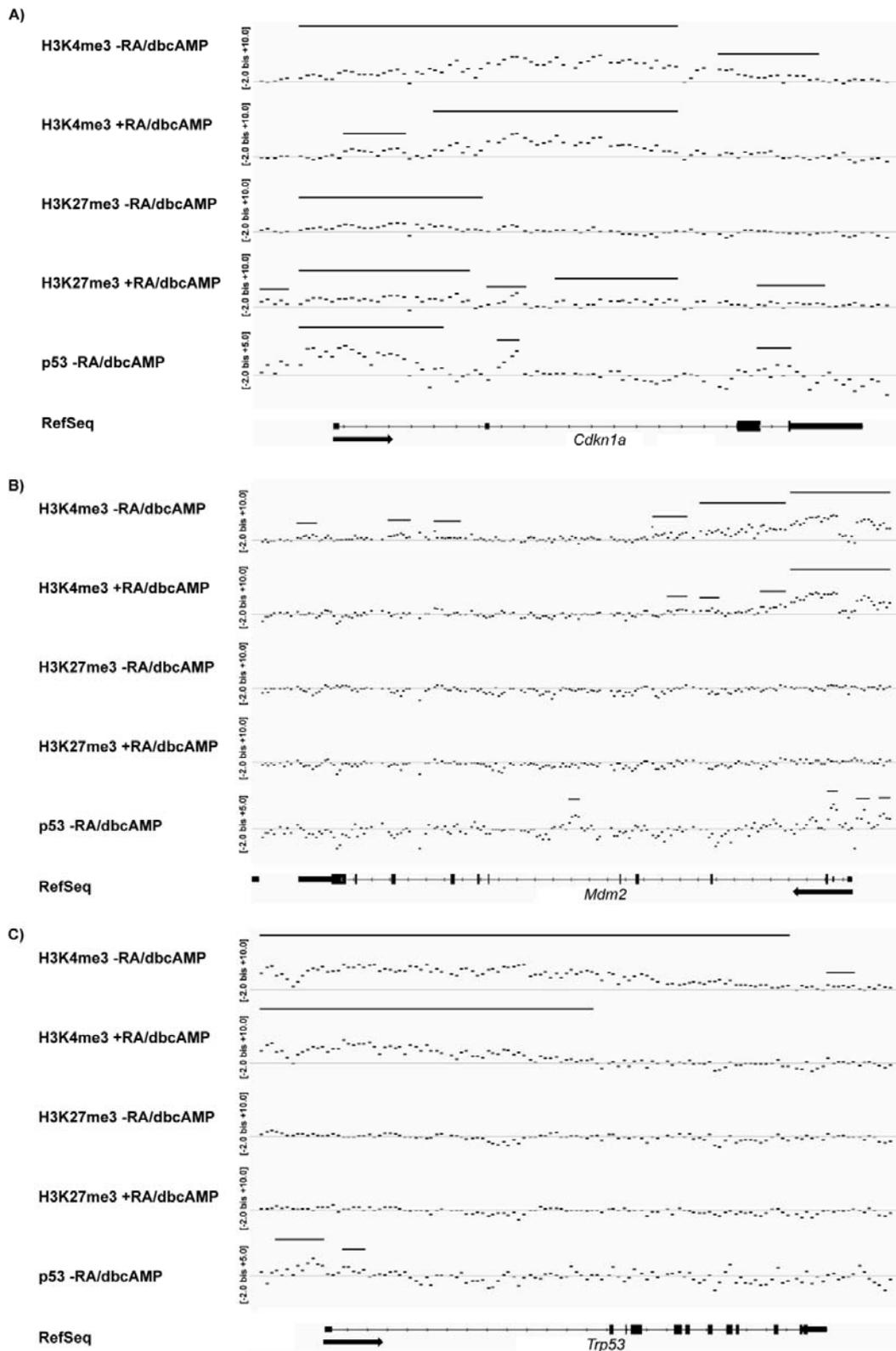


Abbildung 6.6: Untersuchung der Histonmodifikationen der p53-Zielgene *Cdkn1a* und *Mdm2* und p53-Bindung. Vergleich der H3K4me3 und H3K27me3 Histonmodifikationen zwischen undifferenzierten und RA/dbcAMP-behandelten F9-Zellen sowie der p53-DNA-Interaktion innerhalb des (A) *Cdkn1a*-, (B) *Mdm2*- und (C) *Trp53*-Gens (n=2). Dargestellt sind die einzelnen Messpunkte (Log₂-Werte) im Vergleich zur Input-DNA. Die Linien signalisieren die Existenz eines Peaks, die Linienlänge gibt die Länge des Peaks wieder. Die Transkriptionsrichtungen der Gene sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die ChIP-chip Ergebnisse zeigten eine deutliche DNA-Besetzung des p53-Proteins in der TSS-Umgebung des *Cdkn1a*- (Abb. 6.6A) und *Mdm2*-Gens (Abb. 6.6B). Darüber hinaus konnte auch eine p53-Bindung an die regulatorischen Sequenzen des eigenen Gens nachgewiesen werden (Abb. 6.6C). Übereinstimmend mit der abnehmenden Expression des *Cdkn1a*- und *Mdm2*-Gens (Abb. 6.4) nimmt die H3K4-Trimethylierung nach Differenzierung innerhalb des *Cdkn1a*-Gens deutlich ab, während die H3K27-Trimethylierung signifikant zunimmt (siehe Abb. 6.6A). Auch die H3K4-Trimethylierung am *Mdm2*-Gen scheint tendenziell nach RA/dbcAMP-Behandlung reduziert, eine H3K27-Trimethylierung ließ sich hingegen sowohl bei unbehandelten als auch differenzierten Zellen nicht nachweisen (Abb. 6.6B). Die Ergebnisse verdeutlichen die mit dem p53-Status korrelierende Genaktivität, zeigen aber auch, dass es im Verlauf der Differenzierung nicht zu einem kompletten Ausschalten der Genregionen kommt.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf die Funktionalität von p53 in undifferenzierten F9-Zellen hin: (i) geringe Mengen des Proteins sind am Ser18-Rest phosphoryliert, (ii) durch Behandlung mit genotoxischen Substanzen ist p53 weiter aktivierbar, (iii) die expressionelle Reduktion der verfügbaren p53-Proteinmenge nach Differenzierung korreliert mit der Abnahme der *Cdkn1a*- und *Mdm2*-Transkripte, und (iv) p53 bindet an die regulatorischen Sequenzen seiner Zielgene und an den eigenen Promotor.

6.2 Untersuchungen der zellulären Heterogenität von F9-Zellen

Im Verlauf der Differenzierung kommt es neben morphologischen auch zu einer Vielzahl transkriptioneller Änderungen. Die Agilent Mikroarray Genexpressionsanalyse (siehe Abbildung 6.11) zeigte eine mindestens 4-fache expressionelle Änderung in Folge der Differenzierung in 369 Genen. Als zuverlässige Marker der Differenzierung wurde die Expression von *Dab2* (*Disabled-2*), *Col4a1* und *Lama1* sowie *Egflam* (EGF-like, fibronectin type-III and laminin G-like domain-containing protein) (siehe Abschnitt 6.3/Abb. 6.11: Mikroarray-Daten) untersucht, dessen Expression im Rahmen der Differenzierung signifikant zunimmt. *Dab2* hat eine wichtige Funktion bei der Ausbildung des Endoderms (Morris et al., 2002; Yang et al., 2002) und der F9-Differenzierung (Prunier and Howe, 2005). Zur Validierung der durchgeführten Mikroarray-Analyse (siehe Abb. 6.11) wurde der zeitliche Zusammenhang der Regulation der Expression im Verlauf der Differenzierung

untersucht. Aufgrund der zellzahlabhängigen Regulation der p53-Zielgene *Cdkn1a* und *Mdm2* (siehe Abbildung 6.5) wurde auch die *Dab2*-Expression exemplarisch in Abhängigkeit der Zelldichte analysiert.

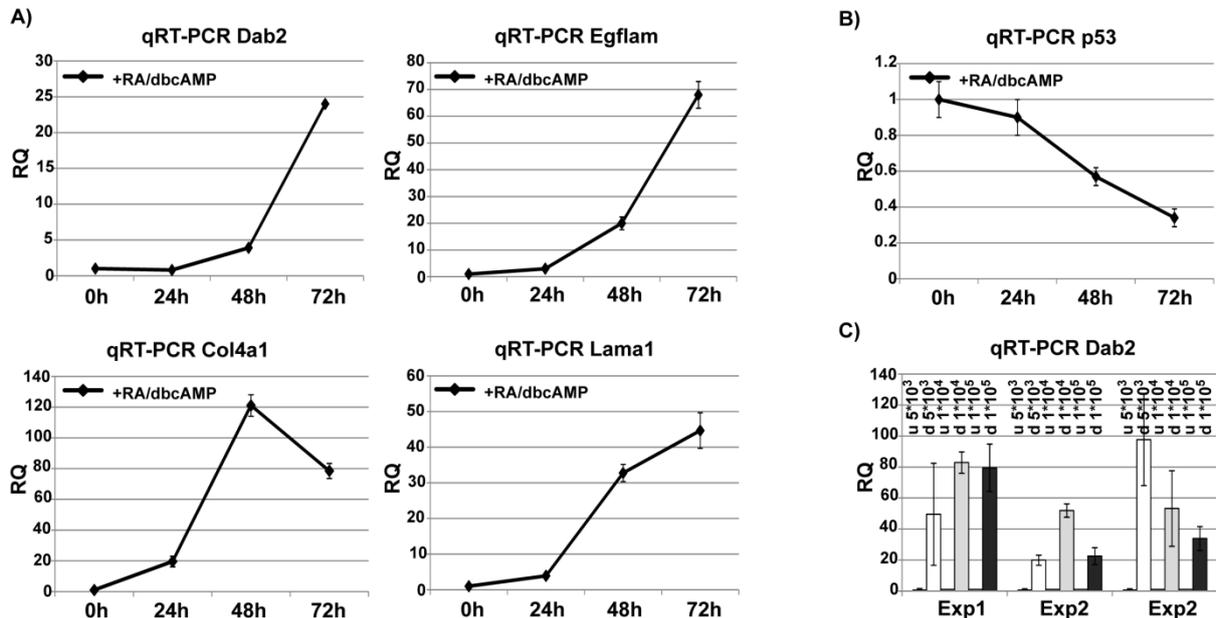


Abbildung 6.7: Validierung differenziell regulierter Gene im Verlauf der Zelldifferenzierung. (A) Dargestellt sind die Ergebnisse der qPCR-Analyse der differenziell regulierten Gene *Dab2*, *Egflam*, *Col4a1* und *Lama1* über die Zeit. Die Normierung erfolgte auf die Probe aus undifferenzierten Zellen (t=0h). (B) qPCR-Analyse der *p53*-Expression in Abhängigkeit der Zeit. (C) qPCR-Analyse der *Dab2*-Expression in Abhängigkeit der Zellzahl (n=3). Die Normierung erfolgte jeweils auf die Probe aus unbehandelten Zellen je Zellzahl. Als *housekeeping* Gen wurde in allen Experimenten *Gapdh* verwendet.

Die qPCRs konnten die Mikroarray-Ergebnisse bestätigen (Abb. 6.7A): die Zugabe von RA/dbcAMP resultierte in einer ca. 25-fachen Zunahme der *Dab2*-Expression, die Expression von *Egflam*, *Col4a1* sowie *Lama1* war sogar um den Faktor >65, >80 bzw. >40 hochreguliert. Der Vergleich der expressionellen Zunahme des *Dab2*- und *Egflam*-Transkripts mit dem des *p53*-Gens (Abb. 6.7B) zeigte eine gegenläufige Regulation. Dies könnte auf einen Zusammenhang der p53-Aktivität an der Regulation dieser Gene hindeuten. Die Ergebnisse der zell-dichteabhängigen *Dab2*-Expression (Abb. 6.7C) zeigten unterschiedlich starke Zunahmen der *Dab2*-mRNA. Bereits in den ersten Arbeiten über F9-Zellen wurde publiziert, dass nach RA/dbcAMP-Zugabe einige Zellen in der Lage sind, noch weiter zu proliferieren (Strickland et al., 1980). Um diese Eigenschaften der F9-Zellen zu untersuchen, wurden differenzierte Zellen (72h in Anwesenheit von RA/dbcAMP) in zwei unterschiedlichen Ansätzen mit den Farbstoffen CFSE (Carboxy-Fluorescein-

Diacetat-Succinimidyl-Ester) und Dil markiert und für weitere 72h ohne Induktoren kultiviert. CFSE gelangt dabei durch passive Diffusion in die Zelle. Durch die Spaltung der Acetat-Gruppen durch intrazelluläre Esterasen erfolgt die Umwandlung des Farbstoffs in seine fluoreszierende Form. Die Succinimidyl-Gruppen interagieren anschließend mit intrazellulären Amiden, was in der Ausbildung fluoreszierender Konjugate resultiert und eine stabile intrazelluläre Fluoreszenz zur Folge hat. Der lipophile Farbstoff Dil markiert hingegen durch laterale Diffusion die Plasmamembran der Zellen. Beide Farbstoffe sind nicht toxisch und werden in Folge der Zellteilung ausgedünnt. Damit eignen sie sich zur Unterscheidung zwischen proliferierenden und ruhenden Zellen (Lyons and Parish, 1994; Nose and Takeichi, 1986). Durch die Zellsortierung der positiven und negativen Populationen und der RNA-Isolierung wurden die Expressionen von differenzierungsregulierten Genen mithilfe der qPCR untersucht (Versuchsplan siehe Abb. 6.8A).

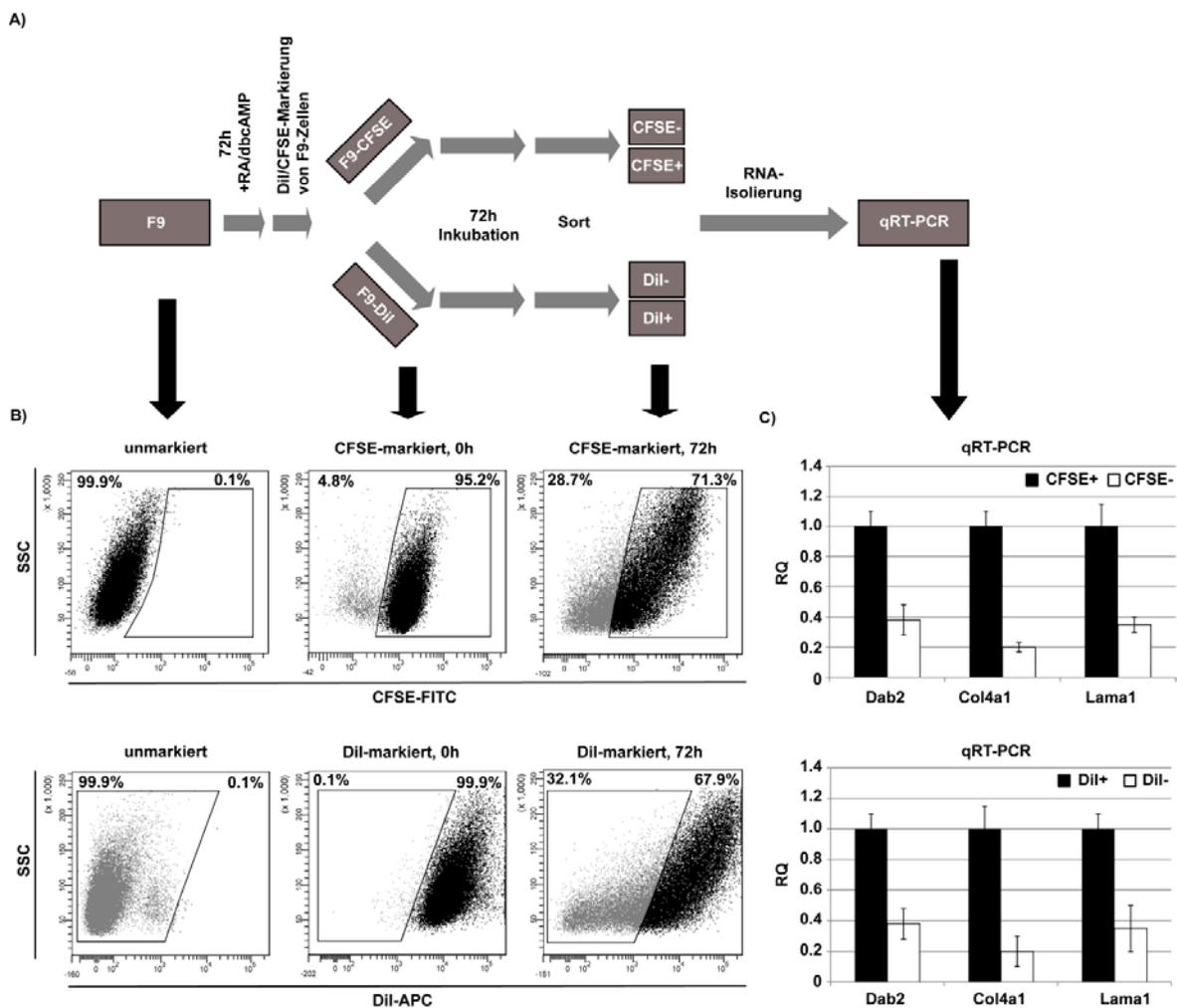


Abbildung 6.8: Untersuchung der Proliferation nach RA/dbcAMP-induzierter Differenzierung. (A) Schematische Übersicht über die gewählte Versuchsstrategie: F9-Zellen wurden 72h mit RA/dbcAMP behandelt. Anschließend wurden die differenzierten Zellen mit den Farbstoffen CFSE

bzw. Dil gefärbt und für 72h ohne Induktoren weiter kultiviert. Durch die spezifischen Fluoreszenzen der Farbstoffe wurden die Zellen dann mit Hilfe des FACS in CFSE⁺/CFSE⁻ bzw. Dil⁺/Dil⁻ Populationen sortiert und die RNA mit Hilfe des RNeasy Micro Kit® (Qiagen) isoliert. Die Expressionsanalyse erfolgte nach cDNA-Synthese mittels qPCR. **(C)** FACS-Analyse und Sortierung der Farbstoff-positiven und negativen Populationen nach 72-stündiger Kultivierung. Gatingstrategie: zur Definition der positiven und negativen Gates wurden zunächst ungefärbte F9-Zellen (Negativkontrolle) analysiert (links). Dabei wurde der Dotplot so konstruiert, dass immer der SSC gegen den Farbstoff (CFSE: FITC-Kanal; Dil: APC-Kanal) dargestellt ist. Zur Validierung der Markierungseffizienz und Definition des positiven Gates wurden F9-Zellen unmittelbar nach Markierung analysiert (mittig). Anschließend wurden die Zellproben nach 72h vermessen und die Gates für die Zellsortierung so definiert, dass je Population (CFSE⁺/CFSE⁻/Dil⁺/Dil⁻) ca. 8-10% aller Events sortiert wurden (rechts). **(D)** qPCR-Analyse differenziell regulierter Gene als Marker der Zelldifferenzierung. Dargestellt sind die RQ-Werte für das *Dab2*-, *Col4a1*- und *Lama1*-Gen. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. Die Normierung erfolgte auf die CFSE⁺ bzw. Dil⁺ Proben.

72h nach RA/dbcAMP-Behandlung und 24h nach Dil- bzw. CFSE-Färbung waren noch nahezu alle F9-Zellen positiv und vital (Abb. 6.8B), so dass ein toxischer Effekt durch die Markierung der Zellen ausgeschlossen werden konnte. Zur Überprüfung der Markierungseffizienz und der Definition des positiven Gates in der Durchflusszytometrie wurden Zellen unmittelbar nach dem Färbeprozess im FACS analysiert; dabei zeigte sich eine nahezu vollständige Markierung nach Dil-Markierung (99.9%) und eine >95%ige Markierungseffizienz nach CFSE-Inkubation (Abb. 6.8B). Nach 72-stündiger Inkubation der markierten, ursprünglich differenzierten Zellen resultierte die FACS-Analyse der Zellen in einem übereinstimmenden Ergebnis: 71.3% der CFSE-markierten Zellen beinhalteten noch den Farbstoff als graduelle Verteilung, 28.7% zeigten keine CFSE-Fluoreszenz mehr. Analog kam es zur Ausdünnung der Dil-Fluoreszenz bei ca. 32% der Zellen, wohingegen etwa 68% noch eine Dil-Fluoreszenz zeigten (Abb. 6.8B). Wie in Abbildung 6.8C dargestellt, lassen sich in Abhängigkeit der proliferativen Eigenschaften der Zellen Unterschiede in der Expression von Differenzierungsmarkern nachweisen: die nicht-proliferierenden Zellen (Dil⁺/CFSE⁺) zeigten dabei einen stärker differenzierten Phänotyp, wohingegen die proliferierende Population (Dil⁻/CFSE⁻) eine reduziertere Expression der Markergene aufwies. So war die *Dab2*-Expression um den Faktor 2.5, *Col4a1* um das 5-fache und die *Lama1*-Expression um den Faktor 3 in der Dil⁺/CFSE⁺ Population erhöht. Zusammenfassend konnten über die Markierung der Zellen mit den beiden Farbstoffen mindestens zwei unterschiedliche Populationen nach Differenzierung identifiziert werden: eine Population, die nach RA/dbcAMP-Behandlung nur langsam bis gar nicht proliferierte, sowie eine proliferierende Population, die auch nach 72-stündiger Differenzierung in der Lage war, sich zu teilen und eine weniger stark ausgeprägte Expression von

Differenzierungsmarkern zeigte. Vergleicht man allerdings die Expressionsunterschiede zwischen den beiden Populationen mit der Gesamtexpression undifferenzierter und differenzierter F9-Zellen (vergleiche Abbildung 6.7A), so zeigen die 2.5-3-fachen Regulationen der Differenzierungsmarker nur ein tendenzielles Ergebnis. Zur Validierung der Daten wurde der Versuch daher unter leicht variierten Bedingungen wiederholt: F9-Zellen wurden für 7 Tage unter Differenzierungsbedingungen kultiviert, anschließend mit Dil markiert und für weitere 7 Tage ohne Induktoren passagiert (Abb. 6.9A). Um auf den tatsächlichen Grad der Differenzierung bzw. Dedifferenzierung schließen zu können, wurden als zusätzliche Kontrolle undifferenzierte Zellen parallel gefärbt und sortiert. Der Dil-Farbstoff eignet sich als idealer Marker für die Proliferation markierter Zellen, lässt aber keine Informationen über die tatsächliche Teilungsrates der Zellen zu. Daher wurden definierte Zellzahlen von 7 Tage differenzierten Zellen nach Dil-Färbung für 72h kultiviert und durch tägliches Bestimmen der Zellzahl mit unbehandelten Dil markierten Zellen verglichen.

ERGEBNISSE

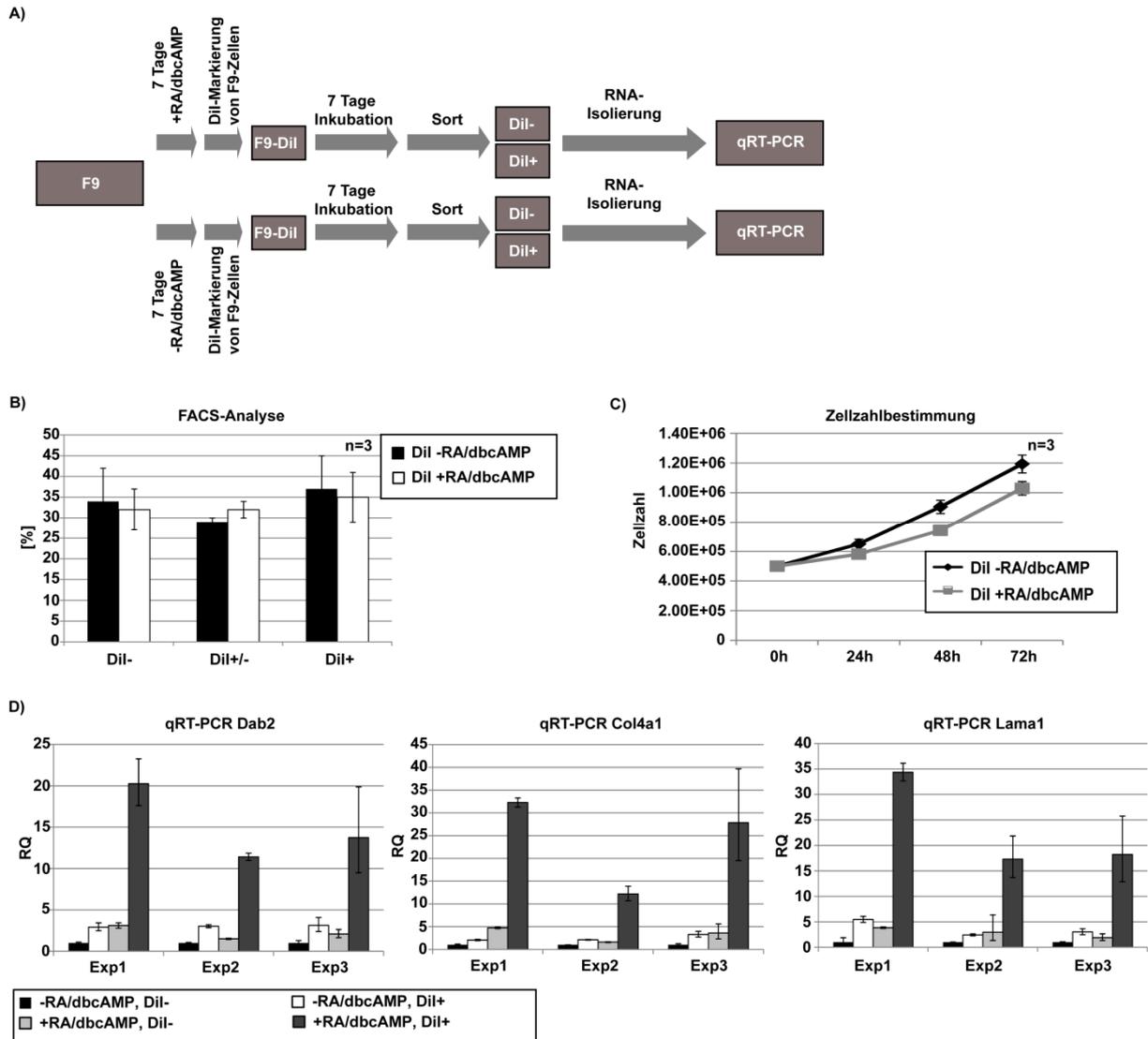


Abbildung 6.9: Langzeitanalyse der F9-Zellen nach Differenzierung. (A) Schematischer Versuchsablauf. **(B)** Zusammenfassung der Ergebnisse nach FACS-Analyse der Dil⁺, Dil^{+/-} und Dil⁻ undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen. F9-Zellen wurden 7 Tage in An- bzw. Abwesenheit von RA/dbcAMP kultiviert und anschließend Dil markiert. 7 Tage nach Expansion der Zellen in Abwesenheit der Differenzierungsinduktoren wurden die Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Dabei dienten unmarkierte Zellen als Negativkontrolle und unmittelbar vorher gefärbte Zellen als Positivkontrolle (n=3). Die Dil-Fluoreszenz wurde im APC-Kanal vermessen. Dil⁻: eindeutig negative Zellen; Dil⁺: eindeutig positive Zellen; Dil^{+/-}: Übergangspopulation mit Restfluoreszenz. **(C)** Wachstumskurve differenzierter (7 Tage, RA/dbcAMP) und undifferenzierter F9-Zellen nach Dil-Markierung und anschließender 72-stündiger Kultivierung ohne Differenzierungsinduktoren. Die Zellzahlbestimmung wurde nach 24h, 48h und 72h als Triplikat durchgeführt. **(D)** qPCR-Analyse differenziell regulierter Gene als Marker der Zelldifferenzierung im Vergleich zwischen Dil⁻ und Dil⁺ sortierten Zellen (undifferenziert und differenziert) (n=3). Dargestellt sind die RQ-Werte für die Gene *Dab2*, *Col4a1* und *Lama1*. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. Die Normierung erfolgte auf die Probe der Dil⁻ Zellen aus dem undifferenzierten Hintergrund. Gesortet wurden je Population ca. 8-10% der eindeutig positiven bzw. negativen Zellen. Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasy Micro Kit® (Qiagen).

Die Dil markierten Zellen zeigten nach vorheriger Differenzierung im Vergleich zu undifferenzierten Kontrollzellen keine signifikanten Unterschiede in der Ausdünnung des Farbstoffs (undiff:diff; Dil⁻: 34:33%; Dil^{+/-}: 29:32%; Dil⁺: 36:35%; Abb. 6.9B). Offenbar stellen sich nach 7 tägiger Abwesenheit der Induktoren wieder vergleichbare Proliferationsverhältnisse ein. Die Analyse des Zellwachstums unterstützt dabei die Datenlage; zwar scheint das Wachstum differenzierter Zellen im Vergleich zu undifferenzierten Zellen reduziert, doch ist diese verminderte Teilungsrate nicht signifikant und nur als Tendenz zu betrachten (Abb. 6.9C). Damit sprechen die Ergebnisse für eine Population innerhalb der F9-Zellen, die womöglich unvollständig oder gar nicht differenziert. Differenzierte Zellen reduzieren im Prozess der Differenzierung ihre proliferativen Eigenschaften, so dass die fortlaufende Proliferation auf eine sich weiter teilende Subpopulation zurückgeht, die aufgrund einer schnellen und fortlaufenden Teilung das Gesamtbild dramatisch verschiebt. Tatsächlich zeigten die qPCR-Analysen der Dil⁺/Dil⁻ Populationen nach dem Analysezeitraum von 14 Tagen ein eindeutiges Ergebnis (6.9D): die Dil⁻ Zellen der ursprünglich differenzierten Kultur wiesen in etwa das Expressionsprofil der undifferenzierten Dil⁺ Zellen auf, wohingegen die Expression der Differenzierungsmarker innerhalb der Dil⁺ Population um ein Vielfaches gesteigert war. Ein weiterer wesentlicher Aspekt der Analyse zeigte sich nach Betrachtung der undifferenzierten, Dil-markierten Zellen. Auch der Vergleich der Markergenexpression zwischen den Dil⁻ und Dil⁺ Populationen aus undifferenzierten Zellen führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Übereinstimmend mit den Ergebnissen nach RA/dbcAMP-Behandlung war die Expression der analysierten Markergene in proliferierenden Zellen (Dil⁻) im Vergleich zu der in nicht-proliferierenden Zellen (Dil⁺) signifikant reduziert. Zusammenfassend bestätigen sich die aus Abbildung 6.8 abgeleiteten Vermutungen: innerhalb der F9-Zellkultur existieren verschiedene Subpopulationen, die sich hinsichtlich ihres Proliferationspotenzials und dem damit korrelierenden Differenzierungsstatus unterscheiden. Diese Populationen sind bereits in den undifferenzierten Zellkulturen vorhanden und in unterschiedlichem Ausmaß durch den Induktor Retinsäure stimulierbar. Womöglich handelt es sich bei der proliferierenden Population um Zellen mit Vorläufereigenschaften, wohingegen die weniger proliferierende Population die Nachkommen sind, die für die Differenzierung bereits vorbereitet (*committed*) sind.

6.3 Untersuchung von Vorläuferzellen innerhalb der F9-Zellkultur

Zur weiteren Charakterisierung der Subpopulationen und Untersuchung ihrer möglichen Vorläuferzeleigenschaften wurden zwei gängige Methoden zur Identifizierung von Stamm- bzw. Vorläuferzellen eingesetzt: (i) der Aldefluor®-Assay (Storms et al., 1999) sowie (ii) die Hoechst33342-Färbung zum Nachweis der *Side Population* (SP) (Goodell et al., 1996).

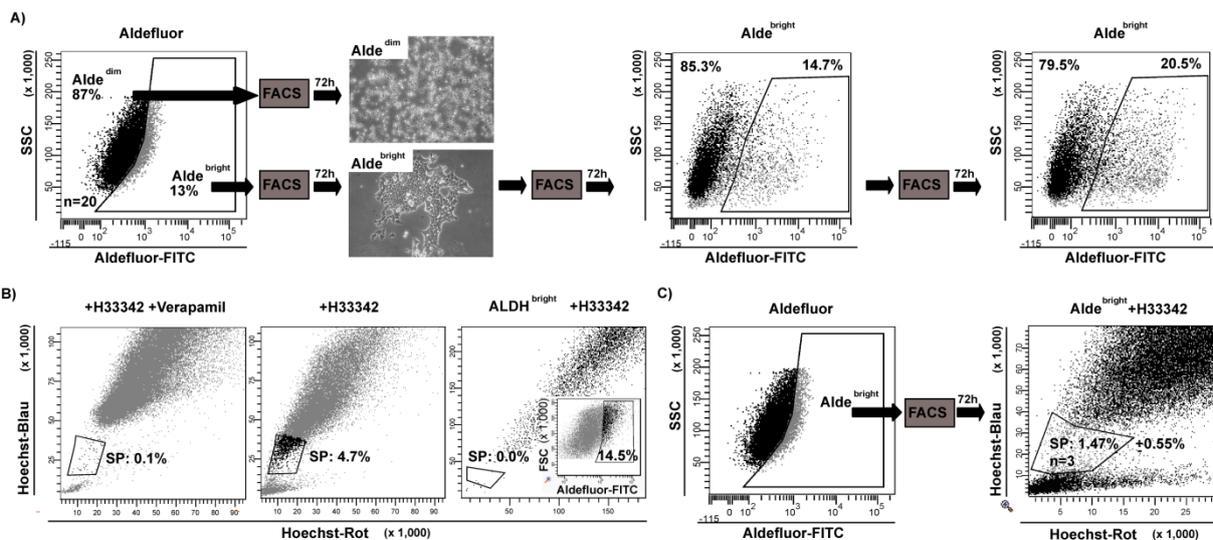


Abbildung 6.10: FACS-basierte Methoden zur Identifizierung der Zellen mit Vorläufereigenschaften in der F9-Zellkultur. (A) Aldefluor®-Assay: undifferenzierte F9-Zellen wurden mit dem Aldefluor®-Reagenz inkubiert. Zur Definition von Alde^{dim} Zellen erfolgte die parallele Inkubation mit dem Aldefluor®-Reagenz sowie dem ALDH-Inhibitor DEAB. Alde^{dim} und Alde^{bright} Zellen wurden sortiert (Sicherheitsort: nur die stark positiven als auch die eindeutig negativen Zellen wurden sortiert, was je Population zwischen 8-10% der Gesamtpopulation entsprach) und je Population wurden 1x10⁴ Zellen in Gelatine-beschichtete 6cm-Platten überführt und 72h kultiviert. Die ursprüngliche Alde^{bright} Population wurde trypsiniert, erneut mit Aldefluor®-Reagenz inkubiert und wieder die Alde^{bright} Population sortiert. Der Versuchsablauf wurde nach 72-stündiger Inkubation der Alde^{bright} sortierten Zellen reproduziert (n=4). Dargestellt als Dotplots ist der Side Scatter (SSC) gegen die Aldefluor®-Fluoreszenz (FITC-Kanal). **(B)** H33342-Färbung: undifferenzierte Zellen wurden in Anwesenheit von H33342 und dem Membrantransporter-Inhibitor Verapamil zur Definition der H33342-negativen SP-Zellen inkubiert und im FACS vermessen (der Hoechst-Farbstoff wurde mit einem UV-Laser bei 350nm angeregt und die Emission mit einem 450/20 BP-Filter [Hoechst-Blau] und einem 675 EFLP optischen Filter [Hoechst-Rot] gemessen). Durch die Inkubation mit H33342 ohne Verapamil wurde die SP-Population bestimmt. In einem weiteren Ansatz wurden die mit H33342-versetzten Zellen 45 Minuten vor Inkubationsende mit Aldefluor® inkubiert. Die Aldefluor®/DEAB-inkubierten Zellen dienten dabei als Negativkontrolle (nicht dargestellt). Gatingstrategie: ausgehend von den Alde^{bright} Zellen (Dotplot: SSC/Aldefluor®-FITC) wurden die H33342 negativen SP-Zellen gated. Als Positivkontrolle für die Existenz von SP-Zellen wurde ein Gate unabhängig der Alde^{bright} Population ausgehend der lebenden Zellen definiert (nicht dargestellt) (n=3). **(C)** Analog wie unter (A) beschrieben, wurden Alde^{bright} Zellen durchflusszytometrisch separiert und 72h nach Kultivierung H33342-gefärbt. Die resultierenden SP-Zellen sind in dem H-Blau/H-Rot Dotplot dargestellt (n=3).

Innerhalb der F9-Zellen ließen sich sowohl Alde^{bright} und Alde^{dim} (Abb. 6.10A) sowie SP-Zellen (Abb. 6.10B) nachweisen. Interessanterweise resultierte die Kultivierung der Alde^{dim} und Alde^{bright} Population nur in der Expansion der Alde^{bright} Zellen (Abb. 6.10.A). Diese Aldefluor®-positive Population zeigte 72h nach Kultivierung wieder die ursprünglichen Alde^{dim} und Alde^{bright} Populationen (undifferenzierte F9-Zellen: Alde^{dim} 87%; Alde^{bright} 13%; 72h nach Kultivierung der Alde^{bright} Zellen: Alde^{dim} 85.3%; Alde^{bright} 14.7%). Auch die erneute Sortierung, Kultivierung und Analyse der Alde^{bright} Zellen führte zu demselben Ergebnis. Damit lassen sich innerhalb der F9-Zellkultur mindestens zwei Hauptpopulationen unterscheiden: eine proliferationsaktive Alde^{bright} und eine nicht proliferierende Alde^{dim} Population. Die Alde^{bright} Zellen waren nach 72-stündiger Kultivierung in der Lage, sich selbst zu generieren und brachten auch Alde^{dim} und Hoechst-negative SP-Zellen hervor (Abb. 6.10A/C). Damit erfüllen Alde^{bright} Zellen sowohl das Kriterium der Selbsterneuerung als auch der Fähigkeit, alle anderen in der Kultur vorkommenden Populationen wieder generieren zu können. Alde^{bright} Zellen stellen daher innerhalb der F9-Zellkultur eine hierarchisch übergeordnete Subpopulation von Zellen mit Vorläufereigenschaften dar. Zusammenfassend lassen sich innerhalb der F9-Zellkultur verschiedene Subpopulationen unterscheiden: proliferierende Alde^{bright} Zellen mit Vorläufereigenschaften, eine nicht-proliferierende Alde^{dim} Population und eine Übergangspopulation aus Alde^{dim}/Alde^{bright} Zellen, wobei sich die SP-Zellen innerhalb der Alde^{dim} und Übergangspopulation befinden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen nach Dil-Färbung undifferenzierter als auch differenzierter Zellen (siehe Abb. 6.9) bestätigen die Ergebnisse der Aldefluor®- und H33342-Färbung die Existenz distinkter Subpopulationen, die sich auch hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades in der Expression von Markergenen unterscheiden. Zur Untersuchung, ob sich diese bei der Dil-Markierung gezeigte heterogene Expression von Differenzierungsmarkern auch auf die Alde^{bright} Vorläuferzellen bzw. Alde^{dim} Subpopulation anwenden lässt, wurden undifferenzierte F9-Zellen Aldefluor®-gefärbt, in eine repräsentative Alde^{dim} und Alde^{bright} Population sortiert, RNA gewonnen und im Vergleich zu undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen auf der Agilent Mikroarray-Plattform analysiert.

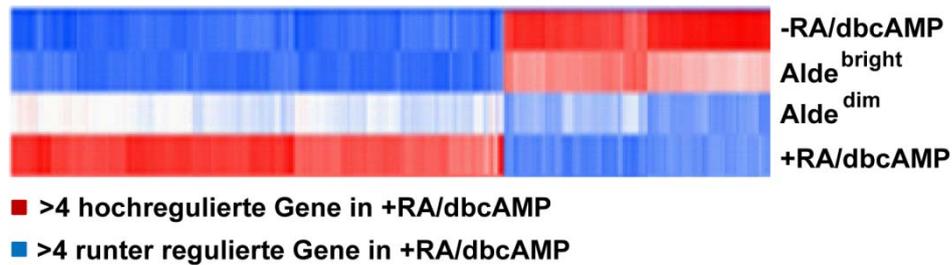


Abbildung 6.11: Heatmap 369 regulierter Gene in undifferenzierten, differenzierten, Alde^{bright} und Alde^{dim} Zellen (Agilent Mikroarray Genexpressionsanalyse). Als differenziell exprimiert wurden mithilfe des Dchip-Programms (Li and Wong, 2001) die Gene bestimmt, die in differenzierten Zellen im Vergleich zu undifferenzierten Zellen mindestens 4-fach hoch oder runter reguliert sind. In rot dargestellt sind die Gene, die im Vergleich zu undifferenzierten Zellen in differenzierten F9-Zellen >4-fach hochreguliert sind. In blau dargestellt sind hingegen die Gene, die nach Differenzierung >4-fach runter reguliert sind. Jede Reihe der Heatmap repräsentiert ein Gen. Liste der regulierten Gene siehe Anhang 9.3.

Die Ergebnisse der Mikroarray-Analyse bestätigen die Korrelation der unterschiedlichen Populationen innerhalb der undifferenzierten F9-Kultur mit dem Differenzierungsgrad der Zellen. So „clusterten“ die Alde^{bright} Zellen mit der Gesamtpopulation undifferenzierter Zellen. Hingegen folgten die Alde^{dim} Zellen mehr dem differenzierten „Cluster“. Allerdings lässt sich nicht von einer vollständigen Differenzierung der Alde^{dim} Zellen sprechen (Abb. 6.11). Vielmehr sind die Zellen auf dem Weg zu differenzieren. Auch diese Ergebnisse zeigen, dass die Alde^{bright} Zellen an der Spitze der Hierarchie stehen und schon innerhalb der undifferenzierten F9-Zellkultur Zellen mit einer unterschiedlichen Ausprägung von Differenzierungsmarkern existieren.

Wie bereits beschrieben, kommt es im Verlauf des Differenzierungsprozesses zur Abnahme der p53-Expression (Abbildung 6.1/6.2). Wie aber verhält sich die p53-Expression innerhalb der Subpopulationen undifferenzierter F9-Zellen? Ist das p53-Protein in allen undifferenzierten Zellen gleichermaßen exprimiert oder ist eine Zuordnung zu einer bestimmten Population möglich? Um diese Fragen zu beantworten, wurden (i) undifferenzierte F9-Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz auf die Expression von p53 analysiert und (ii) das p53-Transkript bzw. Protein in den Alde^{dim} und Alde^{bright} Populationen mittels qPCR und qWB untersucht; (iii) darüber hinaus wurde der prozentuale Anteil an Alde^{bright} Zellen nach der Differenzierung bestimmt.

