

**Analyse der genetischen Rearrangements an einem  
Segment der *mixed lineage leukemia*  
Bruchpunktregion (*MLLbcr*) und an DNA-  
Sequenzen mit Topoisomerase I-Erkennungsstellen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für  
Naturwissenschaften der Universität Ulm**

**vorgelegt von**

**Cindy Baumann**

**aus Meerane**

**Ulm, 2009**



**Dekan**

Prof. Dr. Axel Groß

**Erstgutachter**

Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler

**Zweitgutachter**

Prof. Dr. Wolfgang Weidemann

**Tag der Promotion**

04. Dezember 2009



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>LEUKÄMIE .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	AML .....	1
1.1.2	ALL.....	3
1.1.3	Leukämien bei Kleinkindern versus Therapie-induzierte Sekundärleukämien.....	4
<b>1.2</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER <i>MLL</i>-BRUCHPUNKTREGION.....</b>	<b>5</b>
1.2.1	Topo II-abhängige <i>MLL</i> -Rearrangements .....	6
1.2.2	Apoptotische Spaltung als Initiator von <i>MLL</i> -Rearrangements .....	8
<b>1.3</b>	<b>APOPTOSE.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4</b>	<b>DNA-DOPPELSTRANGBRUCH-REPARATUR.....</b>	<b>11</b>
1.4.1	<i>Non-homologous end-joining</i> (NHEJ).....	11
1.4.2	Homologie-gerichtete Reparatur (HDR) .....	13
<b>1.5</b>	<b>DAS FLUORESZENZ-BASIERTE REKOMBINATIONS-TESTSYSTEM.....</b>	<b>17</b>
<b>1.6</b>	<b>PARP-1, p53 UND TOPO I IM KONTEXT DER HDR .....</b>	<b>18</b>
<b>1.7</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG.....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>22</b>
2.1.1	Geräte.....	22
2.1.2	Software.....	24
2.1.3	Chemikalien und Biochemikalien.....	24
2.1.3.1	<i>Chemotherapeutika und Anti-CD95</i> .....	24
2.1.3.2	<i>Enzyme</i> .....	25
2.1.3.3	<i>Chemikalien</i> .....	25
2.1.4	Sonstige Materialien .....	27
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	28
2.1.6	Nährmedien.....	30
2.1.6.1	<i>Zellkulturmedien</i> .....	30
2.1.6.2	<i>Bakterienkulturmedien</i> .....	31
<b>2.2</b>	<b>ANTIKÖRPER.....</b>	<b>31</b>
2.2.1	Primärantikörper .....	31
2.2.2	Sekundärantikörper.....	33
<b>2.3</b>	<b>VEKTOREN UND OLIGONUKLEOTIDE.....</b>	<b>33</b>
2.3.1	Vektoren .....	33

2.3.2	Oligonukleotide .....	38
<b>2.4</b>	<b>EUKARYOTISCHE ZELLINIEN UND BAKTERIENSTÄMME.....</b>	<b>39</b>
<b>2.5</b>	<b>DNA-TECHNIKEN.....</b>	<b>42</b>
2.5.1	Herstellung kompetenter Bakterien .....	42
2.5.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	42
2.5.3	Einfrieren von Bakterienkulturen .....	42
2.5.4	Isolierung von Vektor-DNA als Mini-Plasmidpräparation .....	42
2.5.5	Mikroplasmidpräparation .....	43
2.5.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	43
2.5.7	DNA-Größenstandard.....	44
2.5.8	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	44
2.5.9	Reinigung und Konzentrierung von DNA.....	44
2.5.9.1	<i>Ethanolpräzipitation.....</i>	<i>44</i>
2.5.9.2	<i>QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden).....</i>	<i>44</i>
2.5.9.3	<i>Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....</i>	<i>45</i>
2.5.10	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen .....	45
2.5.11	Herstellung von glatten DNA-Enden ( <i>blunten</i> ).....	45
2.5.12	Dephosphorylierung von Vektoren.....	46
2.5.13	Ligation.....	46
2.5.14	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	46
2.5.15	Sequenzierung von DNA.....	47
2.5.16	Konstruktion von pSuper-shRNA Expressionsvektoren .....	47
<b>2.6</b>	<b>PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....</b>	<b>49</b>
2.6.1	Probenaufbereitung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- PAGE).....	49
2.6.1.1	<i>Präparation von Totalhomogenaten.....</i>	<i>49</i>
2.6.1.2	<i>Präparation von Zelllysaten .....</i>	<i>49</i>
2.6.1.3	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration .....</i>	<i>49</i>
2.6.1.4	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).....</i>	<i>50</i>
2.6.1.5	<i>Protein-Größenstandard.....</i>	<i>51</i>
2.6.1.6	<i>Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot, Towbin et al. 1992).....</i>	<i>51</i>
2.6.1.7	<i>Proteinnachweis durch Immundetektion auf Western-Blot Membranen (Blake et al., 1984).....</i>	<i>51</i>

<b>2.7 ZELLKULTURTECHNIKEN.....</b>	<b>52</b>
2.7.1 Erhaltung und Kultivierung von Zellen.....	52
2.7.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	53
2.7.2.1 <i>Transfektion durch Elektroporation</i> .....	53
2.7.2.2 <i>Lipofektion mittels FuGENE® HD</i> .....	54
2.7.2.3 <i>Lipofektion mittels Lipofectamine™2000 Reagent</i> .....	54
2.7.3 Selektion und Klonierung von Suspensionskultur-Zellen .....	55
2.7.4 Semiquantitative Analyse der DNA-Bruchinduktion durch Chemotherapeutika .....	55
2.7.5 Durchflusszytometrie.....	56
2.7.5.1 <i>Rekombinationsfrequenzmessung (Akyüz, 2001)</i> .....	57
2.7.5.2 <i>Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie</i> .....	58
2.7.5.3 <i>Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie</i> .....	60
2.7.5.4 <i>Bestimmung von Apoptose und Nekrose mittels Annexin-V-FLUOS/PI-         Färbung</i> .....	60
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>62</b>
<b>3.1 ETABLIERUNG MODIFIZIERTER REKOMBINATIONSVEKTOREN UND CHROMOSOMAL INTEGRIERTER REKOMBINATIONSKONSTRUKTE ZUR ANALYSE DES BRUCH- UND REPARATURVERHALTENS AN DNA-CIS-ELEMENTEN .....</b>	<b>63</b>
3.1.1 Klonierungsstufen zur Erzeugung von retroviralen Rekombinationsvektoren mit integrierten DNA-cis-Elemente .....	63
3.1.1.1 <i>Integration des MLLbcr-Fragments</i> .....	64
3.1.1.2 <i>Integration des RARabcr-Fragments</i> .....	66
3.1.1.3 <i>Integration des IgHEmar-Fragments</i> .....	67
3.1.1.4 <i>Integration des SV40-Fragments</i> .....	68
3.1.1.5 <i>PCR-Analyse und Sequenzierung zur Überprüfung der DNA-cis-         Elemente tragenden Rekombinationsvektoren</i> .....	69
3.1.2 Etablierung der stabilen Zelllinien WTK1(HR-EGFP/3'EGFP- MLLbcr.fwd), WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev) und WTK1(HR- EGFP/3'EGFP-SV40.fwd) .....	70
3.1.2.1 <i>Bestimmung der optimalen Puromycin-Konzentration zur Selektion von         WTK1 Zellklonen mit chromosomal integrierten         Rekombinationskonstrukten</i> .....	71
3.1.2.2 <i>Etablierung und Überprüfung der WTK1 Zellklone mit chromosomal         integrierten Rekombinationskonstrukten</i> .....	72