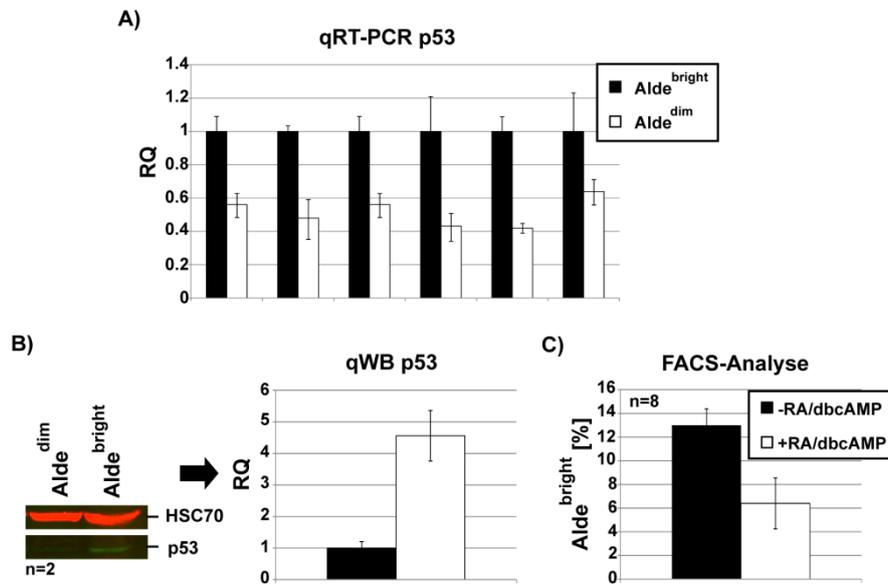


Abbildung 6.12: Analyse der Verteilung des p53-Proteins in F9-Zellen und deren Subpopulationen. (A) qPCR-Analyse des *Trp53*-Gens nach Sortierung und RNA-Isolierung aus Alde^{bright} und Alde^{dim} Populationen undifferenzierter F9-Zellen (n=6). Die Normierung erfolgte auf die Probe der Alde^{bright} Zellen. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasy Micro Kit® (Qiagen). (B) Quantitativer Western Blot zur absoluten Quantifizierung von p53 anhand einer Standardreihe mit humanem rekombinanten p53-Protein (siehe Abbildung 6.2). Aufgetragen wurden 50µg des Gesamtzell-extrakts von undifferenzierten und differenzierten Zellen (n=2 biologische Replikate). Das rekombinante humane p53-Protein wurde in einer Verdünnung von 5µg/µl-0.5µg/µl aufgetragen. Zum Nachweis des p53-Proteins wurde ein polyklonaler rabbit-anti p53-Antikörper und ein anti-rabbit gerichteter IRDye800CW-Sekundärantikörper verwendet. Zur Normierung wurde das HSC70-Protein als *housekeeping* Protein mit einem polyklonalen goat-anti HSC70 und einem anti-goat IRDye700CW-Sekundärantikörper nachgewiesen. (C) FACS-Analyse der Aldefluor®-Färbung im Vergleich zwischen undifferenzierten und differenzierten (72h, RA/dbcAMP) F9-Zellen (n=8). Die Aldefluor®-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal vermessen.

Der Vergleich der Expression des Proteins nach Sortierung von Alde^{dim} und Alde^{bright} Zellen mit Hilfe der qPCR (siehe Abb. 6.12A) zeigte eine ca. 2-fach stärkere p53-Expression in der Alde^{bright} Population. Übereinstimmend mit den qPCR Daten bestätigte die qWB-Analyse die heterogene Expression und Akkumulation von p53 innerhalb der Alde^{bright} Subpopulation: im Vergleich zur Alde^{dim} Population war das p53-Protein in den Alde^{bright} Zellen um den Faktor >4 angereichert (Abb. 6.12B). Damit korreliert die Expression des p53-Proteins zum einen mit den proliferativen Eigenschaften der undifferenzierten F9-Zellpopulation (Alde^{bright}/Dil⁺), zum anderen mit dem Grad der zellulären Differenzierung. Zusätzlich zeigte die Untersuchung der Aldefluor®-Färbung vergleichend zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen eine mit der Abnahme von p53 korrelierende Reduktion der Alde^{bright} Zellen nach Differenzierung von ca. 13% auf etwa 6% (Abb. 6.12C).

Es stellte sich nun die Frage, inwieweit das in den Alde^{bright} Zellen angereicherte p53 ein Faktor der zellulären „stemness“ ist. Zur Klärung wurde der direkte Einfluss von p53 auf die Regulation der Subpopulationen analysiert: (i) F9-Zellen wurden vor der Aldefluor®-Analyse mit dem pCIneo-wtp53 Vektor transfiziert, der die ektoische Expression von Maus-p53 unter Kontrolle des CMV-Promotors gewährleistet. Als Kontrolle diente die Transfektion des pCIneo-Leervektors. (ii) Durch siRNA-vermittelte Depletion von p53 wurde der Effekt auf die Aldefluor®-Population im Vergleich zu einer scrambled-siRNA (siScr) Transfektion untersucht.

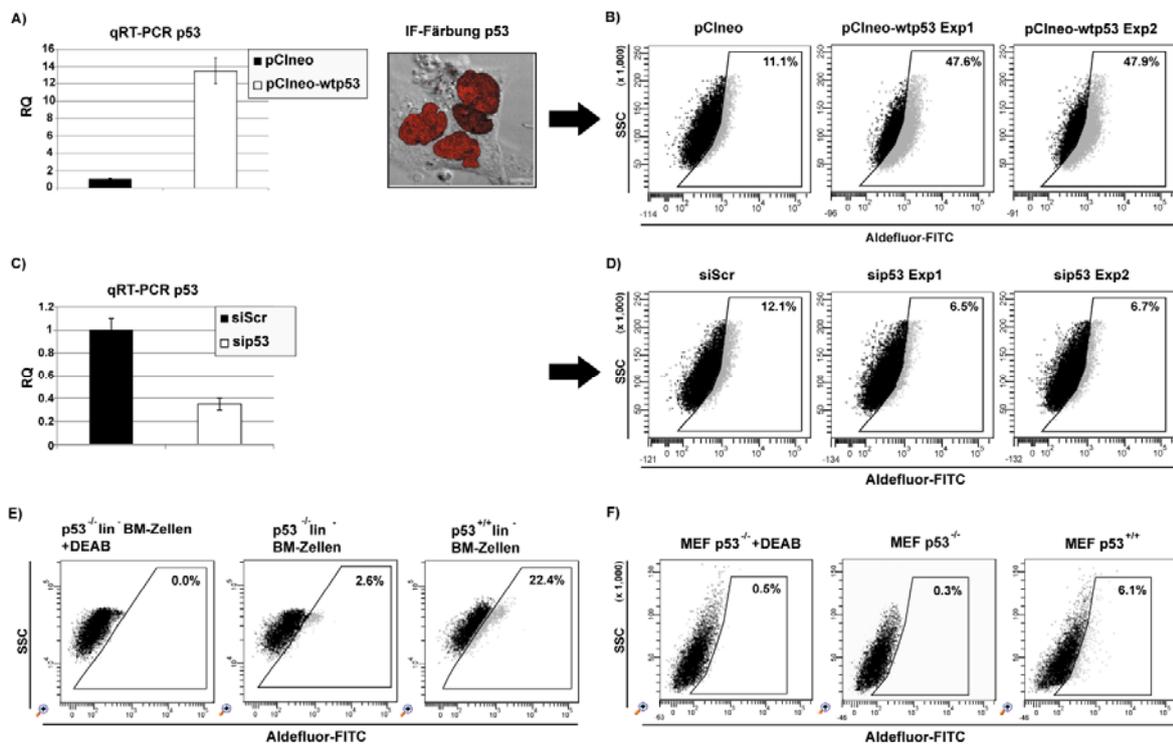


Abbildung 6.13: Abhängigkeit der Alde^{bright} Population von der p53-Expression. (A) qPCR und indirekte Immunfluoreszenz zur Prüfung der ektoischen p53-Expression (siehe Abschnitt 5.2.5.1). F9-Zellen wurden mit dem pCIneo-Leervektor und pCIneo-wtp53 transfiziert und 48h später analysiert. Die Expression von p53 wurde mittels qPCR nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese bestimmt. Die Normierung erfolgte auf die Probe der kontrolltransfizierten Zellen. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. Der Nachweis des ektoisch exprimierten p53-Proteins erfolgte mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz. Die Aufnahme wurde am Laser-Konfokalmikroskop mit einem 63er Objektiv aufgenommen. **(B)** Aldefluor®-Assay 48h nach Kontroll- bzw. pCIneo-wtp53 Transfektion. Nicht dargestellt ist die DEAB-Kontrolle zur Definition Aldefluor®-negativer Zellen. **(C)** qPCR-Analyse 48h nach Transfektion zur Validierung der Depletionseffizienz nach siRNA-vermittelter p53-Depletion (siehe Abschnitt 5.2.5.2). Die Normierung erfolgte auf die Probe der siScr-transfizierten Zellen. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. **(D)** Aldefluor®-Assay 48h nach Kontroll- bzw. sip53-Transfektion. **(E)** Aldefluor®-Assay von Knochenmarkszellen aus p53^{+/+} und p53^{-/-} Balb/c-Tieren nach *Lineage Cell Depletion*. BM: Bone Marrow (Knochenmark). **(F)** Aldefluor®-Assay im Vergleich zwischen p53^{+/+} und p53^{-/-} mouse embryo fibroblasts (MEFs).

In F9-Zellen resultierte die transiente ektopische p53-Expression in einer Expansion der Alde^{bright} Population von 11.1% auf >47% (Abb. 6.13B), wobei die Transkriptmenge von p53 nach Transfektion um mehr als das 15-fache zunahm und das Protein in der indirekten Immunfluoreszenz in nahezu allen Zellen nachweisbar war (Abb. 6.13A). Die transiente Depletion von p53 (Abb. 6.13C) führte hingegen zu einer Reduktion der Alde^{bright} Population von 12.1% (siScr) auf <7% (sip53) (Abb. 6.13D). Dabei ist die p53-Abhängigkeit der Aldefluor®-Reaktion nicht ausschließlich auf die F9-Zellkultur begrenzt. Der Vergleich der Aldefluor®-Reaktion zwischen Knochenmarkzellen aus p53^{+/+} bzw. p53^{-/-} Balb/c-Mäusen zeigte ebenfalls eine deutliche Abhängigkeit der Reaktion von p53 (Abb. 6.13E): in p53^{-/-} lin⁻ BM-Zellen (Knochenmark, *Bone Marrow*) war nur der Nachweis einer geringen, 2.6% umfassenden Alde^{bright} Population möglich, wohingegen sich diese Population in p53^{+/+} lin⁻ BM-Zellen auf >22% expandierte. Noch eindeutiger war der Effekt bei *mouse embryo fibroblasts* (MEFs) aus p53^{-/-} bzw. p53^{+/+} Mäusen (Abb. 6.13F). So zeigten MEFs aus einem p53^{-/-} Hintergrund keine Alde^{bright} Population, wohingegen sich bei 6% der p53^{+/+} MEFs eine reproduzierbare Alde^{bright} Population nachweisen ließ.

Zusammenfassend korreliert die Alde^{bright} Population (DiI⁻/CFSE⁻) positiv mit (i) der Expression des p53-Proteins, (ii) negativ mit dem Grad der Differenzierung und (iii) positiv mit dem Proliferationspotenzial der Kultur. Alde^{dim} Zellen zeigen innerhalb der Gesamtkultur eine partielle Differenzierung und nur eine geringe Expression des p53-Proteins. Zur abschließenden Bestätigung des Zusammenhangs zwischen p53-Expression und Differenzierung wurden undifferenzierte und differenzierte Zellen fixiert, intrazellulär mit einem direkt-markierten Antikörper gegen p53 gefärbt und durchflusszytometrisch sortiert. Nach Isolierung der RNA und cDNA-Synthese wurde die Expression der Differenzierungsmarker zwischen Populationen, die sich in der Expression von p53 unterscheiden, verglichen.

ERGEBNISSE

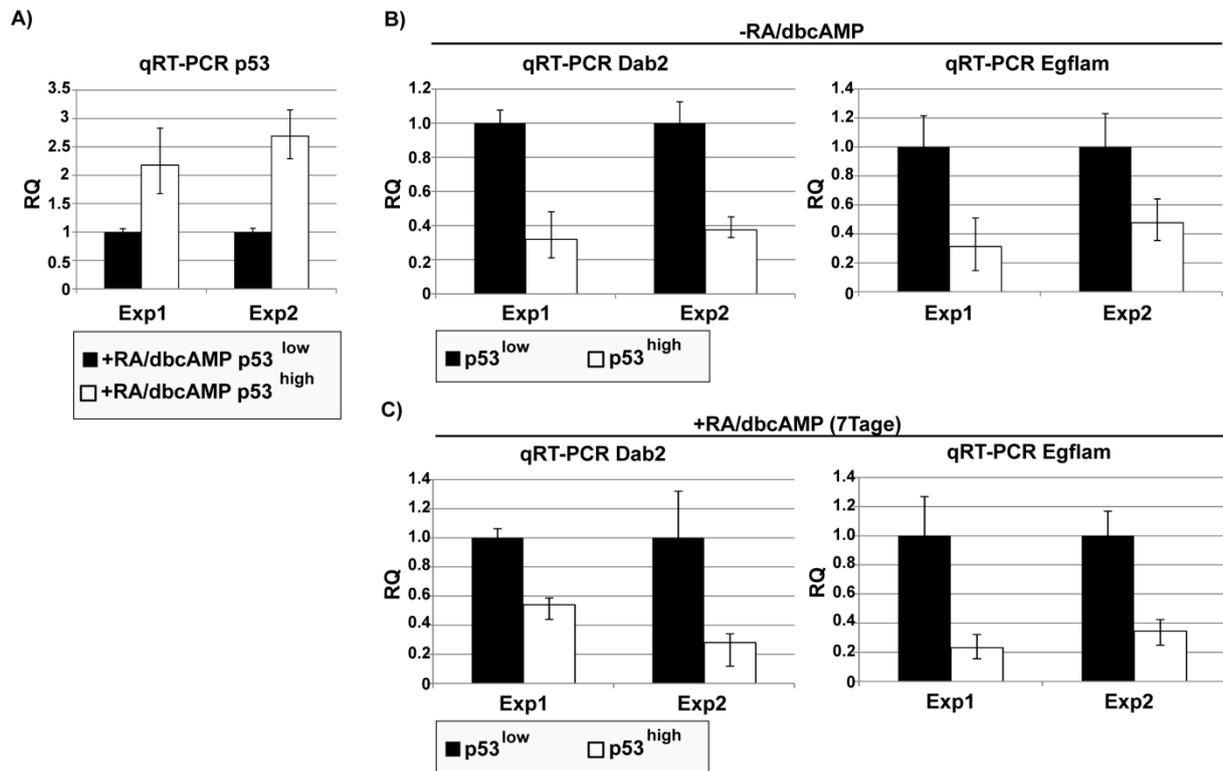


Abbildung 6.14: Vergleich der Markergenexpression zwischen p53^{high} und p53^{low} Populationen undifferenzierter und differenzierter Zellen. Undifferenzierte und differenzierte (7 Tage, RA/dbcAMP) F9-Zellen wurden nach EtOH-Fixierung mit einem direkt-markierten Antikörper gegen p53 gefärbt und je Population zwischen 8-10% der Gesamtpopulation an eindeutig positiven (p53^{high}) bzw. negativen (p53^{low}) Zellen via FACS sortiert. Die Sortierung erfolgte ebenfalls in EtOH. Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasy Micro Kit® (Qiagen). **(A)** qPCR-Analyse zur Überprüfung der p53-Färbung und der Sortierungseffizienz. Dargestellt sind die RQ-Werte des *Trp53*-Gens im Vergleich zwischen p53^{low} und p53^{high} Populationen aus differenzierten Zellen. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. **(B)** qPCR-Analyse der Differenzierungsmarker-Gene *Dab2* und *Egflam* vergleichend zwischen p53^{low} und p53^{high} Populationen aus undifferenzierten bzw. **(C)** differenzierten Zellen. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet.

Die Methode der Intrazellulärfärbung mit anschließender FACS-Separation eignet sich zur Isolierung der p53^{high} und p53^{low} Subpopulation. So konnte in der p53^{high} Subpopulation eine >2-fache p53-Anreicherung nachgewiesen werden (Abb. 6.14A). Übereinstimmend mit den Ergebnissen nach Dil-Markierung (siehe Abb. 6.9) und Aldefluor®-Färbung (siehe Abb. 6.10/6.11/6.12/6.13) ließen sich signifikante Unterschiede in der Expression des *Dab2*- sowie *Egflam*-Gens zwischen p53^{high} und p53^{low} Zellen in undifferenzierten F9-Zellkulturen nachweisen (Abb. 6.14B): die p53^{low} sortierten Zellen zeigten eine ca. 3-fach gesteigerte Expression der Differenzierungsmarker. Auch die Isolation beider Subpopulationen nach Differenzierung (Abb. 6.14C) bestätigte den mehr undifferenzierten Phänotyp der p53^{high} Subpopulation. Die Expression des *Dab2*-Gens war 2-3-fach, die *Egflam*-Expression sogar 3-5-fach stärker in p53^{low} Zellen (Abb. 6.14C).

6.4 Untersuchung der Beteiligung von p53 am Prozess der zellulären Differenzierung

Um einen Einblick in die Beteiligung des p53-Proteins an der Differenzierung von F9-Zellen zu erhalten, wurde p53 durch Transfektion eines shRNA exprimierenden Vektors stabil depletiert (F9/shp53) und die Expression der Differenzierungsmarker *Gata6* und *Sox17* gegen eine Kontroll-Transfektion (F9/Scr) verglichen. *Gata6* und *Sox17* sind Transkriptionsfaktoren, deren Expression nach Differenzierung um ein Vielfaches zunimmt (basierend auf den Mikroarray-Daten aus Abbildung 6.11). Bei der Depletion wurde die publizierte shRNA-Sequenz im Hintergrund des eGFP exprimierenden pSUPERIOR.neo_GFP-Vektors verwendet (Brummelkamp et al., 2002). In dem pSUPERIOR-System wird die Expression der shRNA-kodierenden Sequenz durch einen RNA-Polymerase III abhängigen H1-Promotor vermittelt.

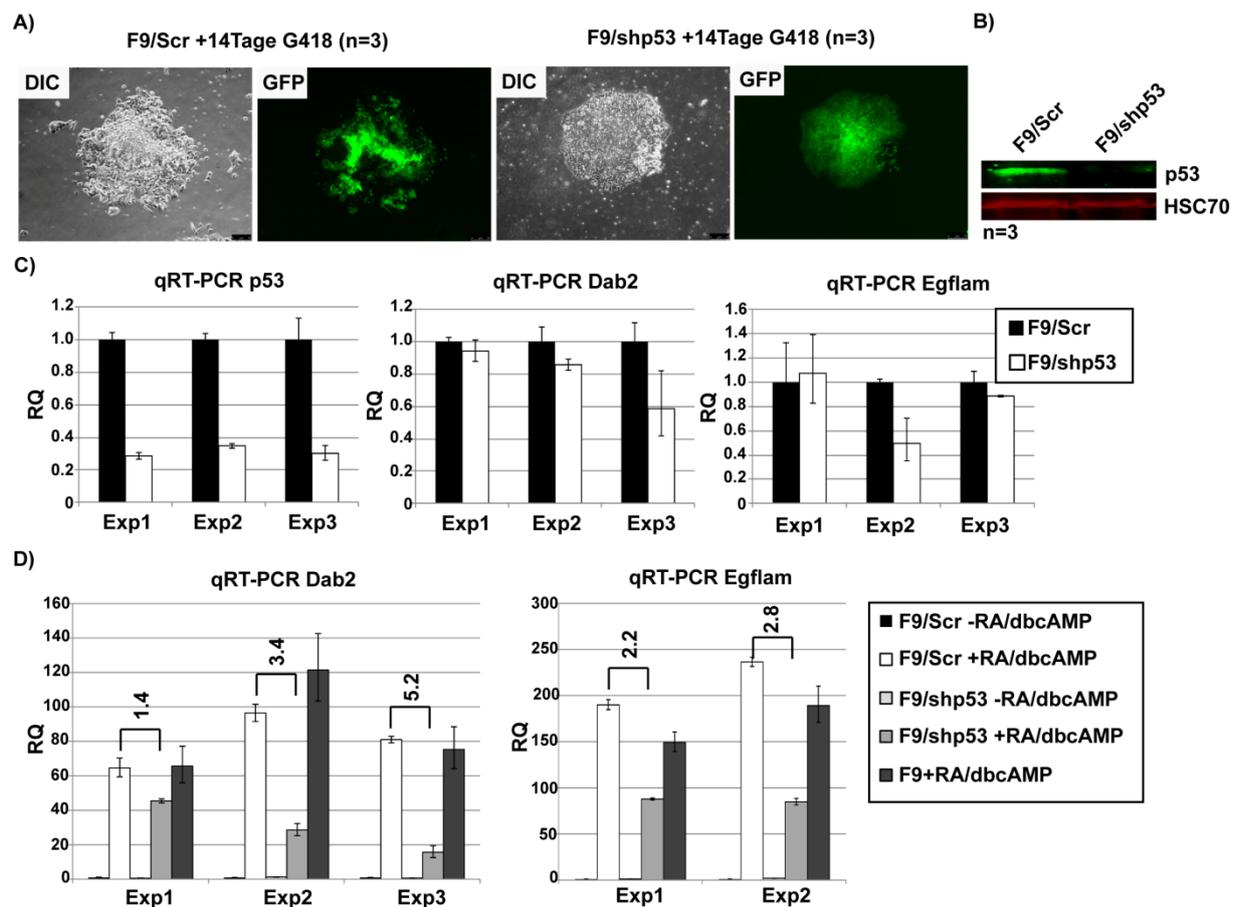


Abbildung 6.15: Auswirkung der stabilen p53-Depletion auf die Differenzierbarkeit der Zellen. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der stabil transfizierten Zellen (F9/Scr bzw. F9/shp53). Dargestellt sind das DIC-Bild sowie die eGFP-Fluoreszenz 14 Tage nach G418-Selektion (2mg/ml). (B) Quantitativer Western Blot 4 Wochen nach Transfektion. Antikörper siehe Abbildung 6.2 (n=3). (C) qPCR-Analyse des *Trp53*-, *Dab2*- und *Egflam*-Gens im Vergleich zwischen den stabil transfizierten Zellen 4 Wochen nach Transfektion (n=3). Normiert wurde auf die jeweilige Kontrolle (F9/Scr). Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. (D) qPCR-Analyse nach Differenzierung der stabil transfizierten Zellen.

transfizierten Zellen. Primer und *housekeeping* Gen siehe (C). Die Zahlen geben die Faktoren zwischen Kontroll- und shp53 stabil transfizierten Zellen wieder (n=2/3).

Bereits 14 Tage nach Transfektion und G418-Selektion waren nahezu alle Zellen eGFP-positiv und vital (Abb. 6.15A). Auch die Analyse der Depletionseffizienz zeigte eine deutliche Reduktion der p53-Expression: 12-fache Abnahme auf Proteinebene (Abb. 6.15B) und eine 3-fache Regulation auf Transkriptionsebene (Abb. 6.15C). Die stabile Depletion führte in undifferenzierten Zellen im Vergleich zur Scr-Kontrolle zu keiner Veränderung der Expression der Differenzierungsmarker (Abb. 6.15C). Allerdings zeigten die Ergebnisse nach RA/dbcAMP-Zugabe signifikante Unterschiede in der Ausprägung der Expression der Markergene. Die F9/Scr stabil transfizierten Zellen erreichten in etwa die äquivalente Zunahme der *Dab2*- und *Egflam*-Expression nach Differenzierung wie nicht-transfizierte Kontrollzellen. Vergleicht man allerdings die Zunahme der Expression zwischen F9/Scr und F9/shp53 transfizierten Zellen, so war die *Dab2*-Expression in den F9/Scr-Zellen um den Faktor 1.4, 3.4 bzw. 5.2 erhöht, im Falle des *Egflam*-Gens ergab sich sogar eine um den Faktor 2.2 und 2.8 gesteigerte Expression (Abb. 6.15D). Damit resultiert die stabile Depletion von p53 in einer eingeschränkten Differenzierbarkeit der F9-Zellen. In welcher Weise aber kann das p53-Protein Einfluss auf die Differenzierung von F9-Zellen nehmen? Zwei Möglichkeiten sind zu berücksichtigen: p53 reguliert die Transkription der differenzierungs-assoziierten Gene entweder über die Bindung an die regulatorischen Sequenzen um die TSS oder über entfernte regulatorische Regionen, die durch epigenetische Mechanismen die Expression der Gene steuern. Ein solcher epigenetischer Mechanismus könnte durch die Transkription aus FL-L1-Elementen vermittelt werden.

6.5 Bioinformatische Analyse: Zusammenhang zwischen Differenzierung und FL-L1-Elementen

Um die Lokalisation von L1-Elementen innerhalb des murinen Genoms zu untersuchen, wurden die Koordinaten aller L1-Elemente aus der NCBIM37/mm9 Assemblierung verwendet (April 2007, Stamm: C57BL/6J). Die Mehrheit aller annotierten L1-Elemente sind degenerierte kurze Fragmente, weswegen ein Längen-Cut-off definiert wurde, um nur die FL (*full length*) L1-Elemente zu lokalisieren. Diese Abtrennung wurde durch das Bestimmen der Länge individueller *L1Md-A* und *L1Md-*

T Elemente umgesetzt. Unter Berücksichtigung, dass der kodierende Teil der murinen L1-Elemente aus einer ORF1-, IRES- und ORF2-Region besteht und rund 4.638nt (A-Subfamilie) bzw. 5.001nt (T/F2-Subfamilie) umfasst, wurde der Cut-off für die Abtrennung der FL-L1-Elemente bei 5.000nt definiert. Insgesamt wurden 15.398 FL-L1-Elemente mit einer mittleren Länge von 5.876nt identifiziert. 2.567 FL-L1-Elemente (16.7% aller FL-L1s) befinden sich innerhalb von Introns in 1.320 Proteinkodierenden Genen. Dabei scheinen die Mitglieder der L1Md-T Familie die stärkste Prädisposition für eine Integration in kodierende Gene aufzuweisen: 19.66% aller L1Md-T Elemente sind innerhalb von 991 kodierenden Genen enthalten. Intronische FL-L1-Elemente sind zweimal öfter revers zur TSS (*transcriptional start site*) lokalisiert als in korrekter Orientierung. 468 Gene beinhalten mehr als zwei FL-L1-Elemente und große Gene (>1Mb) haben multiple FL-L1-Elemente: z.B. 17 FL-L1s im *Sntg1*-Gen und 16 im *Gpc5*-Gen.

Die Mikroarray-basierte Genexpressionsanalyse führte zur Identifizierung von 1.843 Genen, die zwischen RA/dbcAMP-behandelten und unbehandelten Zellen mindestens zweifach reguliert sind. Insgesamt beinhalteten 63 (3.36%) der regulierten Gene intronische FL-L1-Elemente. Bemerkenswert ist, dass 45 von 63 Genen in differenzierten F9-Zellen hochreguliert werden. Diese Tatsache ermöglicht die hypothetische Verknüpfung der Expression des p53-Proteins sowie der FL-L1-Elemente und dessen putative Beteiligung an der Regulation der Differenzierung. Neben den intronischen FL-L1-Elementen wurde die Analyse auf intergene FL-L1-Elemente erweitert, dessen Distanz zum Gen <50kbp beträgt und die in reverser Orientierung zur TSS lokalisiert sind. Dabei ließen sich insgesamt 24 (1.3%) differenziell regulierte Gene identifizieren, die mit den revers orientierten FL-L1-Elementen assoziiert sind.

ERGEBNISSE

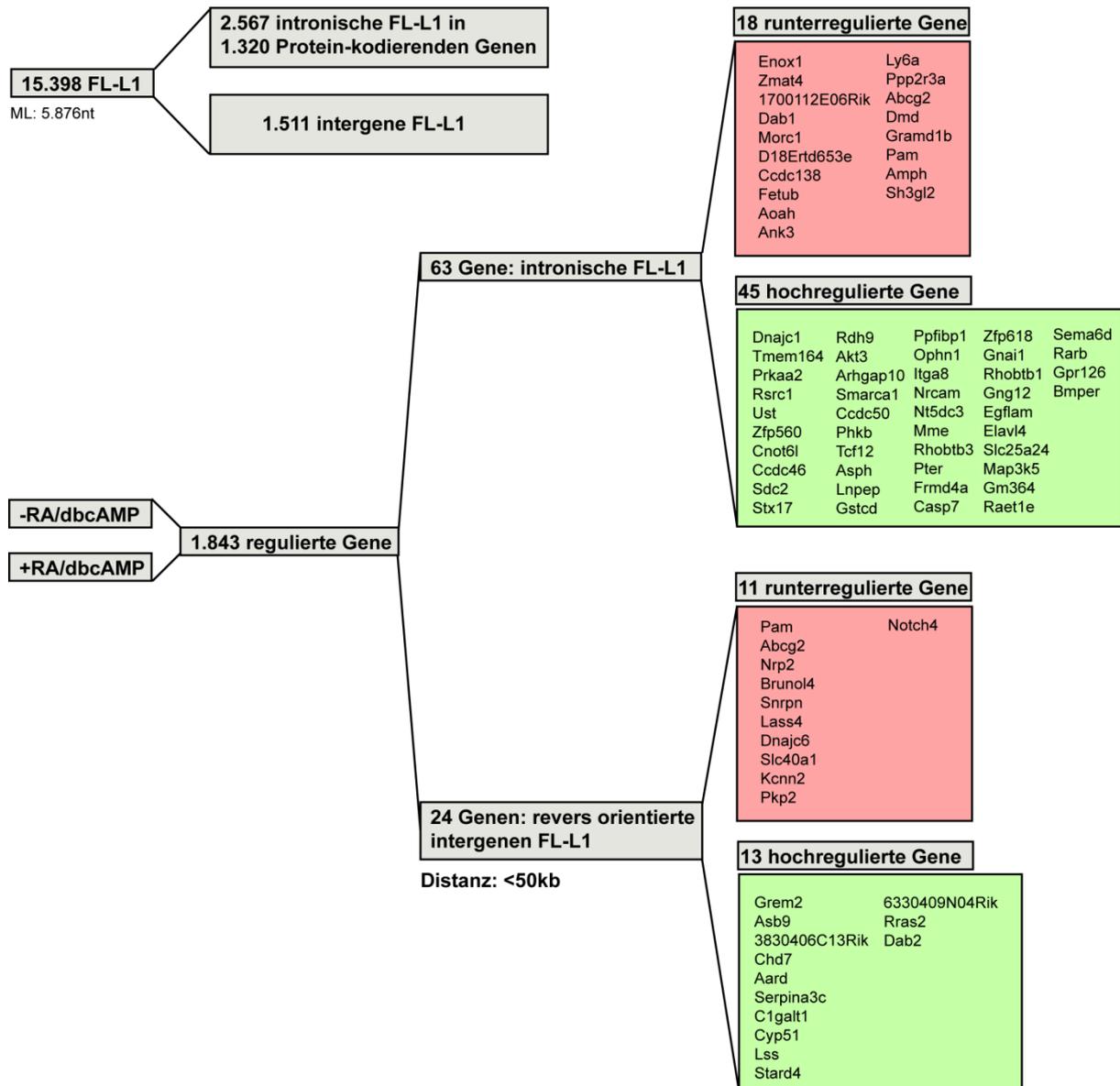


Abbildung 6.16: Zusammenfassung der bioinformatischen Analyse. Erklärungen und Beschreibung siehe Text. ML: mittlere Länge.

6.6 Analyse des Einflusses von p53 auf die Aktivität des *L1Md* 5'-UTR Promotors

Dieses Kapitel befasst sich mit der Analyse, welche der *L1Md*-Familien in F9-Zellen exprimiert werden, wie diese im Verlauf der Differenzierung reguliert werden und welchen Einfluss das p53-Protein an deren Regulation besitzt. Weiter wird die sense und die mögliche antisense Promotoraktivität (ASP: antisense Promotor; SP: sense Promotor) der murinen *L1Md-A* und *L1Md-T* 5'-UTRs, sowie deren Regulation durch p53 untersucht. Dazu wurden zunächst die *L1Md-A* und *L1Md-T* 5'-UTRs in ein

eGFP basierendes Vektorsystem in beiden Orientierungen kloniert (siehe Methoden 5.6.6) und deren Promotor-Aktivitäten mithilfe der Durchflusszytometrie über die Reporterfluoreszenz detektiert. Um die mögliche ASP-Aktivität der internen L1-Regionen (ORF1, IRES, ORF2, 3'-UTR) zu untersuchen, wurden Vektoren mit L1-Fragmenten in reverser Orientierung zu einem detektierbaren Markergen eingesetzt (Abschnitt 5.6.7).

6.6.1 Analyse der LINE-Expression in F9-Zellen

Zur Analyse der Expression von FL-L1-Elementen in undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen wurden Primer generiert, die den Nachweis aller FL-L1-Elemente abdecken (lokalisiert in der ORF1-kodierenden Sequenz; Abb. 6.17A) und Primer, die eine Unterscheidung zwischen der *L1Md-A* und *L1Md-T* Familie erlauben. Der 5'-UTR der murinen L1-Elemente setzt sich aus tandemartigen Wiederholungen von CpG-reichen Monomeren zusammen, denen sich eine konservierte „tether“-Sequenz anschließt, die diese Monomere von der sich anschließenden ORF1-Sequenz separiert (Furano, 2000). Dadurch ist es durch eine Lokalisation der Primer innerhalb der konservierten „tether“-Sequenz möglich, zwischen der *L1Md-A* und *L1Md-T* Familie zu unterscheiden (Abb. 6.17B). Zur Untersuchung der L1-Expression sowie deren Regulation durch p53 wurden folgende Versuchsstrategien gewählt: (i) die Expression aller FL-L1-Elemente (Primer in der ORF1-Region) wurde zwischen pSUP_Scr (undifferenziert und differenziert) und pSUP_shp53 transient transfizierten Zellen verglichen; (ii) in einem Folgeexperiment wurde die familienspezifische L1-Expression in diesen Zellen analysiert. (iii) Um Informationen über eine mögliche ASP-Aktivität des *L1Md* 5'-UTRs zu erhalten, wurde die mögliche Existenz von L1-spezifischen sense und antisense Transkripten durch strangspezifische cDNA-Synthese untersucht.

ERGEBNISSE

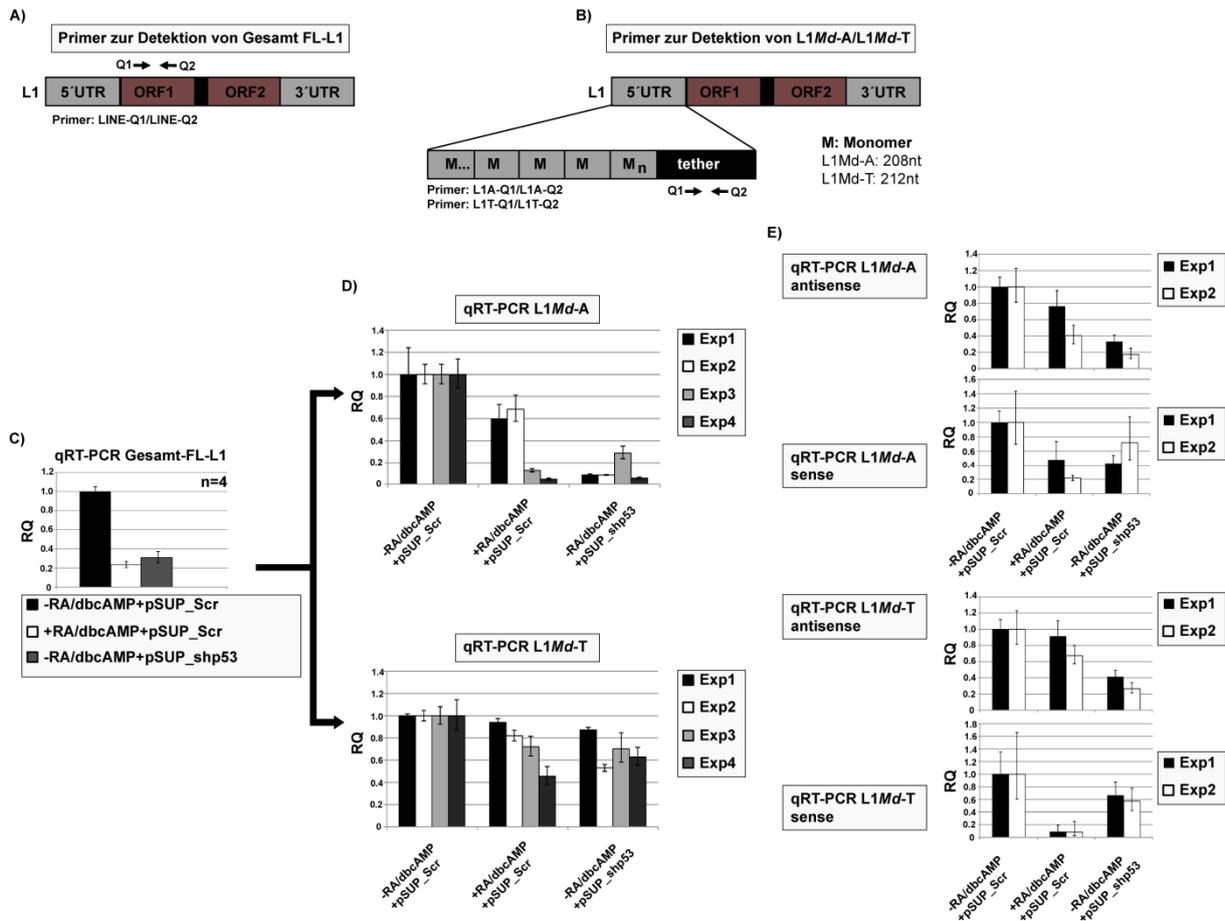


Abbildung 6.17: Analyse der Gesamtexpression von FL-L1-Elementen, der L1Md-A und L1Md-T Familien-spezifischen Expression, sowie der SP- und ASP-Aktivität in Abhängigkeit von p53. (A) Schematische Darstellung der Lokalisation der ORF1-spezifischen Primer zur Detektion aller L1-Elemente. Eine konservierte ORF1-Region wurde für das Design der Primer gewählt. (B) Schematische Darstellung der Lokalisation der Primer zur Detektion Familien-spezifischer L1Md-Elemente. Die Primer sind innerhalb der Familien-spezifischen „tether“-Sequenz innerhalb der 5'-UTR Region lokalisiert. (C) qPCR-Ergebnisse der Gesamt-L1-Expression in unbehandelten pSUP_Scr, RA/dbcAMP-behandelten pSUP_scr und unbehandelten pSUP_shp53 transfizierten F9-Zellen. Die Normierung erfolgte auf die L1-Expression aus der Probe undifferenzierter Zellen. (D) qPCR Ergebnisse der Expression von L1Md-A und L1Md-T Elementen in unbehandelten pSUP_Scr, RA/dbcAMP-behandelten pSUP_scr und unbehandelten pSUP_shp53 transfizierten F9-Zellen. Die Normierung erfolgte auf die Werte aus der undifferenzierten Probe. (E) Detektion der SP- und ASP-Aktivität des 5'-UTRs der L1Md-A und L1Md-T Familie. Die Normierung erfolgte auf die Werte aus undifferenzierten Proben. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* in allen Experimenten verwendet. Alle Analysen wurden 72h nach Transfektion durchgeführt. Zur Beseitigung von genomischen DNA-Resten wurden die RNA-Proben mit DNaseI behandelt.

Übereinstimmend mit den publizierten Daten (Martin and Branciforte, 1993; Naas et al., 1998; Schichman et al., 1992) ließ sich in F9-Zellen eine starke L1-Expression nachweisen (Abb. 6.17C). Betrachtet man die Gesamtheit der FL-L1-Elemente, so war eine Korrelation mit dem p53-Protein zu beobachten. Nach RA/dbcAMP-induzierter Differenzierung nahm die L1-Expression um das 5-fache ab. Ebenfalls zeigte sich ein regulatorischer Einfluss nach p53-Depletion, welcher in einer 3-fachen

Reduktion der Gesamtexpression resultierte (Abb. 6.17C). Durch die Unterscheidung der L1-Familien ließ sich dieses Bild weiter verfeinern und so konnte im Verlauf der Differenzierung eine Reduktion der L1*Md*-A Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 6.17D). Allerdings war diese Abnahme sehr heterogen und variierte zwischen einer <2 und >10-fachen Reduktion im Vergleich zu undifferenzierten Zellen (Abb. 6.17D). Die Daten nach p53-Depletion schienen hingegen untereinander homogener und die Reduktion des Proteins korrelierte mit einer 3-10-fach reduzierten L1*Md*-A Expression (Abb. 6.17D). Im Gegensatz zur L1*Md*-A Familie war die L1*Md*-T Familie nur geringfügig reguliert. Zwar ließ sich auch hier eine Abnahme der Expression nach Differenzierung nachweisen; diese war aber nur als Tendenz erkennbar. Auch nach shRNA-vermittelter Depletion von p53 wurde das heterogene Bild nicht eindeutiger: die Reduktion des p53-Proteins resultierte nur in einer geringfügigen Abnahme der Expression der L1*Md*-T Elemente. Durch den Einsatz der strangspezifischen Primer für die cDNA-Synthese gelang es, sowohl bei der L1*Md*-A als auch L1*Md*-T Familie die SP- und ASP-Aktivitäten zu detektieren (Abb. 6.17E). Betrachtet man dabei die Transkription ausgehend von der SP-Aktivität der L1*Md*-A Familie, zeigen die Ergebnisse eine tendenzielle Abnahme (bis zu 2-fach) nach Differenzierung. Deutlicher wird das Ergebnis nach p53-Depletion, welche mit einer ca. 3-fachen Abnahme des sense Transkripts korreliert. Analoge Resultate brachte die Analyse der antisense Transkripte: 2.5-5-fache Abnahme nach Differenzierung bzw. bis zu 2-fache Reduktion nach p53-Depletion (Abb. 6.17E oben). Im Gegensatz zur L1*Md*-A Familie scheint die SP-Aktivität der L1*Md*-T Familie nach Differenzierung nur geringfügig reguliert, allerdings resultierte die p53-Depletion in einer 2.5-3-fachen Abnahme des Transkripts (Abb. 6.17E unten). Stärker reguliert war die Transkription aus dem L1*Md*-T ASP-Promotor: 10-fache Regulation nach Differenzierung, ca. 2-fache Reduktion nach p53-Depletion.

Ein Hauptproblem bei der PCR-basierten Detektion ist die fehlende Aussage über die transkriptionelle Aktivität individueller FL-L1-Elemente, welche unterschiedlich und vielleicht Kontext-abhängig reguliert werden könnte. Diese Vermutung ließ sich durch die Analyse der L1-Expression in undifferenzierten Zellen, die mit verschiedenen Zelldichten ausplattiert wurden, bestätigen (Abb. 6.18).

ERGEBNISSE

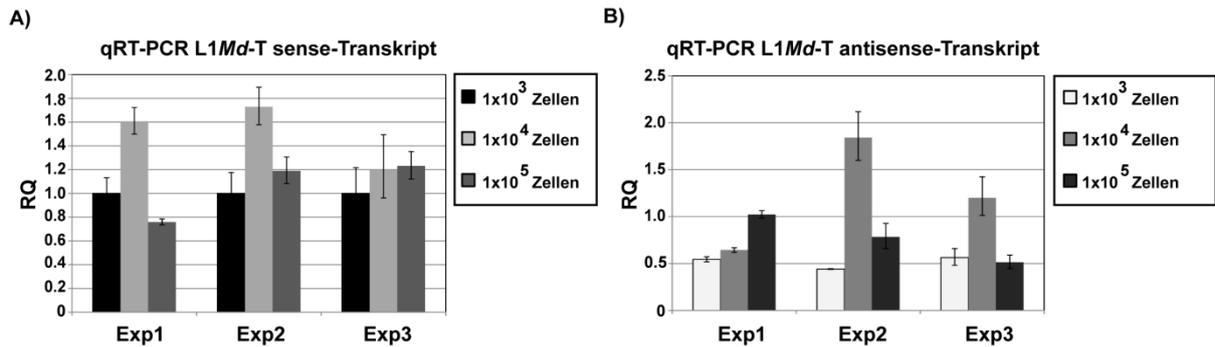


Abbildung 6.18: Untersuchung der zell-dichteabhängigen SP und ASP L1Md-T Aktivität. Undifferenzierte F9-Zellen wurden mit unterschiedlichen Zellzahlen (1×10^3 , 1×10^4 und 1×10^5 Zellen/10cm Schale) ausplattiert und die SP- (A) und ASP-spezifischen Transkripte (B) durch strangspezifische cDNA-Synthese (siehe Abb. 6.18) 24h nach Kultivierung analysiert. Die Normierung erfolgte auf die sense-Transkripte der Probe mit 1×10^3 Zellen. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet.

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass sich das Gleichgewicht zwischen der SP- und ASP-Aktivität schon in Abhängigkeit der Zelldichte verschiebt (Abb. 6.18). Bei einer geringen Zelldichte ließ sich eine reproduzierbare, um den Faktor 2 reduzierte Expression des antisense Transkripts (Abb. 6.18B) im Vergleich zum sense Transkript (Abb. 6.18A) detektieren. Dagegen resultierte eine höhere Zelldichte in einer heterogenen Expression, bei der sich nur noch schwer Tendenzen ablesen lassen. Darüber hinaus hatte die Zelldichte auch einen Einfluss auf die Gesamtexpression der FL-L1-Elemente (Abb. 6.19):

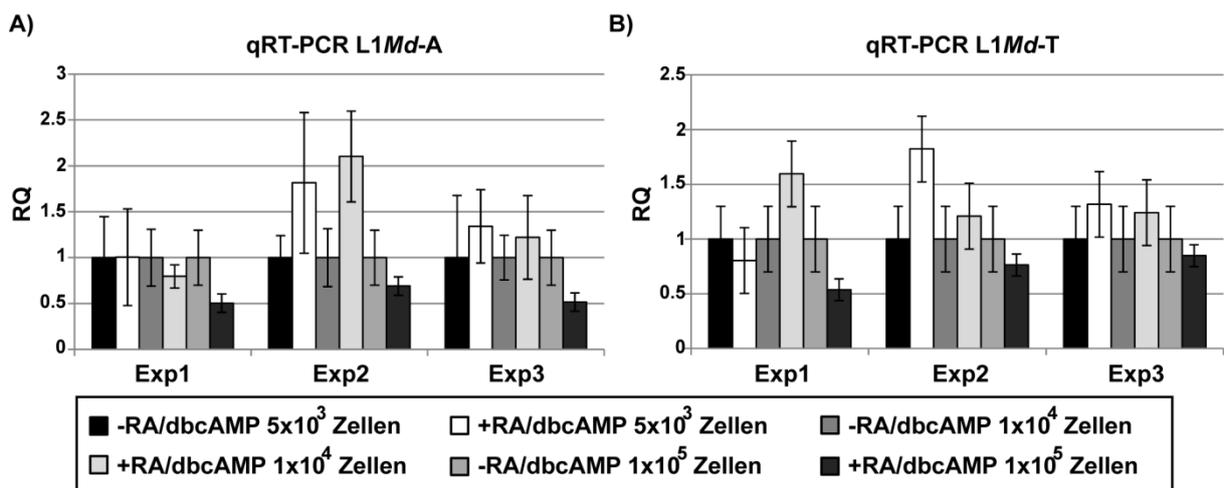


Abbildung 6.19: Untersuchung der zell-dichteabhängigen L1Md-A und L1Md-T Transkription. Undifferenzierte F9-Zellen wurden mit unterschiedlichen Zellzahlen (1×10^3 , 1×10^4 und 1×10^5 Zellen/10-cm Schale) ausplattiert und die Transkription der L1Md-A und L1Md-T Elemente nach Differenzierung im Verhältnis zu den undifferenzierten Kontrollzellen verglichen. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet.

Um den weiteren Einfluss auf die Regulation der SP- und ASP-Aktivität von L1*Md-A* und L1*Md-T* Elementen zu untersuchen, wurde in unbehandelten Zellen das p53-Protein durch 5FU-Behandlung aktiviert und die Expression der sense und antisense Transkripte 4h bzw. 24h nach 5FU-Zugabe untersucht.

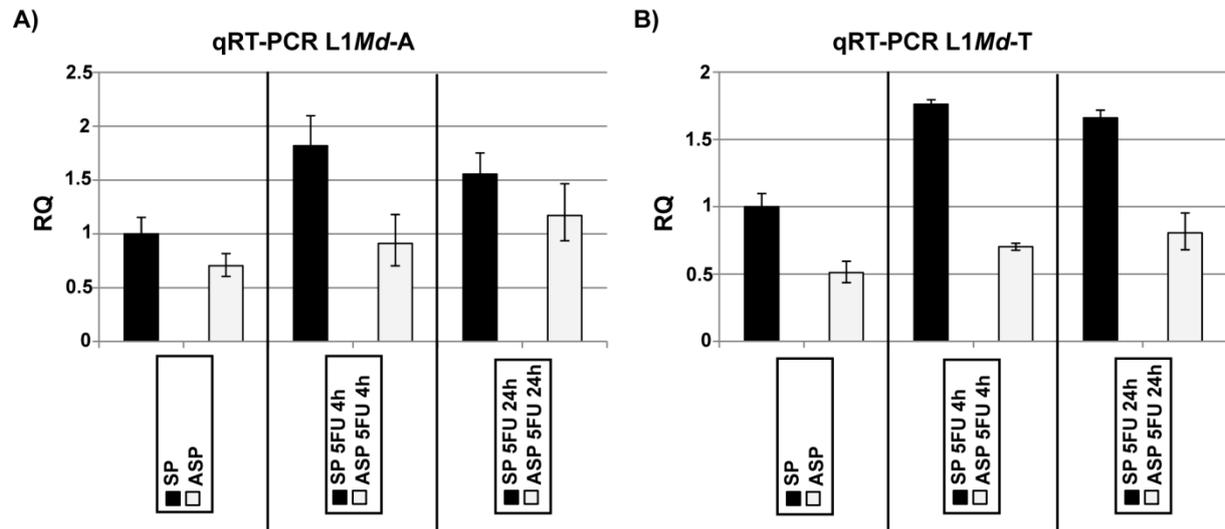


Abbildung 6.20: Regulation der L1 SP- und ASP-Transkription nach Aktivierung von p53 durch 5FU. qPCR Ergebnisse nach strangspezifischer cDNA-Synthese (siehe Abb. 6.18) der L1*Md-A* (A) und L1*Md-T* (B) Familie. Dargestellt sind die RQ-Werte im Vergleich zwischen unbehandelten und 5FU (10µg/ml) behandelten Zellen nach 4 und 24h. Normiert wurde auf das sense-Transkript unbehandelter Zellen. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus Abbildung 6.17 korrelierte die Aktivierung von p53 durch 5FU in einer tendenziellen, bis zu 2-fachen Zunahme der sense- und antisense Transkripte der L1*Md-A* (Abb. 6.20A) und L1*Md-T* (Abb. 6.20B) Familie. Diese Ergebnisse stimmen mit publizierten Daten überein, die eine Induktion der L1-Expression in Folge von genotoxischen Giften, Strahlung und Hitzeschock beschreiben (Farkash and Luning Prak, 2006; Kale et al., 2006; Li et al., 1999).

Trotz der starken Heterogenität weisen die Daten auf (i) eine Reduktion der L1-Transkription nach p53-Depletion hin und (ii) geben erste Hinweise auf eine ASP-Aktivität muriner L1-Elemente. Für eine genauere Analyse scheint es essentiell, die Regulation individueller L1-Elemente zu charakterisieren. Um dem Hinweis auf eine murine ASP-Aktivität nachzugehen, und die Regulation der L1-Promotoraktivität im Kontext zur p53-Expression besser zu charakterisieren, wurden Reportervektoren konstruiert (siehe Methoden 5.6.7), die eine durchflusszytometrische Analyse der SP- und ASP-Aktivität ermöglichen. Diese Analysen sind essentiell, um zu klären, ob der

beobachtete Einfluss von p53 auf die L1-Transkription durch sogenannte „*downstream* Effekte“ zustande kommt oder direkt durch p53 vermittelt wird.

6.6.1.1 Untersuchung der SP- und ASP-Aktivität des L1*Md*-T und L1*Md*-A 5'-UTRs und deren Regulation durch p53

Eine ASP-Aktivität für die humane L1 5'-UTR Region wurde bereits beschrieben (Speek, 2001). Diese ASP-Aktivität ist in vielen Geweben über die entsprechenden Transkripte nachweisbar und möglicherweise an der epigenetischen Regulation zellulärer Gene beteiligt (Soifer and Rossi, 2006; Yang and Kazazian, 2006). Mittlerweile war es sogar möglich, den ASP für humane L1-Elemente umfangreich zu kartieren (Matlik et al., 2006; Yang and Kazazian, 2006). Für murine L1 5'-UTRs wurde bislang keine ASP-Aktivität gezeigt. Auch gibt es entgegen zu Humanzellen (Harris et al., 2009) keine Studien über den Einfluss von p53 auf die Regulation der L1-Promotoraktivitäten. Durch die Klonierung der L1*Md*-A und L1*Md*-T 5'-UTR Regionen und dem Aktivitätsnachweis über einen fluoreszierenden Reporter, der unter direkter Kontrolle der L1 5'-UTRs steht, sind diese Untersuchungen nun möglich (siehe Methoden 5.6.7).

Dabei sind verschiedene Fragestellungen relevant und für diese Arbeit zu klären: (i) inwieweit lässt sich eine SP- und ASP-Aktivität der L1 5'-UTRs nachweisen und (ii) ist das p53-Protein an der Regulation des Promotors beteiligt. Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurden F9-Zellen mit den Reporterkonstrukten (L1T-5UTR-forward und L1T-5UTR-revers, L1A-5UTR-forward und LAT-5UTR-revers) transfiziert. Zusätzlich zu den Reporterkonstrukten wurden die Zellen transient mit einer siRNA zur Depletion von p53 bzw. einer scrambled siRNA transfiziert. Durch diesen Versuchsaufbau lassen sich beide Fragestellungen parallel analysieren. Als weitere Kontrollen wurden F9-Zellen (i) zur Hintergrundabgleichung und zur Validierung der Reporterkonstrukte mit dem Promotor-freien pGL3-GFP Konstrukt und (ii) zur Validierung des geeigneten Analysezeitpunkts mit pEGFP-N2 (Ursprungsvektor für die *eGFP*-Sequenz, siehe Abschnitt 5.6.6) und siRNA transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden 24-48h kultiviert und die *eGFP*-Fluoreszenz anschließend durchflusszytometrisch vermessen.

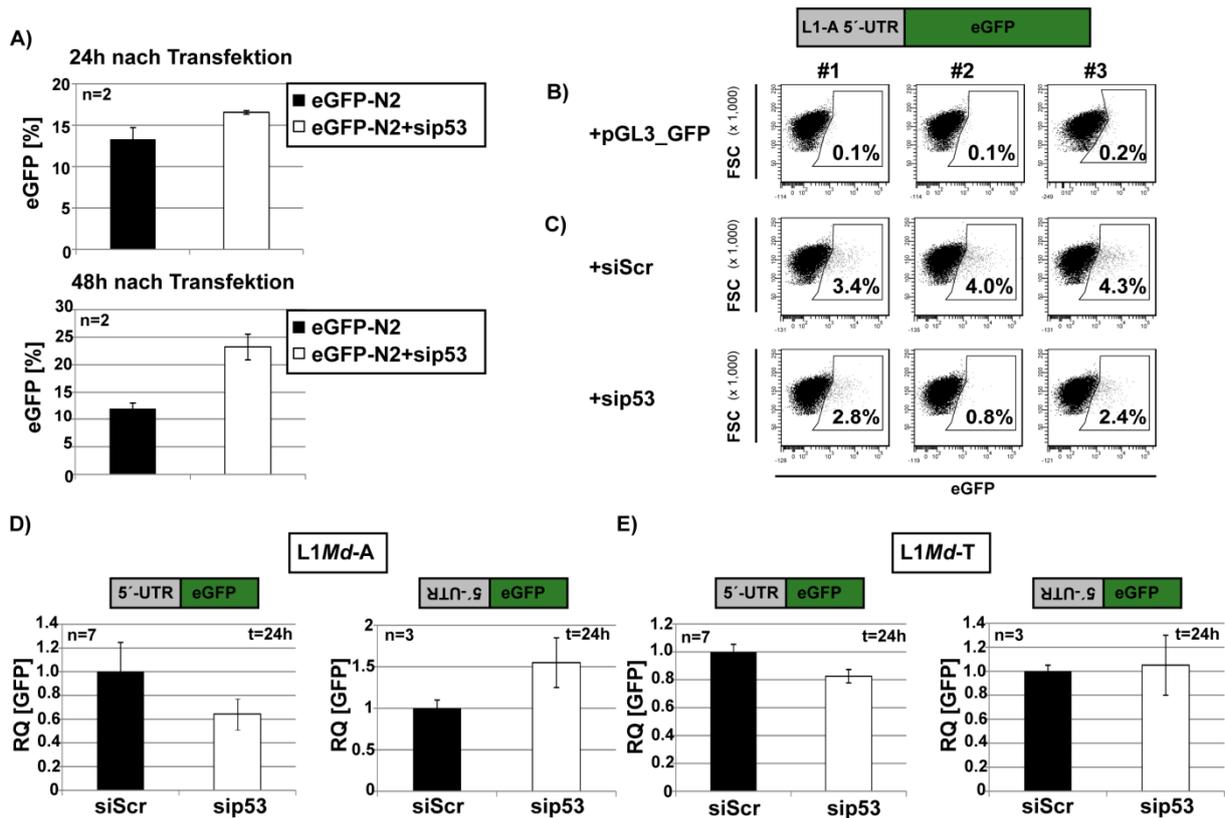


Abbildung 6.21: Analyse der L1Md-T SP und ASP 5'-UTR-Aktivität und der Einfluss von p53 auf deren Regulation. (A) Validierung des Analysezeitpunkts: F9-Zellen wurden 24 bzw. 48h nach der Ko-Transfektion des pEGFP-N2 Konstrukts mit siScr bzw. sip53 durchflusszytometrisch analysiert und die eGFP-Fluoreszenz vermessen. **(B-C)** Exemplarisch dargestellte Ergebnisse der FACS-Analyse nach L1A-5UTR-forward Ko-Transfektion mit Scr bzw. p53-spezifischen siRNAs nach 24h (C). Dargestellt sind die Dotplot-Diagramme als FCS gegen die eGFP-Fluoreszenz. Zur Definition der positiven Gates und zur Entfernung von Hintergrundfluoreszenzen wurde der Promotor-freie pGL3-GFP Vektor ebenfalls transfiziert und auch untransfizierte Zellen vermessen (B). **(D-E)** Zusammengefasste Ergebnisse der L1Md-A (D) bzw. L1Md-T (E) SP- und ASP-Aktivität in Abhängigkeit von der Expression des p53-Proteins. Normiert auf die kontrolltransfizierte Zellen.

Aufgrund der in Abbildung 6.21A dargestellten Ergebnisse erfolgte die Analyse der L1-5'-UTR SP- und ASP-Aktivität 24h nach Transfektion. Die Transfektion der Zellen mit dem promotorlosen pGL3-GFP Konstrukt resultierte nur in einer 0.1-0.2%igen Hintergrundfluoreszenz (Abb. 6.21B), die von den zu untersuchenden Proben abgezogen wurde. Die Transfektion des L1A-5UTR-forward Konstrukts zeigte nach Kotransfektion mit der Scr-Kontrolle eine eGFP-Fluoreszenz in 3.4-4.3% der Zellen (Abb. 6.21C), wobei vergleichbare Werte ebenfalls nach L1A-5UTR-revers, L1T-5UTR-forward und L1T-5UTR-revers detektiert wurden. Der Vergleich der eGFP-Fluoreszenzen und folglich der SP- und ASP-Aktivitäten in Abhängigkeit des p53-Proteins resultierte in einem heterogenen Bild: so schien die Depletion zwar Auswirkungen auf die L1-A sense 5'-UTR Promotoraktivität zu haben, nicht aber auf

die L1-T 5'-UTR SP-Aktivität (Abb. 6.21D/E). Auch bei der Messung der ASP-Aktivitäten ließ sich nur im Falle des L1-A Konstrukts eine Regulation zeigen. Allerdings variierte das Ausmaß der Regulation zwischen den einzelnen Experimenten sehr stark. Ein möglicher Grund könnte eine geringe Transfektionseffizienz sein: die Wahrscheinlichkeit eine ursprünglich p53-positive Zelle (ca. 30% der Gesamtkultur) sowohl mit der siRNA als auch den L1-Konstrukten simultan zu manipulieren ist nur gering. Zudem existiert eine enorm große Anzahl an FL-L1-Elementen innerhalb des Genoms, so dass eine genomweite Regulation eher unwahrscheinlich wäre; dadurch motivieren auch diese Ergebnisse, die Eigenschaften einzelner FL-L1-Elemente zu untersuchen.

Als Kontrolle wurden 3T3 (Maus-Fibroblastenzellen mit Wildtyp p53-Expression) und 3T3LT (SV40-transformierte Zellen, in denen p53 durch das *Large T-Antigen* inaktiviert ist) mit den L1A/T-5UTR Konstrukten transfiziert. Allerdings ließen sich sowohl in p53-positiven 3T3 als auch SV40-transformierten 3T3LT-Zellen keine Aktivitäten der 5'-UTR Promotoren nachweisen. Auch die UV-Bestrahlung zur Aktivierung des p53-Proteins in 3T3-Zellen sowie die ektopische p53-Expression nach pCIneo-wtp53 Transfektion resultierten in keiner visualisierbaren Fluoreszenz des Reporters (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise spielt hier der Zellhintergrund eine Rolle. L1-Retrotransposons werden gerade in Keimbahnzellen und embryonalen Karzinomzellen stark exprimiert (Branciforte and Martin, 1994; Trelogan and Martin, 1995). Denkbar wäre, dass die in 3T3-Zellen essentiellen Kofaktoren, wie z.B. weitere Transkriptionsfaktoren, die für eine Koaktivierung des L1 5'-UTRs zusammen mit p53 unerlässlich sein könnten, nicht vorhanden sind.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Reporterkonstrukte den zuverlässigen Nachweis der bidirektionalen L1Md-T/L1Md-A 5'-UTR-Promotoraktivität in F9-Zellen ermöglichen.

6.6.1.2 Untersuchung der Promotoraktivität interner L1-Regionen und deren Regulation durch p53

Muotri et al. zeigten 2005 die Sox2 vermittelte Repression von humanen L1-Elementen in adulten neuronalen Stammzellen (NSC, *Neuronal Stem Cells*) (Muotri et al., 2005). Aufgrund einer signifikanten Anreicherung von Sox2/LEF-Bindungsmotiven innerhalb humaner L1-Elemente untersuchten Kuwabara et al. 2009 den Einfluss von L1-Elementen an der Transition von NSCs zu proliferierenden

neuronalen Vorläuferzellen. Dabei bestätigten sie zum einen die für humane L1 5'-UTRs beschriebene bidirektionale Promotoraktivität, zeigten aber zusätzlich, dass auch innerhalb der L1-ORF2-Sequenz eine SP- als auch ASP-Promotoraktivität vorhanden ist (Kuwabara et al., 2009).

Inwieweit können die murinen internen L1-Regionen als Promotor fungieren? Zur Untersuchung wurden Vektoren im pBLAK-Hintergrund von Dr. David Symer verwendet (The Ohio State University Comprehensive Cancer Center, unpublizierte Daten). Dabei wurden L1-Fragmente der L1*Md*-T Familie (Genbank ID: AF016099) in unterschiedlicher Orientierung vor (*upstream*) das β -Laktamasegen kloniert: der 5'-UTR in sense Orientierung zum β -Laktamasegen, ORF1-, ORF2- und ORF1-IRES-überlappende Fragmente in reverser Orientierung zum β -Laktamasegen. Diese Vektorkonstrukte wurden in F9-Zellen transfiziert und die mit der Promotoraktivität korrelierende Expression und Aktivität der β -Laktamase durch Umsetzung eines fluoreszierenden Substrats nach 48h durchflusszytometrisch vermessen. Die nachfolgende Abbildung gibt eine Übersicht über die Orientierung der klonierten L1-Fragmente in Bezug auf das β -Laktamasegen und fasst die Ergebnisse der Messungen zusammen:

ERGEBNISSE

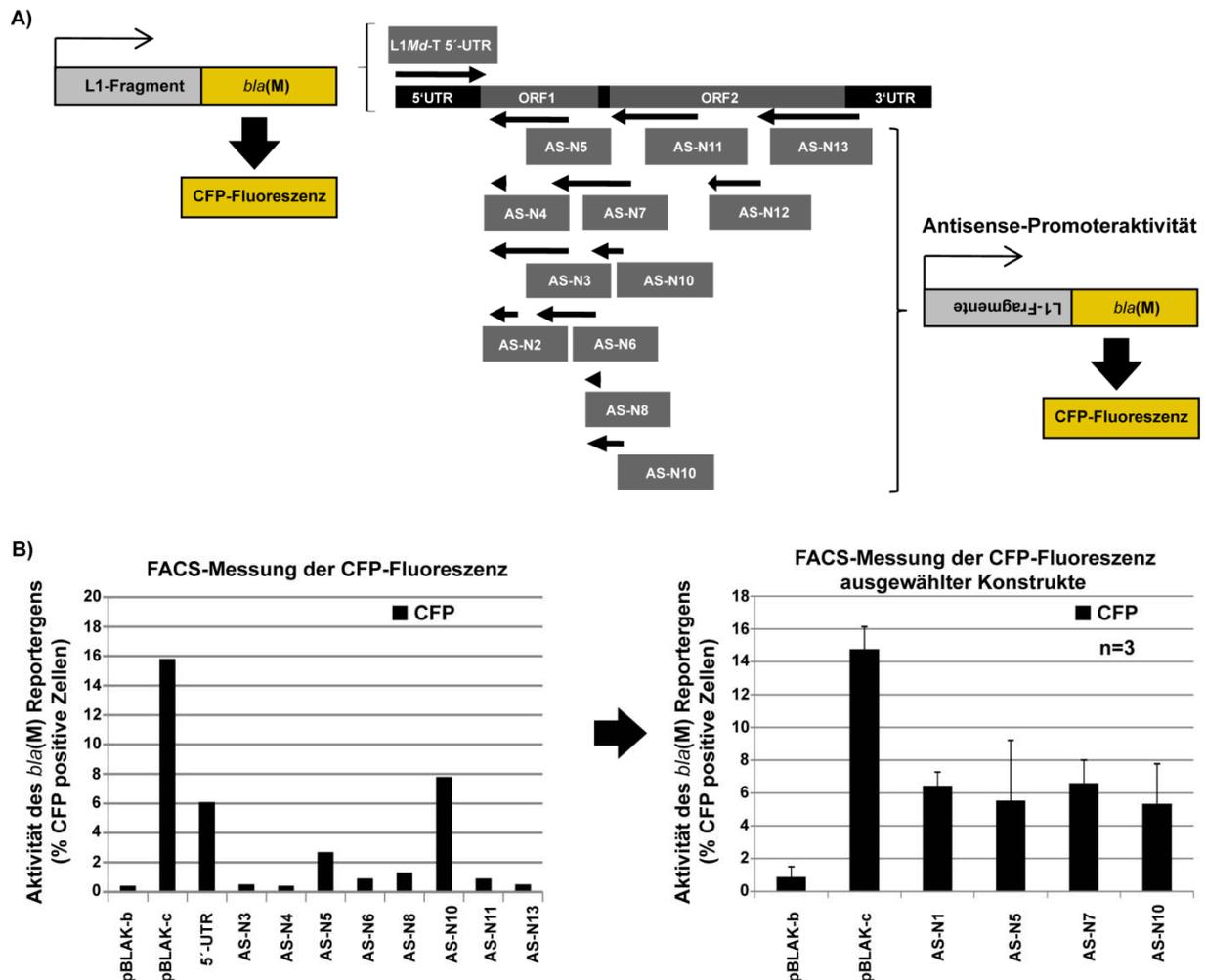


Abbildung 6.22: FRET-basierte Charakterisierung der internen L1-Promotoraktivität durch das β -Laktamase Reportergen. (A) Übersicht über die verwendeten L1-Fragmente im pBLAK-Vektor. Die SP-Aktivität wird dabei durch die β -Laktamaseexpression unter L1 5'-UTR-Kontrolle detektiert. Die putativen ASP-Aktivitäten wurden über die β -Laktamaseaktivität unter Kontrolle der in reverser Orientierung klonierten ORF1-, ORF2- und ORF1-IRES-Fragmente analysiert. Durch die Umsetzung eines FRET-aktivierten (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer) Substrats (CCF2), das mit der β -Laktamaseaktivität korreliert, ist der Emissionsschift von YFP zu CFP durchflusszytometrisch quantifizierbar. Alle pBLAK-Konstrukte wurden transient in F9-Zellen transfiziert und die CFP-Fluoreszenz 48h nach Substratzugabe bestimmt (FACSCanto, BD). Zusätzlich zu den aufgeführten pBLAK-Vektoren wurden zwei Kontrollvektoren verwendet: als Negativkontrolle der Promotor-freie pBLAK-Vektor (pBLAK-b) und als Positivkontrolle der pBLAK-Vektor mit einem SV40-Promotor (pBLAK-c). Die Pfeile geben die Orientierung der klonierten Fragmente wieder. **(B)** Ergebnisse der FACS-Messung der CFP-Fluoreszenz. Dargestellt ist die gemessene Aktivität der β -Laktamase ausgedrückt in % der CFP-positiven Zellen als Säulendiagramm. Die Vektoren mit signifikanter CFP-Fluoreszenz über den Hintergrund der pBL-Kontrolle wurden als Triplikate erneut vermessen (rechtes Diagramm). Zusätzlich wurden die Konstrukte AS-N7/AS-N1 verwendet, die bei der ersten Messung noch nicht zur Verfügung standen.

Zum einen bestätigen die Ergebnisse die in Abbildung 6.21 gemessene L1Md-T 5'-UTR SP-Aktivität in F9-Zellen. Durch Transfektion des 5'-UTR Konstrukts in sense Orientierung (Abb. 6.22A) konnte die SP-Aktivität über die β -Laktamaseaktivität in rund 6% der F9-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 6.22B). Darüber hinaus zeigten

einige der internen L1-Fragmente eine deutliche ASP-Aktivität (Abb. 6.22B): AS-N1 mit >6%, AS-N5 mit >5%, AS-N7 mit >6% und AS-N10 mit >5% (6.22B, rechtes Diagramm). Interessanterweise beinhalteten all diese Konstrukte Fragmente aus der ORF1- und ORF1-IRES-Region. Zum anderen zeigten die getesteten pBLAK-Vektoren mit ORF2-Fragmenten keine Promotoraktivität. Anscheinend ist die Promotoraktivität muriner L1-Elemente nicht nur auf den 5'-UTR begrenzt, sondern weist auch eine ASP-Aktivität ausgehend von der ORF1- und IRES-Sequenz auf.

Um den Einfluss von p53 auf die Regulation dieser internen Promotoraktivitäten zu untersuchen, wurde die β -Laktamaseaktivität nach ektoptischer p53-Expression exemplarisch für das AS-N7 pBLAK-Konstrukt gezeigt, dass genau mit der ORF1-IRES-Region überlappt (siehe Abb. 6.22A).

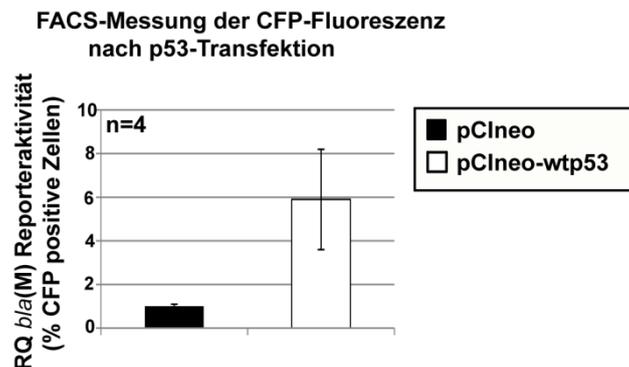


Abbildung 6.23: Einfluss von p53 auf die ASP-Aktivität einer internen L1-Region. Zur Analyse der mit der ASP-Aktivität korrelierenden β -Laktamaseaktivität wurden F9-Zellen mit dem pBLAK_AS-N7 Konstrukt sowie dem pCIneo bzw. pCIneo-wtp53 Vektor kotransfiziert. Die CFP-Expression wurde 48h nach Transfektion mittels FACS detektiert (FACSCanto, BD). Dargestellt ist die gemessene Aktivität der β -Laktamase ausgedrückt in % der CFP-positiven Zellen als Säulendiagramm. Dabei wurden die gemessenen Werte der pCIneo-wtp53 Transfektion relativ in Bezug auf die Kontrolltransfektion quantifiziert (n=3).

Die Messungen zeigten eine p53-abhängige Regulation der ASP-Aktivität interner L1-Regionen. So resultierte das Einbringen des p53-Proteins in einer knapp 6-fachen Zunahme der β -Laktamaseaktivität (Abb. 6.23). Damit ist p53 ein akzessorischer Transkriptionsfaktor, der durch die Interaktionen mit weiteren Faktoren die Aktivität des L1-Promotors ausgehend vom 5'-UTR und internen Sequenzen positiv regulieren kann.

Auch wenn es sich bei diesen Transfektionsstudien um ein artifizielles System handelt, bildet das Resultat, dass das p53-Protein sowohl die SP- als auch die ASP-Aktivität von L1-Elementen reguliert, die Grundlage für die Analyse individueller FL-

L1-Elemente unter endogenen Bedingungen. Das Wissen über den Einfluss von p53 an der Beteiligung der Zelldifferenzierung (siehe Abschnitt 6.3), dem Zusammenhang der Assoziation differenzierungsregulierter Gene mit FL-L1-Elementen durch bioinformatische Analysen (siehe Abschnitt 6.5) und die Tatsache, dass p53 an der Regulation der L1-Promotoraktivität beteiligt ist, werden nun genutzt, um die Regulation und die Funktion einzelner FL-L1-Elemente am Differenzierungsprozess mechanistisch zu untersuchen.

6.6.2 Untersuchung der endogenen L1 ASP-Aktivität und dessen Regulation durch p53

Grundlage bei der Auswahl der individuellen Elemente waren die Ergebnisse der bioinformatischen Analysen. Fasst man diese grob zusammen, lassen sich bei der Auswertung der L1-Lokalisationsdaten in Bezug auf differenziell exprimierte Gene, dessen Expression nach Differenzierung zunimmt, zwei Szenarien unterscheiden:

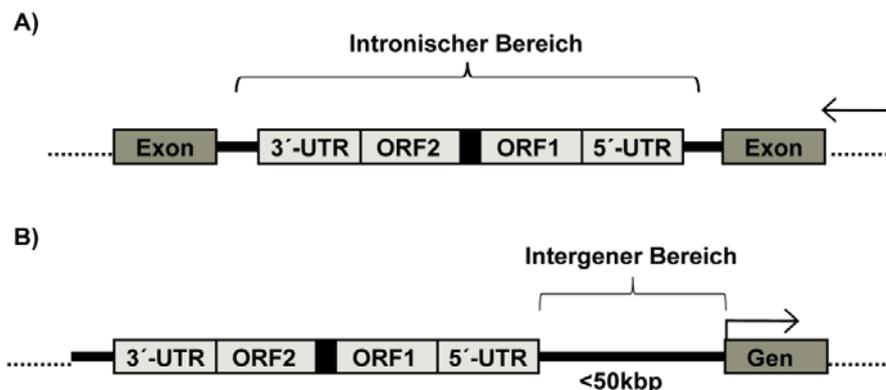


Abbildung 6.24: Orientierung von FL-L1-Elementen im Kontext differenzierungs-regulierter Gene. (A) Das L1-Element liegt im intronischen Bereich zwischen zwei kodierenden Exons. Dargestellt ist die Orientierung in sense bezogen auf die Transkriptionsrichtung des Gens; reverse Orientierung ist nicht dargestellt aber ebenfalls möglich. **(B)** Das L1-Element liegt im intergenen Bereich *upstream* oder *downstream* des Gens. Dargestellt ist die Orientierung in antisense bezogen auf die Leserichtung des Gens. Bei der bioinformatischen Analyse wurden nur FL-L1-Elemente berücksichtigt, dessen Entfernung zur *transcription start site* (TSS) eines Gens <50kbp betrug.

Das individuelle FL-L1-Element liegt dabei entweder (i) innerhalb eines Introns des differenziell regulierten Gens (intronischer Bereich, Abb. 6.24A) in Leserichtung (sense) oder entgegen der Leserichtung (antisense, revers) oder (ii) in unmittelbarer Nähe außerhalb des Gens (<50kbp) (intergener Bereich, Abb. 6.24B).

Zum Nachweis der antisense Transkripte wurde ein Primer innerhalb des L1 5'-UTR platziert, der andere Primer außerhalb der L1-kodierenden Sequenz, den 5'-UTR flankierend (Abb. 6.25).

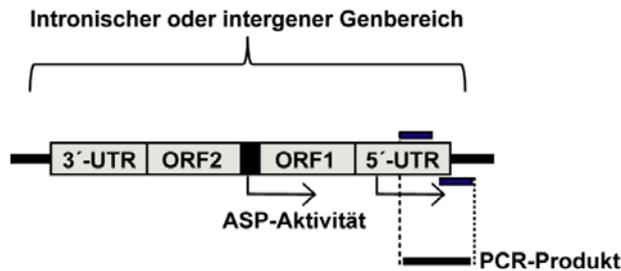


Abbildung 6.25: Anordnung der Primer zum Nachweis der L1 ASP-Aktivität. Schematische Übersicht über die Lokalisation der Primer zur Detektion von antisense Transkripten. Die Primer sind in blau dargestellt.

Das p53-Protein ist in undifferenzierten F9-Zellen funktionell (siehe Abschnitt 6.1), in Zellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften angereichert (siehe Abschnitt 6.3) und – neben seinen Funktionen unter Stressbedingungen – an der Regulation der zellulären Differenzierung beteiligt (siehe Abschnitt 6.4). Gerade hinsichtlich der Mobilisierbarkeit von L1-Elementen und der damit verbundenen möglichen Schädigung der genomischen Integrität (siehe Einleitung 2.4.3) stellen sich die Fragen: wie lässt sich die Aktivierung der L1-Transkription durch p53 mit der zellulären Differenzierung verknüpfen und welche Mechanismen existieren bei der Unterbindung der möglichen schädigenden Mobilisierbarkeit?

Die ursprünglich in humanen Zellen (Matlik et al., 2006) und im Rahmen dieser Arbeit in murinen Zellen identifizierte bidirektionale Transkription aus den L1-Elementen und deren Regulation durch p53 ermöglichen nun, gekoppelt mit den bioinformatischen Auswertungen, die Analyse der AS-Transkription individueller L1-Elemente in Abhängigkeit ihrer Lokalisation (Abb. 6.24A).

6.6.2.1 Analyse der intronischen FL-L1-Elemente innerhalb von differenzierungsspezifischen Genen

Zur Untersuchung der ASP-Aktivität intronischer FL-L1-Elemente wurden 5 FL-L1s ausgewählt, die in den hochregulierten differenzierungsspezifischen Genen *Bmper*, *Gpr126*, *Raet1e*, *Sema6d* und *Rarb* lokalisiert sind.

Zur Untersuchung der Aktivität der internen individuellen FL-L1 SP- und ASP-Aktivität wurden qPCR-Primer generiert, die am Beginn des 5'-UTRs und *upstream* im intergenen Bereich (ASP-Aktivität) sowie am Ende des 3'-UTRs und *downstream* im intergenen Bereich lokalisiert sind (SP-Aktivität) (Anchor-PCR) (Abb. 6.26A). Die sense und antisense Transkripte, ausgehend vom sense und antisense Promotor der L1-Elemente, wurden zwischen undifferenzierten kontrolltransfizierten sowie unbehandelten p53-depletierten Zellen verglichen.

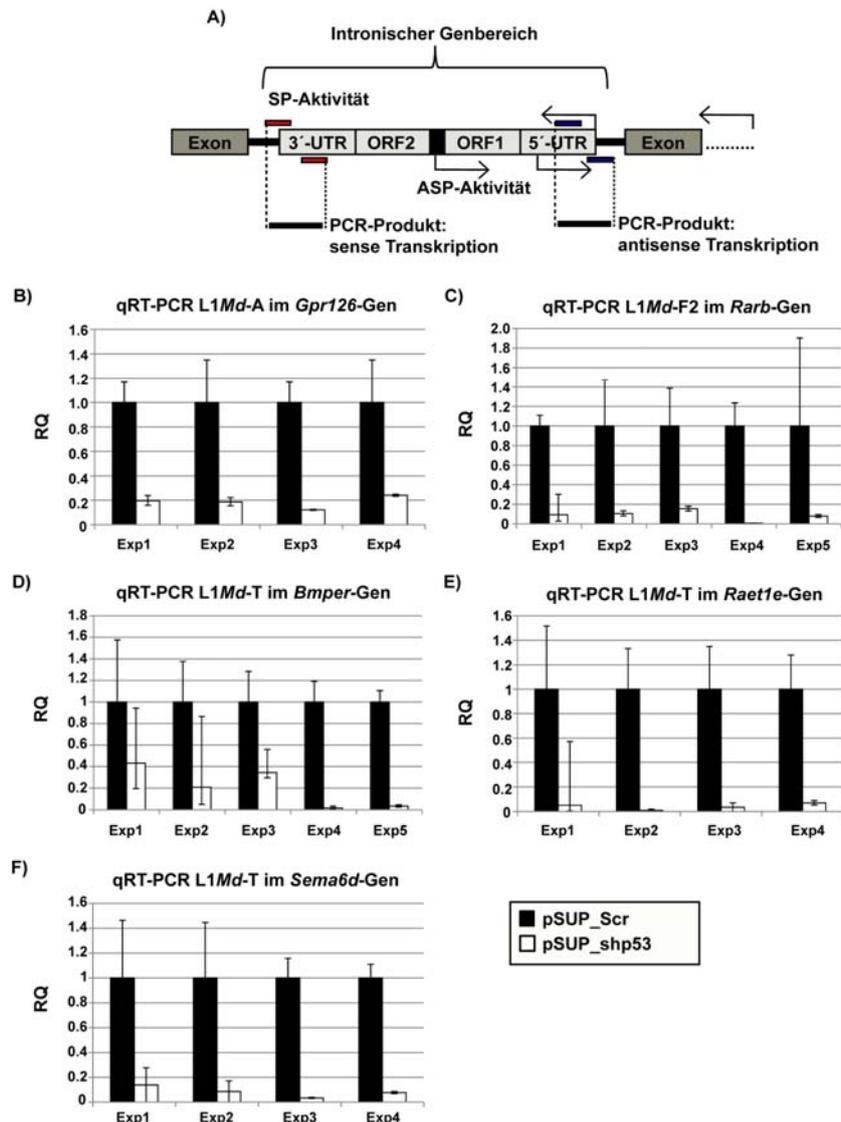


Abbildung 6.26: Regulation der SP- und ASP-Aktivität individueller intronischer FL-L1-Elemente in Abhängigkeit von p53. (A) Positionierung der Primer (siehe Text). Primer zur Detektion des sense-Transkripts sind in rot, zur Detektion des antisense-Transkripts in blau dargestellt. (B) Antisense Transkript des L1Md-A Elements innerhalb des *Gpr126*-Gens. (C) Antisense Transkript des L1Md-F2 Elements innerhalb des *Rarb*-Gens. (D) Antisense Transkript des L1Md-T Elements innerhalb des *Bmper*-Gens. (E) Antisense Transkript des L1Md-T Elements innerhalb des *Raet1e*-Gens. (F) Antisense Transkript des L1Md-T Elements innerhalb des *Sema6d*-Gens. Sense-Transkripte *downstream* des 3'-UTR konnten nicht nachgewiesen werden. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. Die Normierung erfolgte auf die Probe der kontrolltransfizierten Zellen (n=4-5, t=72h nach Ausplattieren der Zellen).