3.1.2.3	<i>Analyse der Anzahl an chromosomal integrierten DNA-cis-Element-tragenden Rekombinationskonstrukten innerhalb der WTK1 Zellklone</i> .....	74
<b>3.2</b>	<b>ANALYSE DES BRUCH- UND REKOMBINATIONSVERHALTENS DES <i>MLL</i>BCR-FRAGMENTS</b> .....	<b>76</b>
3.2.1	Analyse der Rekombination am transient eingeführten <i>MLL</i> bcr-Fragment ....	76
3.2.2	Analyse der Rekombination am <i>IgHE</i> mar-Fragment im Vergleich zum <i>MLL</i> bcr-Fragment in Apoptose-resistenten Zellen.....	78
3.2.3	Einfluss künstlich erzeugter DSBe auf die Rekombination am transient eingeführten <i>MLL</i> bcr-Fragment.....	79
3.2.4	Analyse der Rekombination am <i>MLL</i> bcr-Fragment und Einfluss künstlich induzierter DSBe im chromosomalen Kontext.....	80
3.2.5	Analyse der Rekombination am <i>MLL</i> bcr-Fragment nach Behandlung mit Chemotherapeutika oder Anti-CD95 Antikörper .....	82
3.2.5.1	<i>Bestimmung der geeigneten Konzentration und Inkubationszeit von Zellen mit zytotoxischen Agenzien zur Bruch- und Rekombinationsanalyse am transient eingeführten <i>MLL</i>bcr-Fragment am Beispiel von Aphidicolin</i> .....	84
3.2.5.2	<i>Analyse der Rekombination am transient eingeführten <i>MLL</i>bcr-Fragment nach Behandlung mit Chemotherapeutika unterschiedlicher Wirkklassen</i> .....	86
3.2.5.3	<i>Analyse der Rekombination am transient eingeführten <i>MLL</i>bcr-Fragment in TK6 Zellen nach Behandlung mit Aphidicolin</i> .....	89
3.2.5.4	<i>Analyse der Rekombination am transient eingeführten <i>MLL</i>bcr-Fragment nach Behandlung mit Anti-CD95 Antikörper</i> .....	91
3.2.5.5	<i>Analyse der Rekombination am <i>MLL</i>bcr-Fragment im chromosomalen Kontext nach Behandlung mit Etoposid</i> .....	92
3.2.5.6	<i>Analyse der Rekombination am <i>MLL</i>bcr-Fragment im chromosomalen Kontext nach Behandlung mit Camptothecin</i> .....	94
3.2.5.7	<i>Analyse der Apoptose in den stabilen WTK1 Zellklonen nach Behandlung mit Etoposid und Camptothecin</i> .....	96
3.2.5.8	<i>Analyse von Rekombination am <i>MLL</i>bcr-Fragment und Apoptose in den stabilen WTK1-Klonen nach Behandlung mit Aphidicolin</i> .....	97
3.2.6	PCR-Analyse zur Detektion von DNA-Brüchen im <i>MLL</i> bcr-Fragment im chromosomalen Kontext nach Behandlung mit Etoposid .....	99

3.2.7	Einfluss von Caspase-Inhibition auf die Stimulierung der Rekombination nach Behandlung mit Apoptose-induzierenden Agenzien .....	101
3.2.7.1	<i>Einfluss von Caspase-Inhibition auf die der Rekombination im extrachromosomalen Kontext</i> .....	102
3.2.7.2	<i>Einfluss von Caspase-Inhibition auf die Rekombination im chromosomalen Kontext</i> .....	104
3.2.8	Einfluss der apoptotischen Nuklease CAD ( <i>caspase-activated DNase</i> ) auf die Stimulierung der Rekombination.....	107
3.2.8.1	<i>Einfluss von CAD auf die Stimulierung der Rekombination im extrachromosomalen Kontext</i> .....	107
3.2.8.2	<i>Einfluss von CAD auf die Stimulierung der Rekombination im chromosomalen Kontext</i> .....	110
3.2.9	Einfluss von NFκB auf die Stimulierung der Rekombination.....	111
3.2.9.1	<i>Einfluss von NFκB auf die Sequenz-unabhängige Stimulierung der Rekombination im extrachromosomalen Kontext</i> .....	112
3.2.9.2	<i>Einfluss von NFκB auf die Rekombination im chromosomalen Kontext</i> ....	116
<b>3.3</b>	<b>DER EINFLUSS VON p53, PARP-1 UND TOPO I AUF DIE REKOMBINATION AN TOPO I-ERKENNUNGSSTELLEN TRAGENDEN DNA-SEQUENZEN .....</b>	<b>118</b>
3.3.1	p53 und PARP-1 inhibieren die Rekombination am extrachromosomalen <i>RARα</i> -Fragment im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem	119
3.3.2	p53 stimuliert die Rekombination an zellulären Chromosomen via Topo I während PARP-1 diesem stimulatorischen Effekt entgegenwirkt.....	121
3.3.3	Die Rolle von p53, PARP-1 und Topo I in der DSB Reparatur nach gezielter Spaltung von chromosomaler Substrat-DNA .....	123
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>125</b>
<b>4.1</b>	<b>DAS <i>MLL</i>BCR-FRAGMENT EINE HOCHFRAGILE DNA-SEQUENZ.....</b>	<b>125</b>
<b>4.2</b>	<b>EINFLUSS ZYTOTOXISCHER AGENZIEN AUF DIE GENETISCHEN REARRANGEMENTS AM <i>MLL</i>BCR-FRAGMENT .....</b>	<b>128</b>
<b>4.3</b>	<b>EINFLUSS APOPTOTISCHER FAKTOREN AUF DIE STIMULIERUNG DER REKOMBINATION AM <i>MLL</i>BCR-FRAGMENT NACH BEHANDLUNG MIT ZYTOTOXISCHEN AGENZIEN .....</b>	<b>135</b>
<b>4.4</b>	<b>EINFLUSS VON NFκB AUF DIE SEQUENZ-UNABHÄNGIGE STIMULIERUNG DER REKOMBINATION AN DNA-CIS-ELEMENTEN NACH BEHANDLUNG MIT ETOPOSID UND CAMPTOTHECIN.....</b>	<b>142</b>

<b>4.5 PARP-1 ANTAGONISIERT DIE TOPO I-ABHÄNGIGE STIMULIERUNG DER REKOMBINATION ÜBER P53 .....</b>	<b>145</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>150</b>
<b>6 SUMMARY.....</b>	<b>152</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>154</b>
<b>8 ANHANG .....</b>	<b>181</b>
<b>8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>181</b>
<b>8.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>186</b>
<b>8.3 TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>188</b>
<b>8.4 SEQUENZIERUNGSANALYSEN DER VERWENDETEN DNA-CIS-ELEMENTE IM KONTEXT DER REKOMBINATIONSVEKTOREN .....</b>	<b>189</b>
<b>8.5 REKOMBINATIONSDATEN.....</b>	<b>192</b>
<b>8.6 DANKSAGUNG .....</b>	<b>194</b>
<b>8.7 CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>195</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Leukämie

Der Begriff der Leukämie definiert eine Erkrankung des blutbildenden Systems, die sich durch vermehrte Bildung maligner hämatopoetischer Zellen unterschiedlicher Reifungs- und Differenzierungsstufen auszeichnet. Die Entwicklung von Leukämien steht im Zusammenhang mit dem Auftreten verschiedener genetischer Alterationen wie Insertionen, Inversionen, Deletionen, (partielle) Duplikationen und Translokationen. Für akute Leukämien wird angenommen, dass mindestens zwei kollaborierende Mutationen für ihre Entstehung benötigt werden, wobei eine zur Unterdrückung der Blutzellendifferenzierung beiträgt und eine komplementäre, einen proliferativen und/oder Überlebensvorteil vermittelt (Dash *et al.*, 2002; Gilliland and Tallman, 2002). Die Klassifikation von Leukämien erfolgt prinzipiell entsprechend des Zelltyps und Differenzierungsstatus, denen sie anhand morphologischer, immunologischer oder genetischer Merkmale zugeordnet werden. Zwei der häufigsten Leukämieformen sind die Akut myeloische Leukämie (AML) und die Akut lymphatische Leukämie (ALL).

### 1.1.1 AML

Die AML ist eine genetisch und phänotypisch heterogene Erkrankung, in der bisher über 200 verschiedene strukturelle und numerische Aberrationen als rekurrent identifiziert werden konnten (Estey and Dohner, 2006; Mrozek *et al.*, 2001).