Die Messung der antisense Transkripte, die von der ASP-Aktivität der FL-L1-Elemente ausgeht, ergab eine signifikante Reduktion der Transkriptmenge nach p53-Depletion in allen fünf Genen (Abbildung 6.26B-F). Mit den Primern zur Detektion der vom L1 ausgehenden sense Transkripte (Abb. 6.26A, rot) war hingegen kein Amplikon detektierbar. Aufgrund der Lokalisation der Primer für die Anchor-PCR *downstream* des 3'-UTRs deutet die fehlende Amplifikation die regulierte Termination des L1-Transkripts an. Zusätzlich wurden die antisense-Transkripte von zwei anderen, innerhalb von nicht differenziell regulierten Genen lokalisierten FL-L1-Elementen analysiert: L1Md-T innerhalb des *Robo2*-Gens und L1Md-A innerhalb des *Epha3*-Gens. Interessanterweise war es nicht möglich, ein antisense Transkript aus einem FL-L1-Element innerhalb der nicht regulierten Gene nachzuweisen, was (i) die Idee über den möglichen Einfluss der FL-L1-Elemente am Prozess der Differenzierung weiter unterstützt und (ii) die Spezifität der L1 ASP-Aktivität nur für aktive Gene vermuten lässt. Ein weiteres Indiz für die spezifische Beteiligung der FL-L1-Elemente am Differenzierungsprozess ergab die detailliertere Analyse der innerhalb regulierter Gene liegenden FL-L1-Elemente: so sind innerhalb des *Bmper*- und *Rarb*-Gens jeweils zwei FL-L1-Elemente inseriert. Der Ausschnitt aus dem Genome Browser für das *Bmper*-Gen ist nachfolgend exemplarisch dargestellt:

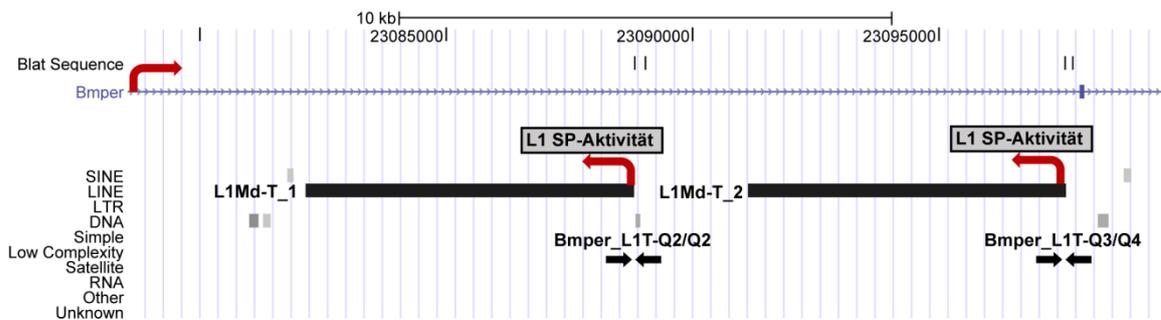


Abbildung 6.27: Darstellung der FL-L1-Elemente innerhalb des *Bmper*-Gens. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem Genome Browser. Die Leserichtung des *Bmper*-Gen ist im oberen Abbildungsteil durch den roten Pfeil markiert. Die zwei in reverser Orientierung liegenden L1-Elemente (L1Md-T_1/L1Md-T_2) sind im unteren Abbildungsteil angezeigt. Die schwarzen Pfeile markieren die Position der Primer zur Detektion der ASP-Aktivität der individuellen FL-L1-Elemente.

Interessanterweise war aber nur eines der FL-L1-Elemente im *Bmper*-Gen aktiv. Nur im Falle des L1Md-T_2 Elements (Abb. 6.27) ließ sich ein antisense Transkript nachweisen (Abb. 6.26D). Für das erste L1Md-T_1 Element war hingegen keine ASP-Aktivität messbar.

Die starke p53-abhängige Expression von antisense Transkripten individueller FL-L1s in undifferenzierten Zellen und deren deutliche Reduktion nach Differenzierung, die mit der Zunahme der Expression des individuellen Gens einhergeht, lassen eine Beteiligung der FL-L1-Elemente an der epigenetischen Regulation der Genexpression vermuten. Innerhalb kürzester Zeit nach RA/dbcAMP-Zugabe kommt es zu einer signifikant gesteigerten Expression der differenziell regulierten Gene. Dies legt nahe, dass sich die Chromatinstruktur in einem transkriptionell offenen Zustand befinden muss, um eine schnelle Genexpression zu ermöglichen. Die stabile Depletion von p53 über mehrere Passagen reduziert möglicherweise die transkriptionelle Kompetenz des Chromatins und folglich auch die Differenzierbarkeit (vergleiche Abbildung 6.15). Gerade die ASP-Aktivität individueller intronischer oder intergener FL-L1-Elemente könnte diesen „offenen“ Chromatinstatus vermitteln und die gesamte Genregion in einem transkriptionell kompetenten Zustand halten. Es wäre auch ein repressorischer Einfluss von p53 auf die Transkription der Gene denkbar: neben der Aktivierung der L1-Promotoraktivität könnte das Protein die Expression des benachbarten Gens reprimieren. Zur Untersuchung des epigenetischen Einflusses intronischer FL-L1-Elemente auf die Transkription differenzierungs-assoziiierter Gene wurden die Experimente exemplarisch an dem L1*Md-A* Element des *Egflam*-Gens durchgeführt. Dabei wurde analog zu den bereits beschriebenen FL-L1-Elementen (siehe Abb. 6.26) (i) der Einfluss von p53 an der Regulation der ASP-Aktivität analysiert, (ii) die Interaktion von p53 mit regulatorischen Bereichen des Gens sowie des FL-L1-Elements untersucht, (iii) die Existenz und Stabilität von nicht-kodierenden Transkripten bestimmt, die durch die ASP-Aktivität des FL-L1-Elements resultieren können, und (iv) der Zustand des Chromatins innerhalb des Genabschnitts durch den Nachweis von Histon-Markern die mit aktivem bzw. inaktivem Chromatin korrelieren, untersucht. (v) Darüber hinaus wurde auch die Besetzung der DNA mit der phosphorylierten Form der RNA-Polymerase II (RNA-Pol II-S5P) analysiert.

6.6.2.2 Untersuchung der L1 ASP-Aktivität im *Egflam*-Gen

Zur Prüfung der ASP-Aktivität des FL-L1*Md-A* Elements innerhalb des *Egflam*-Gens wurden Primer generiert (Positionierung siehe Abbildung 6.25) und das antisense-Transkript im Vergleich zwischen undifferenzierten und RA/dbcAMP-behandelten

pSUP_scr transfizierten und pSUP_shp53 transfizierten undifferenzierten F9-Zellen bestimmt.

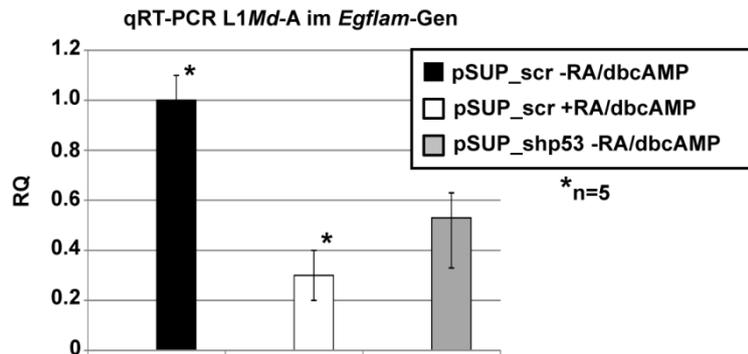


Abbildung 6.28: Analyse der *Egflam* intronischen L1Md-A ASP-Aktivität. qPCR-Analyse zur Detektion des antisense Transkript ausgehend vom L1Md-A Elements innerhalb des *Egflam*-Gens im Vergleich zwischen kontrolltransfizierten (pSUP_scr) undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen sowie undifferenzierten pSUP_shp53 transfizierten Zellen (n=5; t=72h). Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. Die Normierung erfolgte auf die Probe der kontrolltransfizierten undifferenzierten Zellen.

Wie bereits für andere intronische FL-L1-Elemente gezeigt (siehe Abbildung 6.26), ließ sich auch im Falle des L1Md-A Elements ein antisense Transkript nachweisen (Abb. 6.28). Dessen Expression nahm nach Zelldifferenzierung und p53-Depletion um das 4- bzw. 2-fache ab, was auf den regulatorischen Einfluss von p53 an der ASP-Aktivität dieses L1Md-A Elements hindeutet (Abb. 6.28). Aufgrund der L1 ASP-Aktivität wäre es denkbar, dass das antisense-Transkript in nicht-kodierenden Transkripten (ncRNA) mit reverser Orientierung zum *Egflam*-Transkript resultiert. Daher wurden Primer generiert, die im intronischen Bereich zwischen dem L1Md-A Element und der TSS des *Egflam*-Gens positioniert sind und eine Detektion von ncRNAs ermöglichen. Zum Nachweis der direkten Interaktion von p53 mit den regulatorischen DNA-Regionen wurden weitere Primer entworfen, mit denen die Bindung von p53 an das L1Md-A-Element und die *Egflam*-Promotorregion durch p53-ChIP untersucht werden konnte (Abb. 6.29A).

ERGEBNISSE

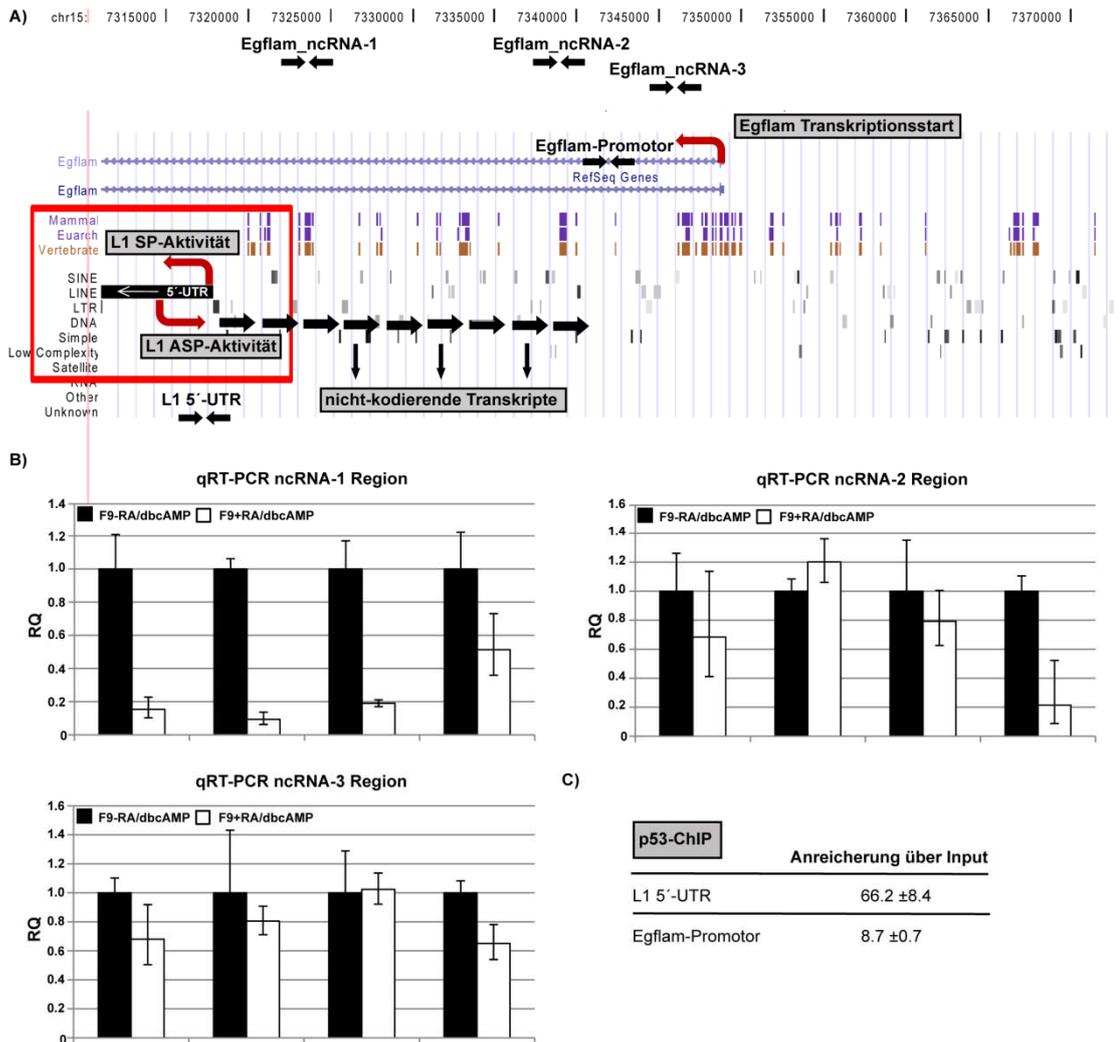


Abbildung 6.29: Untersuchung der Transkription von ncRNAs vermittelt durch die L1 ASP-Aktivität sowie Analyse der p53 DNA-Besetzung am *Egflam*-Gen und L1Md-A Element. (A) Ausschnitt des *Egflam*-Genbereichs mithilfe des Genome Browser. Dargestellt ist ein Ausschnitt des *Egflam*-Gens (Leserichtung durch den roten Pfeil am Promotor gekennzeichnet), sowie des intronisch lokalisierten L1Md-A Elements in identischer Orientierung. Basierend auf der ASP-Aktivität des L1Md-A Elements wurden Primer zur Detektion von nicht-kodierenden Transkripten generiert: *Egflam_ncRNA-1/ Egflam_ncRNA-2* und *Egflam_ncRNA-3*. Um die p53-Besetzung am L1Md-A 5'-UTR zu zeigen, wurde das L1-*Egflam_qChIP* Primerpaar entworfen. Die DNA-Besetzung in der Nähe des *Egflam*-Promotors lässt sich durch die p53 ChIP-Analyse mit den *Egflam_ChIP* Primern analysieren. **(B)** Vergleichende Untersuchung der Expression von ncRNA zwischen undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen (n=4/5; t=72h). Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. Die Normierung erfolgte auf die Probe aus undifferenzierten Zellen. **(C)** Ergebnisse der p53 ChIP-Analyse nach qPCR. Dargestellt ist die Anreicherung der ChIP-DNA über den Input basierend auf der Quantifizierung anhand einer Standardreihe (je Primerpaar) mit Input. Für die Standardreihe wurden 50ng, 10ng, 2ng und 0.4ng der WCE-DNA eingesetzt (Korrelationskoeffizienten $R^2 > 0.98$).

Die Ergebnisse zeigten die Existenz nicht-kodierender Transkripte (Abb. 6.29B) und eine signifikante Anreicherung von p53 innerhalb des L1 5'-UTRs um den Faktor 66 bzw. um den Faktor 9 am *Egflam*-Promotor (Abb. 6.29C). Der Vergleich zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen zeigte dabei eine signifikante, mehr als 5-

fache Reduktion an Transkript in der ncRNA-1 Region nach Differenzierung. In zwei weiteren Regionen (ncRNA-2 und -3) ließen sich zwar die Transkripte nachweisen, doch waren diese nicht reguliert (Abb. 6.29B). Die ncRNA-1 Region ist in unmittelbarer Nähe des L1*Md-A* Elements lokalisiert, wohingegen die zwei anderen Regionen in deutlicher Entfernung in Richtung *Egflam*-TSS liegen (Abb. 6.29A). Zwar lassen sich keine Aussagen über die Länge und Entstehungsposition der ncRNAs durch die L1 ASP-Aktivität treffen, doch deutet die unterschiedliche Regulation übereinstimmend mit der Expression des FL-L1 antisense Transkripts auf den Ursprung des ncRNA-1 Transkript aus dem L1*Md-A* Element hin. Möglicherweise ist die RNA-Polymerase II durch die basale Transkription des *Egflam*-Gens in undifferenzierten Zellen an der Entstehung der vom L1*Md-A* Element weit entfernten (ncRNA-2/-3), nicht-kodierenden RNAs beteiligt. Um Rückschlüsse auf den Transkriptionsursprung zu erhalten, wurde eine strangspezifische cDNA-Synthese in Triplikaten durchgeführt. Zusätzlich wurden undifferenzierte F9-Zellen mit Actinomycin D behandelt und Proben über einen Zeitraum von 7 Stunden für die PCR-basierte Detektion der ncRNA-Stabilität gesammelt. Actinomycin D ist ein zytotoxisches Antibiotikum, das durch Bindung an die DNA die RNA-Synthese inhibiert. Dadurch ist es möglich, die Stabilität der noch vorhandenen Transkripte zu bestimmen.

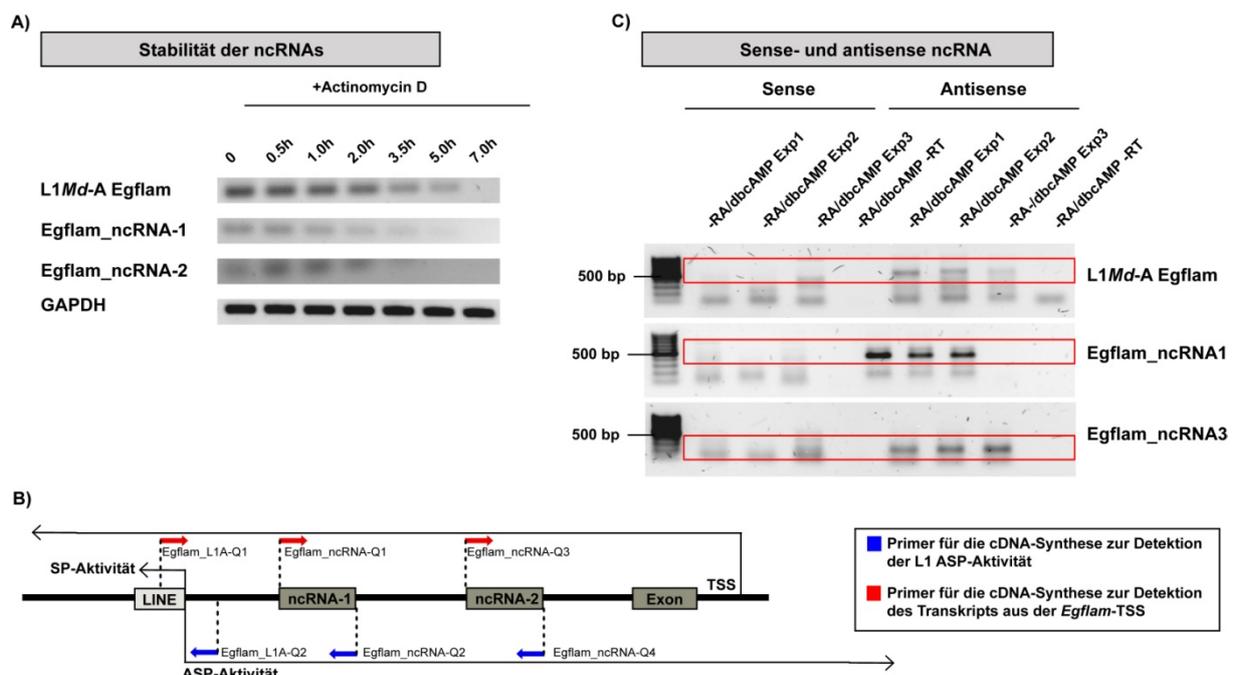


Abbildung 6.30: Analyse der Stabilität und der Transkriptionsorientierung der ncRNAs zwischen der *Egflam*-TSS und dem intronischen L1*Md-A* Element. (A) Ergebnisse der Actinomycin D Zeitreihe undifferenzierten F9-Zellen. F9-Zellen wurden mit Actinomycin D (1µg/ml)

kultiviert und Proben nach 0h, 0.5h, 1h, 2h, 3.5h und 7h gesammelt. Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurde die Stabilität der ncRNAs über PCR und anschließender elektrophoretischer Auftrennung bestimmt. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. **(B)** Schema zum verbesserten Verständnis. **(C)** Strangspezifische cDNA-Synthese der nicht-kodierenden Transkripte zur Abschätzung des Transkriptionsprinzips.

Gegenüber der stabilen *Gapdh*-RNA, die auch 7h nach Actinomycin D Behandlung noch unverändert nachweisbar war, zeigten die ncRNAs nur eine geringe Stabilität von ca. 5h im Falle der ncRNA-1 und ncRNA-2 Regionen und nur etwa 2-3.5h im Falle der ncRNA-3 Region (Abb. 6.30A). Durch die strangspezifische cDNA-Synthese kann zwischen dem sense-Transkript ausgehend aus der *Egflam*-TSS und dem antisense Transkript ausgehend aus dem FL-L1 ASP unterschieden werden (Abb. 6.30B). Interessanterweise zeigte die Analyse überwiegend eine antisense Orientierung der intronischen Transkripte (Abb. 6.30C). Mit zunehmender Entfernung vom FL-L1-Element (ncRNA-3) kam es hingegen auch zu einer detektierbaren sense Transkription (Abb. 6.30C). Anscheinend überwiegt in unmittelbarer Umgebung des FL-L1-Elements die durch die ASP-Aktivität vermittelte Transkription nicht-kodierender RNAs, wohingegen mit zunehmender Entfernung die antisense-Transkription in Konkurrenz zur sense-Transkription steht, die womöglich durch die basale Expression des *Egflam*-Gens zustande kommt.

Zur Untersuchung der möglichen Beteiligung der FL-L1 antisense Transkripte an der epigenetischen Regulation des *Egflam*-Gens wurde die gesamte Genregion, inklusive des L1Md-A Elements, auf die Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27me3 sowie die p53-DNA-Besetzung durch ChIP-chip Analysen untersucht. Darüber hinaus wurde die 5'-UTR-Region des FL-L1-Elements sowie die TSS des *Egflam*-Gens auf die RNA-Pol II-S5 Phosphorylierung (spezifisch für die Initiation) (Sims et al., 2004) und die H3K27me1 Modifikation exemplarisch für zwei ncRNA-Regionen über qPCR analysiert.

ERGEBNISSE

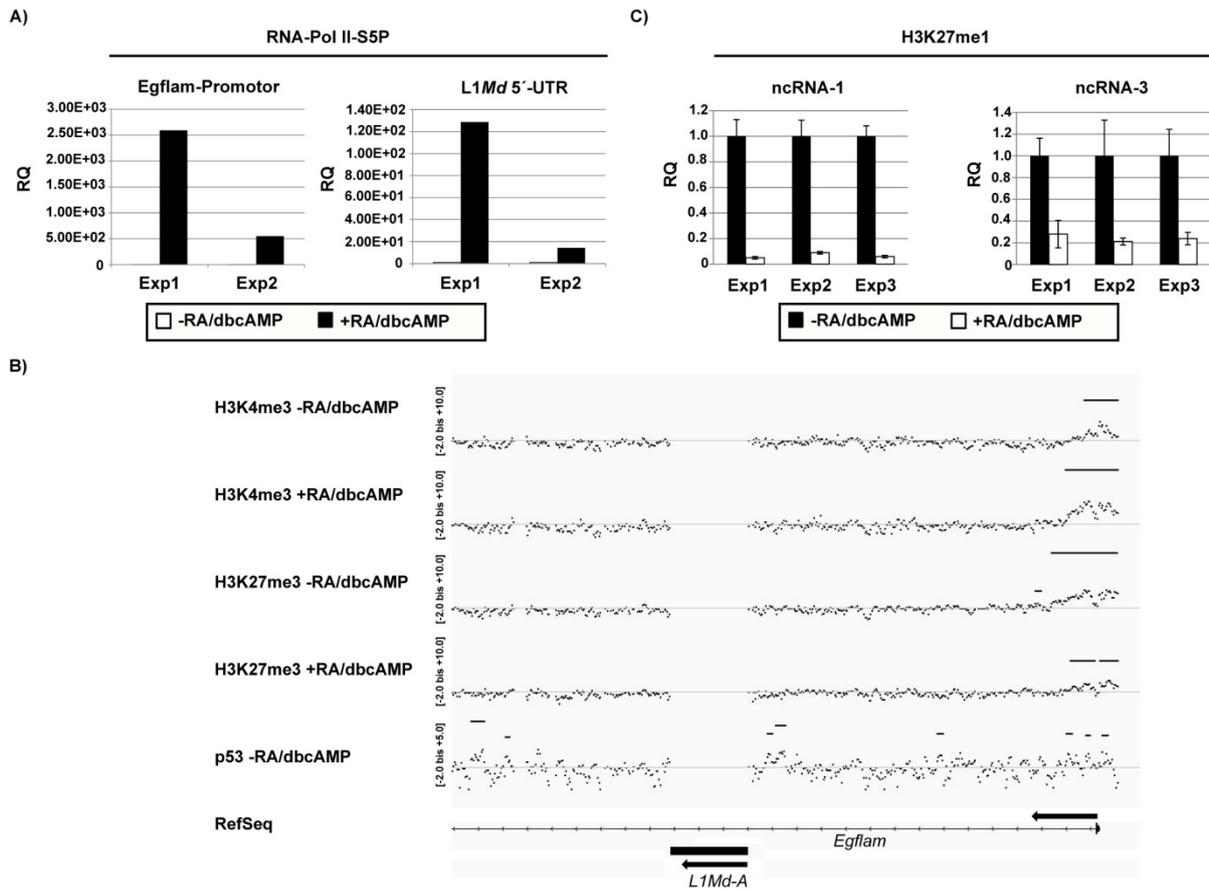


Abbildung 6.31: Untersuchung der Histonmodifikationen, p53-Bindung und RNA-Pol II-S5P im *Egflam*-Gen. (A) Vergleich der RNA-Pol II-S5P (P: Phosphorylierung) zwischen unbehandelten und RA/dbcAMP-behandelten F9-Zellen. Dargestellt sind die ChIP-Ergebnisse nach spezifischer qPCR. Die Normierung erfolgte anhand einer Input-DNA Standardreihe. Eingesetzt wurden jeweils 1µg der ChIP-DNA. Die Quantifizierung erfolgte auf die Proben aus undifferenzierten Zellen (n=2). (B) ChIP-chip Ergebnisse nach H3K4me3 sowie H3K27me3 ChIP zwischen unbehandelten und RA/dbcAMP-behandelten F9-Zellen sowie der p53-DNA-Interaktion (n=2). Dargestellt sind die einzelnen Messpunkte (Log₂-Werte) im Vergleich zur Input-DNA. Die Linien signalisieren die Existenz eines Peaks, die Linienlänge gibt die Länge des Peaks wieder. Die Transkriptionsrichtungen der Gene sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. (C) H3K27me1 ChIP-Ergebnisse normiert auf die Probe aus undifferenzierten Zellen. Für die Standardreihe wurden 50ng, 10ng, 2ng und 0.4ng der WCE-DNA eingesetzt (Korrelationskoeffizienten $R^2 > 0.98$).

Die ChIP-Ergebnisse zeigten übereinstimmend mit der gesteigerten Expression nach Differenzierung (siehe Abb. 6.7A) eine deutliche Zunahme der RNA-Pol II-S5 Phosphorylierung nach RA/dbcAMP-Behandlung an der *Egflam*-TSS Region (Abb. 6.31A). Hingegen der Erwartungen nahm auch am FL-L1 5'-UTR die RNA-Pol II-S5 Phosphorylierung nach Differenzierung der Zellen zu. Die Ergebnisse der ChIP-chip Analyse erweitern die über qChIP gezeigte Interaktion von p53 mit der FL-L1- und *Egflam*-Genregion (vergleiche Abb. 6.29). So ließen sich sowohl in der *Egflam*-Promotorregion als auch in direkter Umgebung des L1Md-A Elements deutliche p53-Peaks nachweisen (Abb. 6.31B). Übereinstimmend mit der signifikant gesteigerten

Expression des *Egflam*-Transkripts nach RA/dbcAMP-Behandlung resultierte die Differenzierung in einer Zunahme der H3K4-Trimethylierung, wohingegen die H3K27-Trimethylierung abnahm. In direkter Umgebung des *L1Md-A* Elements waren weder eine H3K4- noch eine H3K27-Trimethylierung nachweisbar, allerdings sind für intronische Transkripte andere Histon-Marker ausschlaggebend (Bannister et al., 2005). Daher wurde exemplarisch die H3K27me1-Modifikation an den Regionen der ncRNA-1 und -3 untersucht (ncRNA-Regionen siehe Abb. 6.29A). Die H3K27 Monomethylierung ist für aktive Regionen beschrieben (Barski et al., 2007) und zeigte eine deutliche Anreicherung in undifferenzierten F9-Zellen. Nach Differenzierung nahm die H3K27me1-Modifikation ab und war nur noch schwach nachweisbar (Abb. 6.31C).

Im folgenden Abschnitt werden analoge Versuche für intergen (siehe Abb. 6.24B) lokalisierte FL-L1-Elemente durchgeführt und beschrieben.

6.6.2.3 Analyse revers orientierter *L1Md-T* Elemente *upstream* des *Dab2*-Gens

Neben den intronischen FL-L1-Elementen (siehe Abschnitt 6.6.2.2) konnten mit Hilfe der bioinformatischen Analyse auch eine Vielzahl von FL-L1-Elementen in der direkten (<50kbp) Nachbarschaft differenziell regulierter Gene identifizieren werden (siehe Abschnitt 6.5). In diesem Abschnitt wird deren Beteiligung an der Regulation der Chromatinstruktur und damit am Differenzierungsprozess untersucht. Die Versuche wurden an einem revers orientierten *L1Md-T* Element *upstream* des *Dab2*-Gens durchgeführt. Die *Dab2*-Expression wird nach RA/dbcAMP-Behandlung induziert (siehe Abbildung 6.7A). Zur Klärung der Funktionalität dieses *L1Md-T* Elements (SP- und ASP-Aktivität) wurde ausgehend von genomischer DNA der F9-Zellen eine 822bp lange Sequenz des 5'-UTRs in korrekter und reverser Orientierung in den pGL3-GFP Vektor kloniert (siehe Methoden 5.6.8). Anschließend wurde die SP- und ASP-Aktivität durchflusszytometrisch über die Fluoreszenz des eGFP-Reporters in transfizierten F9-Zellen analysiert. Um parallel den Einfluss von p53 auf die Regulation dieser L1-Fragmente analysieren zu können, erfolgte die zusätzliche Transfektion mit einer scr siRNA, einer siRNA gegen p53, dem pCIneo-Leervektor sowie dem pCIneo-wtp53 Konstrukt zur ektopischen Expression des p53-Proteins.

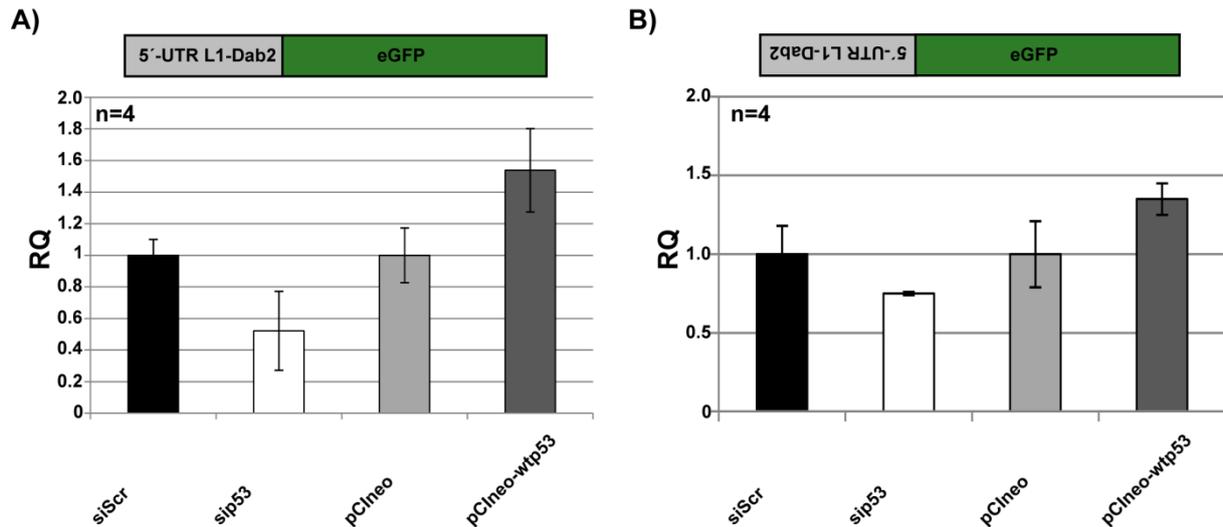


Abbildung 6.32: Analyse der SP- und ASP-Aktivität des *Dab2*-assoziierten L1*Md*-T Elements über die Fluoreszenz des eGFP-Reporters und dessen Regulation durch p53. (A) Ergebnisse nach durchflusszytometrischer Messung der eGFP-Fluoreszenz (korreliert mit der SP-Aktivität des L1*Md*-T Elements). (B) Dargestellt ist die relative Quantifizierung der eGFP-Fluoreszenz normiert auf die kontrolltransfuzierten Zellen (siScr bzw. pCIneo) im Vergleich zu den sip53- bzw. pCIneo-wtp53 transfuzierten Zellen nach 48h (n=4).

Die Ergebnisse der Transfektionen zeigen die SP- und ASP-Aktivität des FL-L1-Elements und deren Abhängigkeit von p53. Verglichen mit den Kontrollzellen resultierte die p53-Depletion in einer 2-fachen Reduktion, bzw. die ektopische Expression in einer 1,5-fachen Zunahme der eGFP-Expression durch die SP-Aktivität (Abb. 6.32A). Ähnliche Ergebnisse konnten bei der ASP-Aktivität beobachtet werden (Depletion: 1,5-fache Reduktion; ektopische Expression: 1,4-fache Zunahme) (Abb. 6.32B). Um einen Anhaltspunkt über den Beginn der antisense-Transkription zu erhalten, wurden Primer generiert, die zu unterschiedlichen Positionen innerhalb des L1*Md*-T Elements komplementär sind. Ein zweiter Anker-Primer wurde *downstream* des 5'-UTR in den intergenen Sequenzen platziert (Abbildung 6.33A). Bei der cDNA-Synthese wurde neben den Random-Primern noch ein spezieller Primer eingesetzt um den exakten Startpunkt des Transkripts zu ermitteln. Dabei nutzt man die Eigenschaft der Reversen Transkriptase, die im Prozess der cDNA-Synthese beim Erreichen des mRNA-5'-Endes mehrere Cytosine an das 3'-Ende der resultierenden cDNA anfügt (aufgrund der intrinsischen terminalen Desoxynukleotidtransferase). Der Primer enthält am 3'-Ende drei Guanin-Basen, die mit den Cytosinen am 3'-Ende der cDNA hybridisieren können. Diese Hybridisierung initiiert einen Template-Wechsel und resultiert in der Inkorporierung der Oligonukleotidsequenz in die cDNA (Chen and Patton, 2001).

ERGEBNISSE

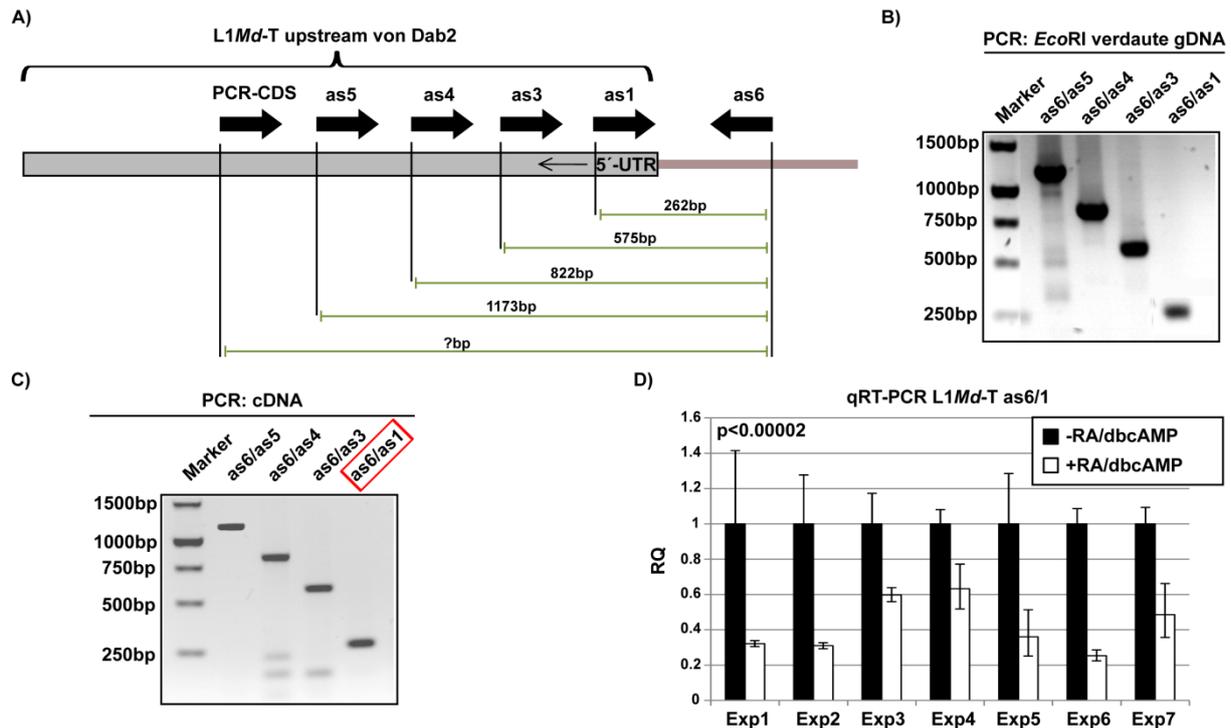


Abbildung 6.33: Analyse des antisense-Transkriptionsstarts sowie der Regulation der antisense Expression des L1Md-T Elements nach Differenzierung. (A) Schematische Übersicht der generierten Primer zur Detektion der antisense-Startposition. Dargestellt sind die zu erwartenden Fragmentgrößen nach der PCR. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Random-Primern und dem P1Cap Primer zur Detektion eines Fragments unbekannter Größe. (B) PCR-basierte Validierung der generierten Primerpaare mit gDNA. (C) Ergebnis der RT-PCR zur Bestimmung der Länge des antisense-Transkripts. (D) Ergebnis der qPCR basierten Quantifizierung der Expression des antisense-Transkripts im Vergleich zwischen undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. Die Normierung erfolgte auf die Probe mit undifferenzierten Zellen (n=7; t=72h).

Wie in Abbildung 6.33C dargestellt gelang der Nachweis des antisense-Transkripts überraschenderweise noch mit dem weit im L1Md-T Element positionierten Primer as5 (Abb. 6.33A). Allerdings brachte die PCR mit dem PCR-CDS Primer kein Ergebnis, was den Rückschluss zulässt, dass sich der Start der ASP-Transkription $>1.173\text{bp}$ (as5-Amplikon) innerhalb des L1Md-T Elements befindet. Dieses Ergebnis unterstützt die Tatsache, dass auch interne L1-Regionen eine ASP-Aktivität besitzen (siehe Abbildung 6.22). Trotz der gemessenen ASP-Aktivität nach Klonierung des 822bp (as4/as6) umfassenden Fragments (Abb. 6.33B) scheint das Transkript (Abb. 6.33C) seinen Ursprung tiefer im L1Md-T Element zu haben. Unter Verwendung der Primerpaare as1/as6, deren Amplikon nur eine Größe von 262bp aufweist, konnte die antisense-Expression quantifiziert werden. Die Untersuchungen zeigten, dass es im Rahmen der Differenzierung zur transkriptionellen Abnahme des antisense-Transkripts um den Faktor >2.5 kommt (Abb. 6.33D). Damit korrelieren die Daten mit

der reduzierten eGFP-Fluoreszenz nach p53-Depletion (siehe Abbildung 6.32). In analoger Vorgehensweise zu den Untersuchungen intronischer FL-L1-Elemente (siehe Abschnitt 6.6.2.2) wurde (i) die Existenz von nicht-kodierenden Transkripten und deren expressionellen Regulation nach Differenzierung als auch (ii) die direkte Bindung von p53 an das L1Md-T Element sowie den *Dab2*-Promotor untersucht (p53-ChIP). Betrachtet man die Umgebung des *Dab2*-Gens, so lassen sich zwei mögliche Transkriptionsstartstellen (TSS) finden (Abb. 6.34A). Zur Untersuchung der tatsächlichen TSS des *Dab2*-Gens wurde eine verschachtelte RACE-PCR (5'-RACE nested PCR) angewendet (Abb. 6.34B). Durch die erste PCR-Reaktion mit dem ersten RACE-Primer wird der weiter zu amplifizierende Bereich angereichert und erhöht damit die Spezifität des zweiten RACE-Primers, der innerhalb dieser Sequenzen nun mit hoher Spezifität binden kann und den gewünschten Sequenzbereich in einer zweiten PCR-Reaktion amplifiziert.