Zu den häufigen zytogenetisch detektierbaren Rearrangements zählen mit 5-6 % chromosomale Translokationen, die das *MLL (mixed lineage leukemia)*-Gen betreffen (Rowley, 2000). Dieses Gen ist das humane Homolog des *Drosophila trithorax*-Gens und auf Chromosom 11q23 lokalisiert. Es kodiert ein ca. 430 kDa großes Protein, welches die Expression von *HOX (homeobox)*-Genen reguliert, die wiederum in die embryonale Entwicklung und Hämatopoese involviert sind (Hess, 2004). Für *MLL* wurden bisher über 60 Fusionspartner identifiziert (Huret *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass die daraus resultierenden vielfältigen *MLL*-Fusionsproteine (Daser and Rabbitts, 2005) alle die Fähigkeit des Wildtyp (wt)-*MLL*, die *HOX* Genexpression zu regulieren, beeinflussen. In Folge dieser Fehlregulation führt die abnormale Expression individueller *HOX*-Gene wahrscheinlich zur Inhibition der hämatopoetischen Reifung und trägt somit zur Leukämogenese bei (Grier *et al.*, 2005).

Neben den karyotypisch auffälligen Rearrangements wie Translokationen bilden Patienten, die bei der Diagnose einen zytogenetisch normalen Karyotyp aufweisen, mit ca. 45 %, die größte zytogenetische Untergruppe der AML (Byrd *et al.*, 2002; Grimwade *et al.*, 2001; Grimwade *et al.*, 1998; Slovak *et al.*, 2000).

Um eine bessere prognostische Kategorisierung dieser zytogenetisch normalen AMLn zu erreichen, werden molekulargenetische Techniken, wie *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR), das Erstellen von Genexpressions-Profilen und/oder direkte Sequenzierungen eingesetzt (Mrozek *et al.*, 2007). Über sie konnten rekurrente molekulare Alterationen wie interne Tandemduplikationen (ITDen) des *FLT3* (*Fms-like tyrosine kinase 3*)-Gens (Beran *et al.*, 2004; Nakao *et al.*, 1996) und partielle Tandemduplikationen (PTDen) des *MLL* (*mixed lineage leukemia*)-Gens (Dohner *et al.*, 2002; Munoz *et al.*, 2003; Shiah *et al.*, 2002) detektiert werden.

Letztere bestehen aus einer Wiederholung von *MLL*-Exons im Leserahmen in 5'-3'-Richtung und führen zu einer potentiell translatierbaren Sequenz (Caligiuri *et al.*, 1994; Schichman *et al.*, 1994). Die *MLL*-PTDen wurden in ca. 8 % der Erwachsenen mit einer zytogenetisch normalen *de novo* AML detektiert. Sie gelten als ungünstige prognostische Faktoren dieser Erkrankung (Bloomfield *et al.*, 2006; Dohner *et al.*, 2002). Es wurde festgestellt, dass die *MLL*-PTDen gehäuft im Zusammenhang mit *FLT3*-ITDen (33 %) auftreten (Libura *et al.*, 2003; Steudel *et al.*, 2003). Die Koexistenz dieser beiden Mutationen konnte, im Vergleich zu den Einzelmutationen, in den meisten Studien jedoch nicht mit einem veränderten klinischen Resultat korreliert werden (Olesen *et al.*, 2005; Rege-Cambrin *et al.*, 2005). Der pathogene Mechanismus und die spezifischen Zielgene sind für die *MLL*-PTDen bisher noch nicht gut charakterisiert. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass, im Gegensatz zu anderen *MLL*-Aberrationen, für *MLL*-PTD positive AMLn die *MLL*-wt Transkription unterdrückt ist, was möglicherweise zur leukämogenen Transformation beiträgt (Whitman *et al.*, 2005). Größere Einblicke in die mechanistische Pathogenese gibt es hingegen für die *FLT3*-ITDen. Sie führen zu einer konstitutiv aktivierenden Alteration der *FLT3*-Rezeptor-Tyrosin-Kinase und resultieren in Zellproliferation, Apoptose-Inhibition und Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege (Gilliland and Griffin, 2002; Spiekermann *et al.*, 2003).

Obwohl die meisten *FLT3*-Mutationen und *MLL*-PTDen bisher in AML-Patienten beschrieben wurden, sind sie nicht ausschließlich mit der AML assoziiert, sondern wurden auch in ALL-Fällen detektiert (Pallisgaard *et al.*, 1998; Silverman, 2007).

### 1.1.2 ALL

Die ALL ist mit 35 % die am stärksten vertretene Malignität bei Kindern (Parkin *et al.*, 1988). Sie wird in B-Linien- und T-Linien-ALL unterteilt, wobei diese wiederum in die jeweilige Vorläufer-ALL und reif(zellig)e-ALL untergliedert werden. Bei Erwachsenen haben ca. 25 % der ALL-Fälle T-Linien- und ca. 75 % B-Linien-Ursprung, bei Kindern 15 % T-Linien und 85 % B-Linien Ursprung (Huret, 2006).

Bei älteren Kindern mit B-Vorläufer-ALL zählt die t(12;21) *TEL/AML1*(*translocation-ets-leukemia/acute myeloid leukemia 1*) Fusion neben der Hyperdiploidie (51-65 Chromosomen oder DNA Index  $\geq 1,16$ ) zu den häufigsten chromosomalen Abnormalitäten (jeweils ca. 25 % der Krankheitsfälle). Beide sind fast nie bei Kleinkindern mit ALL zu finden (Moricke *et al.*, 2005). Bei Kleinkindern ist die ALL stärker mit Rearrangements im *MLL*-Gen (Chromosom 11q23) assoziiert, wobei das, einen Transkriptionsfaktor kodierende, Gen *AF4* (*ALL-1 fused gene on chromosome 4*) dessen häufigster Fusionspartner ist (Gu *et al.*, 1992b). Über karyotypische Analysen und molekulare Techniken wurden *MLL*-Gentranslokationen bei 70-80 % der Kleinkinder mit ALL detektiert. Im Vergleich dazu wurden nur 2-4 % dieser Rearrangements bei älteren Kindern mit ALL ermittelt (Biondi *et al.*, 2000; Greaves, 1996).

Die *MLL*-rearrangierte ALL zeigt ein charakteristisches Genexpressionsprofil, welches sich signifikant von der Nicht-*MLL*-rearrangierten B-Vorläufer-ALL und AML unterscheidet (Armstrong *et al.*, 2002; Yeoh *et al.*, 2002). Besonders auffällig ist, dass Kleinkinder mit einer *MLL*-Translokation wesentlich schlechtere Prognosen als ältere Kinder mit der gleichen genetischen Abnormalität haben. Dies impliziert einen bisher unbekanntem Einfluss von altersabhängigen Faktoren für die Therapieantwort (Pui *et al.*, 1994). Ereignisfreie Langzeit-Überlebensraten für Kleinkinder mit *MLL*-rearrangierter ALL bewegen sich zwischen 13-34 % (Chen *et al.*, 1993; Chessells *et al.*, 2002; Dordelmann *et al.*, 1999; Hilden *et al.*, 2006; Isoyama *et al.*, 2002; Pui *et al.*, 1994; Rubnitz *et al.*, 1994). Bisher hat die Behandlung mit konventionellen chemotherapeutischen Agenzien zu keiner Verbesserung der Prognose für Kleinkinder mit ALL geführt.

Aufgrund dieser schlechten Prognose für *MLL*-assoziierte Leukämien bei Kleinkindern gilt es nicht nur neue Therapien zu entwickeln, sondern auch Strategien zur Prävention zu finden. Darum sind die Untersuchung von ätiologischen Einflüssen, Ursprung und Zeitverlauf für das Auftreten sowie die Natur der DNA Schäden, die zu *MLL*-Translokationen in Kleinkind-Leukämien führen, wichtige Forschungsgebiete.

In Bezug auf den Ursprung akuter Leukämien zeigten Studien mit monozygoten Zwillingen mit *MLL*-Rearrangements involvierten Leukämien, dass beide jeweils die gleiche Fusions-

Gensequenz trugen. Dies indiziert den Erwerb der *MLL*-Rearrangements *in utero*. Mechanistisch kommt es möglicherweise zum Transfer der malignen Zellen über plazentale Anastomosen von einem Zwilling zum anderen (Greaves *et al.*, 2003). Die Annahme zum *in utero* Erwerb wurde des Weiteren durch retrospektive Studien mit archiviertem neonatalen Fersenblut gestützt. Dabei wurden in dem neonatalen Blut von Kindern, die später eine Leukämie entwickelten, bereits Fusions-Gensequenzen detektiert (Gale *et al.*, 1997). Diese Erkenntnisse unterstützen die Interpretation, dass viele - wenn nicht alle - Kindheitsleukämien einen pränatalen Ursprung während der fötalen Hämatopoese haben.

### **1.1.3 Leukämien bei Kleinkindern versus Therapie-induzierte Sekundärleukämien**

Einen Anhaltspunkt für die Entstehung von *MLL*-Rearrangements *in utero* lieferte die Entdeckung der ähnlichen Verteilung von Bruchpunkten innerhalb des *MLL*-Gens für Leukämien in Kleinkindern versus Chemotherapie-induzierten Sekundärleukämien (Cimino *et al.*, 1997). Letztere stehen insbesondere in Verbindung mit der chemotherapeutischen Behandlung über DNA Topoisomerase II (Topo II)-Inhibitoren wie Etoposid. Es wurde vielfach demonstriert, dass ein Mechanismus zur Induktion von *MLL*-Rearrangements über Substanzen ablaufen kann, die Topo II angreifen. Sie hemmen dabei z.B. das Wiederversiegeln eines, über Topo II vorher gespaltenen, DNA-Doppelstrangs (Andersen *et al.*, 2001; Hande, 1998; Ishii *et al.*, 2002). Topo II-Inhibitoren führen zur Stabilisierung des DNA-Topo II Spaltungskomplexes und zur Manifestation von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBen), die möglicherweise bei der Entstehung von leukämogenen Rearrangements beteiligt sind (Fortune and Osheroff, 2000).

Es wird angenommen, dass die kanzerogenen chromosomalen Alterationen, die *in utero* auftreten, über ähnliche Mechanismen wie bei den Therapie-induzierten Sekundärleukämien durch die pränatale Einwirkung von Topo II-Inhibitoren verursacht werden können (Emerenciano *et al.*, 2007). Neben den erwähnten chemotherapeutischen Agenzien gehören auch Benzol-Metabolite wie Benzochinon, Isoflavone, Flavonoide, Lignane, Chinon-Antibiotika und einige Pestizide zu diesen Inhibitoren. Des Weiteren wurden in spezifischen Früchten und Gemüse, die Quercetin enthalten, Sojabohnen (Genistein), Tee, Kaffee, Kakao und Wein (Catechine) Topoisomerase-inhibitorische Verbindungen gefunden (Alexander *et al.*, 2001; Frantz *et al.*, 1996; Hande, 1998; Ross, 1998). Für die Aufnahme von frischem Gemüse und Früchten während der Schwangerschaft gibt es aber auch gegenteilige Ergebnisse, die sie mit einem gesenkten anstatt erhöhtem Risiko für Kleinkind-*MLL*

assoziiieren (Spector *et al.*, 2005). Generell konnte für die maternale Aufnahme von Nahrungsmitteln, die Topo II-Inhibitoren enthalten, bisher nur ein erhöhtes Risiko für die Kleinkind-AML, nicht jedoch für Kleinkind-ALL, detektiert werden (Ross, 1998).

Ein weiterer interessanter Aspekt im Zusammenhang mit der Rolle von Topo II-Inhibitoren in Kleinkind-Leukämien, ist die Entdeckung von kritischen Polymorphismen in detoxifizierenden Enzymen, wie der C609T-Polymorphismus im Gen der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase 1 (*NQO1*). Dieses Enzym dient normalerweise zur Detoxifizierung von Chinonen, welche wiederum oftmals Bestandteil von Topo II-Inhibitoren sind (Smith *et al.*, 2002). Für Chinone konnte eine Spaltungsaktivität im *MLL*-Gen und Fusionspartner-Gen *AF4* an deren Topo II-Spaltungsstellen nachgewiesen werden (Lovett *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass der Polymorphismus C609T in *NQO1* zu einer signifikant gesenkten enzymatischen Aktivität des Proteins führt (Siegel *et al.*, 1999; Traver *et al.*, 1997). Das Auftreten von *NQO1* Enzymvarianten mit einer niedrigeren Aktivität konnte mit einem erhöhten Risiko für Kleinkind-MLL assoziiert werden (Wiemels *et al.*, 1999). Ein ähnlicher Zusammenhang wurde für die Therapie-induzierte AML gefunden, so waren in einer Kohorte von Patienten mit myeloischer Leukämie 11 % der Therapie-induzierten AML Patienten homozygot und 41 % heterozygot für den *NQO1* Polymorphismus. Diese Anteile waren signifikant höher als in einer Population der gleichen ethnischen Zusammensetzung erwartet wurde. Des Weiteren zeigten nur 4 % der Patienten mit primärer AML die homozygote C609T *NQO1*-Variante (Larson *et al.*, 1999). Demzufolge indizieren diese Daten, dass der *NQO1* Polymorphismus auch ein Risikofaktor für die Entwicklung von Therapie-induzierter AML ist.

Neben dem *MLL*-Gen, als Zielgen für Therapie- bzw. Topo II-Inhibitoren-induzierten Translokationen, wurden weitere Gene wie *AML1* (Hake *et al.*, 2007), *AF4* (Lovett *et al.*, 2001), *PML* und *RAR $\alpha$*  (Cuzick *et al.*, 1987) in diesem Zusammenhang beschrieben. Die Exposition mit Topo II-Inhibitoren ist jedoch prädominant mit Translokationen des *MLL*-Gens assoziiert (Mudie *et al.*, 2006) und wurde folglich verstärkt auf sequenzspezifische Merkmale untersucht.

## 1.2 Charakterisierung der *MLL*-Bruchpunktregion

Das *MLL*-Gen ist ca. 92 kb groß und umfasst 37 Exons. Die meisten Translokations-Bruchpunkte, die mit hämatologischen Malignitäten assoziiert sind, konnten in einer 8.3 kb großen Bruchpunkt-(Cluster)-Region (bcr) lokalisiert werden. Sie integriert nach neuer Kartierung die Exons 7 – 13 (Gu *et al.*, 1994; Reichel *et al.*, 2001a). Diese Bruchpunktregion

kann des weiteren in einen zentromeren und telomeren Abschnitt unterteilt werden. Während die meisten *MLL*-Bruchpunkte von Fällen der Kleinkind-Leukämie und der Therapie-induzierten AML in der Nähe des telomeren *MLLbcr* Abschnitts lokalisiert sind, häufen sich die Bruchpunkte von Patienten mit *de novo* AML nahe des zentromeren Abschnitts (Broeker *et al.*, 1996; Reichel *et al.*, 2001a). Besonders in der Nähe der telomeren Region wurden mittlerweile vielfältige genomische Details identifiziert und analysiert, die zur Bruchentstehung und darauf folgender fehlerhafter Rekombination am *MLL*-Gen beitragen könnten. Einige dieser Sequenz-Charakteristika und die damit verbundenen implizierten Mechanismen zur Entstehung von *MLL*-Rearrangements werden in den folgenden Abschnitten 1.2.1-1.2.2 beschrieben.