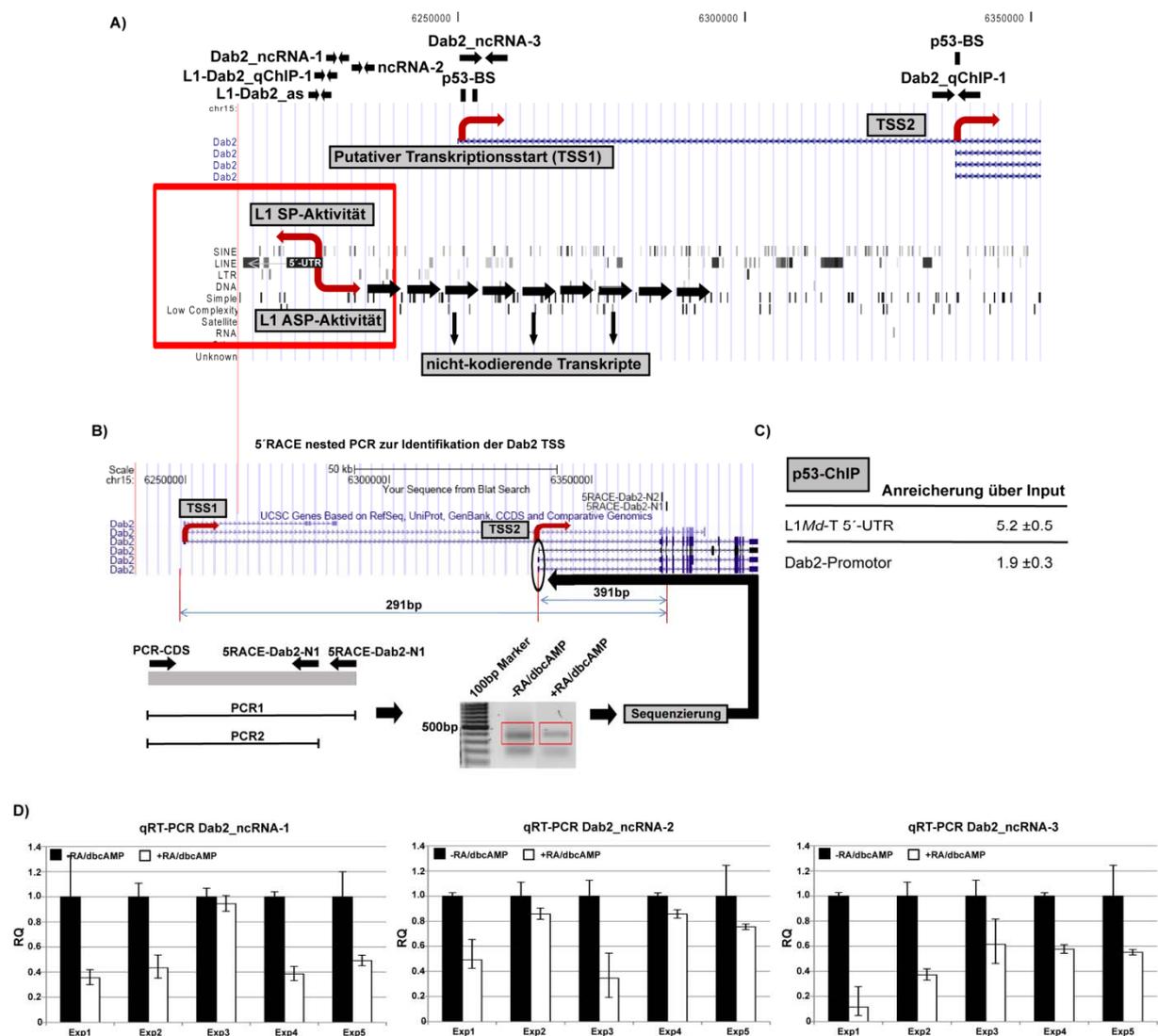


Abbildung 6.34: Untersuchung der *Dab2*-TSS, der Transkription ncRNAs sowie die Analyse der p53 DNA-Besetzung am *Dab2*-Gen und L1*Md*-T Element. (A) Dargestellt ist ein Ausschnitt des *Dab2*-Gens mithilfe des Genome Browsers (Leserichtung durch die roten Pfeile an beiden putativen Promotoren gekennzeichnet) sowie des intergenen L1*Md*-T Elements in reverser Orientierung. Zur Detektion von nicht-kodierenden Transkripten wurden entsprechende Primer generiert. **(B)** Analyse der *Dab2*-TSS durch 5'-RACE nested PCR. Die cDNA-Synthese wurde mit Random-Primern und dem P1Cap-Primer durchgeführt. Die erste PCR-Amplifikation erfolgte mit dem 5RACE-*Dab2*-N1 und dem PCR-CDS Primer, die zweite PCR-Amplifikation ausgehend von der ersten PCR mit dem 5RACE-*Dab2*-N2 und dem PCR-CDS Primer. Die möglichen Amplikonlängen sind schematisch im Genome Browser dargestellt (291bp im Falle der TSS1, 391bp im Falle der TSS2). Das Gelbild nach der zweiten PCR-Reaktion von cDNA aus undifferenzierten und differenzierten Zellen ist folgend abgebildet, die Fragmente wurden aus dem Gel extrahiert (siehe Abschnitt 5.6.3), aufgereinigt und sequenziert. **(C)** Ergebnisse der p53 Chip-Analyse nach qPCR. Dargestellt ist die Anreicherung von 1ng ChIP-DNA über den Input basierend auf der Quantifizierung anhand einer Standardreihe (je Primerpaar) mit WCE-DNA. Für die Standardreihe wurden 50ng, 10ng, 2ng und 0.4ng der WCE-DNA eingesetzt (Korrelationskoeffizienten $R^2 > 0.98$). **(D)** Vergleichende Untersuchung der Expression von ncRNAs zwischen undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen ($n=5$; $t=72h$). Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. Die Normierung erfolgte auf die Probe aus undifferenzierten Zellen.

Durch die 5'-RACE nested PCR konnte die TSS des *Dab2*-Gens ermittelt werden. Sowohl in undifferenzierten als auch differenzierten Zellen wird die *Dab2*-Expression ausgehend vom entferntesten (relativ zum L1*Md*-T Element) Promotor (TSS2, Abb. 6.34A/B) initiiert. Neben dem Nachweis der direkten Bindung von p53 an diesen *Dab2*-Promotor mit einer knapp 2-fachen Anreicherung, gelang auch der Nachweis der DNA-Besetzung von p53 in der 5'-UTR Region des L1*Md*-T Elements (Anreicherung >5-fach; Abb. 6.34C). Übereinstimmend mit den Charakterisierungen an intronischen FL-L1-Elementen (siehe Abschnitt 6.6.2.2) ließen sich auch nicht-kodierende Transkripte in der intergenen Region zwischen dem L1*Md*-T Element und der *Dab2*-Startstelle identifizieren. Die Expression dieser Transkripte nahm nach Differenzierung tendenziell ab (Abb. 6.34D) und diese ncRNAs zeigten eine geringere Stabilität als das *Gapdh*-Transkript (Abb. 6.35A).

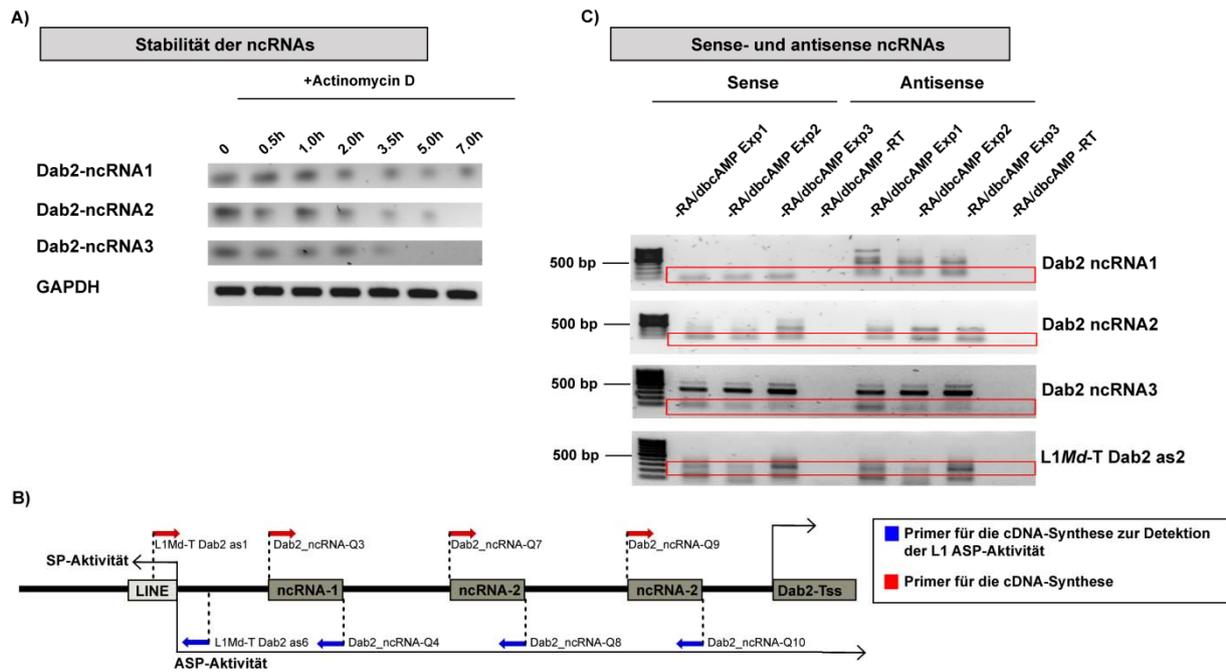


Abbildung 6.35: Analyse der Stabilität und der Transkriptionsorientierung der ncRNAs zwischen der *Dab2*-TSS und dem intergenen *L1Md-T* Element. (A) Ergebnisse der Actinomycin D Zeitreihe undifferenzierter F9-Zellen. F9-Zellen wurden mit Actinomycin D (1µg/ml) kultiviert und Proben nach 0h, 0.5h, 1h, 2h, 3.5h und 7h gesammelt. Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurde die Stabilität der ncRNAs über PCR und anschließender elektrophoretischer Auftrennung bestimmt. Als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. **(B)** Schema zum verbesserten Verständnis des Nachweis der sense- und antisense Transkripte (bezogen auf das L1-Element). **(C)** Strangspezifische cDNA-Synthese der nicht-kodierenden Transkripte zur Abschätzung des Transkriptionsprunges.

Die *Dab2_ncRNA1* war zwar noch 7h nach Actinomycin D detektierbar, zeigte aber im Vergleich zum *Gapdh*-Transkript eine deutlich reduzierte Transkriptmenge. Die *Dab2_ncRNA2* und *_ncRNA3* Transkripte wurden bereits nach 7 bzw. 5h abgebaut (Abb. 6.35A). Interessanterweise ließen sich keine Unterschiede in der Transkriptionsrichtung (sense bzw. antisense) der ncRNAs feststellen (Abb. 6.35B-C), obwohl die Transkriptionsorientierung dieser ncRNAs nicht in Konkurrenz zur basalen Expression des *Dab2*-Gens steht.

Analog zu den Untersuchungen an intergenen FL-L1-Elementen (siehe Abschnitt 6.6.2.2) wurde die RNA-Pol II-S5 Phosphorylierung über qChIP untersucht sowie die p53-DNA-Interaktion und H3K4- und H3K27-Trimethylierung über ChIP-chip studiert.

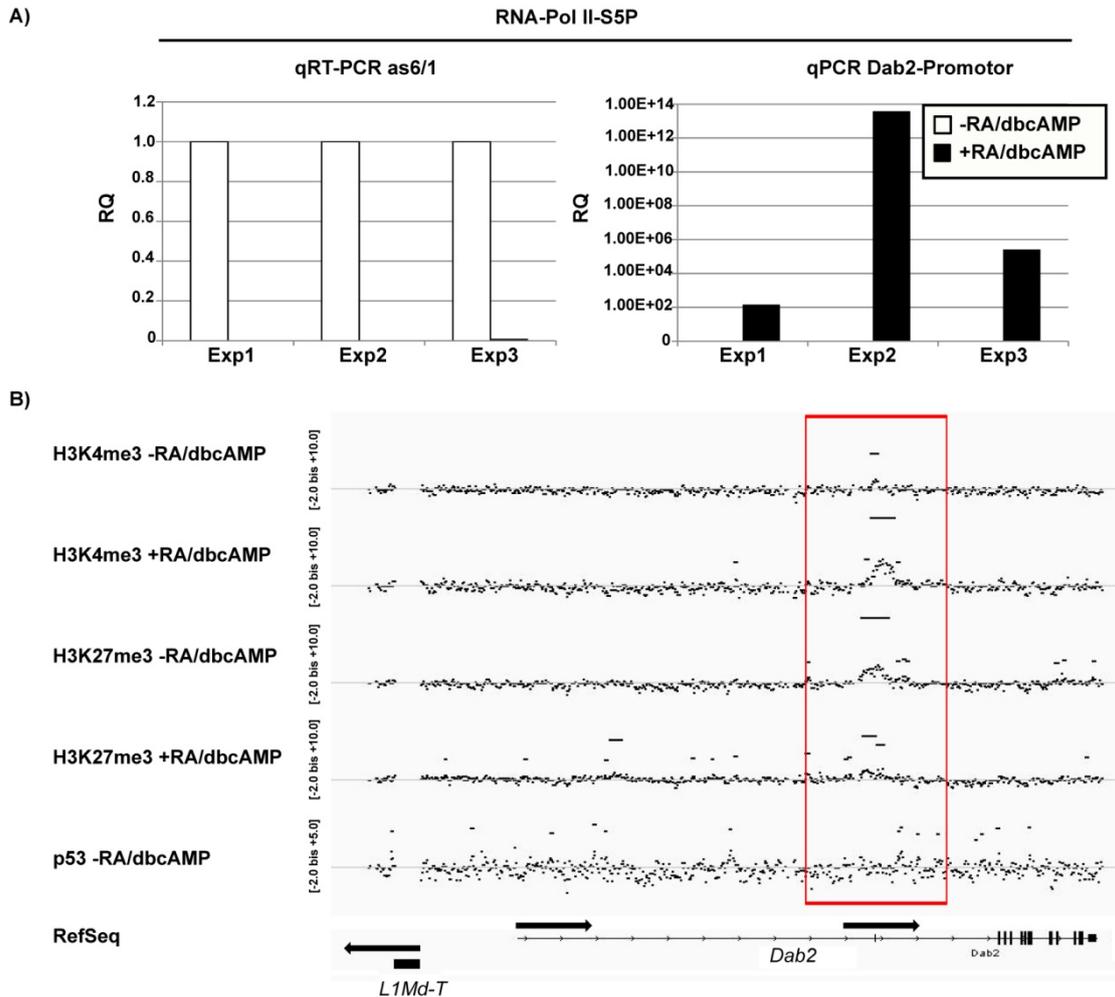


Abbildung 6.36: Untersuchung der Histonmodifikationen, p53-Bindung und RNA-Pol II-S5P im *Dab2*-Gen und dem benachbarten *L1Md-T* Element. (A) Vergleich der RNA-Pol II-S5P zwischen unbehandelten und RA/dbcAMP-behandelten F9-Zellen. Dargestellt sind die ChIP-Ergebnisse nach spezifischer qPCR. Die Normierung erfolgte anhand einer Input-DNA Standardreihe. Eingesetzt wurden jeweils 1µg der ChIP-DNA. Die Quantifizierung erfolgte auf die Proben aus undifferenzierten Zellen (n=2). (B) ChIP-chip Ergebnisse nach H3K4me3- sowie H3K27me3-ChIP zwischen unbehandelten und RA/dbcAMP-behandelten F9-Zellen sowie der p53-DNA-Interaktion (n=2). Dargestellt sind die einzelnen Messpunkte (Log₂-Werte) im Vergleich zur Input-DNA. Die Linien signalisieren die Existenz eines Peaks, die Linienlänge gibt die Länge des Peaks wieder. Die Transkriptionsrichtungen der Gene sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen am *Egflam*-Gen (siehe Abbildung 6.31), dessen Expression genau wie die des *Dab2*-Gens nach Differenzierung signifikant gesteigert wird (siehe Abbildung 6.7), resultierte die ChIP-Analyse in einem eindeutigen Bild: in undifferenzierten Zellen ließ sich nur eine schwache RNA-Pol II-S5 Phosphorylierung an der *Dab2*-Promotorregion nachweisen (aufgrund der deutlichen Zunahme nach Differenzierung sind die Balken in Abb. 36A nicht sichtbar, eine RNA-Pol II-S5P war aber nachweisbar und wurde für die Normierung verwendet). Auch die H3K4me3-Modifikation war an der Promotorregion nur

schwach vorhanden (siehe Abbildung 6.36B); stattdessen überwog die H3K27me3-Modifikation. Korrelierend mit der nach Differenzierung zunehmenden Expression resultierte die RA/dbcAMP-Behandlung der Zellen in einer Umkehrung des epigenetischen Modifikationsmusters: Zunahme der RNA-Pol II-S5 Phosphorylierung (Abb. 6.36A), signifikante Abnahme der repressiven H3K27me3-Modifikation verbunden mit einer deutlichen Zunahme der H3K4me3-Modifikation (Abb. 6.36B). Die RA/dbcAMP-induzierte Differenzierung resultierte in einer Abnahme der L1*Md*-T antisense Transkription (siehe Abbildung 6.33D). Folglich ließ sich nach Differenzierung und reduzierter p53-vermittelter Aktivierung der ASP-Aktivität eine Zunahme der H3K27-Trimethylierung nachweisen (Abb. 6.36B). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der qChIP (siehe Abbildung 6.34C) war die p53-DNA-Interaktion sowohl an den regulatorischen Regionen des *Dab2*-Gens als auch in räumlicher Nähe zu dem L1*Md*-T Element möglich.

6.7 Untersuchung des Einflusses muriner Apobec-Proteine auf die L1-Retrotransposition

Die transkriptionelle Aktivität der FL-L1-Elemente hat einen negativen Seiteneffekt: Mobilisierbarkeit der intakten FL-L1-Elemente. Wie wäre ein solcher Widerspruch zwischen dem Effekt als epigenetischer Modulator und schädigendem Effekt durch Mobilisierung erklärbar? Im Laufe der Evolution hat die Zelle unterschiedlichste Strategien zur retroviralen Abwehr entwickelt (siehe Einleitung 2.4.4). Eine dieser Strategien besteht in der Aktivierung der Apobec-Proteinfamilie (siehe Einleitung 2.4.4.1).

Im Gegensatz zum menschlichen Genom, das 11 verschiedene *APOBEC*-Gene trägt, finden sich bei Mäusen nur 3 Gene: *Apobec1*, *Apobec2* und *Apobec3*. Ein inhibitorischer Effekt auf die L1-vermittelte Retrotransposition in murinen embryonalen Karzinomazellen wurde allerdings bislang nicht beschrieben. Zur Untersuchung des Einflusses der Apobec-Proteine auf die L1-Retrotransposition wurde zunächst der Einfluss des murinen Apobec3-Proteins (Apo3) analog zu der beschriebenen humanen L1-Inhibition durch die Apobec3-Proteinfamilie untersucht. Dazu wurde eine gegen murines *Apobec3* gerichtete shRNA (pLKO.1_shApo3) verwendet, um den Einfluss auf die Mobilisierung eines humanen L1-Elements durch transiente Depletion zu untersuchen. Als Kontrolle wurde der pLKO.1-Vektor mit einer shRNA-kodierenden Sequenz gegen das eGFP-Protein eingesetzt. Zur

Validierung der Depletionseffizienz der shRNA wurden F9-Zellen mit pLKO.1_shApo3 und pLKO.1_shGFP transient transfiziert und die Expression des *Apobec3*-Gens nach 48h mit Hilfe der qPCR untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine im Vergleich zur Kontrolltransfektion deutliche Abnahme des *Apobec3*-Transkripts (Abb. 6.37A). Anschließend wurde der Einfluss des Apobec3-Proteins auf die Mobilisierung des humanen L1-Elements mit Hilfe des Zellkultur-basierten pJM101/L1_{RP}-Retrotranspositionsassays analysiert. Die genaue Versuchsdurchführung des Retrotranspositionsassays ist unter Abschnitt 5.3.2 des Methodenteils detailliert beschrieben. Die nachfolgende Abbildung fasst den experimentellen Versuchsplan (Abb. 6.37B) sowie das Ergebnis der Untersuchung nach Kristallviolett-Färbung (Abb. 6.37C) zusammen:

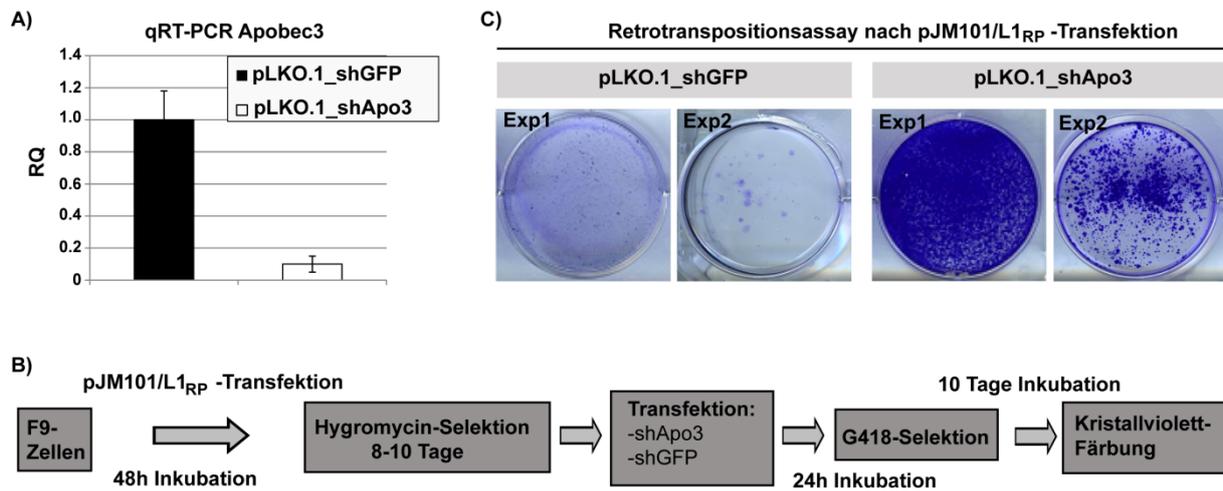


Abbildung 6.37: Einfluss des murinen Apobec3-Proteins auf die Mobilisierung eines humanen L1_{RP}-Elements. (A) qPCR basierte Validierung der Depletionseffizienz nach transienter Transfektion des shRNA-exprimierenden pLKO.1_Apo3 Plasmids (Open Biosystems) im Vergleich zum pLKO.1_shGFP (Open Biosystems) Kontrollvektor nach 48h. Die Normierung erfolgte auf die *Apobec3*-Expression der Probe nach Kontrolltransfektion, als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet. (B) Schematischer Versuchsablauf des Retrotranspositionsassays. Dafür wurden F9-Zellen mit dem Retrotranspositionskonstrukt pJM101/L1_{RP} mit Hilfe des EffecteneTM-Reagenz transient transfiziert. Durch Hygromycin-Selektion 48h nach Transfektion über einen Zeitraum von 8-10 Tagen wurden stabile, das Plasmid-tragende Klone selektiert, anschließend mit einer definierten Zellzahl ausgesät und transient mit den pLKO.1_Apo3 und pLKO.1_shGFP Konstrukten transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen mit Retrotranspositionereignissen durch eine 10-tägige G418-Behandlung selektiert und anschließend über eine Kristallviolett-Färbung dargestellt. (C) Ergebnis des Retrotranspositionsassays nach pJM101/L1_{RP}-Transfektion in Abhängigkeit des Apobec3-Proteins. Dargestellt sind technische Replikate nach Kristallviolett-Färbung im Vergleich zwischen pLKO.1_shGFP- und pLKO.1_shApo3-Transfektion.

Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss des murinen Apobec3-Proteins auf die Retrotransposition des humanen L1-Elements (Abb. 6.37C). So ließ sich nach

Kontrolltransfektion mit dem pLKO.1_shGFP Konstrukt nur eine schwache Retrotransposition detektieren, wohingegen eine massive Expansion des L1-Elements nach *Apobec3*-Depletion nachweisbar war. Neben dem pJM101/L1_{RP}-Konstrukt mit einem humanen L1_{RP}-Element wurde die Retrotransposition mit gleicher experimenteller Vorgehensweise mit einem murinen FL-L1-Konstrukt, dem pDB135-Vektor (enthält ein L1_{Md}-T Element)(Martin et al., 2005a), durchgeführt. Allerdings führte die pDB135-Transfektion zu keinem detektierbaren Mobilisierungsevent in F9-Zellen. Möglicherweise ist das murine L1-Element in Mauszellen deutlich strikter reguliert als das humane L1-Element. Deshalb wurden die weiteren Retrotranspositionsversuche mithilfe des humanen L1-Elements durchgeführt.

In F9-Zellen kommt es im Rahmen der Differenzierung zur Reduktion der L1_{Md}-Expression (siehe Abbildung 6.17) und damit zur Inaktivierung der möglicherweise schädigenden L1-Retrotransposition. In welcher Weise aber ist die Expression von *Apobec3* im komplexen Prozess der Differenzierung reguliert? Um dieser Frage nachzugehen, wurde die *Apobec3*-Expression im Vergleich zwischen unbehandelten und RA/dbcAMP-behandelten, differenzierten F9-Zellen mithilfe der qPCR untersucht. Das Ergebnis der Analyse zeigte eine signifikante Abnahme der *Apobec3*-Expression nach 72-stündiger Differenzierung von F9-Zellen (Abb. 6.38). Diese Reduktion korrelierte mit der abnehmenden L1_{Md}-Expression (siehe Abb. 6.17C). Dieses Ergebnis unterstützt die Funktion der Apobec-Proteine als L1-„Antidot“ in F9-Zellen. Interessanterweise korrelierte die Abnahme der *Apobec3*-Expression nach Differenzierung auch mit der Reduktion von p53 nach RA/dbcAMP-Behandlung (siehe Abbildung 6.1). Als transkriptioneller Regulator der L1-sense und antisense Promotoraktivität individueller FL-L1-Elemente (siehe Abb. 6.32) wäre es denkbar, dass das p53-Protein in seiner Funktion als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor ebenfalls die Expression des *Apobec3*-Gen regulieren könnte. Daher wurde die Expression von *Apobec3* nach Depletion von p53 durch transiente pSUP_shp53 Transfektion analysiert.

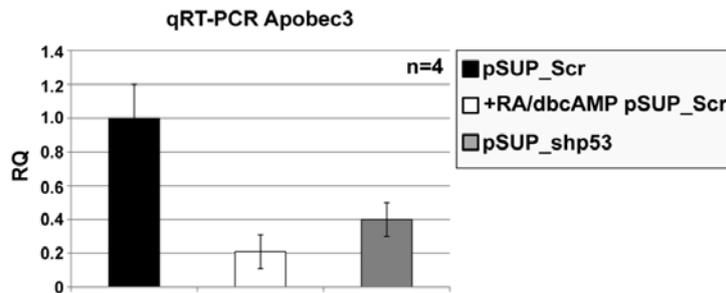


Abbildung 6.38: Regulation der *Apobec3*-Expression im Rahmen der Zelldifferenzierung und in Abhängigkeit von p53. qPCR basierte Analyse der *Apobec3*-Expression im Vergleich zwischen undifferenzierten, differenzierten (72h, RA/dbcAMP) und p53-depletierten (72h nach pSUP_shp53 Transfektion) F9-Zellen. Die Normierung erfolgte auf die *Apobec3*-Expression der kontrolltransfizierten, undifferenzierten Probe; als *housekeeping* Gen wurde *Gapdh* verwendet.

Tatsächlich scheint das p53-Protein an der Regulation der *Apobec3*-Expression direkt beteiligt zu sein. Die Depletion von p53 korrelierte mit einer signifikanten Reduktion der *Apobec3*-Expression (siehe Abbildung 6.38). Über ChIP-chip wurde die Bindung von p53 an die *Apobec3*-Genregion sowie die Histon-Marker H3K4me3 und H3K27me3 untersucht.

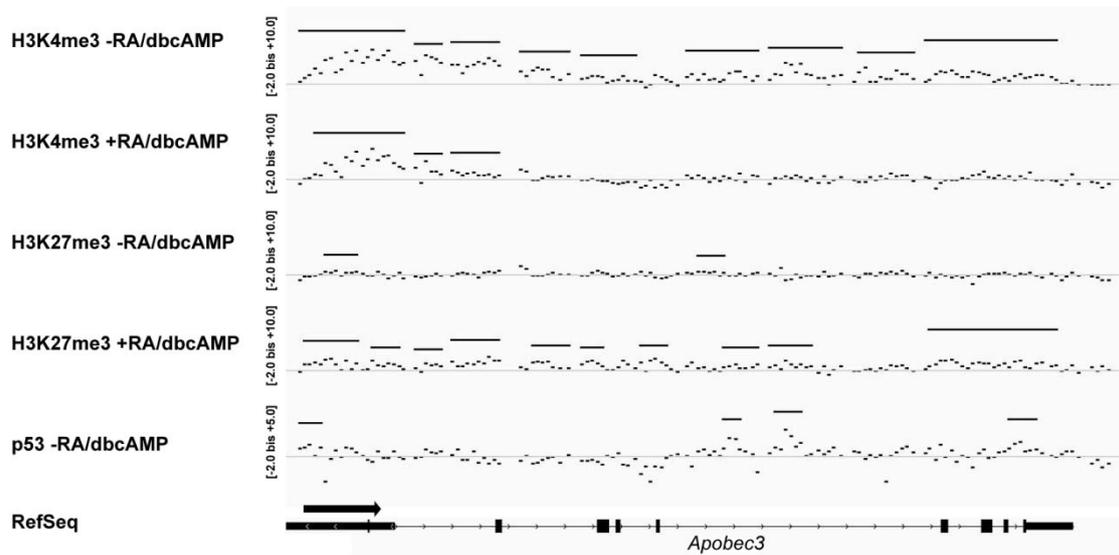


Abbildung 6.39: Untersuchung der Histonmodifikationen und p53-Bindung im *Apobec3*-Gen. Vergleich der H3K4me3- und H3K27me3-Histonmodifikationen zwischen unbehandelten und RA/dbcAMP-behandelten F9-Zellen sowie der p53-DNA-Interaktion des *Apobec3*-Gen (n=2). Dargestellt sind die einzelnen Messpunkte (Log₂-Werte) im Vergleich zur Input-DNA. Die Linien signalisieren die Existenz eines Peaks, die Linienlänge gibt die Länge des Peaks wieder. Die Transkriptionsrichtungen der Gene sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Ergebnisse der p53-ChIP (Abb. 6.39) unterstützen die Ergebnisse der qPCR-Analyse des *Apobec3*-Gens nach p53-Depletion bzw. RA/dbcAMP-induzierter Differenzierung (siehe Abb. 6.38). Innerhalb des *Apobec3*-Gens ließen sich vier p53-Bindungspeaks nachweisen, darunter ein Peak in der TSS-Region. Der Vergleich der H3K4- und H3K27-Trimethylierung zwischen unbehandelten und RA/dbcAMP-behandelten Zellen zeigte ein eindeutiges Ergebnis: übereinstimmend mit der reduzierten Expression des *Apobec3*-Transkripts resultierte die Differenzierung in einer Abnahme der H3K4-Trimethylierung, während die H3K27me3-Modifikation deutlich zunahm (Abb. 6.39). Damit scheint das p53-Protein einen direkten Einfluss auf die Regulation von *Apobec3* zu besitzen und ist somit in der Lage, den schädigenden Effekt der L1-Mobilisierung über die transkriptionelle Aktivierung des L1-„Antidots“ *Apobec3* zu kompensieren. Folglich müsste neben der zunehmenden Retrotransposition durch shRNA-vermittelte Reduktion von *Apobec3* auch die Depletion von p53 in einer gesteigerten L1-Mobilisierung resultieren.

Analog zum pJM101/L1_{RP}-Retrotranspositionsassay nach Depletion von *Apobec3* wurde dieselbe Strategie gewählt, um den Einfluss der p53-Depletion sowie der kombinatorischen *Apobec3*/p53-Depletion auf die Mobilisierungsaktivität des humanen L1-Elements zu untersuchen (vgl. Abbildung 6.37B). Dabei wurde die Retrotransposition zwischen F9-Zellen die transient mit einer scrambled-siRNA Sequenz und einer gegen p53-gerichteten siRNA transfiziert wurden, verglichen. Zusätzlich wurden F9-Zellen parallel mit einer siRNA gegen p53 und dem shRNA Konstrukt pLKO.1_shApo3 transfiziert. Als Kontrolle der pLKO.1_Apo3 Transfektion wurden die Mobilisierungsereignisse mit dem pLKO.1_shGP Konstrukt verglichen.

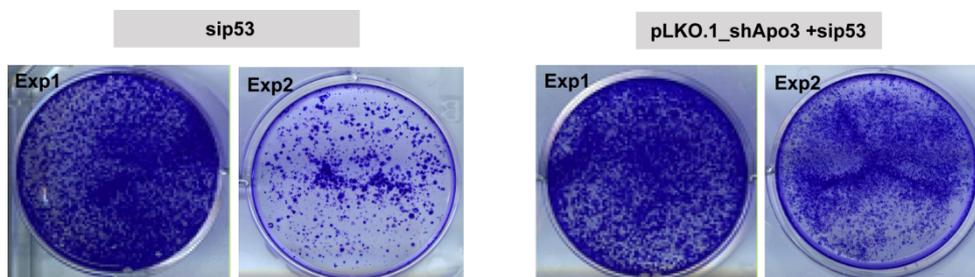


Abbildung 6.40: Einfluss des p53-Proteins auf das Retrotranspositions Potenzial des humanen L1_{RP}-Elements. Dargestellt ist das Ergebnis des Retrotranspositionsassays in Abhängigkeit der p53-Depletion bzw. Ko-Depletion mit *Apobec3* als unabhängige Replikate nach Kristallviolett-Färbung. Versuchsablauf: siehe Abbildung 6.37B.

Die Ergebnisse des Retrotranspositionsassays zeigen den deutlichen Einfluss von p53 am Prozess der L1-Mobilisierung. Im Vergleich zur Scr-Kontrolle wurde nach p53-Depletion eine signifikante Zunahme der Mobilisierungsaktivität nachgewiesen. Die in Abbildung 6.38 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das *ApoBec3*-Gen ein transkriptionelles Target von p53 ist. Daher lässt sich die zunehmende Retrotransposition nach Depletion von p53 aufgrund einer reduzierten Expression von *ApoBec3* erklären. Aufgrund der transienten Transfektion, die nur einen geringen prozentualen Anteil der Gesamtzellpopulation erreicht, sowie der in der Regel nicht vollständigen Depletion nach siRNA-Behandlung, müsste die Kombination beider Depletionen in der Zunahme des Effekts resultieren. Tatsächlich ließ sich zumindest in einem biologischen Replikat optisch eine Zunahme der Anzahl positiv-selektionierter Klone zeigen (Abb. 6.40; Vergleich sip53: shApo3+sip53).

Aufgrund der Selektion von einzelnen Klonen und folglich nur deren Anreicherung unter Selektionsbedingungen erlaubt der pJM101/L1_{RP}-basierte Retrotranspositionsassay nur eine qualitative Aussage über Mobilisierungsereignisse (Moran et al., 1996). Angenommen es fänden nur wenige (z.B. 1-10) Retrotranspositionsereignisse zu Beginn statt, so könnte bei der 10-tägigen G418-Selektion eine Expansion der wenigen G418-resistenten Zellen stattfinden. Damit ist die Aussage über einen potenzierenden Effekt der kombinatorischen Depletion nicht quantitativ. Deswegen wurde ein weiteres, in der Arbeitsgruppe um Dr. John V. Moran entwickeltes Transpositionskonstrukt, das L1_{RP}-EGFP Plasmid, verwendet (Ostertag et al., 2000). Prinzipiell ist der Aufbau des L1_{RP}-EGFP Vektors mit dem des pJM101/L1_{RP} identisch. Allerdings wurde die Neomycin-Genkassette durch die kodierende Sequenz des eGFP-Proteins ausgetauscht, was eine mehrtägige Selektion erspart, die Analysezeit deutlich reduziert, die Verzerrung durch Selektion unterbindet und eine quantifizierbare Kinetik der L1-Retrotransposition mithilfe der Durchflusszytometrie ermöglicht. Damit eignet sich das Konstrukt zur Bestimmung der Gesamtanzahl an Retrotranspositionsereignissen durch Einzellzellanalyse (Ostertag et al., 2000).

Zur relativen Quantifizierung der Retrotranspositionsereignisse wurden F9-Zellen mit dem L1_{RP}-EGFP Konstrukt transient transfiziert. Parallel erfolgte die Kotransfektion mit einer scr siRNA-Kontrolle sowie mit siRNA gegen p53, shRNA gegen Apo3 (pLKO.1_shApo3) und der Kombination beider (sip53+shApo3). Auf die pLKO.1_shGFP Kontrolle wurde aufgrund der Messung von GFP verzichtet.

Ostertag et al. (2000) untersuchten die Kinetik der L1-Retrotransposition in HeLa-Zellen und beschrieben eine Zeit bis zur Detektion von Retrotranspositionsereignissen von mindestens 48h (Ostertag et al., 2000). Die Versuche in F9-Zellen wurden aufgrund der fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung bereits 26 Stunden nach Transfektion durchflusszytometrisch analysiert.

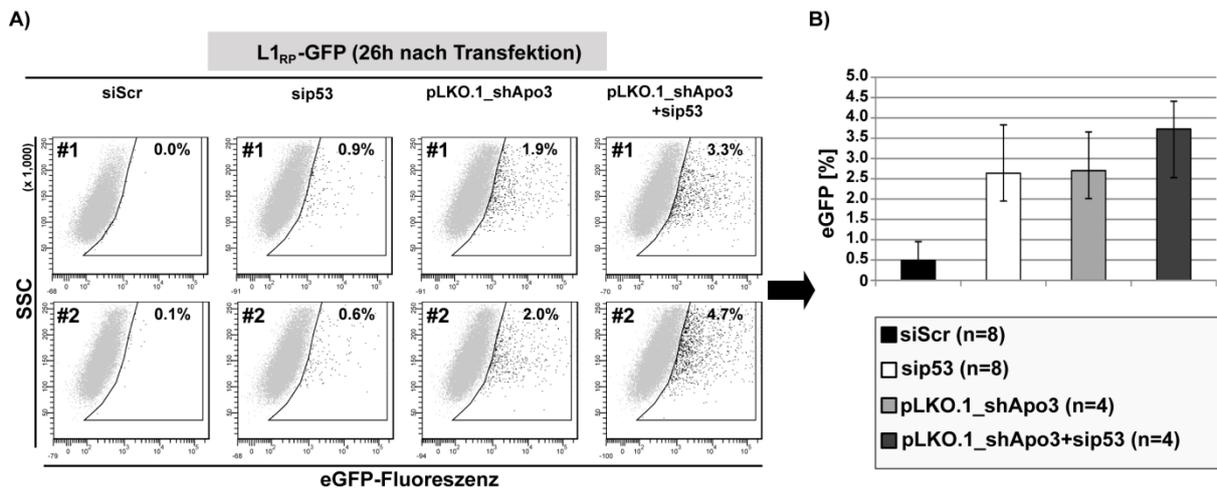


Abbildung 6.41: Relative Quantifizierung der Retrotranspositionsaktivität in Abhängigkeit der p53- und Apobec3-Expression mithilfe des L1_{RP}-EGFP Konstrukts. (A) Dargestellt ist das Ergebnis nach durchflusszytometrischer eGFP-Fluoreszenzmessung nach L1_{RP}-EGFP Transfektion und Kotransfektion einer siRNA-Kontrolle (siScr), sip53, pLKO.1_shApo3 sowie der Kombination aus sip53 und pLKO.1_shApo3 (FACSCanto, BD). Aufgetragen ist der SSC gegen die Fluoreszenz des eGFP-Proteins. Die negativen Gates wurden anhand untransfizierter F9-Zellen definiert. Die Messungen erfolgten 26h nach Transfektion. **(B)** Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse. Dargestellt ist der Anteil im FACS vermessener eGFP-positiver Zellen.

Das Ergebnis des quantifizierbaren Retrotranspositionsassays mit dem L1_{RP}-EGFP-Konstrukt (Abb. 6.41A) konnte die Aussage nach Transfektion des pJM101/L1_{RP}-Konstrukts (vergleiche Abbildung 6.40) bestätigen und verfeinern. Kommt es in siScr-transfizierten Zellen nur in 0.5% aller Zellen zur Mobilisierung des humanen L1_{RP}-Elements, so verfünffacht sich die Anzahl an Retrotranspositionen sowohl nach Depletion von p53, als auch von Apo3 (Abb. 6.41B). Tatsächlich resultierte die Kombination beider Depletionen in einer mehr als 7-fachen Zunahme der eGFP-positiven Zellen und einer damit korrelierenden, gesteigerten Mobilisierungsaktivität. Aufgrund transienter Bedingungen ist eine absolute Quantifizierung der Ergebnisse nicht möglich. Jedoch bestätigt die relative Quantifizierung die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche und ist für eine eindeutige Aussage ausreichend. Zur abschließenden Validierung der Daten wurden F9-Zellen mit dem L1_{RP}-EGFP-

Konstrukt transfiziert und anschließend 48h nach Beginn der Differenzierung im Vergleich zu undifferenzierten Zellen analysiert (Abb. 6.42). Die Analyse ermöglicht die Untersuchung der Retrotransposition im Kontext der Differenzierung, bei der es zu einer Reduktion des p53-Proteins kommt.

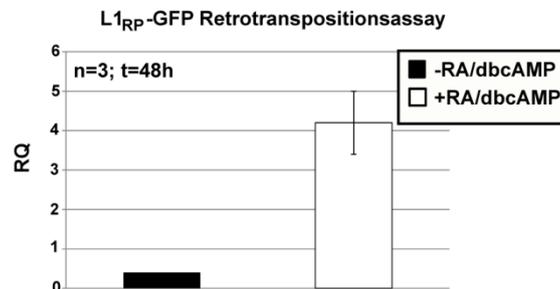


Abbildung 6.42: Retrotranspositionsassay nach Beginn der RA/dbcAMP-induzierten Differenzierung der Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der eGFP-Fluoreszenzmessung nach L1_{RP}-EGFP Transfektion und 48-stündiger RA/dbcAMP-Behandlung.

Die Daten der Retrotransposition nach Beginn der Differenzierung unterstützen die bisherigen Ergebnisse. Nach Zugabe von RA und dbcAMP – speziell nach 48h – kommt es zur Reduktion des p53-Proteins (siehe Abb. 6.7A) und folglich zu einer verminderten *Apobec3*-Expression, die sich in einer gesteigerten Retrotransposition (Abb. 6.42) widerspiegelt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, (i) dass das murine *Apobec3*-Protein analog zum humanen Protein in der Lage ist, die Retrotransposition von L1-Elementen wirkungsvoll zu inhibieren, (ii) *Apobec3* während der Differenzierung differenziell reguliert wird und (iii) dass diese Regulation durch die transkriptionelle Aktivatorfunktion in direkter Weise von p53 vermittelt wird.

Inwieweit sind die in Mäusen beschriebenen anderen beiden Mitglieder der *Apobec*-Familie, *Apobec1* und *Apobec2*, am Prozess der Retrotransposition beteiligt? Und inwieweit ist p53 an der transkriptionellen Regulation dieser Gene involviert? Diesen Fragestellungen wurde analog zu den bei *Apobec3* eingesetzten Versuchsstrategien nachgegangen und (i) die Expression von *Apobec1* sowie *Apobec2* zwischen undifferenzierten, differenzierten sowie p53-depletierten Zellen verglichen und (ii) deren Einfluss auf das Mobilisierungsverhalten des L1_{RP}-Elements analysiert.

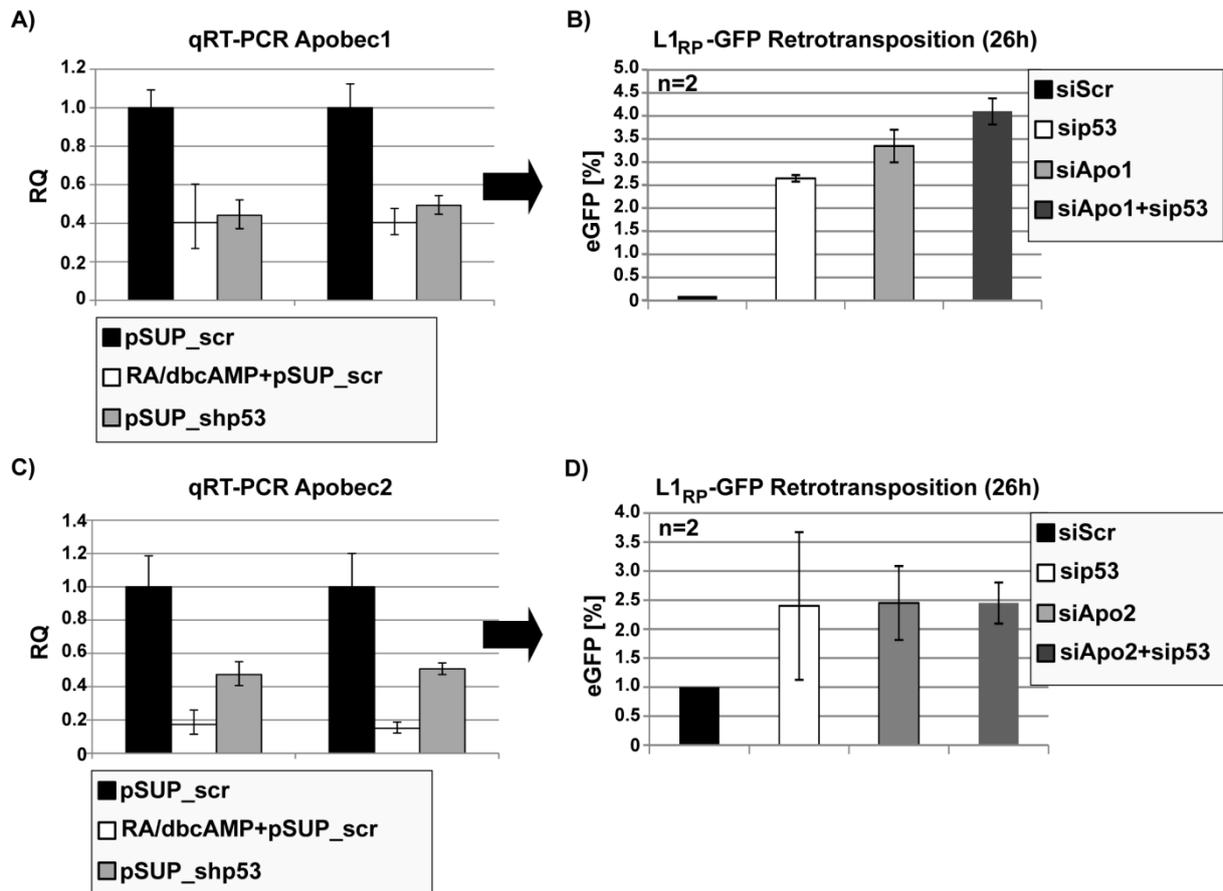


Abbildung 6.43: Einfluss des Apobec1- und Apobec2-Proteins auf die Retrotransposition des L1_{RP}-Elements sowie deren Abhängigkeit von der p53-Expression. (A, C) qPCR basierender Vergleich der *Apobec1* (A) und *Apobec2* (C) Genexpression zwischen pSUP_scr, pSUP_scr+RA/dbcAMP und pSUP_shp53 transfizierten Zellen; n=2. (B, D) Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse des Retrotranspositionsassays nach durchflusszytometrischer eGFP-Fluoreszenzmessung nach Transfektion mit dem L1_{RP}-EGFP Retrotranspositionsreporter und einer siRNA-Kontrolle (siScr) oder spezifischen siRNAs gegen p53, Apobec1 (B) und Apobec2 (D). Dargestellt ist der Anteil im FACS vermessener eGFP-positiver Zellen. Die negativen Gates wurden anhand untransfizierter F9-Zellen definiert. Die Messungen erfolgten 26h nach Transfektion; n=2.

Die Ergebnisse aus Abbildung 6.43 zeigen sowohl den Einfluss von p53 an der Regulation von *Apobec1* und *Apobec2* (Abb. 6.43A/6.43C) als auch eine Beteiligung beider Apobec-Proteine am Prozess der L1-Retrotransposition (Abb. 6.44B/6.44D). Übereinstimmend mit der *Apobec3*-Expression (vergleiche Abbildung 6.38) kommt es im Verlauf der zellulären Differenzierung von F9-Zellen zur Reduktion der *Apobec1*- sowie *Apobec2*-Expression um den Faktor 2.5 bzw. >5 (Abb. 6.43A/6.43C). In beiden Fällen zeigte die qPCR-Analyse nach p53-Depletion eine Abnahme der Expression beider Gene, was auf eine Beteiligung von p53 an deren Regulation hindeutet. Bei der Inhibition der Retrotransposition sind beide Proteine involviert. Die Depletion von *Apobec1* resultierte dabei in einer dramatischen, mehr als 100-fachen Zunahme der GFP-positiven Zellen (Abb. 6.43B), die Depletion von *Apobec2* ließ sich in einer >2-

fachen Mobilisierungsaktivität messen. Als Positivkontrolle des Assays wurden L1_{RP}-EGFP transfizierte F9-Zellen zusätzlich mit siRNA gegen p53 transfiziert. Wie bereits in Abbildung 6.40 dargestellt, resultierte auch hier die Depletion in einer erhöhten Anzahl GFP-positiver Zellen. Vergleicht man den Prozentsatz der GFP⁺-Zellen zwischen den beiden Experimenten aus Abb. 6.43B und 6.43D, so lassen sich die jeweiligen Prozentwerte in den unabhängigen Experimenten wiederfinden (2.45%:2.6%). Auch die Ergebnisse nach *Apobec*-Depletion sind konsistent (shApo1: 4.1% /shApo2: 2.5%). Aufgrund der internen Konsistenz der unabhängigen Versuche scheint eine >100-fache Zunahme gänzlich unwahrscheinlich. Vielmehr war hier der Hintergrund der siScr-Transfektion reduziert (Abb. 6.43B).

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: (i) sowohl das *Apobec1*- als auch das *Apobec2*-Gen sind ebenfalls in undifferenzierten Zellen stärker exprimiert als nach der Differenzierung, (ii) die Depletion von p53 resultiert in einer in etwa mit der nach Differenzierung beobachteten Abnahme der Expression beider *Apobec*-Gene, was eine direkte Regulation durch p53 analog zu *Apobec3* vermuten lässt und (iii) sowohl die Depletion von *Apobec1* als auch *Apobec2* durch transiente siRNA resultiert in einer Zunahme von Retrotranspositionseignissen. Im komplexen Prozess der Differenzierung scheinen die stark L1*Md*-exprimierenden F9-Zellen einen effektiven, präzise regulierten Weg gefunden zu haben, die möglichen schädigenden Effekte der L1-Retrotransposition geschickt kompensieren zu können. Sowohl bei der Regulation der FL-L1-Elemente als auch des L1-„Antidots“ nimmt das p53-Protein eine Schlüsselfunktion ein.

7. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des Tumorsuppressors p53 auf die Differenzierung von F9-Zellen untersucht werden. Dabei wurde als erstes die Regulation der Expression des Proteins während der Differenzierung analysiert, die Funktionalität von p53 überprüft und dessen Expression in phänotypischen Subpopulationen der Zelllinie untersucht. Bioinformatische Auswertungen stellten die Verbindung zwischen differenzierungsregulierten Genen und FL-L1-Elementen her. Zur mechanistischen Erklärung der beobachteten Phänomene wurde die Beteiligung von p53 an der Regulation der FL-L1 sense- und antisense Promotoraktivität und dem daraus resultierenden epigenetischen Zustand differenzierungsregulierter Gene bestimmt. Nachfolgend werden die Ergebnisse genauer diskutiert:

7.1 p53 ist in F9-Zellen transkriptionell aktiv

Die Reduktion des p53-Proteins nach RA-vermittelter Differenzierung von F9-Zellen (Dony et al., 1985; Oren et al., 1982; Reich et al., 1983) geht mit der Abnahme der p53-mRNA einher (Oren et al., 1982). Übereinstimmend mit den publizierten Daten führte die Behandlung der F9-Zellen mit RA/dbcAMP zu einer deutlichen Reduktion des p53-Transkripts und Proteins (Abbildung 6.1/6.2). Auf Grundlage von Expressionsuntersuchungen der p53-Zielgene *Cdkn1a* und *Mdm2* wurde ein inaktiver, latenter Zustand des Proteins in F9-Zellen postuliert, der sich aber durch genotoxische Substanzen und Bestrahlung der Zellen umkehren lässt (Lutzker and Levine, 1996; Mayo and Berberich, 1996; Zamble et al., 1998). Entgegen der beschriebenen Latenz war es möglich, die Abnahme der *Cdkn1a*- und *Mdm2*-Expression nach Differenzierung der F9-Zellen (Abbildung 6.4) und die Bindung von p53 an die regulatorischen Sequenzen dieser Gene zu zeigen (Abbildung 6.6), was eine Funktion des Proteins während der Differenzierung vermuten lässt. Diese transkriptionelle Abnahme der p53-regulierten Gene widerspricht allerdings den publizierten Beobachtungen (Lutzker and Levine, 1996), welche die differenzierungsinduzierte Zunahme der Expression p53-regulierter Gene, u.a. auch *Cdkn1a* und *Mdm2*, beschreiben. Die mögliche Erklärung dieser widersprüchlichen Daten brachte die Untersuchung der Expression bei unterschiedlichen Zelldichten. Bei einer geringen Zelldichte führte die Differenzierung zu einem deutlichen Anstieg der

Cdkn1a- und *Mdm2*-Expression, während es bei höheren Zelldichten zu einer reproduzierbaren Abnahme beider Transkripte kam (Abbildung 6.5). Diese Ergebnisse lassen sich als eine zelldichteabhängige Regulation von p53 interpretieren. Bei einer hohen Zelldichte scheint das p53-Protein die moderate Transaktivierung seiner Zielgene zu vermitteln, wohingegen eine geringe Zelldichte die p53-Stressantwort in vereinzelt Zellen induziert.

Ein weiterer Nachweis der Funktionalität des Proteins gelang durch die Analyse der Serin18-Phosphorylierung nach 5FU-, Camptothecin- und Doxorubicin-Behandlung der Zellen. Übereinstimmend mit den publizierten Daten (Lutzker and Levine, 1996; Malashicheva et al., 2000; Mayo and Berberich, 1996; Zamble et al., 1998) resultierte die Behandlung mit diesen Substanzen in der Aktivierung des p53-Proteins (Abbildung 6.3B). Dabei korrelierte die Zunahme der Phosphorylierung mit einer gesteigerten Proteinmenge von p53 (Abbildung 6.3C). Darüber hinaus ließ sich auch unter normalen Zellkulturbedingungen ein geringer Anteil Ser18-phosphorylierter p53-Moleküle nachweisen, was ebenfalls für die Funktionalität des Proteins spricht (Abbildung 6.3B).

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse die Rolle von p53 in undifferenzierten F9-Zellen als konstitutiver Transkriptionsfaktor.

7.2 Phänotypische Heterogenität innerhalb der F9-Zellkultur

Die RA/dbcAMP-Behandlung der F9-Zellen führte, wie bereits beschrieben (Strickland et al., 1980), nicht zur Differenzierung der Gesamtkultur. Zwar stellten die meisten Zellen ihre Proliferation 2-3 Tage nach RA-Zugabe ein, doch schien es einen geringen Anteil an nicht differenzierbaren, RA-resistenten Zellen zu geben. Diese waren in der Lage, die morphologisch differenzierten Zellen zu überwachsen, was wieder zu einer Kultur morphologisch undifferenzierter Zellen führte.

Durch Verwendung vitaler fluoreszierender Farbstoffe die im Verlauf der Zellteilung ausgedünnt werden, gelang es, zwei Subpopulationen vor und nach Differenzierung (siehe Abschnitt 6.8) über die Durchflusszytometrie zu identifizieren: eine proliferierende ($Dil^-/CFSE^-$) und eine ruhende ($Dil^+/CFSE^+$) Subpopulation. Letztere zeigte eine ausgeprägtere Expression von Differenzierungsmarkern als die proliferierenden Zellen. Auch die undifferenzierte F9-Zellkultur enthält beide Subpopulationen, die sich ähnlich hinsichtlich der Expression von Differenzierungsmarkern unterscheiden: stärkere Expression von

differenzierungsspezifischen Genen in nicht-proliferierenden (Dil^+) Zellen. Um die Eigenschaften der Subpopulationen zu studieren, wurden Verfahren zur Charakterisierung von Stamm- und Vorläuferzellen eingesetzt: der Aldefluor[®]-Assay und die Analyse der *side population*.

Der Aldefluor[®]-Assay wurde als erstes für die Isolation von Leukämienstammzellen aufgrund der gesteigerten ALDH-Aktivität eingesetzt (Cheung et al., 2007). Dabei wurde eine Population von Alde^{bright} AML-Zellen (akute myeloische Leukämie; AML) in 14 von 43 Patientenproben nachgewiesen, die zusätzlich CD34, einen Leukämienstammzellmarker exprimierten und besser in immunsupprimierten Mäusen wuchsen. In den letzten Jahren wurde die ALDH-Aktivität erfolgreich als Marker zur Isolation von CSCs (*Cancer Stem Cells*) bei verschiedenen Krebsarten verwendet (Marcato et al., 2011). Auch in F9-Zellen ließ sich eine Alde^{bright} Subpopulation nachweisen, die charakteristische Merkmale von Vorläuferzellen zeigte:

1. Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung
2. Die Fähigkeit zu allen in der Kultur vorkommenden differenzierten Zellen auszureifen

Die Alde^{dim} Subpopulation scheint die Zellen zu repräsentieren, die auf dem Weg zur Differenzierung sind (*committed cells*), was durch die Mikroarray-Daten unterstützt wird: Alde^{bright} Zellen clustern eher mit den unbehandelten F9-Zellen, während die Alde^{dim} Subpopulation eher den differenzierten Zellen ähnelt (Abbildung 6.11). Die Ergebnisse verdeutlichen die Heterogenität innerhalb der F9-Zellkultur und ermöglichen die Unterscheidung von zwei Subpopulationen: (i) einer stärker proliferierenden Subpopulation (Alde^{bright}) und (ii) einer kaum proliferierenden Alde^{dim} Subpopulation. Die Alde^{bright} Subpopulation kann sich selbst erneuern und alle anderen Subpopulationen der Kultur hervorbringen. Diese steht an der Spitze der hierarchischen Organisation und zeigt auch nach RA/dbcAMP-Behandlung einen undifferenzierten Phänotyp. Die Dil-Färbung differenzierter und undifferenzierter Zellen unterstützt diese Vermutung, denn bereits nach 7 Tagen ließen sich keine prozentualen Unterschiede zwischen den Dil^+ und Dil^- Subpopulationen mehr nachweisen (siehe Abbildung 6.9B/C). Die Alde^{dim} Subpopulation zeigt einen differenzierten Phänotyp, ist aber noch nicht vollständig differenziert.

7.3 Das p53-Protein in Alde^{bright} Zellen reguliert deren Differenzierung

Wie einleitend beschrieben (siehe Abschnitt 2.1.3), ist das p53-Protein an unterschiedlichen Differenzierungsprozessen sowie Rückhaltung reifer somatischer Zellen im Prozess der iPS-Generierung beteiligt. Dies war die Motivation zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Alde^{bright} Zellen und der Expression des p53-Proteins. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten neben einer eindeutigen Anreicherung von p53 in Alde^{bright} Zellen (Abbildung 6.12) auch die direkte Beeinflussung der Aldefluor[®]-Reaktion durch das p53-Protein (Abbildung 6.13). Die ektopische Expression erhöhte die Alde^{bright} Subpopulation, während die Depletion durch siRNA einen gegenteiligen Effekt erzielte. Dieser Zusammenhang ließ sich auch bei lin⁻ Knochenmarkzellen aus Balb/c p53^{+/+} bzw. p53^{-/-} Tieren sowie MEF p53^{+/+} und MEF p53^{-/-} Zellen bestätigen (siehe Abbildung 6.13).

Die Sortierung von p53⁺ und p53⁻ Subpopulationen nach Intrazellulärfärbung bestätigte die Ergebnisse nach Aldefluor[®]- und Dil/CFSE-Markierung der Zellen: übereinstimmend mit der verstärkten Expression von p53 in Alde^{bright} Zellen ließ sich in p53⁺ Zellen sowohl von undifferenzierten als auch differenzierten F9-Zellkulturen ein undifferenzierterer Phänotyp als in der p53⁻/Alde^{dim} Subpopulation nachweisen (siehe Abbildung 6.14). Damit lässt sich vermuten, dass das p53-Protein an der Regulation der Vorläuferzellen (Alde^{bright}) beteiligt sein könnte. Diese ist schematisch in Abb. 7.1 zusammengefasst.

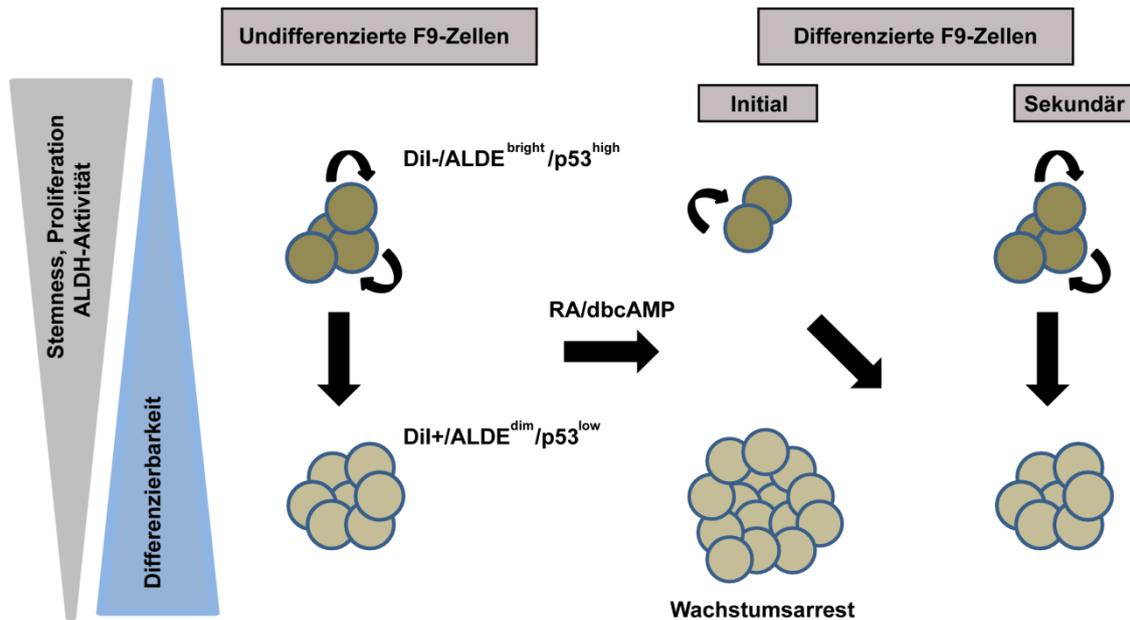


Abbildung 7.1: Zusammenfassung der Eigenschaften von $p53^{\text{high}}/\text{Alde}^{\text{bright}}$ sowie $p53^{\text{low}}/\text{Alde}^{\text{dim}}$ Zellen innerhalb der F9-Zellkultur. Innerhalb der undifferenzierten F9-Zellkultur lassen sich zwei Subpopulationen unterscheiden: eine $p53^{\text{high}}$ -Population, die sowohl stark-proliferative Eigenschaften wie auch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzt. Diese Zellen dünnen den Farbstoff Dil aus (Dil-) und sind nicht bzw. nur partiell differenzierbar. Zudem zeigen sie eine hohe Aktivität von ALDHs und stellen im Aldefluor®-Assay die $\text{Alde}^{\text{bright}}$ Population dar. Eine zweite Subpopulation umfasst die $p53^{\text{low}}$ Zellen. Diese Subpopulation ist negativ für Aldefluor® (Alde^{dim}), zeigt nur noch ein eingeschränktes Proliferationspotenzial (Dil+) und zeichnet sich durch die gesteigerte Expression von Differenzierungsmarkern aus. Nach Zugabe der Induktoren RA und dbcAMP kommt es zu einer vollständigen Differenzierung der $p53^{\text{low}}/\text{Alde}^{\text{dim}}$ Population, die sich in Folge einer partiellen epithelialen-mesenchymalen Transition morphologisch verändert und im weiteren Verlauf ihre Proliferation einstellt. Im Gegensatz zu Alde^{dim} Zellen differenzieren die $\text{Alde}^{\text{bright}}/p53^{\text{high}}$ Zellen nicht vollständig. Zwar reduziert sich deren prozentualer Anteil während der initialen Differenzierung, doch sind diese Zellen in einem sekundären Prozess in der Lage, vermutlich durch eine Folge von symmetrischen und asymmetrischen Teilungen die ursprünglichen Verhältnisse wieder herzustellen (der Einfachheit halber wurde die Darstellung für die zwei Hauptpopulationen gewählt. Dabei wurden die Übergangspopulationen sowie die SP-Zellen nicht berücksichtigt).

Erste Hinweise auf eine Beteiligung des Proteins an der Differenzierung von F9-Zellen zeigten die Ergebnisse der Sortierung von $p53^{\text{high}}$ und $p53^{\text{low}}$ Zellen und der Untersuchung der Expression von Differenzierungsmarkern (siehe Abschnitt 7.3). Ein weiterer Hinweis ergab sich aus der zeitlich gegenläufig regulierten Expression von Differenzierungsmarkern und dem p53-Protein: erst 48h nach Induktion der Differenzierung kommt es zu einer signifikanten Abnahme des p53 mRNA-Levels (Abbildung 6.7).

Insgesamt spricht die schnelle Differenzierbarkeit der Zellen binnen 48h nach RA/dbcAMP-Zugabe für ein transkriptionell offenes Chromatin der regulierten Gene. Diese Differenzierbarkeit der Zellen ist nach stabiler Depletion von p53 (Abb. 15) nur noch eingeschränkt möglich, was den Zusammenhang zwischen p53 und der transkriptionellen Kompetenz der regulierten Gene andeutet. Auf welche Weise aber

kann das p53-Protein den Zustand des Chromatins beeinflussen? Vorangegangene Arbeiten zeigten eine Interaktion von p53 mit dem Chromatin-Remodeling Komplex SWI/SNF (Lee et al., 2002). Darüber hinaus kann das p53-Protein mit einer Vielzahl transkriptioneller Ko-Aktivatoren mit Histon-Acetylaseaktivität (HAT) interagieren und die Rekrutierung dieser Proteine an die Ziel-DNA-Region vermitteln. Zu den Interaktionspartnern zählen z.B. die Histon-Acetylasen p300/CBP (Avantaggiati et al., 1997; Gu and Roeder, 1997), PCAF (Scolnick et al., 1997) oder auch TIP60 (Gevry et al., 2007). Dadurch ist es dem p53-Protein möglich, nach Bindung an die DNA den epigenetischen Zustand seiner Zielgene und der damit verbundenen Zugänglichkeit des Chromatins zu regulieren. Erst kürzlich wurde eine weitere wichtige Beobachtung beschrieben: das p53-Protein ist in der Lage, die SP-Aktivität humaner L1-Elemente transkriptionell zu stimulieren (Harris et al., 2009). Gerade in ES- und EC-Zellen ist das Level der L1-Transkription sehr hoch, die Retrotranspositionereignisse aber nur gering, was eine strikte Regulation der L1-Aktivität andeutet. Kürzlich erschienene Arbeiten postulieren die Beteiligung der L1-Elemente am Differenzierungsprozess humaner embryonaler Stammzellen (Macia et al., 2011) und die Inhibition sowie die shRNA-vermittelte Depletion der L1-RT (ORF2) führte zur Differenzierung von Tumorzellen (Sciamanna et al., 2005). Dabei könnte vor allem die antisense Aktivität des L1-Elements für die Regulation der Expression benachbarter Gene entscheidend sein. Die schnelle p53-abhängige Differenzierbarkeit der F9-Zellkultur, die starke Expression von L1-Elementen in genau diesen Zelltypen als auch die beschriebene Regulation des humanen L1-Promotors durch p53 motivieren für die Untersuchung des Zusammenhangs der L1-Transkription, der p53-Expression und der zellulären Differenzierung. Damit könnte auch die Bindung von p53 an die L1-Elemente und Aktivierung deren ASP-Aktivität das Chromatin der benachbarten DNA-Sequenzen durch das antisense Transkript beeinflussen.

7.4 p53 und die Regulation der Transkription von FL-L1-Elementen

FL-L1-Elemente sind oft in räumlicher Nähe zu Genen integriert. Einige dieser Gene werden im Verlauf der Differenzierung von F9-Zellen hochreguliert (z.B. *Dab2*). Auch genomweit wurde bereits die Existenz von L1-Sequenzen proximal zur TSS bekannter proteinkodierender Gene innerhalb des Menschen-, Ratten- und Mausgenoms untersucht. Dabei wurden 79, 84 bzw. 25 solcher L1-Elemente innerhalb einer Region von -6000bp bis +1000bp zur TSSs identifiziert (Kuwabara et

al., 2009). Die Autoren interpretierten die Ergebnisse als möglichen Hinweis auf einen globalen regulatorischen Mechanismus bei der Kontrolle der neuronalen Genexpression und beschrieben die in der Nähe von Genen lokalisierten FL-L1-Elemente als entscheidende Regulatoren der adulten Neurogenese (Muotri et al., 2005).

Um die FL-L1-assoziierte Transkription und die putativen Einflüsse auf die benachbarten Gene zu studieren, wurden folgende Strategien verwendet: (i) die Detektion der gesamten L1-Expression, (ii) die Unterscheidung zwischen familienspezifischen L1-Mitgliedern, (iii) die Analyse der SP- und ASP-Aktivität sowie die Analyse spezifischer FL-L1-Elemente.

Durch die Positionierung der Primer innerhalb der konservierten Region in der ORF1-Sequenz konnte die Expression der Gesamtheit aller FL-L1-Elemente untersucht werden. Durch Platzierung innerhalb der familienspezifischen „tether“-Sequenz (Furano, 2000) war die Unterscheidung zwischen der *L1Md-A* und *L1Md-T* Familie möglich. Die qPCR-Analyse zeigte eine starke Expression der L1-Elemente in F9-Zellen und die Untersuchung der familienspezifischen Transkripte führte zum Nachweis der *L1Md-T* und *L1Md-A* Familie (Martin, 1991; Schichman et al., 1992). Übereinstimmend mit publizierten Daten führte die RA/dbcAMP-Zugabe zu einer deutlichen Abnahme der Transkriptmenge der FL-L1-Elemente in F9-Zellen (Martin and Branciforte, 1993). Die Analyse der *L1Md-T* und *L1Md-A* familienspezifischen Expression resultierte hingegen in keinen eindeutigen Ergebnissen: zwar scheint die Expression beider Familien durch die RA/dbcAMP-Zugabe beeinflusst zu werden, doch sind die Unterschiede weniger signifikant und sehr variabel (Abbildung 6.17). Auch die SP- und ASP-Aktivität im Vergleich zwischen undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen lieferte kein klares Ergebnis, deuten aber ebenfalls eine abnehmende Aktivität nach RA/dbcAMP-Zugabe an.

Aufgrund der Tatsache, dass (i) p53 an der Regulation der Differenzierung in F9-Zellen beteiligt ist, (ii) L1-Familienmitglieder stark exprimiert werden, (iii) sich die Positionierung von L1-Elementen mit differenziell regulierten Genen assoziieren lässt und (iv) der beschriebenen Interaktion von p53 mit dem humanen L1-Promotor, wurden die Auswirkungen der p53-Depletion durch transiente shRNA auf die Expression der L1-Elemente untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der gesamten L1-Expression, die in etwa der nach Differenzierung beobachteten Abnahme entsprach. Ähnlich wie bei den Untersuchungen der

familienspezifischen *L1Md-A* und *L1Md-T* Expression nach Zelldifferenzierung resultierte auch die Depletion von p53 in einer deutlichen Reduktion der *L1Md-A* Expression. Zwar führte die Abnahme der verfügbaren p53-Menge auch zu einer Abnahme der *L1Md-T* Transkripte, doch war diese nur als Tendenz erkennbar (Abbildung 6.17).

Unter Berücksichtigung der großen Anzahl von FL-L1-Elementen innerhalb des murinen Genoms wäre deren simultane Regulation undenkbar. Die Ergebnisse der qPCR-Analyse beschreiben lediglich den Mittelwert (resultiert aus der Transkription mehrerer FL-L1-Elemente) und sind daher womöglich nicht für individuelle Elemente zutreffend. Die Tatsache, dass das p53-Protein einen aktivierenden Einfluss auf die SP-Aktivität humaner L1 5'-UTRs hat (Harris et al., 2009), und sich p53-REs innerhalb der Sequenzen humaner L1-Elemente nachweisen lassen (Harris et al., 2009), bedeutet nicht zwangsläufig eine simultane Regulation der Gesamtheit aller L1-Elemente. Letztendlich sind weitere regulatorische Faktoren wie die DNA-Methylierung oder der Zustand des Chromatins für eine Kontext-abhängige Regulation erforderlich.

In welcher Weise könnte die Regulation der Differenzierung mit der Expression des p53-Proteins und dessen Beteiligung an der L1-Expression zusammenhängen? Eine entscheidende Rolle könnte dabei die L1-ASP-Aktivität spielen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals auch eine ASP-Aktivität des murinen L1-Promotors gezeigt werden (Abbildung 6.21). Es ließ sich aber nach transienter Depletion des p53-Proteins keine eindeutige Regulation der ASP-Aktivität nachweisen. Die Ergebnisse lassen sich unter anderem aufgrund der geringen Effizienz der shRNA-Transfektion erklären. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit, die Zielpopulation zu treffen, nur gering. Auch repräsentieren die ausgewählten Fragmente der 5'-UTR Regionen nur exemplarisch die endogene Situation – ohne Berücksichtigung weiterer regulatorischer Komponenten wie z.B. dem lokalen Chromatinzustand. Zudem wäre auch hier die bereits angesprochene globale Regulation schlichtweg undenkbar.

Den Beweis, dass auch interne Regionen des humanen L1-Elements als sense- und antisense Promotor fungieren können, erbrachte die Arbeitsgruppe um Fred Gage (Kuwabara et al., 2009). Sie zeigten, dass ORF2-Sequenzen des humanen L1-Elements eine SP- als auch ASP-Promotoraktivität besitzt. Durch die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe um David Symer und der freundlichen Genehmigung zur Nutzung der

Vektoren war es möglich, auch in F9-Zellen die interne Promotoraktivität muriner L1-Elemente und deren Regulation durch p53 zu zeigen (siehe Abschnitt 6.6.1.2). Entgegen der für das humane L1 beschriebenen ORF2-Sequenz als möglicher interner Promotor, scheint bei der Maus die ORF1- bzw. ORF1-IRES-Region Ausgangspunkt der Aktivität zu sein (Abbildung 6.22). Durch die ektopische Expression von p53 ließ sich die ASP-Aktivität der internen Regionen signifikant steigern (Abbildung 6.23).

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse für eine transkriptionelle Regulation von L1-Elementen durch p53. Alle gewählten Versuchsstrategien zielten dabei entweder auf die Gesamtheit aller L1-Elemente bzw. L1-Familien oder auf Transfektionsstudien mit den L1 5'-UTRs ab. Die Variationen zwischen den einzelnen Versuchen sowie das unvorstellbare Szenario, dass das p53-Protein an der simultanen Regulation der Gesamtheit aller FL-L1-Elemente beteiligt sein sollte, sprechen für eine notwendige Untersuchung einzelner FL-L1-Elemente, die mit den differenziell regulierten Genen assoziiert sind.

7.5 p53-regulierte antisense Transkription aus FL-L1-Elementen und Regulation der Genexpression während der Differenzierung

Basierend auf den bioinformatischen Auswertungen wurden die FL-L1-Elemente analysiert, die in räumlicher Nähe zu differenziell regulierten Genen lokalisiert sind. Es gelang zu zeigen, dass die Expression individueller, aus FL-L1-Elementen stammender antisense Transkripte in Intronen des *Gpr126*, *Rarb*, *Bmper*, *Raet1e* und *Sema6d*-Gens im Prozess der Differenzierung von F9-Zellen abnimmt (siehe Abbildung 6.26). Diese Abnahme korrelierte zum einen mit der des p53-Proteins nach Zelldifferenzierung, zum anderen mit der Depletion des Proteins durch shRNA. Dahingegen zeigte die Expression der Wirts-Gene eine deutliche Zunahme nach RA/dbcAMP-Behandlung.

Welche Funktion aber hat die p53-regulierte ASP-Aktivität der individuellen FL-L1-Elemente im komplexen Prozess der Differenzierung? Bereits 48h nach RA/dbcAMP-Behandlung kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Expression differenzierungsspezifischer Gene (siehe Abbildung 6.7), d.h. auch im undifferenzierten Zustand muss sich die Chromatinumgebung der regulierten Gene bereits in einem transkriptionsfähigen Zustand befinden, um nach Induktion eine derart schnelle Reaktion zu ermöglichen. Dafür sprechen auch die Daten nach

Aldefluor[®]-Messung (siehe Abschnitt 6.3), die schon in undifferenzierten Zellen eine heterogene Expression von Differenzierungsmarkern zeigten: je stärker die Expression von p53, desto weniger differenziert sind die Zellen. Die stabile Depletion von p53 führte hingegen zu einer schlechteren Differenzierbarkeit. Unter Berücksichtigung aktueller Publikationen, die eine Beteiligung von L1-Elementen an der epigenetischen Regulation humaner embryonaler Stammzellen vermuten (Macia et al., 2011) und der Tatsache, dass p53 die ASP-Aktivität individueller L1-Elemente reguliert, könnte die durch p53-regulierte antisense Transkription des intronischen L1-Elements das Chromatin in einem transkriptionsfähigen Zustand halten. In Folge der RA/dbcAMP-Behandlung kommt es zur Abnahme des p53-Proteins und folglich auch zur Reduktion der ASP-Aktivität der individuellen L1s. Durch das offene Chromatin könnte die Transkription der regulierten Gene nach RA/dbcAMP-Behandlung unmittelbar stattfinden. In Alde^{dim} Zellen, die vorrangig nach RA-Zugabe differenzieren, ist dieser Prozess womöglich schon aktiviert. Die p53-Expression ist reduziert, die FL-L1 AS-Transkription nimmt ab und die Expression der differenzierungsspezifischen Gene ist gesteigert. Trotz der Reduktion der p53-Menge nach stabiler Depletion ist die Differenzierbarkeit herabgesetzt (Abbildung 6.15), wohingegen Alde^{dim} Zellen mit reduzierten p53-Mengen leichter differenzieren (Abbildung 6.11). Wie lässt sich dieser scheinbare Widerspruch erklären? Die ablaufenden epigenetischen Prozesse haben sich womöglich erst nach einigen Zellteilungen manifestiert. Die Kontrolle des Chromatins durch FL-L1-Elemente und p53 ist vermutlich ein strikt regulierter Prozess. Die Versuche nach stabiler p53-Depletion wurden nach einigen Wochen durchgeführt; in dieser Zeitspanne von mehreren Zellteilungen hat sich wahrscheinlich auch die Kompetenz des Chromatins verändert. Durch die reduzierte ASP-Aktivität und der resultierenden antisense-Transkription könnte die Genregion für die Transkriptionsmaschinerie nach RA/dbcAMP-Behandlung nun schwerer zugänglich sein und damit die reduzierte Differenzierbarkeit erklären.

Zur detaillierten Studie wurde exemplarisch das FL-L1-Element innerhalb des *Egflam*-Gens untersucht. An diesem L1Md-A Element ließ sich eine durch p53-regulierte ASP-Aktivität zeigen, die zur Transkription nicht-kodierender RNAs (ncRNAs) zwischen dem FL-L1-Element und der TSS des *Egflam*-Gens führte (siehe Abbildung 6.29). Diese ncRNAs zeigten eine geringere Stabilität als das *Gapdh*-Transkript (Abbildung 6.30) und die Analyse der Transkriptionsrichtung führte zu

einem interessanten Ergebnis: in der Nähe des FL-L1-Elements überwog die Transkription beginnend aus dem L1-Element, in der Nähe der *Egflam*-TSSs die Transkription beginnend aus der Promotorregion (Abbildung 6.30). Man kann davon ausgehen, dass auch in undifferenzierten Zellen (i) eine basale Transkription des *Egflam*-Gens stattfindet und (ii) dessen Transkript in Konkurrenz zu dem des FL-L1-Elements steht. Anscheinend vermittelt das p53-Protein durch die Aktivierung des ASP des FL-L1-Elements innerhalb der intronischen Region des differenziell regulierten Gens den offenen Chromatinzustand durch die Interferenz beider Transkripte. Tatsächlich zeigten die ChIP-Analysen der aktiven Histonmodifikation H3K4me3- und der repressiven H3K27me3-Modifikation ein reguliertes, aber bivalentes epigenetisches Profil. In der Region der TSS des *Egflam*-Gens führte die Differenzierung zu einer signifikanten Abnahme der repressiven H3K27me3-Modifikation und einem gesteigerten Level von aktivem H3K4me3. Auch die RNA-Pol II-S5 Phosphorylierung nahm in der TSS-Region deutlich zu. Allerdings ließ sich auch in undifferenzierten Zellen die H3K4me3 sowie in differenzierten Zellen das repressive H3K27me3 nachweisen, auch wenn eine deutliche Regulation nach Differenzierung zu erkennen war. Die qChIP-Analyse des intronischen FL-L1-Elements zeigte ebenfalls, trotz der abnehmenden Expression nach RA/dbcAMP-Behandlung, eine gesteigerte RNA-Pol II-S5 Phosphorylierung am L1-Element nach Differenzierung, was durch das Innehalten der aktiven RNA-Polymerase II an intronischen FL-L1-Elementen erklärt werden könnte (Abbildung 6.31). Darüber hinaus zeigten die ChIP-chip Ergebnisse eine deutliche p53-Interaktion mit den distalen DNA-Regionen in der Nähe des 5'-UTRs. Neben der aktivierenden Funktion auf die L1-Transkription ließ sich das Protein auch an der TSS des *Egflam*-Gens nachweisen (Abbildung 6.31). Vermutlich wirkt die p53-Besetzung hier reprimierend. Trotz des offenen Chromatins unterbindet das p53-Protein womöglich den Zugang weiterer aktivierender Proteine an die regulatorischen *Egflam*-Regionen und ermöglicht dadurch nur die basale Transkription in undifferenzierten Zellen.

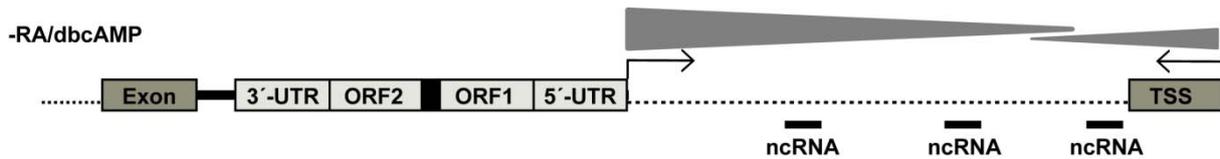


Abbildung 7.2: Zusammenfassung der transkriptionellen Interferenz zwischen dem L1-initiierten AS-Transkript und der *Egflam*-Transkription. In undifferenzierten F9-Zellen ist die antisense Transkription aus dem L1*McA* Element am stärksten. Diese führt zur Generation von instabilen nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs). Aufgrund der basalen Expression des *Egflam*-Gens steht das antisense Transkript in Konkurrenz mit dem sense Transkript aus der TSS des *Egflam*-Gens. Nach Differenzierung nimmt die ASP-Aktivität des L1s ab und die *Egflam*-Expression wird gesteigert.

Betrachtet man die Zellen während der Entwicklung der Maus, so können nur die embryonalen Stammzellen noch in alle Zelltypen differenzieren. Je fortgeschrittener die Entwicklung, desto eingeschränkter das Differenzierungspotenzial der Zellen. Neuronale Stammzellen können nur noch spezialisiertere und differenziertere neuronale Zelltypen hervorbringen, die hämatopoetischen Stammzellen sind auf die Differenzierung in Zelltypen des blutbildenden Systems beschränkt (Rossant et al., 2003). Dabei besitzt jede dieser Zellen ein zelltypspezifisches Netzwerk von Transkriptionsfaktoren, das sogenannte „transkriptionelle Gedächtnis“, welches durch epigenetische Modifikationen erhalten bleibt (Hemberger et al., 2009). Unterschiedliche Publikationen zeigten erst kürzlich, dass das Fehlen verschiedener epigenetischer Modifikationen in der ektopischen Expression zelllinienspezifischer Gene und damit verbundener Periimplantationslethaliät resultiert. Die Etablierung und Erhaltung des epigenetischen Programms ist damit für die frühen Stadien der Entwicklung essentiell (Ng et al., 2008; Surani et al., 2007; Yuan et al., 2009). Das Selbsterneuerungspotenzial embryonaler Stammzellen ist beispielsweise von der Erhaltung einer spezifischen epigenetischen Modifikation abhängig (Hemberger et al., 2009; Jaenisch and Young, 2008; Surani et al., 2007). Im Detail wurde gezeigt, dass sogenannte bivalente Domänen – die aus einer Koexistenz aktiver (H3K4me3) und repressiver (H3K27me3) Modifikationen bestehen – in regulatorischen Loci für wichtige entwicklungsregulierte Gene in ES-Zellen stark angereichert vorkommen (Azuara et al., 2006; Bernstein et al., 2006; Mikkelsen et al., 2007). Diese Entdeckung führte zu der Hypothese, dass bivalente Domänen die Pluripotenz von ES-Zellen durch „Halten“ von entwicklungspezifischen Genen in einem transkriptionskompetenten Zustand vermitteln. Allgemein sind es also Transkriptionsfaktoren, die den individuellen Zustand des Chromatins regulieren, indem sie mit Histonen um die DNA-Bindung konkurrieren (Hayes and Wolffe, 1992).

p53 interagiert dabei mit einer Vielzahl von Proteinen, für die eine histonmodifizierende Funktion beschrieben wurde (Langley et al., 2002; Liu et al., 1999; Luo et al., 2001; Murphy et al., 1999; Vaziri et al., 2001). Dadurch ist das Protein in der Lage, eine spezifische Modifikation des Chromatins zu vermitteln (Allison and Milner, 2004).