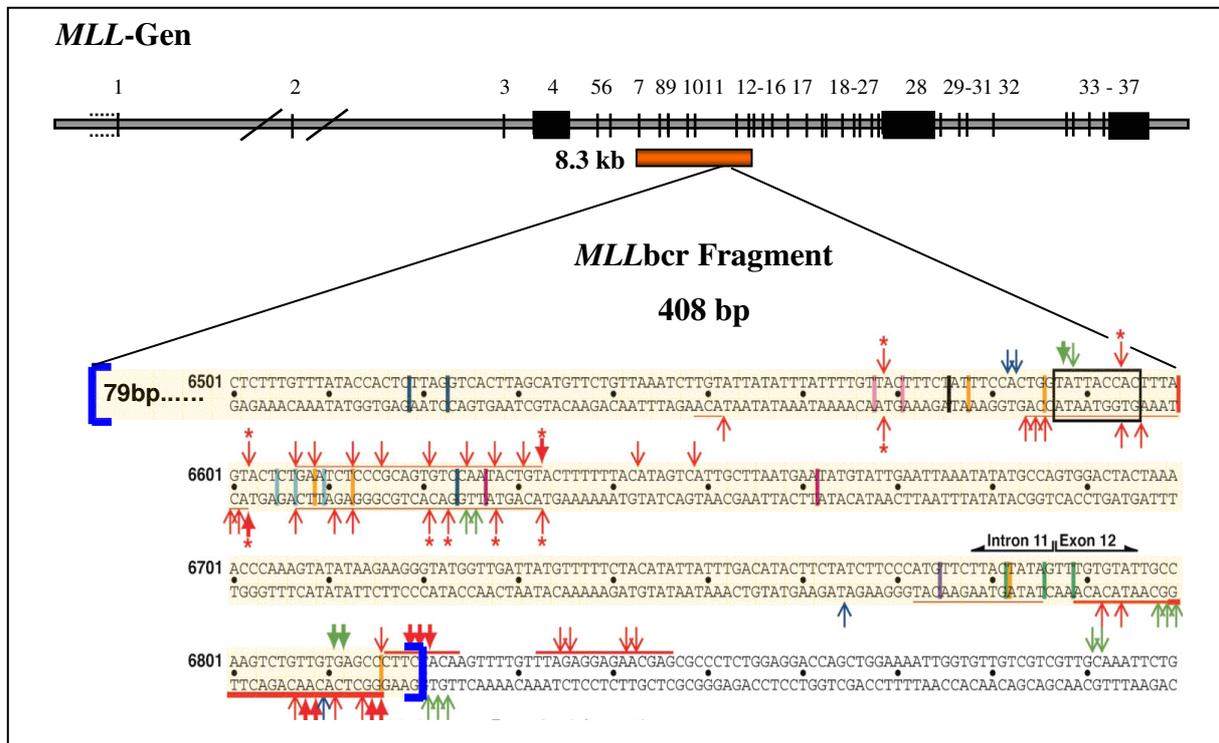
### 1.2.1 Topo II-abhängige *MLL*-Rearrangements

In Bezug auf den unter Abschnitt 1.1.3 dargestellten möglichen Zusammenhang zwischen Topo II-Inhibitoren und der Entwicklung Therapie-induzierter bzw. Kleinkind-Leukämie mit *MLL*-Genrearrangements wurden eine Vielzahl Untersuchungen zum Verständnis dieses Phänomens durchgeführt. Verschiedene Studien konnten Medikamenten- induzierte Topo II Schnittstellen an oder in der Nähe von Translokations-Bruchpunkten lokalisieren (Felix, 1998; Lovett *et al.*, 2001; Whitmarsh *et al.*, 2003). Die Identifikation dieser Schnittstellen basierte auf publizierten Topo II-Konsensussequenzen oder auf *in vitro* Spaltung klonierter DNA, doch steht in Frage ob letztere auch die *in vivo* Topo II Schnittstellen widerspiegeln (Capranico *et al.*, 1990; Kas and Laemmli, 1992; Udvardy and Schedl, 1991).

Mittels einer Kombination aus konventioneller *ligation-mediated PCR* (LMPCR) und *extension ligation-mediated PCR* (ELMPCR) konnten *in vivo* Topo II-vermittelte DNA Läsionen in einem *MLLbcr*-Gensegment kartiert werden (Mirault *et al.*, 2006). Ein Teil dieses Segments stimmt mit der *MLLbcr*-Sequenz, die in dieser Arbeit verwendet wurde, überein. Abb. 1 zeigt diesen Ausschnitt der genomischen Karte, in der u.a. sämtliche bekannte Translokations-Bruchpunkte und die Stellen der Topo II-vermittelten DNA-Spaltungen gekennzeichnet sind. Es zeigte sich, dass viele bisher unbekannte Topo II-Schnittstellen innerhalb des *MLLbcr*-Gensegments identifiziert werden konnten. Die meisten dieser Schnittstellen lagen relativ weit von den Translokations-Hotspots entfernt und konnten somit die Rolle von Topo II als möglichen Translokations-Initiator nicht ausreichend belegen.

Die Position einer Topo II-Schnittstelle in der Umgebung von multiplen apoptotischen Spaltungsstellen sowie in der Nähe eines Translokations-Hotspots (Abb. 1) stimmte jedoch mit Erkenntnissen über potentielle Interaktionen zwischen Topo II und Caspase-aktivierten

DNAsen (Durrieu *et al.*, 2000) überein. Des Weiteren deckte sich diese Kolo­kalisierung mit der Annahme einer möglichen Translokations-Vermittlung über Topo II (Mirault *et al.*, 2006; Whitmarsh *et al.*, 2003).



**Abb. 1** Ausschnitt aus der Sequenz der *MLLbcr* mit Topoisomerase-Schnittstellen, Hotspots der apoptotischen Spaltung und Translokations-Bruchpunkten aus Mirault *et al.*, 2006 im Kontext des *MLL*-Gens.

Blaue Pfeile: Etoposid-induzierte Topo II Schnittstellen, Grüne Pfeile: Camptothecin-induzierte Topo I-Schnittstellen, Rot unterstrichen: Hotspots für apoptotische DNA-Spaltung (dicke Linien indizieren stärkere Spaltung), Rote Pfeile: Prädominante Spaltungsstellen (dicke Pfeile indizieren stärkere Spaltungsstellen), Stern: glatter DSB (Doppelstrangbruch), schwarze Box: ein Haupt-Translokations-Hotspot, der neun mit Multimedikamenten-Behandlung, inklusive Topo II-gerichteten Medikamenten, assoziierte Therapie-induzierte Translokations-Bruchpunkte integriert (Langer *et al.*, 2003; Raffini *et al.*, 2002; Whitmarsh *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Des Weiteren einen Bruchpunkt der SN-1 Zelllinie von einem Patienten mit T-Linien-ALL ohne Geschichte über vorherige Behandlung (Zhang *et al.*, 2004). Vertikale Markierungen: weitere Translokations-Bruchpunkte aus der Literatur (Gillert *et al.*, 1999; Langer *et al.*, 2003; Raffini *et al.*, 2002; Reichel *et al.*, 2001a). Jede Farbe korrespondiert mit einem anderen Patienten, außer für alle orangenen Bruchpunkte, welche von CD95-vermittelter Apoptose *in vitro* resultierten (Betti *et al.*, 2001; Betti *et al.*, 2003). Duplikate Markierungen mit der gleichen Farbe reflektieren Unsicherheiten über die exakte Lokalisation des *MLL*-Bruchpunkts aufgrund lokaler Überlappungen der DNA-Sequenzen am *MLL*-Partnergen-Übergang oder wegen Sequenzlücken zwischen dem derivativen *MLL*- und Partner-Bruchpunkten. Die blauen Klammern flankieren den Bereich der *MLLbcr*, die in dieser Arbeit untersucht wurde.

Frühere Untersuchungen zur Überprüfung, ob eine Etoposid-vermittelte Spaltung im *MLL*-Lokus Rearrangements fördert, hatten mittels Southern Blot-Analyse unter Benutzung eines *MLL*-Fragments als Sonde schadensinduzierte genetische Alterationen gezeigt. Die reziproken Partner wurden dabei jedoch nicht identifiziert (Betti *et al.*, 2003; Stanulla *et al.*, 2001; Stanulla *et al.*, 1997). Weiterreichende Studien bestätigten, dass eine Etoposid-Behandlung von humanen oder murinen Zellen ausreichend ist, um sofort die Initiation von spezifischen Rearrangements im *MLL*-Gen zu fördern. Es wurden dabei Alterationen wie

zahlreiche Translokationen und *MLL*-PTDn detektiert, konsistent mit dem vollen Spektrum an identifizierten onkogenen Ereignissen in leukämischen Proben (Blanco *et al.*, 2004; Libura *et al.*, 2005). In humanen Zellen, in welchen die Brüche repariert worden waren und die über einen längeren Zeitraum von 10-14 Tage proliferierten, waren die Mehrheit der Alterationen *MLL*-PTDn. Des Weiteren wurden einige Deletionen, Inversionen sowie Insertionen und nur noch eine Translokation detektiert. Obwohl die Etoposid-induzierten Translokationen also initial häufig waren, setzte sich nur ein kleiner Anteil dieser Translokationen in *ex vivo* proliferierenden Zellen durch. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die detektierten *MLL*-Translokationen zwar zehn verschiedene Chromosomen involvierten, doch stimmte keines dieser Partnersequenzen mit bereits bekannten onkogenen *MLL*-Partnern überein (Libura *et al.*, 2005). Im murinen System hingegen waren die meisten identifizierten Translokationspartner bereits bekannte Gene, inklusive einiger humaner Orthologe mit kanzerogener Implikation (Blanco *et al.*, 2004). Zusammengefasst bedarf es demzufolge weiterer Aufklärung über die Spezifität von Etoposid zur Induktion von *MLL*-Rearrangements, sowie über den zugrundeliegenden Mechanismus, über den Etoposid oder andere Topoisomerase-Inhibitoren spezifische chromosomale Aberrationen fördern.

### **1.2.2 Apoptotische Spaltung als Initiator von *MLL*-Rearrangements**

Die unter Abschnitt 1.2.1 dargestellte Kartierung eines Teils der telomeren *MLL* Bruchpunktregion (Abb. 1, Mirault *et al.*, 2006) zeigt, neben den bereits erwähnten Topo II-Schnittstellen, weite Regionen von Hotspots für apoptotische Spaltungen und Topo I-Schnittstellen (Mirault *et al.*, 2006). Unter apoptotischer Spaltung ist dabei die DNA-Bruchinduktion über Nukleasen, nach Aktivierung des Selbstmordprogramms (Apoptose, Abschnitt 1.3) der Zelle zu verstehen.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Hotspots für apoptotische Spaltungen und Topo I-Schnittstellen kartografisch eng miteinander assoziiert sind. Diese lokale Überlagerung könnte mit der Annahme verknüpft sein, dass die Topo I-induzierte DNA-Spaltung zur Chromatin-Lyse der Apoptose beiträgt und somit die Bruch-Induktion innerhalb des *MLL*bcr unterstützen kann (Sordet *et al.*, 2003; Sordet *et al.*, 2004a).

In Exon 12 wurde in allen untersuchten Zelltypen eine Region lokalisiert, die besonders starker apoptotischer Spaltung unterlag (Mirault *et al.*, 2006). Die einzigartige potentielle DSB-Stelle innerhalb dieser apoptotischen Spaltungsregion (Abb. 1) korrespondierte präzise mit einem *MLL*-Translokations-Bruchpunkt, der in kultivierten Zellen unter CD95-Rezeptor-induzierter Apoptose beobachtet wurde (Betti *et al.*, 2003). Die Aktivierung von Apoptose

könnte demzufolge ausreichend sein um DSBe zu induzieren, die zu Translokationen beitragen. Dies wurde durch die Detektion von *MLL-AF9* Fusions-Transkripten in der lymphoblastoiden Zelllinie TK6 nach Apoptoseinduktion untermauert (Betti *et al.*, 2003).

Eine weitere interessante Entdeckung in Bezug auf die Apoptose-induzierten Bruchpunkte der *MLLbcr* war die Lokalisation des *MLL*-Translokations-Bruchpunkts innerhalb einer sogenannten *scaffold/matrix attachment region* (s/mar) (Stanulla *et al.*, 1997).

Diese Regionen sind Sequenzen innerhalb eukaryotischer Chromosomen, die mit der nukleären Matrix verbunden sind. Sie dienen der Organisation des Chromatins in strukturelle Domänen und können die Zugänglichkeit des Chromatins regulieren (Fernandez *et al.*, 2001; Jenuwein *et al.*, 1997). Es wurde gezeigt, dass s/mars, die sich entlang von AT- oder ATC-reichen DNA-Abschnitten erstrecken, möglicherweise zu einer Auflösung der transienten Basenpaarung befähigt sind (Negrini *et al.*, 1993). *MLL*-Bruchpunkte innerhalb solcher Regionen könnten demzufolge chromosomal in einer leicht zugänglichen Konfiguration vorliegen (Stanulla *et al.*, 1997), die ihre Spaltung begünstigen. Unterstützt wird diese These durch die Detektion von DNase I-hypersensitiven (DNase I HS) Stellen innerhalb der telomeren *MLL*-s/mar. Diese Stellen werden fast immer mit der Bindung von Proteinen an spezifischen DNA-Regionen assoziiert und führen folglich, im Sinne einer gesteigerten DNA-Zugänglichkeit, zur strukturellen Veränderung des Chromatins (Fleenor and Kaufman, 1993; Pastorcic *et al.*, 1989; Strissel *et al.*, 1998). Die daraus resultierende initial geöffnete DNA-Region könnte gegenüber Spaltungen durch eine Vielzahl von Agenzien, inklusive apoptotischer Nukleasen, empfindlicher sein (Stanulla *et al.*, 1997; Strissel *et al.*, 1998).

Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der Apoptose innerhalb der Bruchentstehung der *MLLbcr* liegt in der Annahme, dass die Schnittstellen der DNA-Fragmentation höherer Ordnung (50 kb DNA-Fragmente), die in früh-apoptotischen Zellen auftritt, innerhalb von s/mars lokalisiert sind (Bode *et al.*, 1995; Bortner *et al.*, 1995; Razin *et al.*, 1995). Die Kolo-kalisation von *MLL*-Bruchpunkten mit s/mars würde folglich die Möglichkeit der Entstehung Apoptose-verursachter DSBe untermauern und für die Entwicklung leukämogener Alterationen eine anschließende fehlerhafte Reparatur implizieren (Stanulla *et al.*, 1997).

Ein kontroverser Aspekt der Entwicklung Apoptose-abhängiger *MLL*-Rearrangements ist, dass ein solcher Apoptose-induzierter Mechanismus zur Entwicklung von kanzerogenen Translokationen den Abbruch des Apoptose-Programms erforderlich machen würde. Die konventionelle Interpretation von Apoptose ist bisher jedoch, dass nachdem das apoptotische Programm einmal gestartet wurde, es unausweichlich zum Tod der Zelle führt (Green and Kroemer, 1998; Rich *et al.*, 2000)

### 1.3 Apoptose

Die Apoptose ist ein Selbstmordprogramm zur Eliminierung von Zellen, die redundant, geschädigt oder infiziert sind (Kerr *et al.*, 1972). Sie kann in zwei distinkte molekulare Signalwege unterteilt werden, einen intrinsischen oder Mitochondrien-vermittelten Weg und einen extrinsischen oder Rezeptor-vermittelten Weg (Danial and Korsmeyer, 2004).

Der intrinsische Signalweg wird normalerweise als Antwort auf intrazelluläre Stresssignale, wie DNA-Schäden, virale Infektionen oder hohe Niveaus an reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) angeschaltet. Er führt über die Oligomerisierung der Proteine Bax und Bak in der mitochondriellen äußeren Membran zur Aktivierung ihrer Permeabilisierung (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*) und somit zur Freisetzung apoptotischer Faktoren, wie z.B. Cytochrom c. Die weiteren Schritte der intrinsischen apoptotischen Kaskade, wie die Aktivierung verschiedener Caspasen, werden über diese freigesetzten Faktoren vermittelt (Wei *et al.*, 2001).