In analoger Vorgehensweise wie bei intronischen FL-L1-Elementen wurde der Einfluss von p53 auf die Regulation intergener FL-L1-Elemente analysiert, die in <50kbp von differenzierungsregulierten Genen lokalisiert sind. Dazu wurde exemplarisch das revers zur *Dab2*-TSS angeordnete FL-L1-Element der *L1Md-T* Familie untersucht. Da es sich um ein mutiertes L1-Element handelt, wurde das Promotorpotenzial der 5'-UTR Region vorab untersucht (Abbildung 6.32). Dabei ließ sich neben der bidirektionalen Promotoraktivität auch ein direkter Einfluss des p53-Proteins auf die transkriptionelle Aktivität des 5'-UTRs zeigen. Durch 5'RACE nested PCR war es möglich, den tatsächlichen Transkriptionsstart des *Dab2*-Gens zu kartieren (Abbildung 34). Die p53-ChIP wies das Protein sowohl an der TSS des *Dab2*-Gens als auch am 5'-UTR des L1-Element nach (siehe Abbildung 6.34). Aufgrund der p53-abhängigen ASP-Aktivität ließ sich auch hier die Existenz von ncRNAs zwischen dem *L1Md-T* Element und der TSS des *Dab2*-Gens vermuten. Es gelang der Nachweis instabiler ncRNAs (siehe Abbildung 6.34/6.35). Die Untersuchung des Ursprungs des Transkripts zeigte ein interessantes Bild: obwohl die Transkription des L1-antisense Transkripts anders als beim *Egflam*-Gen (siehe Abschnitt 7.7.1) aufgrund der intergenen Lokalisation nicht mit dem *Dab2*-Transkript in Konkurrenz steht, ließen sich unterschiedliche Entstehungsrichtungen der ncRNA-Transkripte nachweisen (siehe Abbildung 6.35). Die ChIP-Ergebnisse lieferten ein genaueres Bild des Chromatins und dem RNA-Pol II-S5 Phosphorylierungsstatus (Abbildung 6.36): in undifferenzierten Zellen war die S5-Phosphorylierung ausschließlich am 5'-UTR des L1-Elements nachweisbar. Nach Differenzierung änderte sich das Bild deutlich, die S5-Phosphorylierung war nun ausschließlich an der *Dab2*-TSS zu finden. Nach RA/dbcAMP-Behandlung der Zellen nahm die H3K4-Trimethylierung, übereinstimmend mit der gesteigerten *Dab2*-Expression an der identifizierten Promotorregion (siehe Abbildung 6.34) deutlich zu (siehe Abbildung 6.36). Hingegen kam es in Folge der RA/dbcAMP-Behandlung zu einer Abnahme der H3K27me3 Histonmodifikation am *Dab2*-Promotor. Aufgrund der reduzierten ASP-Aktivität des *L1Md-T* Elements *upstream* des *Dab2*-Gens und der reduzierten

antisense Transkriptmenge resultierte die Differenzierung der Zellen in einer gesteigerten H3K27-Trimethylierung der intergenen Region bis hin zur tatsächlichen *Dab2*-Promotorregion (Abb. 6.36).

Die nachgewiesenen sense und antisense ncRNA-Transkripte sprechen womöglich für eine zirkulierende RNA-Polymerase (siehe Abbildung 7.3). Durch das p53-aktivierte Antisensetranskript aus dem L1*Md*-T Element wird die Chromatinregion vor der *Dab2*-TSS ebenfalls in einem transkriptionskompetenten Zustand gehalten. Anders als bei intronischen FL-L1-Elementen, dessen Transkript in Konkurrenz zu dem des entsprechenden Gens steht, vermittelt das antisense Transkript aus entfernten FL-L1-Elementen die transkriptionelle Kompetenz der Genregion.

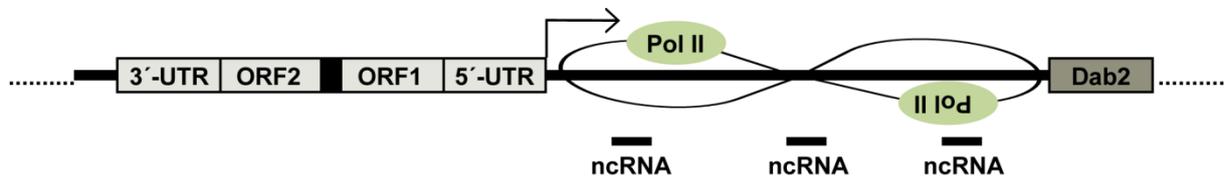


Abbildung 7.3: L1*Md*-T vermittelte transkriptionelle Kompetenz des *Dab2*-Gens. In undifferenzierten F9-Zellen ist die antisense Transkription aus dem L1*Md*-T Element am stärksten. Diese führt zur Generation von instabilen nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs). Dabei wäre es denkbar, dass die RNA-Polymerase zwischen dem L1*Md*-T Element und der TSS des *Dab2*-Gens zirkuliert. Auf diese Weise schafft die p53-regulierte L1-initiierte Transkription ein transkriptionskompetentes Chromatin.

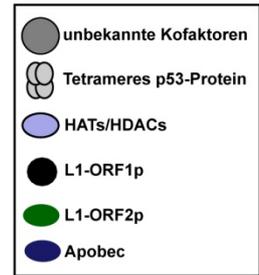
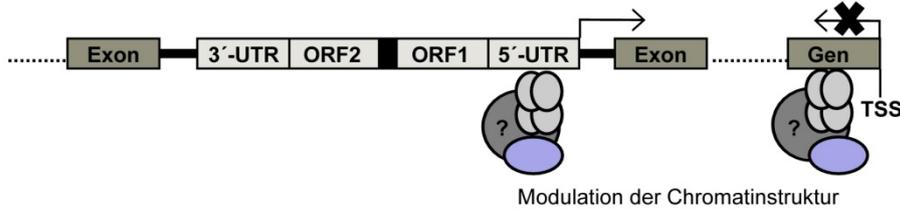
Mittlerweile ist es mehr als 50 Jahre her, dass Barbara McClintock die transposablen Elemente als „kontrollierende Elemente“ beschrieb (McClintock, 1956). Knapp 15 Jahre später erweiterten Britten und Davidson McClintock's Hypothese (Britten und Davidson, 1971) und postulierten, dass genau diese repetitiven Elemente aufgrund ihrer Verteilung über das gesamte Genom ganze Signalwege kreieren könnten. Heute wissen wir, dass das Genom eine parallele evolutionäre Entwicklung mit seinen mobilen Elementen durchlief und repetitive DNA und insbesondere Retrotransposons den Prozess der genomischen Evolution beeinflussen und vorantreiben können. Durch die beschriebene Stimulation des humanen L1-Promotors durch p53 wurde erstmals die Funktion des Tumorsuppressors mit der L1-Aktivität verknüpft (Harris et al., 2009). Die vorliegende Arbeit konnte die publizierten Ergebnisse verlinken, auf Mauszellen übertragen und erstmals den epigenetischen Einfluss individueller FL-L1-Elemente mit der Differenzierung von embryonalen Karzinomazellen verbinden. Dabei scheint die Interaktion von p53 mit den

individuellen FL-L1-Elementen für einen epigenetisch korrekten Chromatinzustand entscheidend zu sein.

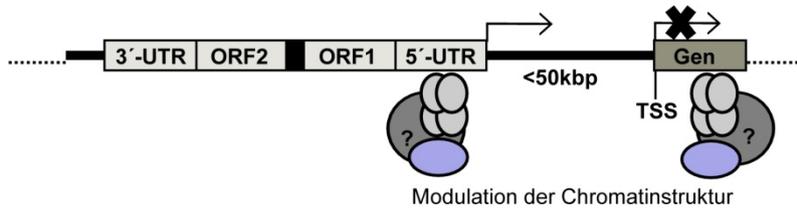
7.6 Das p53-Protein verhindert die L1 Retrotransposition durch die transkriptionelle Aktivierung der Apobec-Proteinfamilie

Wie einleitend beschrieben (siehe Abschnitt 2.4.4.1), hat die Zelle es im Laufe der Entwicklung geschafft, eine Vielzahl von Strategien zur Modulation der L1-Aktivitäten zu entwickeln. Hier wurde der Einfluss von Mitgliedern der Apobec-Proteinfamilie auf die Retrotransposition von FL-L1-Elementen sowie deren Regulation durch das p53-Protein untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass das p53-Protein in der Lage ist, die *Apobec1*, *Apobec2* und *Apobec3*-Expression durch Bindung an die regulatorischen Regionen des *Apobec*-Gens zu vermitteln (Abbildung 6.39). Übereinstimmend mit publizierten Daten, die einen inhibitorischen Einfluss der Apobec-Proteine am Prozess der Retrotransposition beim Menschen beschreiben (Kinomoto et al., 2007; MacDuff et al., 2009; Muckenfuss et al., 2006; OhAinle et al., 2008), führte die Depletion von *Apobec3* zu einer signifikanten Zunahme von Retrotranspositionseignissen (Abbildung 6.37). Darüber hinaus ließ sich dieser Effekt auch nach p53-Depletion beobachten (Abbildung 6.40). Damit scheint nicht nur die Apobec-vermittelte Reduktion der Retrotransposition auch bei der Maus eine entscheidende Rolle zu spielen, sondern ist diese auch unmittelbar von der Anwesenheit des p53-Proteins abhängig. Damit ist p53 das zentrale Protein, dass auf der einen Seite durch Aktivierung der L1-Promotoraktivität die benachbarte Chromatinumgebung moduliert und auf der anderen Seite die aktive Mobilisierung der putativ schädigenden FL-L1-Elemente durch direkte Aktivierung der *Apobec*-Expression unterbindet. Die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit sind in der nachfolgenden Abbildung graphisch zusammengefasst:

A) Intronsche LINEs: transkriptionelle Interferenz



B) Intergene LINEs: transkriptionelle Kompetenz



C) Transkriptionelle Aktivierung der Apobec-Expression: Blockade der Retrotransposition

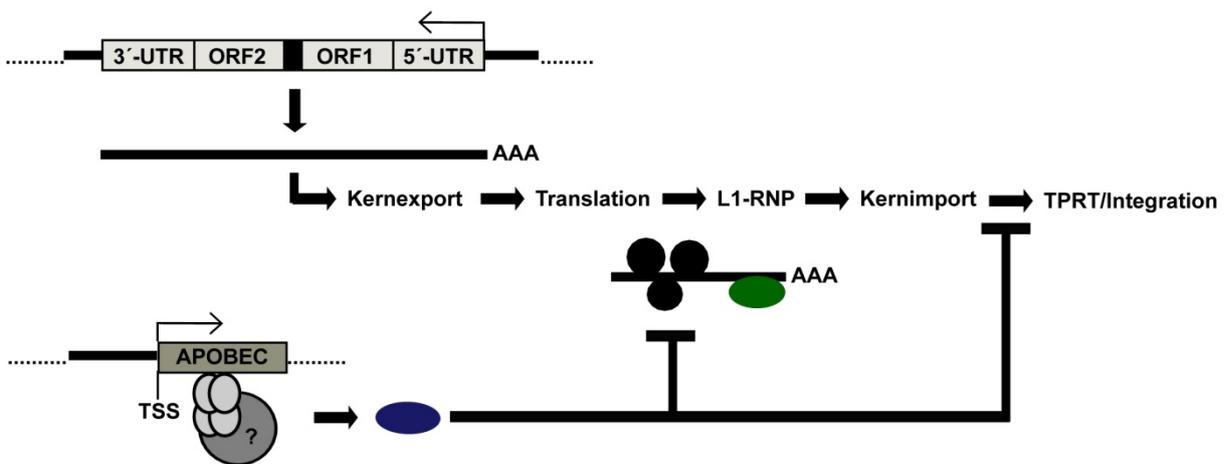


Abbildung 7.4: Zusammenfassung der Funktionen des p53-Proteins in undifferenzierten F9-Zellen. In undifferenzierten F9-Zellen bindet das p53-Protein an die L1-Promotorregion von individuellen intronschen (A) und intergenen (B) FL-L1-Elementen und reguliert Kontext-abhängig neben der sense- auch die antisense-Promotoraktivität. Dabei agiert das p53-Protein vermutlich als Koaktivator im Komplex mit einer Vielzahl an weiteren Proteinen. Derartige Interaktionspartner könnten Transkriptionsfaktoren wie YY1 (Athaniar et al., 2004; Becker et al., 1993; Kurose et al., 1995; Minakami et al., 1992; Singer et al., 1993), Sox11 (Tchenio et al., 2000) oder RUNX3 (Yang and Kazazian, 2006; Yang et al., 2003) sein, für die eine aktivierende Interaktion mit dem L1-Promotor nachgewiesen wurde. Weitere Interaktionspartner könnten Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie wie das TATA-Box bindende Protein TBP oder TFIIF sein, für die eine Interaktion mit dem p53-Protein beschrieben wurde (Espinosa and Emerson, 2001; Leveillard et al., 1996; Liu and Chen, 2006). Um die Histonmodifikationen zu ändern, muss das p53-Protein mit weiteren Proteinen, die eine HAT- (Histon-Acetyltransferase) bzw. HDAC- (Histon-Deacetylase) Aktivität besitzen, wechselwirken. (C) Zudem bindet p53 an die Promotorregion der *Apobec*-Genfamilie und induziert dessen Transkription. Die Apobec-Proteine verhindern anschließend die Retrotransposition aktiver FL-L1-Elemente durch Inhibition der L1-RNP Ausbildung oder des TPRT-Prozesses (Muckenfuss et al., 2006).

8. LITERATUR

Aaronson SA, Todaro GJ (1968). Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J Cell Physiol* **72**: 141-8.

Alisch RS, Garcia-Perez JL, Muotri AR, Gage FH, Moran JV (2006). Unconventional translation of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Genes Dev* **20**: 210-24.

Allison SJ, Milner J (2004). Remodelling chromatin on a global scale: a novel protective function of p53. *Carcinogenesis* **25**: 1551-7.

Anderson ME, Woelker B, Reed M, Wang P, Tegtmeyer P (1997). Reciprocal interference between the sequence-specific core and nonspecific C-terminal DNA binding domains of p53: implications for regulation. *Mol Cell Biol* **17**: 6255-64.

Armesilla-Diaz A, Elvira G, Silva A (2009). p53 regulates the proliferation, differentiation and spontaneous transformation of mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* **315**: 3598-610.

Armstrong JF, Kaufman MH, Harrison DJ, Clarke AR (1995). High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr Biol* **5**: 931-6.

Athanikar JN, Badge RM, Moran JV (2004). A YY1-binding site is required for accurate human LINE-1 transcription initiation. *Nucleic Acids Res* **32**: 3846-55.

Avantaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, Kelly K (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**: 1175-84.

Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jorgensen HF, John RM *et al* (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* **8**: 532-8.

Babushok DV, Kazazian HH, Jr. (2007). Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Hum Mutat* **28**: 527-39.

Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L *et al* (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**: 1674-7.

Banito A, Gil J (2010). Induced pluripotent stem cells and senescence: learning the biology to improve the technology. *EMBO Rep* **11**: 353-9.

Bannister AJ, Schneider R, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T (2005). Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *J Biol Chem* **280**: 17732-6.

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z *et al* (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**: 823-37.

Becker KG, Swergold GD, Ozato K, Thayer RE (1993). Binding of the ubiquitous nuclear transcription factor YY1 to a cis regulatory sequence in the human LINE-1 transposable element. *Hum Mol Genet* **2**: 1697-702.

LITERATUR

- Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P (2008). Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse, in sickness and in health. *Genome Res* **18**: 343-58.
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J *et al* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**: 315-26.
- Bernstine E, Hooper M, Grandchamp S, Ephrussi B (1973). Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **Dec;70(12)**: 3899–3903.
- Berry C, Hannenhalli S, Leipzig J, Bushman FD (2006). Selection of target sites for mobile DNA integration in the human genome. *PLoS Comput Biol* **2**: e157.
- Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, van Buul PP, Gil-Gomez G, Rutgers DH *et al* (1998). The role of the tumor suppressor p53 in spermatogenesis. *Cell Death Differ* **5**: 669-77.
- Blanc V, Davidson NO (2010). APOBEC-1-mediated RNA editing. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**: 594-602.
- Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M *et al* (2010). Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 19**: Unit 19 10 1-21.
- Bogerd HP, Wiegand HL, Hulme AE, Garcia-Perez JL, O'Shea KS, Moran JV *et al* (2006). Cellular inhibitors of long interspersed element 1 and Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8780-5.
- Bond GL, Hu W, Levine AJ (2005). MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr Cancer Drug Targets* **5**: 3-8.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Branciforte D, Martin SL (1994). Developmental and cell type specificity of LINE-1 expression in mouse testis: implications for transposition. *Mol Cell Biol* **14**: 2584-92.
- Brazdova M, Quante T, Togel L, Walter K, Loscher C, Tichy V *et al* (2009). Modulation of gene expression in U251 glioblastoma cells by binding of mutant p53 R273H to intronic and intergenic sequences. *Nucleic Acids Res* **37**: 1486-500.
- Brouha B, Schustak J, Badge RM, Lutz-Prigge S, Farley AH, Moran JV *et al* (2003). Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5280-5.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**: 550-3.
- Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L *et al* (1999). Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* **104**: 263-9.
- Cam H, Griesmann H, Beitzinger M, Hofmann L, Beinoraviciute-Kellner R, Sauer M *et al* (2006). p53 family members in myogenic differentiation and rhabdomyosarcoma development. *Cancer Cell* **10**: 281-93.

- Campbell WA, Yang H, Zetterberg H, Baulac S, Sears JA, Liu T *et al* (2006). Zebrafish lacking Alzheimer presenilin enhancer 2 (Pen-2) demonstrate excessive p53-dependent apoptosis and neuronal loss. *J Neurochem* **96**: 1423-40.
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K *et al* (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **281**: 1677-9.
- Carnell AN, Goodman JI (2003). The long (LINEs) and the short (SINEs) of it: altered methylation as a precursor to toxicity. *Toxicol Sci* **75**: 229-35.
- Cesaroni M, Cittaro D, Brozzi A, Pelicci PG, Luzi L (2008). CARPET: a web-based package for the analysis of CHIP-chip and expression tiling data. *Bioinformatics* **24**: 2918-20.
- Chao C, Saito S, Anderson CW, Appella E, Xu Y (2000). Phosphorylation of murine p53 at ser-18 regulates the p53 responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11936-41.
- Chen D, Patton JT (2001). Reverse transcriptase adds nontemplated nucleotides to cDNAs during 5'-RACE and primer extension. *Biotechniques* **30**: 574-80, 582.
- Chen J, Ruan H, Ng SM, Gao C, Soo HM, Wu W *et al* (2005). Loss of function of def selectively up-regulates Delta113p53 expression to arrest expansion growth of digestive organs in zebrafish. *Genes Dev* **19**: 2900-11.
- Cheung AM, Wan TS, Leung JC, Chan LY, Huang H, Kwong YL *et al* (2007). Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia* **21**: 1423-30.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**: 346-55.
- Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S, She X *et al* (2009). Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol* **7**: e1000112.
- Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, Faretta M, Ronzoni S, Giulini B *et al* (2009). The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* **138**: 1083-95.
- Cohen SN, Chang AC (1973). Recircularization and autonomous replication of a sheared R-factor DNA segment in *Escherichia coli* transformants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 1293-7.
- Conley AB, Miller WJ, Jordan IK (2008). Human cis natural antisense transcripts initiated by transposable elements. *Trends Genet* **24**: 53-6.
- Constance CM, Morgan JIt, Umek RM (1996). C/EBPalpha regulation of the growth-arrest-associated gene gadd45. *Mol Cell Biol* **16**: 3878-83.
- Cordaux R, Batzer MA (2009). The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* **10**: 691-703.
- Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Insinga A, Imbriano C, Piccolo S (2003). Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads. *Cell* **113**: 301-14.

LITERATUR

Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-8.

Cost GJ, Feng Q, Jacquier A, Boeke JD (2002). Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO J* **21**: 5899-910.

Czosnek HH, Bienz B, Givol D, Zakut-Houri R, Pravtcheva DD, Ruddle FH *et al* (1984). The gene and the pseudogene for mouse p53 cellular tumor antigen are located on different chromosomes. *Mol Cell Biol* **4**: 1638-40.

Danilova N, Sakamoto KM, Lin S (2008). p53 family in development. *Mech Dev* **125**: 919-31.

DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 2420-4.

Deppert W, Haug M, Steinmayer T (1987). Modulation of p53 protein expression during cellular transformation with simian virus 40. *Mol Cell Biol* **7**: 4453-63.

Dewannieux M, Heidmann T (2005). LINEs, SINEs and processed pseudogenes: parasitic strategies for genome modeling. *Cytogenet Genome Res* **110**: 35-48.

Dombroski BA, Mathias SL, Nanthakumar E, Scott AF, Kazazian HH, Jr. (1991). Isolation of an active human transposable element. *Science* **254**: 1805-8.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS *et al* (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**: 215-21.

Dony C, Kessel M, Gruss P (1985). Post-transcriptional control of myc and p53 expression during differentiation of the embryonal carcinoma cell line F9. *Nature* **317**: 636-9.

Durrant I (1990). Light-based detection of biomolecules. *Nature* **346**: 297-8.

Ebert A, Lein S, Schotta G, Reuter G (2006). Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Res* **14**: 377-92.

Eickbush TH, Jamburuthugoda VK (2008). The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases. *Virus Res* **134**: 221-34.

el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**: 45-9.

Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* **20**: 6877-88.

Esnault C, Maestre J, Heidmann T (2000). Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet* **24**: 363-7.

Espinosa JM, Emerson BM (2001). Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* **8**: 57-69.

LITERATUR

- Fanning T, Singer M (1987). The LINE-1 DNA sequences in four mammalian orders predict proteins that conserve homologies to retrovirus proteins. *Nucleic Acids Res* **15**: 2251-60.
- Farkash EA, Luning Prak ET (2006). DNA damage and L1 retrotransposition. *J Biomed Biotechnol* **2006**: 37285.
- Feng Q, Moran JV, Kazazian HH, Jr., Boeke JD (1996). Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* **87**: 905-16.
- Feng Z (2010). p53 regulation of the IGF-1/AKT/mTOR pathways and the endosomal compartment. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a001057.
- Feng Z, Levine AJ (2010). The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends Cell Biol* **20**: 427-34.
- Ferretti L, Sgaramella V (1981). Temperature dependence of the joining by T4 DNA ligase of termini produced by type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* **9**: 85-93.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-11.
- Forsberg EC, Prohaska SS, Katzman S, Heffner GC, Stuart JM, Weissman IL (2005). Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS Genet* **1**: e28.
- Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D (2007). Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* **1116**: 196-207.
- Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, Shay JW (1992). A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol* **12**: 2866-71.
- Furano AV (2000). The biological properties and evolutionary dynamics of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **64**: 255-94.
- Gardner R (1983). Origin and differentiation of extraembryonic tissues in the mouse embryo. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **24**: 63-1133.
- Gevry N, Chan HM, Laflamme L, Livingston DM, Gaudreau L (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* **21**: 1869-81.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* **183**: 1797-806.
- Goodier JL, Kazazian HH, Jr. (2008). Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* **135**: 23-35.
- Goodier JL, Ostertag EM, Du K, Kazazian HH, Jr. (2001). A novel active L1 retrotransposon subfamily in the mouse. *Genome Res* **11**: 1677-85.
- Gottlieb E, Haffner R, King A, Asher G, Gruss P, Lonai P *et al* (1997). Transgenic mouse model for studying the transcriptional activity of the p53 protein: age- and tissue-dependent changes in radiation-induced activation during embryogenesis. *EMBO J* **16**: 1381-90.

LITERATUR

- Gottlieb E, Vousden KH (2010). p53 regulation of metabolic pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a001040.
- Gu W, Roeder RG (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**: 595-606.
- Hallenborg P, Feddersen S, Madsen L, Kristiansen K (2009). The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function. *Expert Opin Ther Targets* **13**: 235-46.
- Han JS, Szak ST, Boeke JD (2004). Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature* **429**: 268-74.
- Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* **114**: 4557-65.
- Harris CR, Dewan A, Zupnick A, Normart R, Gabriel A, Prives C *et al* (2009). p53 responsive elements in human retrotransposons. *Oncogene* **28**: 3857-65.
- Harris RS, Liddament MT (2004). Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* **4**: 868-77.
- Hartig R, Shoeman RL, Janetzko A, Tolstonog G, Traub P (1998). DNA-mediated transport of the intermediate filament protein vimentin into the nucleus of cultured cells. *J Cell Sci* **111 (Pt 24)**: 3573-84.
- Hasler J, Samuelsson T, Strub K (2007). Useful 'junk': Alu RNAs in the human transcriptome. *Cell Mol Life Sci* **64**: 1793-800.
- Hayes JJ, Wolffe AP (1992). The interaction of transcription factors with nucleosomal DNA. *Bioessays* **14**: 597-603.
- He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ (2007). microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer* **7**: 819-22.
- Helling RB, Goodman HM, Boyer HW (1974). Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* **14**: 1235-44.
- Hemberger M, Dean W, Reik W (2009). Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 526-37.
- Hohjoh H, Singer MF (1997). Sequence-specific single-strand RNA binding protein encoded by the human LINE-1 retrotransposon. *EMBO J* **16**: 6034-43.
- Holmes SE, Singer MF, Swergold GD (1992). Studies on p40, the leucine zipper motif-containing protein encoded by the first open reading frame of an active human LINE-1 transposable element. *J Biol Chem* **267**: 19765-8.
- Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M *et al* (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* **460**: 1132-5.
- Hu W (2009). The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**: a001073.

- Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ (2007). p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* **450**: 721-4.
- Hutvagner G, Zamore PD (2002). RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 225-32.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**: 23-8.
- Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT *et al* (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* **4**: 1-7.
- Jaenisch R, Young R (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* **132**: 567-82.
- Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378**: 206-8.
- Jurka J (1997). Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1872-7.
- Kaesler MD, Pebernard S, Iggo RD (2004). Regulation of p53 stability and function in HCT116 colon cancer cells. *J Biol Chem* **279**: 7598-605.
- Kale SP, Carmichael MC, Harris K, Roy-Engel AM (2006). The L1 retrotranspositional stimulation by particulate and soluble cadmium exposure is independent of the generation of DNA breaks. *Int J Environ Res Public Health* **3**: 121-8.
- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H *et al* (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* **119**: 1001-12.
- Kannan K, Kaminski N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Amariglio N, Givol D (2001). DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene* **20**: 3449-55.
- Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A *et al* (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* **460**: 1140-4.
- Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C *et al* (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* **252**: 1708-11.
- Khazina E, Weichenrieder O (2009). Non-LTR retrotransposons encode noncanonical RRM domains in their first open reading frame. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 731-6.
- Kimberland ML, Divoky V, Prchal J, Schwahn U, Berger W, Kazazian HH, Jr. (1999). Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Hum Mol Genet* **8**: 1557-60.
- Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, Ishizaka Y, Kojima A, Kurata T *et al* (2007). All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res* **35**: 2955-64.

LITERATUR

Kolosha VO, Martin SL (1997). In vitro properties of the first ORF protein from mouse LINE-1 support its role in ribonucleoprotein particle formation during retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10155-60.

Kolosha VO, Martin SL (2003). High-affinity, non-sequence-specific RNA binding by the open reading frame 1 (ORF1) protein from long interspersed nuclear element 1 (LINE-1). *J Biol Chem* **278**: 8112-7.

Komarova EA, Chernov MV, Franks R, Wang K, Armin G, Zelnick CR *et al* (1997). Transgenic mice with p53-responsive lacZ: p53 activity varies dramatically during normal development and determines radiation and drug sensitivity in vivo. *EMBO J* **16**: 1391-400.

Kress M, May E, Cassingena R, May P (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* **31**: 472-83.

Kulpa DA, Moran JV (2005). Ribonucleoprotein particle formation is necessary but not sufficient for LINE-1 retrotransposition. *Hum Mol Genet* **14**: 3237-48.

Kurose K, Hata K, Hattori M, Sakaki Y (1995). RNA polymerase III dependence of the human L1 promoter and possible participation of the RNA polymerase II factor YY1 in the RNA polymerase III transcription system. *Nucleic Acids Res* **23**: 3704-9.

Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ *et al* (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274**: 948-53.

Kuwabara T, Hsieh J, Muotri A, Yeo G, Warashina M, Lie DC *et al* (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci* **12**: 1097-105.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J *et al* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.

Lane D, Levine A (2010). p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000893.

Lane DP, Crawford LV (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**: 261-3.

Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S *et al* (2002). Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* **21**: 2383-96.

Lavie L, Maldener E, Brouha B, Meese EU, Mayer J (2004). The human L1 promoter: variable transcription initiation sites and a major impact of upstream flanking sequence on promoter activity. *Genome Res* **14**: 2253-60.

Lavin MF, Gueven N (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* **13**: 941-50.

Le Beau MM, Westbrook CA, Diaz MO, Rowley JD, Oren M (1985). Translocation of the p53 gene in t(15;17) in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* **316**: 826-8.

- Lee D, Kim JW, Seo T, Hwang SG, Choi EJ, Choe J (2002). SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. *J Biol Chem* **277**: 22330-7.
- Lee KH, Li M, Michalowski AM, Zhang X, Liao H, Chen L *et al* (2009). A genomewide study identifies the Wnt signaling pathway as a major target of p53 in murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 69-74.
- Lehtonen E, Laasonen A, Tienari J (1989). Teratocarcinoma stem cells as a model for differentiation in the mouse embryo. *Int J Dev Biol* **33**: 105-115.
- Lengner CJ, Steinman HA, Gagnon J, Smith TW, Henderson JE, Kream BE *et al* (2006). Osteoblast differentiation and skeletal development are regulated by Mdm2-p53 signaling. *J Cell Biol* **172**: 909-21.
- Leveillard T, Andera L, Bissonnette N, Schaeffer L, Bracco L, Egly JM *et al* (1996). Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumour-associated mutations. *EMBO J* **15**: 1615-24.
- Li C, Wong WH (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 31-6.
- Li H, Collado M, Villasante A, Strati K, Ortega S, Canamero M *et al* (2009). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* **460**: 1136-9.
- Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* **302**: 1972-5.
- Li T, Spearow J, Rubin CM, Schmid CW (1999). Physiological stresses increase mouse short interspersed element (SINE) RNA expression in vivo. *Gene* **239**: 367-72.
- Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E *et al* (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* **7**: 165-71.
- Linzer DI, Maltzman W, Levine AJ (1979). The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen. *Virology* **98**: 308-18.
- Liu G, Chen X (2006). Regulation of the p53 transcriptional activity. *J Cell Biochem* **97**: 448-58.
- Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD *et al* (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **19**: 1202-9.
- Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Huang G, Di Giandomenico S *et al* (2009). p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* **4**: 37-48.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* **25**: 402-8.
- Louis JM, McFarland VW, May P, Mora PT (1988). The phosphoprotein p53 is down-regulated post-transcriptionally during embryogenesis in vertebrates. *Biochim Biophys Acta* **950**: 395-402.

LITERATUR

- Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A *et al* (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **107**: 137-48.
- Lutzker SG, Levine AJ (1996). A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells is activated by either DNA damage or cellular differentiation. *Nat Med* **2**: 804-10.
- Lyons AB, Parish CR (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* **171**: 131-7.
- MacCallum DE, Hupp TR, Midgley CA, Stuart D, Campbell SJ, Harper A *et al* (1996). The p53 response to ionising radiation in adult and developing murine tissues. *Oncogene* **13**: 2575-87.
- MacDuff DA, Demorest ZL, Harris RS (2009). AID can restrict L1 retrotransposition suggesting a dual role in innate and adaptive immunity. *Nucleic Acids Res* **37**: 1854-67.
- Macia A, Munoz-Lopez M, Cortes JL, Hastings RK, Morell S, Lucena-Aguilar G *et al* (2011). Epigenetic control of retrotransposon expression in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **31**: 300-16.
- Maimets T, Neganova I, Armstrong L, Lako M (2008). Activation of p53 by nutlin leads to rapid differentiation of human embryonic stem cells. *Oncogene* **27**: 5277-87.
- Malashicheva AB, Kislyakova TV, Aksenov ND, Osipov KA, Pospelov VA (2000). F9 embryonal carcinoma cells fail to stop at G1/S boundary of the cell cycle after gamma-irradiation due to p21WAF1/CIP1 degradation. *Oncogene* **19**: 3858-65.
- Malik HS, Burke WD, Eickbush TH (1999). The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. *Mol Biol Evol* **16**: 793-805.
- Maltzman W, Czyzyk L (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* **4**: 1689-94.
- Mandel M, Higa A (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-62.
- Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW (2011). Aldehyde dehydrogenase: Its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle* **10**: 1378-84.
- Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B *et al* (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**: 21-31.
- Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D (2003). HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* **9**: 1398-403.
- Marion RM, Strati K, Li H, Murga M, Blanco R, Ortega S *et al* (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* **460**: 1149-53.
- Martin SL (1991). Ribonucleoprotein particles with LINE-1 RNA in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* **11**: 4804-7.
- Martin SL (2006). The ORF1 protein encoded by LINE-1: structure and function during L1 retrotransposition. *J Biomed Biotechnol* **2006**: 45621.

LITERATUR

Martin SL, Branciforte D (1993). Synchronous expression of LINE-1 RNA and protein in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* **13**: 5383-92.

Martin SL, Bushman FD (2001). Nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein from the mouse LINE-1 retrotransposon. *Mol Cell Biol* **21**: 467-75.

Martin SL, Cruceanu M, Branciforte D, Wai-Lun Li P, Kwok SC, Hodges RS *et al* (2005a). LINE-1 retrotransposition requires the nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein. *J Mol Biol* **348**: 549-61.

Martin SL, Li J, Weisz JA (2000). Deletion analysis defines distinct functional domains for protein-protein and nucleic acid interactions in the ORF1 protein of mouse LINE-1. *J Mol Biol* **304**: 11-20.

Martin SL, Li WL, Furano AV, Boissinot S (2005b). The structures of mouse and human L1 elements reflect their insertion mechanism. *Cytogenet Genome Res* **110**: 223-8.

Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH, Jr., Boeke JD, Gabriel A (1991). Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* **254**: 1808-10.

Matlik K, Redik K, Speek M (2006). L1 antisense promoter drives tissue-specific transcription of human genes. *J Biomed Biotechnol* **2006**: 71753.

Mayo LD, Berberich SJ (1996). Wild-type p53 protein is unable to activate the mdm-2 gene during F9 cell differentiation. *Oncogene* **13**: 2315-21.

Mazzaro G, Bossi G, Coen S, Sacchi A, Soddu S (1999). The role of wild-type p53 in the differentiation of primary hemopoietic and muscle cells. *Oncogene* **18**: 5831-5.

McClintock B (1956). Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **21**: 197-216.

McGhee JD, von Hippel PH (1975a). Formaldehyde as a probe of DNA structure. I. Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases. *Biochemistry* **14**: 1281-96.

McGhee JD, von Hippel PH (1975b). Formaldehyde as a probe of DNA structure. II. Reaction with endocyclic imino groups of DNA bases. *Biochemistry* **14**: 1297-303.

Medstrand P, van de Lagemaat LN, Dunn CA, Landry JR, Svenback D, Mager DL (2005). Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation. *Cytogenet Genome Res* **110**: 342-52.

Meek DW (2009). Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer* **9**: 714-23.

Meselson M, Yuan R (1968). DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* **217**: 1110-4.

Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S (1976). Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **127**: 1529-37.

Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G *et al* (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**: 553-60.

LITERATUR

- Minakami R, Kurose K, Etoh K, Furuhashi Y, Hattori M, Sakaki Y (1992). Identification of an internal cis-element essential for the human L1 transcription and a nuclear factor(s) binding to the element. *Nucleic Acids Res* **20**: 3139-45.
- Molchadsky A, Shats I, Goldfinger N, Pevsner-Fischer M, Olson M, Rinon A *et al* (2008). p53 plays a role in mesenchymal differentiation programs, in a cell fate dependent manner. *PLoS One* **3**: e3707.
- Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* **378**: 203-6.
- Montoya-Durango DE, Liu Y, Teneng I, Kalbfleisch T, Lacy ME, Steffen MC *et al* (2009). Epigenetic control of mammalian LINE-1 retrotransposon by retinoblastoma proteins. *Mutat Res* **665**: 20-8.
- Moran JV, Holmes SE, Naas TP, DeBerardinis RJ, Boeke JD, Kazazian HH, Jr. (1996). High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell* **87**: 917-27.
- Morris SM, Tallquist MD, Rock CO, Cooper JA (2002). Dual roles for the Dab2 adaptor protein in embryonic development and kidney transport. *EMBO J* **21**: 1555-64.
- Morrish TA, Gilbert N, Myers JS, Vincent BJ, Stamato TD, Taccioli GE *et al* (2002). DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet* **31**: 159-65.
- Muckenfuss H, Hamdorf M, Held U, Perkovic M, Lower J, Cichutek K *et al* (2006). APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition. *J Biol Chem* **281**: 22161-72.
- Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-50.
- Muotri AR, Chu VT, Marchetto MC, Deng W, Moran JV, Gage FH (2005). Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* **435**: 903-10.
- Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ *et al* (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* **13**: 2490-501.
- Naas TP, DeBerardinis RJ, Moran JV, Ostertag EM, Kingsmore SF, Seldin MF *et al* (1998). An actively retrotransposing, novel subfamily of mouse L1 elements. *EMBO J* **17**: 590-7.
- Nagao M, Campbell K, Burns K, Kuan CY, Trumpp A, Nakafuku M (2008). Coordinated control of self-renewal and differentiation of neural stem cells by Myc and the p19ARF-p53 pathway. *J Cell Biol* **183**: 1243-57.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR *et al* (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**: 17-29.
- Nathans D, Smith HO (1975). Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu Rev Biochem* **44**: 273-93.
- Ng RK, Dean W, Dawson C, Lucifero D, Madeja Z, Reik W *et al* (2008). Epigenetic restriction of embryonic cell lineage fate by methylation of Elf5. *Nat Cell Biol* **10**: 1280-90.

LITERATUR

Nigumann P, Redik K, Matlik K, Speek M (2002). Many human genes are transcribed from the antisense promoter of L1 retrotransposon. *Genomics* **79**: 628-34.

Nose A, Takeichi M (1986). A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol* **103**: 2649-58.

OhAinle M, Kerns JA, Li MM, Malik HS, Emerman M (2008). Antiretroelement activity of APOBEC3H was lost twice in recent human evolution. *Cell Host Microbe* **4**: 249-59.

Oren M, Reich NC, Levine AJ (1982). Regulation of the cellular p53 tumor antigen in teratocarcinoma cells and their differentiated progeny. *Mol Cell Biol* **2**: 443-9.

Ostertag EM, Goodier JL, Zhang Y, Kazazian HH, Jr. (2003). SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *Am J Hum Genet* **73**: 1444-51.

Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. (2001). Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. *Genome Res* **11**: 2059-65.

Ostertag EM, Prak ET, DeBerardinis RJ, Moran JV, Kazazian HH, Jr. (2000). Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Nucleic Acids Res* **28**: 1418-23.

Parant J, Chavez-Reyes A, Little NA, Yan W, Reinke V, Jochemsen AG *et al* (2001). Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet* **29**: 92-5.

Perepelitsa-Belancio V, Deininger P (2003). RNA truncation by premature polyadenylation attenuates human mobile element activity. *Nat Genet* **35**: 363-6.

Porrello A, Cerone MA, Coen S, Gurtner A, Fontemaggi G, Cimino L *et al* (2000). p53 regulates myogenesis by triggering the differentiation activity of pRb. *J Cell Biol* **151**: 1295-304.

Prunier C, Howe PH (2005). Disabled-2 (Dab2) is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT). *J Biol Chem* **280**: 17540-8.

Purdie CA, Harrison DJ, Peter A, Dobbie L, White S, Howie SE *et al* (1994). Tumour incidence, spectrum and ploidy in mice with a large deletion in the p53 gene. *Oncogene* **9**: 603-9.

Radinsky R, Fidler IJ, Price JE, Esumi N, Tsan R, Petty CM *et al* (1994). Terminal differentiation and apoptosis in experimental lung metastases of human osteogenic sarcoma cells by wild type p53. *Oncogene* **9**: 1877-83.

Reich NC, Oren M, Levine AJ (1983). Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol* **3**: 2143-50.

Renart J, Reiser J, Stark GR (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzylmethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 3116-20.

Robertson EJ, Bradley A (1986). Production of permanent cell lines from early embryos and their use in studying developmental problems. In *Experimental approaches to mammalian embryonic development*. . Cambridge University Press.

LITERATUR

Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G *et al* (2011). Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**: 24-6.

Rogel A, Popliker M, Webb CG, Oren M (1985). p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Mol Cell Biol* **5**: 2851-5.

Rossant J, Chazaud C, Yamanaka Y (2003). Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**: 1341-8; discussion 1349.

Rossant J, Papaioannou V (1977). *The biology of embryogenesis*. Sherman, ed. MIT Press.

Rotter V, Schwartz D, Almon E, Goldfinger N, Kapon A, Meshorer A *et al* (1993). Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 9075-9.

Rotter V, Wolf D, Pravtcheva D, Ruddle FH (1984). Chromosomal assignment of the murine gene encoding the transformation-related protein p53. *Mol Cell Biol* **4**: 383-5.

Sah VP, Attardi LD, Mulligan GJ, Williams BO, Bronson RT, Jacks T (1995). A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat Genet* **10**: 175-80.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA *et al* (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-4.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**: 104-8.

Schichman SA, Severynse DM, Edgell MH, Hutchison CA, 3rd (1992). Strand-specific LINE-1 transcription in mouse F9 cells originates from the youngest phylogenetic subgroup of LINE-1 elements. *J Mol Biol* **224**: 559-74.

Schmid P, Lorenz A, Hameister H, Montenarh M (1991). Expression of p53 during mouse embryogenesis. *Development* **113**: 857-65.

Schwahn U, Lenzner S, Dong J, Feil S, Hinzmann B, van Duijnhoven G *et al* (1998). Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. *Nat Genet* **19**: 327-32.

Sciamanna I, Landriscina M, Pittoggi C, Quirino M, Mearelli C, Beraldi R *et al* (2005). Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth. *Oncogene* **24**: 3923-31.

Scolnick DM, Chehab NH, Stavridi ES, Lien MC, Caruso L, Moran E *et al* (1997). CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* **57**: 3693-6.

Scott AF, Schmeckpeper BJ, Abdelrazik M, Comey CT, O'Hara B, Rossiter JP *et al* (1987). Origin of the human L1 elements: proposed progenitor genes deduced from a consensus DNA sequence. *Genomics* **1**: 113-25.

Sela N, Mersch B, Hotz-Wagenblatt A, Ast G (2010). Characteristics of transposable element exonization within human and mouse. *PLoS One* **5**: e10907.

LITERATUR

- Sharp PA, Sugden B, Sambrook J (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**: 3055-63.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Peled A, Rotter V (1991). Involvement of wild-type p53 in pre-B-cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 8982-6.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**: 646-50.
- Sheng Z, Sun W, Smith E, Cohen C, Xu XX (2000). Restoration of positioning control following Disabled-2 expression in ovarian and breast tumor cells. *Oncogene* **19**: 4847-54.
- Shmueli A, Oren M (2004). Regulation of p53 by Mdm2: fate is in the numbers. *Mol Cell* **13**: 4-5.
- Simpson DA, Feeney S, Boyle C, Stitt AW (2000). Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis* **6**: 178-83.
- Sims RJ, 3rd, Belotserkovskaya R, Reinberg D (2004). Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev* **18**: 2437-68.
- Singer MF, Krek V, McMillan JP, Swergold GD, Thayer RE (1993). LINE-1: a human transposable element. *Gene* **135**: 183-8.
- Slatter TL, Ganesan P, Holzhauer C, Mehta R, Rubio C, Williams G *et al* (2009). p53-mediated apoptosis prevents the accumulation of progenitor B cells and B-cell tumors. *Cell Death Differ* **17**: 540-50.
- Sleigh MJ (1992). Differentiation and proliferation in mouse embryonal carcinoma cells. *Bioessays* **14**: 769-75.
- Smit AF (1999). Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 657-63.
- Soddu S, Blandino G, Scardigli R, Martinelli R, Rizzo MG, Crescenzi M *et al* (1996). Wild-type p53 induces diverse effects in 32D cells expressing different oncogenes. *Mol Cell Biol* **16**: 487-95.
- Soifer HS, Rossi JJ (2006). Small interfering RNAs to the rescue: blocking L1 retrotransposition. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 758-9.
- Solomon MJ, Larsen PL, Varshavsky A (1988). Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell* **53**: 937-47.
- Soros VB, Yonemoto W, Greene WC (2007). Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H. *PLoS Pathog* **3**: e15.
- Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Speck M (2001). Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. *Mol Cell Biol* **21**: 1973-85.

LITERATUR

Stenglein MD, Harris RS (2006). APOBEC3B and APOBEC3F inhibit L1 retrotransposition by a DNA deamination-independent mechanism. *J Biol Chem* **281**: 16837-41.

Stiewe T (2007). The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **7**: 165-8.

Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM *et al* (1999). Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9118-23.

Strickland S, Mahdavi V (1978). The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* **15**: 393-403.

Strickland S, Smith KK, Marotti KR (1980). Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells: generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyryl cAMP. *Cell* **21**: 347-55.

Surani MA, Hayashi K, Hajkova P (2007). Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* **128**: 747-62.

Swergold GD (1990). Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol Cell Biol* **10**: 6718-29.

Szak ST, Pickeral OK, Makalowski W, Boguski MS, Landsman D, Boeke JD (2002). Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. *Genome Biol* **3**: research0052.

Tamir Y, Bengal E (1998). p53 protein is activated during muscle differentiation and participates with MyoD in the transcription of muscle creatine kinase gene. *Oncogene* **17**: 347-56.

Tataria M, Quarto N, Longaker MT, Sylvester KG (2006). Absence of the p53 tumor suppressor gene promotes osteogenesis in mesenchymal stem cells. *J Pediatr Surg* **41**: 624-32; discussion 624-32.

Tchenio T, Casella JF, Heidmann T (2000). Members of the SRY family regulate the human LINE retrotransposons. *Nucleic Acids Res* **28**: 411-5.

Tedeschi A, Di Giovanni S (2009). The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon. *EMBO Rep* **10**: 576-83.

Thorstenson YR, Hunicke-Smith SP, Oefner PJ, Davis RW (1998). An automated hydrodynamic process for controlled, unbiased DNA shearing. *Genome Res* **8**: 848-55.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**: 145-9.

Trelogan SA, Martin SL (1995). Tightly regulated, developmentally specific expression of the first open reading frame from LINE-1 during mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1520-4.

Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, Maherali N, Kulalert W, Walsh RM *et al* (2009). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* **460**: 1145-8.

van Os R, de Haan G, Dykstra BJ (2009). Hematopoietic stem cell quiescence: yet another role for p53. *Cell Stem Cell* **4**: 7-8.

LITERATUR

Vassilev LT (2004). Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle* **3**: 419-21.

Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK *et al* (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**: 149-59.

Villiard E, Brinkmann H, Moiseeva O, Mallette FA, Ferbeyre G, Roy S (2007). Urodele p53 tolerates amino acid changes found in p53 variants linked to human cancer. *BMC Evol Biol* **7**: 180.

Wang L, Park P, Zhang H, La Marca F, Lin CY (2010). Prospective identification of tumorigenic osteosarcoma cancer stem cells in OS99-1 cells based on high aldehyde dehydrogenase activity. *Int J Cancer* **128**: 294-303.

Wang X, Kua HY, Hu Y, Guo K, Zeng Q, Wu Q *et al* (2006). p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *J Cell Biol* **172**: 115-25.

Watanabe T, Takeda A, Tsukiyama T, Mise K, Okuno T, Sasaki H *et al* (2006). Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev* **20**: 1732-43.

Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, Song L, Zmijewska A, Chen X *et al* (2002). Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3 β and p53 after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7951-5.

Waterston RH, Hillier LW, Fulton LA, Fulton RS, Graves TA, Pepin KH *et al* (2003). The human genome: genes, pseudogenes, and variation on chromosome 7. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **68**: 13-22.

Wei W, Gilbert N, Ooi SL, Lawler JF, Ostertag EM, Kazazian HH *et al* (2001). Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Mol Cell Biol* **21**: 1429-39.

White JD, Rachel C, Vermeulen R, Davies M, Grounds MD (2002). The role of p53 in vivo during skeletal muscle post-natal development and regeneration: studies in p53 knockout mice. *Int J Dev Biol* **46**: 577-82.

Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Qian J, Wallace RB (1991). The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* **10**: 233-8.

Wu MH, Yung BY (1994). Cell cycle phase-dependent cytotoxicity of actinomycin D in HeLa cells. *Eur J Pharmacol* **270**: 203-12.

Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* **7**: 1126-32.

Xie K, Sowden MP, Dance GS, Torelli AT, Smith HC, Wedekind JE (2004). The structure of a yeast RNA-editing deaminase provides insight into the fold and function of activation-induced deaminase and APOBEC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8114-9.

Yang DH, Smith ER, Roland IH, Sheng Z, He J, Martin WD *et al* (2002). Disabled-2 is essential for endodermal cell positioning and structure formation during mouse embryogenesis. *Dev Biol* **251**: 27-44.

- Yang N, Kazazian HH, Jr. (2006). L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 763-71.
- Yang N, Zhang L, Zhang Y, Kazazian HH, Jr. (2003). An important role for RUNX3 in human L1 transcription and retrotransposition. *Nucleic Acids Res* **31**: 4929-40.
- Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Chang LL, Cheng AL (2004). Phosphorylation of p53 on Thr55 by ERK2 is necessary for doxorubicin-induced p53 activation and cell death. *Oncogene* **23**: 3580-8.
- Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Cheng AL (2001). Nuclear extracellular signal-regulated kinase 2 phosphorylates p53 at Thr55 in response to doxorubicin. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 880-6.
- Yu F, Zingler N, Schumann G, Stratling WH (2001). Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Res* **29**: 4493-501.
- Yuan P, Han J, Guo G, Orlov YL, Huss M, Loh YH *et al* (2009). Eset partners with Oct4 to restrict extraembryonic trophoblast lineage potential in embryonic stem cells. *Genes Dev* **23**: 2507-20.
- Zamble DB, Jacks T, Lippard SJ (1998). p53-Dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6163-8.
- Zauberman A, Flusberg D, Haupt Y, Barak Y, Oren M (1995). A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. *Nucleic Acids Res* **23**: 2584-92.
- Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH *et al* (2000). The transcriptional program following p53 activation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**: 475-82.
- Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W *et al* (2008). Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell* **3**: 475-9.
- Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen AJ *et al* (2008). p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* **455**: 1129-33.
- Zingler N, Willhoeft U, Brose HP, Schoder V, Jahns T, Hanschmann KM *et al* (2005). Analysis of 5' junctions of human LINE-1 and Alu retrotransposons suggests an alternative model for 5'-end attachment requiring microhomology-mediated end-joining. *Genome Res* **15**: 780-9.

9. ANHANG

9.1 Plasmidkarten

9.1.1 pGL3_Basic

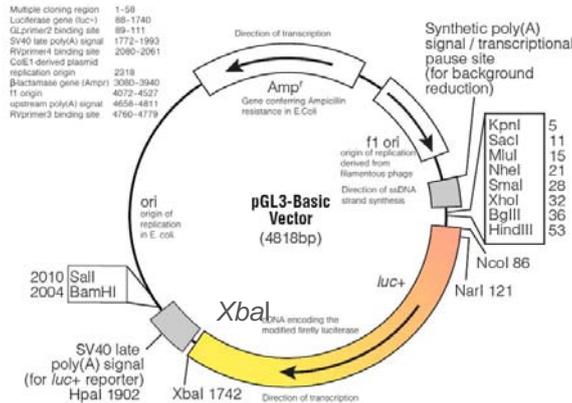


Abbildung 9.1: Plasmidkarte des pGL3_Basic Vektors. Dargestellt ist die Plasmidkarte des pGL3-Basic Vektors von Promega. Durch *HindIII* und *XbaI* Verdau wurde die Luciferase-kodierende Sequenz später durch das eGFP-Gen des pEGFP_N2 Vektors von Clontech ausgetauscht. Der Vektor verfügt über keinen eukaryotischen Promotor und eignet sich daher besonders für Promotorstudien.

9.1.2 pEGFP_N2

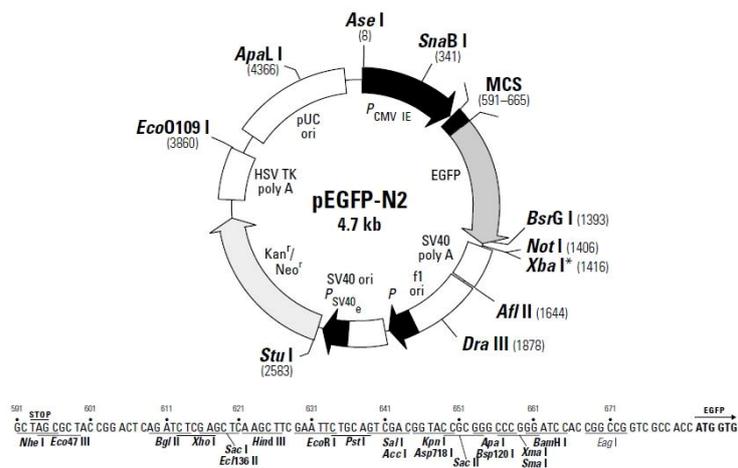


Abbildung 9.1: Plasmidkarte des pEGFP-N2 Vektors. Dargestellt ist die Plasmidkarte des pEGFP-N2 Vektors von Clontech. Durch *HindIII* und *XbaI* Verdau wurde das eGFP-Gen ausgeschnitten und anstelle der Luciferase-Sequenz in den pGL3_Basic Vektor kloniert.

9.1.3 pGL3-GFP

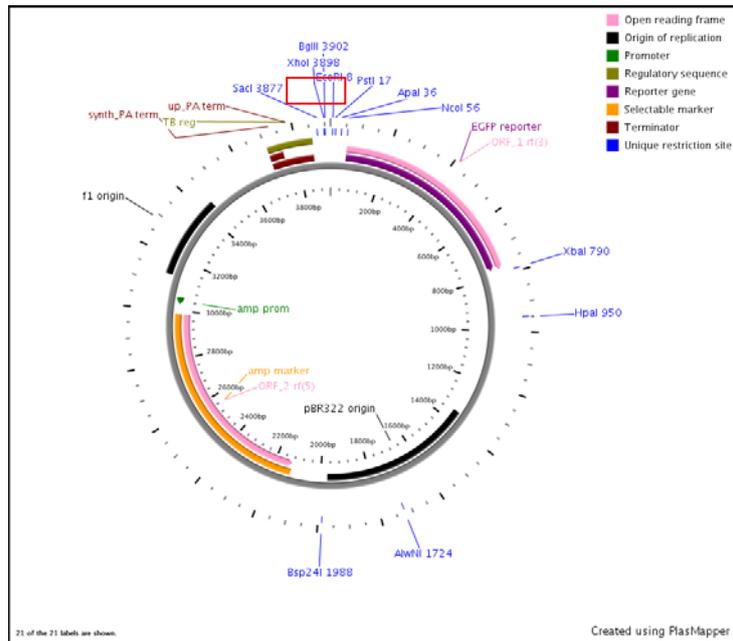


Abbildung 9.3: Plasmidkarte des pGL3-GFP Vektors. Dargestellt ist die Plasmidkarte des klonierten pGL3-GFP Vektors durch *HindIII* und *XbaI* Verdau der eGFP-Sequenz aus dem pEGFP-N1 Plasmid. Der Vektor beinhaltet keine Promotor- oder Enhancersequenzen. Durch die Klonierung des eGFP entstand eine neue, nur einmal vorkommende *EcoRI*-Schnittstelle (rotes Kästchen), über welche die *L1Md*-Promotorsequenzen kloniert wurden. Die Plasmidkarte wurde mit dem PlasMapper erzeugt (<http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/>).

9.2 Sicherheitstechnische Daten

O	Brandfördernd
C	Ätzend
F	Leichtentzündlich
T	Giftig
T+	Sehr giftig
Xn	Gesundheitsschädlich
Xi	Reizend
N	Umweltgefährdend

9.2.1 Verzeichnis der R-Sätze (Gefahrenhinweise)

R 8	Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen
R 10	Entzündlich
R 11	Leichtentzündlich

R 20	Gesundheitsschädlich beim Einatmen
R 22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
R 24	Giftig bei Berührung mit der Haut
R 25	Giftig beim Verschlucken
R 26	Sehr giftig beim Einatmen
R 28	Sehr giftig beim Verschlucken
R 32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
R 34	Verursacht Verätzungen
R 35	Verursacht schwere Verätzungen
R 36	Reizt die Augen
R 37	Reizt die Atmungsorgane
R 38	Reizt die Haut
R 40	Verdacht auf krebserzeugende Wirkung
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
R 45	Kann Krebs erzeugen
R 46	Kann vererbare Schäden verursachen
R 61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
R 62	Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
R 66	Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen
R 67	Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen
R 68	Irreversibler Schaden möglich

9.2.2 Kombination der R-Sätze

R 20/21	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
R 20/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken
R 20/21/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 21/22	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R 23/24/25	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 24/25	Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R 36/38	Reizt die Augen und die Haut
R 36/37/38	Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut

R 39/23/24/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 42/43	Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich
R 48/20/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken
R 48/23/24/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 50/53	Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
R 51/53	Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

9.2.3 Verzeichnis der S-Sätze (Sicherheitsratschläge)

S 3	Kühl aufbewahren
S 7	Behälter dicht geschlossen halten
S 9	Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren
S 16	Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen
S 22	Staub nicht einatmen
S 23.2	Dampf nicht einatmen
S 24	Berührung mit der Haut vermeiden
S 26	Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
S 28.1	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser
S 28.2	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife
S 28.6	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 400 und anschließende Reinigung mit viel Wasser
S 36	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
S 37	Geeignete Schutzhandschuhe tragen
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)

- S 53 Exposition vermeiden - vor Gebrauch bes. Anweisungen einholen
- S 60 Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen
- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

9.2.4 Kombination der S-Sätze

- S 24/25 Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden
- S 36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
- S 36/37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
- S 37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen

9.2.5 Gefahrenstoffe

Tabelle 9.1 Zusammenstellung der in der Arbeit verwendeten Gefahrenstoffe.

Substanzname	Symbol	R-Sätze	S-Sätze
2-Mercaptoethanol	T,N	R 22-24-34-51/53	S 26-36/37/39-45
2-Propanol	F, Xi	R 11-36-67	S 7-16-24-26
Actinomycin D	T+	R 28	S 22-28-36/37-45
Ampicillin	Xn	R 36/37/38-42/43	S 22-26-36/37
Chloroform	Xn	R 22-38-40-48/20/22	S 36/37
EDTA	Xi	R 36	S: (2)-26
Essigsäure 100%	C	R 10-35	S 23.2-26-45
Ethanol	F	R 11	S 7-16
Ethidiumbromid	T+	R 22-26-36/37/38-68	S 26-28.2-36/37
Formaldehyd 37%	T	R 23/24/25-34-40-43	S 26-36/37/39-45-51
Hygromycin B	T+	R 27/28-37/38-41	S (1/2)-26-27/28-36/37/39-45
Isoamylalkohol	Xn	R 10-20	S 24/25
Methanol	F, T	R 11-23/24/25-39/2324/25	S 7-16-36/37-45
Natriumazid	T+	R 28-32-50/53	S 28.1-45-60-61
Natriumdodecylsulfat	Xn	R 21/22-36/37/38	S 26-36/37
Natriumhydroxid	C	R 35	S 26-37/39-45
Paraformaldehyd	O, Xn	R 20/22-36/37/38-40-43	S 22-26-36/37
Phenol	T	R 24/25-34	S 28.6-45
Salzsäure 37%	C	R 34-37	S 26-36/37/39-45
TEMED	C, O	R 11-20/22-34	S (1/2)-16-26-36/37/39-45
Triton X-100	Xn	R 22-41	S 24-26-39
Wasserstoffperoxid 30%	C	R34	S 3-26-36/37/39-45

9.3 Liste der im Agilent Mikroarray Genexpressionsanalyse regulierten Gene

Positiv regulierte Gene nach RA/dbcAMP-Zugabe (*Fold Change*).

Hs3st1 (31.3) Bmper (29.2) A_51_P281078 (28.6) Mgl1 (26.7) Stra8 (23.9) Cidea (22.5) BC048679 (19.9) Gpr126 (17.7) Cdh5 (16.3) Snai1 (16.2) Aqp8 (15.5) Crygc (15.4) BG296545 (15.3) Rarb (14.4) Mlkl (14.2) Lama1 (14.1) Igfbp5 (13.9) Fgf3 (13.6) Lamb1-1 (13.2) Pthr1 (12.7) TC1620752 (12.6) Grem2 (12.2) Fbp2 (12.1) BC023892 (12) AK044510 (11.9) Peg12 (11.6) Asb9 (11.6) Chn2 (10.4) Aqp3 (10.3) Cxcl14 (9.9) Col13a1 (9.9) 9930013L23Rik (9.6) Serping1 (9.6) P4ha2 (9.5) Runx1 (9.5) Gata6 (9.4) 2210016H18Rik (9.2) Tmem166 (9.1) 2310026E23Rik (8.9) Cyp26a1 (8.9) Ankrd44 (8.8) Fst (8.6) Lpl (8.4) Sox17 (8) Fhdc1 (7.9) H2afy2 (7.9) Fgfr2 (7.9) Plagl1 (7.8) Gpr124 (7.8) Sobp (7.7) Ccnd2 (7.7) Fgf10 (7.6) Sema6d (7.6) Barx1 (7.5) Gypc (7.5) H2afy3 (7.4) Raet1e (7.3) Pcdh19 (7.3) Msx2 (7.3) Cdx1 (7.1) Bhmt (7.1) Man2a1 (7.1) Flrt3 (7) 9030425E11Rik (6.9) Gdpd5 (6.9) Pbx3 (6.9) Emp1 (6.9) Gm364 (6.8) Foxf2 (6.7) A_51_P333594 (6.7) Hmgn3 (6.6) Slc30a4 (6.6) Rasd1 (6.6) AK220484 (6.5) Sct (6.5) Timp2 (6.4) Nsg1 (6.4) Nudt11 (6.4) Raet1a (6.4) Lamc1 (6.4) Wdr40b (6.3) Phactr1 (6.3) Slc43a3 (6.2) Col4a2 (6.2) 6030419C18Rik (6.2) App (6.2) Aurkc (6.2) BC052328 (6.2) Hoxb13 (6.1) Pdzd3 (6) Zbtb10 (6) Dmrt1 (5.9) Slc16a2 (5.8) Snx7 (5.8) F3 (5.7) Sdc3 (5.7) Bmpr2 (5.6) Mbnl1 (5.6) Metrnl (5.6) Rhob (5.6) Pdgfra (5.4) Slc7a6 (5.4) Zfp362 (5.4) E130311K13Rik (5.4) AA545317 (5.3) Bmi1 (5.3) Gng10 (5.3) Tmem144 (5.3) Ppp2r2c (5.3) 2310016C16Rik (5.2) Islr2 (5.2) ENSMUST00000111711 (5.2) Osta (5.1) 1700052K11Rik (5.1) Kit (5.1) Galnt7 (5.1) Prtg (5.1) Dsc2 (5) Cuedc1 (5) Tmem63c (5) Pld1 (5) Pgbd5 (5) Col4a1 (4.9) Sox7 (4.9) Hmga2 (4.9) Rassf8 (4.8) Plac1 (4.8) A_52_P517668 (4.7) Map3k5 (4.7) 1810011O10Rik (4.7) Amfr (4.7) Slc38a5 (4.7) Socs1 (4.7) Ptprg (4.6) Cotl1 (4.6) Elovl4 (4.6) BC035537 (4.5) Fads3 (4.5) Hoxa1 (4.5) 3830406C13Rik (4.4) Stox2 (4.4) Tgfb1 (4.4) Cryga (4.4) Ddit3 (4.4) Rhoc (4.4) Atp6v0a1 (4.3) Cdh4 (4.3) Gata4 (4.3) Mall (4.3) Bmp6 (4.3) Dmkn (4.3) Tap1 (4.3) Plod2 (4.3) Slc25a24 (4.3) Chst8 (4.2) Kcnp3 (4.2) Bmp1 (4.2) Col16a1 (4.2) Hoxa7 (4.2) Pik3r3 (4.2) Elavl4 (4.2) C230078M08Rik (4.2) Magee1 (4.2) Zfpm1 (4.2) Pitx1 (4.2) Tgfbr2 (4.2) Sh3kbp1 (4.1) Mgst2 (4.1) Lonrf3 (4.1) Calcoco2 (4) Slc35d1 (4) Lrrc8 (4) 4930506M07Rik (4) NAP028025-1 (4) 39696 (4) Jun (4) Nnat (4)

Negativ regulierte Gene nach RA/dbcAMP-Zugabe (*Fold Change*).

BB283405 (-4) Evc2 (-4) Rab6b (-4) Spata13 (-4) Npb (-4) 4732444A12Rik (-4) Myl2 (-4) Syne2 (-4) Ctsh (-4) Prx (-4) Chrna9 (-4.1) Mkrn1 (-4.1) Ly6g6d (-4.1) Nnt (-4.1) Igsf9 (-4.1) Alox5ap (-4.1) 1190005I06Rik (-4.2) Man2b2 (-4.2) Wnt10a (-4.2) Lgals3 (-4.2) Ppfibp2 (-4.2) Gpsm3 (-4.2) Pcolce2 (-4.2) Arc (-4.3) Eno3 (-4.3) Pipox (-4.3) Mapt (-4.3) Gpd1 (-4.3) Cpne9 (-4.3) Gstt2 (-4.3) Krt18 (-4.3) Lctl (-4.4) ENSMUST00000062945 (-4.4) Zap70 (-4.4) Rragb (-4.4) Phf19 (-4.5) Mfng (-4.5) Cldn4 (-4.5) Fgfbp1 (-4.6) Ly6g6e (-4.6) Zfp532 (-4.6) Gsta3 (-4.6) Mybpc2 (-4.6) 8430410A17Rik (-4.6) Ppp1r1a (-4.7) Fxyd6 (-4.7) Cbx7 (-4.7) Ildr1 (-4.7) Lefty2 (-4.8) BC028528 (-4.8) Grb7 (-4.8) LOC100047943 (-4.8) Cyp2s1 (-4.8) Cdh22 (-4.8) Acss1 (-4.8) Dtx1 (-4.9) Apobec3 (-4.9) Klk1b3 (-4.9) Tgm1 (-4.9) Clnk (-4.9) Syng1 (-4.9) Usp28 (-4.9) D18Erd653e (-4.9) Lyl1 (-4.9) Auh (-4.9) D4Bwg0951e (-4.9) Ucp1 (-5) Gm1631 (-5) Slamf9 (-5) Pou3f1 (-5) Cxx1b (-5.1) Synj2 (-5.1) Gna14 (-5.1) Ina (-5.1) Rhbg (-5.2) Lrrc2 (-5.2) Morc1 (-5.2) Stk22s1 (-5.2) Exoc3l (-5.3) Pten (-5.3) Gstm3 (-5.3) Il17d (-5.3) Zfp459 (-5.4) LOC100044624 (-5.4) Gbx2 (-5.5) Jakmip1 (-5.5) Tst (-5.5) Cspg5 (-5.5) Lamb3 (-5.6) Bmp4 (-5.6) Rab25 (-5.7) ENSMUSG00000074303 (-5.7) Gstm1 (-5.7) Slc22a18 (-5.7) Calml4 (-5.7) Tex21 (-5.8) Apobec2 (-5.8) Clstn3 (-5.9) Tjp3 (-5.9) Emid2 (-5.9) Gpx2 (-6) 2410007B07Rik (-6) Pdk1 (-6) Notum (-6) Lphn2 (-6.1) ENSMUST00000100423 (-6.1) B230311B06Rik (-6.2) Zmynd10 (-6.2) Pkp2 (-6.2) Itgb7 (-6.2) Slc34a3 (-6.3) Ccdc19 (-6.3) Foxd3 (-6.3) Liph (-6.3) Ntf5e (-6.4) Robo4 (-6.6) Pla2g7 (-6.6) Cpt1b (-6.6) Centb1 (-6.7) Ccdc3 (-6.7) Dab1 (-6.7) Nos3 (-6.8) Slco4a1 (-6.8) Arhgap30 (-6.8) Mcam (-6.9) Slc12a8 (-6.9) Nhedc2 (-6.9) Mcf2l (-7.1) 6330514A18Rik (-7.1) Gldc (-7.1) Ifitm1 (-7.1) Notch4 (-7.1) Pla1a (-7.3) Hrc (-7.3) 39692 (-7.4) 1190002H23Rik (-7.4) Cldn7 (-7.4) Col18a1 (-7.5) Pglyrp1 (-7.5) Cabcl1 (-7.5) Ddx58 (-7.7) Kncl1 (-

7.8) E130202H07Rik (-7.8) 1700019H03Rik (-7.9) Slc27a2 (-8) Dnmt3l (-8.1) Adam23 (-8.1) Cds2 (-8.2) 2310002J15Rik (-8.7) Sec14l4 (-8.7) Camkv (-8.8) Aire (-8.9) Pdzk1 (-8.9) Apoc2 (-9.1) 9130017N09Rik (-9.1) Klk1 (-9.3) Trim61 (-9.5) Rps6kl1 (-9.7) 1700112E06Rik (-9.8) Clic6 (-9.8) Dpys (-9.9) A_51_P395309 (-9.9) Nphs1 (-10) Sned1 (-10.2) Pga5 (-10.3) Ly6c1 (-10.4) Prss12 (-10.5) Myo1g (-11) Otx2 (-11.1) Zmat4 (-11.1) Pdzd2 (-11.6) Car4 (-11.8) Tcea3 (-11.9) Evc (-11.9) Hck (-12.2) Hspb2 (-12.3) Crb3 (-12.7) Spnb1 (-12.7) Trim63 (-12.9) 4933402E13Rik (-13.2) Vil1 (-13.3) Spib (-13.8) Pcdh21 (-13.8) Klk8 (-13.9) Spink3 (-15.2) Thy1 (-16.2) Actn3 (-16.7) ENSMUST00000113472 (-17.6) Lgals2 (-17.6) D630045M09Rik (-20.1) Grhl2 (-20.7) Calca (-20.9) CU075549.1 (-20.9) Myb (-21.4) Irs4 (-23.3) Nkx6-3 (-27.1) Enpp3 (-31.2) Dnahc8 (-32.6) Enox1 (-33.4) Fgf5 (-35.1) Trh (-38.8) Casq2 (-45.1) Afp (-71)

9.4 Abbildungsverzeichnis

Tabelle 9.2: Abbildungsverzeichnis mit zugehörigen Seitenzahlen

Abb.	Beschreibung	Seite
2.1	Darstellung eines autonomen nicht-LTR L1-Retrotransposons	10
2.2	Replikationszyklus aktiver L1-Elemente	13
2.3	Möglicher Einfluss der Retrotransposons auf die Genomstruktur der Zelle	15
2.4	Zelluläre Abwehr gegen die transposable Aktivität von Retrotransposons	16
5.1	FRET-basierte Detektion der β -Laktamaseaktivität	44
5.2	Mechanismus des Zellkultur basierten Retrotranspositions-Assays sowie dem prinzipiellen Aufbau des pJM101/L1 _{RP} Konstrukts	45
5.3	Konstruktion des pGL3-GFP Vektors	61
5.4	Darstellung des L1-Alignments im GenomeBrowser zur Auswahl geeigneter BAC-Klone für die L1Md 5'-UTR Amplifikation	63
5.5	Übersichtsdarstellung zur Klonierung der L1Md 5'-UTR Regionen in das pGL3-GFP System zur Detektion der 5'-UTR SP- bzw. ASP-Aktivität	64
5.6	Klonierung des L1Md-T_Dab2 5'-UTRs in den pGL3-GFP/dsRed Vektor zur Detektion der SP- und ASP-Aktivität	66
6.1	Quantifizierung der p53-Transkriptmenge im Vergleich zwischen differenzierten und undifferenzierten F9-Zellen	75
6.2	Quantifizierung des p53-Proteins im Vergleich zwischen differenzierten und undifferenzierten F9-Zellen	75
6.3	Nachweis der Ser18-Phosphorylierung von p53 nach Behandlung mit genotoxischen Substanzen	77
6.4	Untersuchung der p53-regulierten Gene vergleichend zwischen undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen	78
6.5	Analyse der zellichteabhängigen Expression des <i>Cdkn1a</i> - und <i>Mdm2</i> -Gens im Vergleich zwischen undifferenzierten und differenzierten F9-Zellen	79
6.6	Untersuchung der Histonmodifikationen der p53-Zielgene <i>Cdkn1a</i> und <i>Mdm2</i> und p53-Bindung	81
6.7	Validierung differenziell regulierter Gene im Verlauf der Zelldifferenzierung	83
6.8	Untersuchung der phänotypischen Heterogenität nach F9-Zelldifferenzierung	84
6.9	Langzeitanalyse der F9-Zellen nach Differenzierung	87
6.10	FACS-basierte Methoden zur Identifizierung der Zellen mit Vorläufereigenschaften in der F9-Zellkultur	89
6.11	Heatmap 1843 regulierter Gene in undifferenzierten, differenzierten, Alde ^{brght} und Alde ^{dim} Zellen (Agilent Mikroarray Genexpressionsanalyse)	91
6.12	Analyse der Verteilung des p53-Proteins in F9-Zellen und deren Subpopulationen	92
6.13	Abhängigkeit der Alde ^{brght} Population von der p53-Expression	93
6.14	Vergleich der Markergenexpression zwischen p53 ^{high} und p53 ^{low} Populationen undifferenzierter und differenzierter Zellen	95
6.15	Auswirkung der stabilen p53-Depletion auf die Differenzierbarkeit der Zellen	96
6.16	Zusammenfassung der bioinformatischen Analyse	99

Fortsetzung Tabelle 9.2

Abb.	Beschreibung	Seite
6.17	Analyse der Gesamtexpression von FL-L1-Elementen, der L1 <i>Md</i> -A und L1 <i>Md</i> -T Familien-spezifischen Expression, sowie der SP- und ASP-Aktivität in Abhängigkeit von p53	101
6.18	Untersuchung der zelllichteabhängigen SP und ASP L1 <i>Md</i> -T Aktivität	103
6.19	Untersuchung der zelllichteabhängigen L1 <i>Md</i> -A und L1 <i>Md</i> -T Transkription	103
6.20	Regulation der L1 SP- und ASP-Transkription nach Aktivierung von p53 durch 5FU	104
6.21	Analyse der L1 <i>Md</i> -T SP und ASP 5'-UTR-Aktivität und der Einfluss von p53 auf deren Regulation	106
6.22	FRET-basierte Charakterisierung der internen L1-Promotoraktivität durch das β -Laktamase Reporter gen	109
6.23	Einfluss von p53 auf die ASP-Aktivität einer internen L1-Region	110
6.24	Orientierung von FL-L1-Elementen im Kontext differenzierungs-regulierter Gene	111
6.25	Anordnung der Primer zum Nachweis der L1 ASP-Aktivität	112
6.26	Regulation der SP- und ASP-Aktivität individueller intronischer L1-Elemente in Abhängigkeit von p53	113
6.27	Darstellung der FL-L1-Elemente innerhalb des <i>Bmp</i> <i>er</i> -Gens	114
6.28	Analyse der <i>Egfl</i> <i>am</i> intronischen L1 <i>Md</i> -A ASP-Aktivität	116
6.29	Untersuchung der Transkription von ncRNAs vermittelt durch die L1 ASP-Aktivität sowie Analyse der p53 DNA-Besetzung am <i>Egfl</i> <i>am</i> -Gen und L1 <i>Md</i> -A Element	117
6.30	Analyse der Stabilität und der Transkriptionsorientierung der ncRNAs zwischen der <i>Egfl</i> <i>am</i> TSS und dem intronischen FL-L1	118
6.31	Untersuchung der Histonmodifikationen, p53-Bindung und RNA-Pol II-S5P im <i>Egfl</i> <i>am</i> -Gen	120
6.32	Analyse der SP- und ASP-Aktivität des <i>Dab2</i> -assoziierten L1 <i>Md</i> -T Elements über die Fluoreszenz des eGFP-Reporters und dessen Regulation durch p53	122
6.33	Analyse des antisense-Transkriptionsstarts sowie der Regulation der antisense Expression des L1 <i>Md</i> -T Elements nach Differenzierung	123
6.34	Untersuchung der <i>Dab2</i> -TSS, der Transkription ncRNAs sowie die Analyse der p53 DNA-Besetzung am <i>Dab2</i> -Gen und L1 <i>Md</i> -T Element	124
6.35	Analyse der Stabilität und der Transkriptionsorientierung der ncRNAs zwischen der <i>Dab2</i> -TSS und dem intergenen L1 <i>Md</i> -T Element	126
6.36	Vergleichende Untersuchung der Histonmodifikationen zwischen undifferenzierten und RA-behandelten F9-Zellen sowie der p53 und Pol II-S5 DNA-Interaktion an der <i>Dab2</i> -Genumgebung	127
6.37	Einfluss des murinen Apobec3-Proteins auf die Mobilisierung eines humanen L1 _{RP} -Elements	129
6.38	Regulation der <i>Apobec3</i> -Expression im Rahmen der Zelldifferenzierung und in Abhängigkeit von p53	131
6.39	Untersuchung der Histonmodifikationen und p53-Bindung im <i>Apobec3</i> -Gen	131
6.40	Einfluss des p53-Proteins auf das Retrotranspositionspotenzial des humanen L1 _{RP} -Elements	132
6.41	Relative Quantifizierung der Retrotranspositionsaktivität in Abhängigkeit der p53- und Apobec3-Expression mithilfe des L1 _{RP} -EGFP Konstrukts	134
6.42	Retrotranspositionsassay nach Beginn der RA/dbcAMP-induzierten Differenzierung der Zellen	135
6.43	Einfluss des Apobec1- und Apobec2-Proteins auf die Retrotransposition des L1 _{RP} -Elements sowie deren Abhängigkeit von der p53-Expression	136
7.1	Zusammenfassung der Eigenschaften von p53 ^{high} /Alde ^{bright} sowie p53 ^{low} /Alde ^{dim} Zellen innerhalb der F9-Zellkultur	142
7.2	Zusammenfassung der transkriptionellen Interferenz zwischen dem L1-initiierten AS-Transkript und der <i>Egfl</i> <i>am</i> -Transkription	149
7.3	Transkriptionelle Kompetenz des <i>Dab2</i> -Gens durch intergene L1-Elemente	151
7.4	Zusammenfassung der Funktionen des p53-Proteins in undifferenzierten F9-Zellen	153

Fortsetzung Tabelle 9.2

Abb.	Beschreibung	Seite
9.1	Plasmidkarte des pGL3 Basic Vektors	172
9.2	Plasmidkarte des pEGFP-N2 Vektors	172
9.3	Plasmidkarte des pGL3-GFP Vektors	173

9.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 9.3: Tabellenverzeichnis mit zugehörigen Seitenzahlen

Abb.	Beschreibung	Seite
4.1	Genspezifische Primer für die qPCR	30
4.2	Primer für die qPCR/PCR zur Detektion von L1-Sequenzen	30-32
4.3	Primer zur Detektion ncRNAs	32
4.4	Primer für die qRT-basierte CHIP-Analyse	32
4.5	Primer für die PCR-Klonierung	33
4.6	Sonstige verwendete Primer	33
4.7	Auflistung aller siRNAs mit den dazugehörigen Sequenzen	33
5.1	<i>Effectene</i> TM -Transfektion	40
5.2	Übersicht über die zur cDNA-Synthese benötigten Komponenten	52
5.3	Reaktionsbedingungen der cDNA-Synthese	53
5.4	Thermisches und zeitliches Reaktionsschema einer PCR-Reaktion	55
5.5	Mengen- bzw. Volumina der Einzelkomponenten für eine als Triplikat angesetzte qRT-Probe	57
5.6	Allgemeines Reaktionsschema der qPCR	57
9.1	Zusammenstellung der in der Arbeit verwendeten Gefahrenstoffe	177
9.2	Abbildungsverzeichnis mit zugehörigen Seitenzahlen	179-181
9.3	Tabellenverzeichnis mit zugehörigen Seitenzahlen	181

LEBENS LAUF

A. LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Geboren am: 15.10.1981
Geburtsort: Herdecke (Ruhr)
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULBILDUNG

1992- 1998 Besuch der Johann- Gutenberg-Realschule Langenfeld
Schwerpunkt/Wahlfach: Biologie-Naturwissenschaften
1998- 2001 Besuch der Berufsbildenden Schule 16 der Stadt Köln
Schwerpunkt: Biochemie/Molekulargenetik und Mikrobiologie
Schulabschluss: allgemeine Fachhochschulreife

BERUFS AUSBILDUNG

1998- 2001 abgeschlossene Berufsausbildung zum biologisch-technischen Assistenten (BTA)

BERUF SERFAHRUNG

01.2002-01.2003 Firma NewLab, BioQuality AG
40699 Erkrath
GLP/GMP-zertifiziertes Labor für Virologie und Prionenanalytik
01.2003-10.2003 Firma Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH
Obere Hauptstr. 10b
85386 Eching bei München
Mitarbeiter im wissenschaftlichen Außendienst

STUDIUM/PROMOTION

10.2003-10.2006 abgeschlossenes Bachelor-Studium (BSc.) der Molekularen Biologie; University of Applied Science Gelsenkirchen, Abt. Recklinghausen.
Bachelorarbeit: Analyse der Genexpression von DNA-Vakzinen gegen das humane Immundefizienz Virus (HIV) in der lebenden Maus (Universitätsklinikum Essen, Prof. Dr. Dittmer)
10.2006-08.2008 Masterstudium (MSc.) der Molekularen Biologie – Schwerpunkte: Biochemie der Signaltransduktion, Molecular Targeting Technologies und Proteinbiochemie. University of Applied Science Gelsenkirchen, Abt. Recklinghausen
10.2007-02.2008 Research-Projekt: Heinrich-Pette-Institut, Leibniz Institut für Experimentelle Virologie, Abt. Tumorstudiologie Prof. Dr. Deppert.
Analyse von wtp53 in F9-Teratokarzinom-Zellen
02.2008-06.2008 Master-Thesis: Heinrich-Pette-Institut, Leibniz Institut für Experimentelle Virologie, Abt. Tumorstudiologie Prof. Dr. Deppert. **p53-abhängige Differenzierung embryonaler Stammzellen in einem Maus-Tumorzellmodell**
Seit Juli 2008 Wissenschaftliche Promotion am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg

B. DANKSAGUNG

Am Ende dieser Arbeit möchte ich doch das Wichtigste nicht vergessen, den Dank an all die Menschen zu richten, die mich während meiner Zeit am HPI begleitet haben und entscheidend am Prozess dieser Arbeit mitwirkten:

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Deppert. Er war es, der mir nach meiner Masterarbeit die Durchführung meiner Doktorarbeit ermöglichte, der in den entscheidenden Momenten die richtigen wissenschaftlichen Zusammenhänge gesehen hat und mir mit zahlreichen Anregungen und Diskussionen auch durch schwierigere Daten half.

Herrn Prof. Dr. Hahn danke ich herzlich für die Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

Ich danke den Fragestellern bei meiner Disputation: Frau Prof. Dr. Dorothee Dartsch (Institut für Pharmazie, Universität Hamburg) und Herrn PD Dr. Edzard Spillner (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg).

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an Dr. Genrich Tolstonog richten, der mich seit Beginn meiner Masterarbeit wissenschaftlich betreut hat. Es war mir eine große Freude und Ehre ein kleines Stück seines großen Wissens mitnehmen zu dürfen. Ich danke ihm für zahlreiche Diskussionen und spannende Ideen. Danke Genrich!

Ich danke dem Heinrich-Pette-Institut – im speziellen Herrn Dr. Heinrich Hohenberg, Frau Dr. Nicole Nolting und Frau Dr. Angela Homfeld – für das Gisela-Weier Promotionsstipendium und der damit verbundenen Assoziation mit der LCI-Graduiertenschule.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gerald Schumann für die Bereitstellung von Vektoren, die entscheidend zu dem Verlauf der Arbeit beigetragen haben. Darüber hinaus danke ich ihm für seine richtungsgebende Diskussion und den durchgeführten Arbeiten an embryonalen Stammzellen.

Ich danke der Leibniz-Graduiertenschule (Leibniz Center Infection, LCI) für viele schöne und lehrreiche Seminartage und Grillabende.

DANKSAGUNG

Ich danke Arne Düsedau und Cordula Grüttner für viele nette Sortstunden am FACS.

Ich danke meinen großartigen Kollegen/Kolleginnen und ehemaligen Kollegen/Kolleginnen am Heinrich-Pette-Institut für eine mehr als perfekte Arbeitsatmosphäre, für zahlreiche Hilfestellungen und guten Zuspruch sowie vielen netten Kaffeegesprächen. Insbesondere möchte ich mich bei Marion Kühl, Gabi Warnecke und Martina Hintz für die praktische Unterstützung sowie bei meinen Freunden Annette Preuss, Dr. Florian Wegwitz, Eva Lenfert und Martin Warmer für eine großartige Promotionszeit bedanken.

Ich danke all den Menschen die mich weit weg meiner Heimat besucht haben. All diese Besuche haben mir viel bedeutet. Danke Oma und Opa, danke liebe Eltern, danke Sarah, danke Christina, danke Jan, Bernhard, Petra und Holger.

Ich danke Patrizia für viele schöne vergangene Jahre.

Ich danke meinem besten Freund Peter, der immer und wirklich immer da war und mir mit seinen Weisheiten geholfen hat...

Ich danke meiner wundervollen Freundin Katharina für den großartigen privaten und beruflichen Zusammenhalt, ihrer phantastischen Unterstützung, zahlreichen aufbauenden Worte und ihrem unerschöpflichen Optimismus der mich durch diese Arbeit getragen hat. Danke dass es Dich gibt!

Am Ende möchte ich den letzten und wichtigsten Dank meiner Familie aussprechen. Danke für die jahrelange Unterstützung, die mich erst dahin gebracht hat wo ich jetzt stehe. Danke liebe Eltern, danke liebe Oma und danke lieber Opa.