Der extrinsische Signalweg wird über die Bindung extrazellulärer Liganden an Rezeptoren der Plasmamembran wie CD95 aktiviert. Nach dieser Bindung rekrutiert der im Cytoplasma befindliche Teil des Rezeptors Initiator-Caspasen und führt zur autoproteolytischen Aktivierung dieser Proteasen. Die weiteren Schritte der extrinsischen Signalkaskade verlaufen entweder über die direkte Aktivierung von Effektor-Caspasen oder ebenfalls über die Freisetzung von mitochondriellen Faktoren (Blank and Shiloh, 2007; Scaffidi *et al.*, 1998).

Beide Signalwege führen demzufolge zur Aktivierung proteolytischer Enzyme, den Caspasen. Sie werden als inaktive Vorläufer exprimiert, die sich nach ihrer initialen Spaltung zu aktivierten Oligomeren formieren. Es werden zwei Gruppen von Caspasen unterschieden, die Initiator-Caspasen, wie Caspase-8, -9, -10 und die Effektor-Caspasen, wie Caspase-3, -6, -7 (Thornberry and Lazebnik, 1998). Während die Initiator-Caspasen u. a. zur proteolytischen Aktivierung der Effektor-Caspasen beitragen können, bestimmen die Effektor-Caspasen, über die proteolytische Spaltung einer Vielzahl von zellulären Substraten, größtenteils die Eigenschaften des apoptotischen Zelltods (Wolf and Green, 1999). Sie führen zum rapiden Abbau der zellulären Organelle und leiten die für den apoptotischen Zelltod typische DNA-Fragmentierung ein. Es wird angenommen, dass diese DNA-Fragmentierung in zwei Stufen abläuft. Die Fragmentierung höherer Ordnung führt zunächst zur sequentiellen Degradation der genomischen DNA von initial 300 kb großen Fragmenten zu den 50 kb großen „Chromatinschleifen“-Fragmenten. Die anschließende internukleosomale DNA-Spaltung führt zur charakteristischen DNA-Auftrennung, die bei der fortschreitenden Degradation der 50 kb-Fragmente entsteht (Oberhammer *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1991). Mehrere Nukleasen

sind an der Degradation der DNA in den verschiedenen Stadien der Fragmentierung beteiligt. Eine gut beschriebene Nuklease des apoptotischen Programms ist die *caspase-activated DNase* (CAD). Ihre Aktivierung erfolgt über die Degradation der inhibitorischen Untereinheit ICAD (*inhibitor of CAD*), die zumeist durch Caspase 3 eingeleitet wird (Enari *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Sakahira *et al.*, 1998; Widlak *et al.*, 2003). CAD weist eine strikte Spezifität für doppelsträngige DNA auf und es wird dieser Nuklease sowohl eine Beteiligung bei der Fragmentierung höherer Ordnung als auch bei der internukleosomalen Spaltung zugeschrieben (Nagata *et al.*, 2003; Widlak and Garrard, 2005). Die Einleitung dieser Fragmentierungsstufen innerhalb der Apoptose galt, wie im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, lange Zeit als definitive Bestimmung für die Zelle zu sterben. Dieses Konzept wird jedoch mittlerweile in Frage gestellt. Es wurde für eine Familie von Proteinen namens IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) impliziert, die Kapazität zu besitzen, bestimmte Stufen des apoptischen Programms zu modulieren (Deveraux and Reed, 1999). XIAP (*x-linked inhibitor of apoptosis*), ein Mitglied der IAPs wurde z.B. als Suppressor der Apoptose über domänenspezifische Inhibition von Caspase-9 und der aktivierten Form von Caspase-3 beschrieben (Datta *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 1998). XIAP und andere IAPs könnten demzufolge, nachdem die aktivierte Caspase-3 die Spaltung von ICAD und anderen Substraten initiiert hat, zur Unterdrückung dieser Caspase-3 Aktivität führen. Dies würde bedeuten, dass CAD zunächst zwar freigesetzt und nukleolytisch aktiv wird, doch könnten die dadurch verursachten Schädigungen der DNA während der DNA-Fragmentierung höherer Ordnung reparabel sein. Eine fehlerhafte DNA-DSB-Reparatur könnte folglich zu genetischen Alterationen, wie Translokationen führen und zur kanzerogenen Entwicklung der „geretteten“ Zelle beitragen (Vaughan *et al.*, 2002).

## **1.4 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur**

Die Reparatur von DSBen erfolgt in Säugerzellen im wesentlichen über die mechanistisch unterscheidbaren Prozesse des *non-homologous end-joining* (NHEJ) und der Homologiegerichteten Reparatur (*homology-directed repair*, HDR). Letztere untergliedert sich in konservative homologe Rekombination (HR) und *single-strand-annealing* (SSA), die nicht-konservative Form der Rekombination (Haber and Leung, 1996; Lieber *et al.*, 2003; Wyman and Kanaar, 2006).

### **1.4.1 Non-homologous end-joining (NHEJ)**

*Non-homologous end-joining* (NHEJ) kann abhängig von der Art der DSBe sowohl fehlerfrei,

wie bei Nuklease induzierten DSBen mit komplementären Überhängen (Lin *et al.*, 1999), als auch fehlerhaft, wie bei der Involvierung von Mikrohomologien ( $\geq 1$  komplementäre Basen) aufgrund mangelnder Sequenz-Komplementarität, ablaufen. Die fehlerhafte Form des NHEJ kann zu kurzen Deletionen, Inversionen, Insertionen von Auffüll-DNA oder direkten Wiederholungen und Mikrohomologien innerhalb der religierten DNA-Sequenz führen.

Eine wichtige Rolle für den NHEJ-Prozess spielt die Formierung des trimeren DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) Holoenzym-Komplex. Dieser entsteht durch die Bindung des Ku70/80 Heterodimers an die DNA-Enden, sowie über die Rekrutierung der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*, DNA-PKcs). Sobald die DNA-PKcs an die DNA-Enden bindet, wird sie aktiviert und phosphoryliert sich selbst sowie andere Zielproteine inklusive RPA (*replication protein A*), WRN (*werner protein*) und Artemis (Burma *et al.*, 2001; Burma and Chen, 2004; Chan *et al.*, 1999; Collis *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2005; Karmakar *et al.*, 2002; Shao *et al.*, 1999; Yannone *et al.*, 2001). Die autophosphorylierende Aktivität der DNA-PKcs ist bedeutend für die effiziente Progression des NHEJ-Prozesses (Chan *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2003), da die DNA-PKcs im dephosphorylierten Zustand den Zugang für prozessierende Enzyme und Ligasen an die DNA-Enden blockiert (Block *et al.*, 2004; Calsou *et al.*, 1999; Weterings *et al.*, 2003).

Bei der fehlerhaften Variante des NHEJ ist eine DNA-Endprozessierung nötig. Mre11, ein Protein des Mre11/Rad50/NBN (MRN)-Komplex mit 3'-5' exonukleolytischer Aktivität (Gatz *et al.*, 2008; Paull and Gellert, 1998; Paull and Gellert, 1999) spielt dabei eine wichtige Rolle (Deriano *et al.*, 2009; Gatz *et al.*, 2008; Mimitou and Symington, 2009; Wasako *et al.*, 2009). Fehlerfreies NHEJ benötigt eine solche DNA-Endprozessierung nicht.

Im letzten Schritt des NHEJ wird die DNA-Lücke, unter möglicher Beteiligung von Polymerase  $\mu$  und  $\lambda$  aufgefüllt. Die DNA Ligase IV, mit ihren Bindepartnern XRCC4 und XLF (Cernunnons), versiegelt den DNA-DSB (Ahnesorg *et al.*, 2006; Buck *et al.*, 2006; van Gent *et al.*, 2001; Weterings and Chen, 2008).

Fehlfunktionen im NHEJ-Prozess werden eine große Bedeutung bei der Entwicklung von kanzerogenen Translokationen zugeschrieben, da das NHEJ u.a. ein wichtiger Teil der V(D)J-Rekombination ist, die normalerweise der Ausbildung von immunologischer Diversität in B- und T-Lymphozyten über die Rekombination von separaten V-, D- und J-Gensegmenten dient. Angrenzend zu diesen Segmenten finden sich Heptamer- und Nonamer-Sequenzen, die für die Initiation der V(D)J-Rekombination von Bedeutung sind. Sie können jedoch einer solch starken Varianz unterliegen, dass ähnliche Sequenzen, sogenannte Pseudo-Signale, auch

andernorts im Genom zu finden sind. Diese Pseudo-Signale können fälschlicherweise zum Substrat der V(D)J-Rekombination werden und somit z.B. zur fehlerhaften Verbindung unterschiedlicher Chromosomenarme führen (Hesse *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1997; Raghavan *et al.*, 2001).

Im Fall von *MLL*-Translokationen konnten in zwei Zelllinien von Patienten mit *MLL*-involvierter B-Vorläufer-ALL in der Nähe der t(4;11) Bruchpunkte solche Heptamer- und Nonamersequenzen identifiziert werden. Sie führten zur Annahme, dass sie als Pseudo-Signale der V(D)J-Rekombination, ähnlich den normalen V(D)J-Rekombinationssignalen, fungieren und folglich direkt in die Entstehung der Translokationen involviert sein könnten (Gu *et al.*, 1992a). Dagegen spricht jedoch, dass sich die Pseudo-Signale zwar in der Nähe der Bruchpunkte (innerhalb 20-30 Nukleotide), aber nicht direkt an den Bruchpunkten befinden und es keinen Hinweis auf eine Matrizen-unabhängige Nukleotid-Addition gibt, was im Gegensatz zu anderen Beispielen der illegitimen V(D)J-Rekombination steht (Aplan *et al.*, 1990; Tycko and Sklar, 1990). Des Weiteren wurden bei der Klonierung von zusätzlichen Bruchpunkten von Patienten keine Pseudo-Signale in der Nähe der Bruchpunkte lokalisiert.

Die Klonierung einer großen Anzahl von *MLL*-Translokationspunkten indizierte jedoch, dass die *MLL*-Bruchpunkte, trotz fehlender Nonamer- oder Heptamersequenzen in ihrer Nähe, über den NHEJ-Mechanismus repariert wurden, da die *MLL* Translokationspunkte für die NHEJ-Reparatur typische Merkmale, wie kurze Deletionen aufwiesen.

Sie wurden sowohl in Kleinkind- als auch in adulten Patienten mit t(4;11) Translokationen gefunden (Reichel *et al.*, 2001a; Reichel *et al.*, 1998). Die Detektion dieser NHEJ-spezifischen Sequenz-Modifikationen führte zur Schlussfolgerung, dass die Translokationen wahrscheinlich über DSBe oder initiale Einzelstrangbrüche (SSBs) induziert und diese über einen anschließenden NHEJ-Prozess, ohne Beteiligung der V(D)J-Rekombination, fehlerhaft repariert wurden (Reichel *et al.*, 2001a; Reichel *et al.*, 1998).

### **1.4.2 Homologie-gerichtete Reparatur (HDR)**

Die Homologie-gerichtete Reparatur (HDR) umfasst Rekombinationsprozesse, die im Vergleich zu NHEJ, eine unbeschädigte, zur Bruchregion homologe Matrize des Genoms (Schwesterchromatide, homologe Chromosomen oder sich wiederholende Abschnitte auf den selben oder anderen Chromosomen) zur Reparatursynthese nutzen (Johnson and Jasin, 2000; Shrivastav *et al.*, 2008).

Die konservative homologe Rekombination (HR) gilt als die fehlerfreie Form der HDR, da der DSB unter Benutzung einer Matrize ohne Sequenzverlust akkurat repariert werden kann.

Wird ein DSB detektiert, vermittelt wahrscheinlich der ATM (*ataxia telangiectasia mutated protein*) kontrollierte MRN-Komplex, über die Prozessierung der DNA-Termini, die initiale Schadensantwort (Lim *et al.*, 2000; Tauchi *et al.*, 2002). Danach folgen im wesentlichen drei Schritte: Die DNA-Strang-Invasion, die *branch migration* und die Auflösung der Holliday – Struktur, z.B. durch spezifische Endonukleasen in zwei Duplexe.

*In vitro* Daten legen nahe, dass BRCA2 (*breast cancer 2*) in Säugetieren zur Rekrutierung von Rad51 an die DNA-DSB-Enden beiträgt und Rad51 in Folge dessen nach der Homologiesuche die Strang-Invasion vermittelt (Shivji *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2003). Hierbei formt die Rad51 Rekombinase, mittels akzessorischer Faktoren, ein langes helikales Polymer, welches sich um die durch nukleolytische Resektion entstandenen einzelsträngigen 3'-DNA Überhänge legt, um ein Nukleoprotein-Filament zu bilden (Benson *et al.*, 1994).

Dieses Nukleoprotein-Filament wandert an der homologen Region der Ziel-Duplex ein und bildet eine sogenannte Kreuzungs- oder Holliday-Struktur aus, die durch Strangwanderung (*branch migration*) verschoben werden kann. Es wurde gezeigt, dass Rad54 mit hoher Spezifität an solche Holliday-Strukturen bindet und in einer ATPase abhängigen Weise die Strangwanderung vorantreibt (Bugreev *et al.*, 2006; Mazina *et al.*, 2007), dabei stimuliert Rad51 diese Aktivität von Rad54 (Rossi and Mazin, 2008). Weitere, an diesem Prozess beteiligte Proteine sind die Helikasen RECQ1 (Bugreev *et al.*, 2008) und möglicherweise WRN (Opresko *et al.*, 2009).

Nachdem die DNA-Stränge durch die Strangwanderung über eine ausreichende Homologielänge miteinander gepaart wurden, erfolgt die Auflösung der Holliday-Strukturen. Hierbei gibt es verschiedene Varianten. So kann die Dissoziation ohne *crossing-over* Ereignisse, durch „Ausklinken“ der Holliday-Strukturen, erfolgen (Johnson and Jasin, 2000) oder über endonukleolytische Spaltung der Holliday-Strukturen bei gleicher Wahrscheinlichkeit für entstehende oder fehlende *crossing-over* Ereignisse. An letzterer Form der Dissoziation ist wahrscheinlich ein Komplex aus BLM, einer RecQ-artigen Helikase, Topo III und BLAP75 (*BLM associated protein 75*) beteiligt (Raynard *et al.*, 2006).

Nach Auflösung der Holliday-Strukturen werden abschließend die DNA-Lücken durch weitgehend unbekannte Polymerasen aufgefüllt (Maloisel *et al.*, 2008) und der Bruch mittels Ligasen versiegelt. BRCA1 (*breast cancer 1*) übt durch die Interaktion mit BARD1 (*BRCA1 associated RING domain 1*) und BACH1 (*BTB and CNC homology 1*) möglicherweise solch eine Ligasefunktion aus (Greenberg *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zur HR ist das single-strand-annealing (SSA) mit dem Verlust genetischer Information verbunden, da es innerhalb dieses Prozesses zur Resektion von DNA-Abschnitten

kommt. Es findet meist zwischen sich wiederholenden Sequenzen der selben DNA-Duplex statt. Ebenso wie für die HR scheint der MRN-Komplex über die mögliche Beteiligung am exonukleolytischen Abbau der DNA-Enden eine entscheidende Rolle bei der Initiation dieser Reparatur zu spielen (Paull and Gellert, 1999; Tauchi *et al.*, 2002). Dieser Abbau erfolgt solange bis auf beiden Seiten des Bruchs eine homologe Region (zwischen 30-100 bp flankierend zum DSB) einzelsträngig freigelegt wurde. Diese beiden homologen Abschnitte werden, in einer Rad51-unabhängigen Weise, miteinander gepaart. Die Ausbildung dieses Intermediats wird, zumindest *in vitro*, über das DNA-Bindungs- und DNA-Hybridisierungs-Vermögen von Rad52 unterstützt (West, 2003). Danach werden die einzelsträngigen nicht-komplementären Überhänge über Nukleasen entfernt, wodurch es zum Verlust einer der repetitiven Einheiten und der intermediären DNA-Sequenz kommt. Abschließend werden, wie bei HR, die verbleibenden DNA-Lücken über noch nicht eindeutig identifizierte Polymerasen aufgefüllt und die beiden DNA Enden miteinander ligiert.

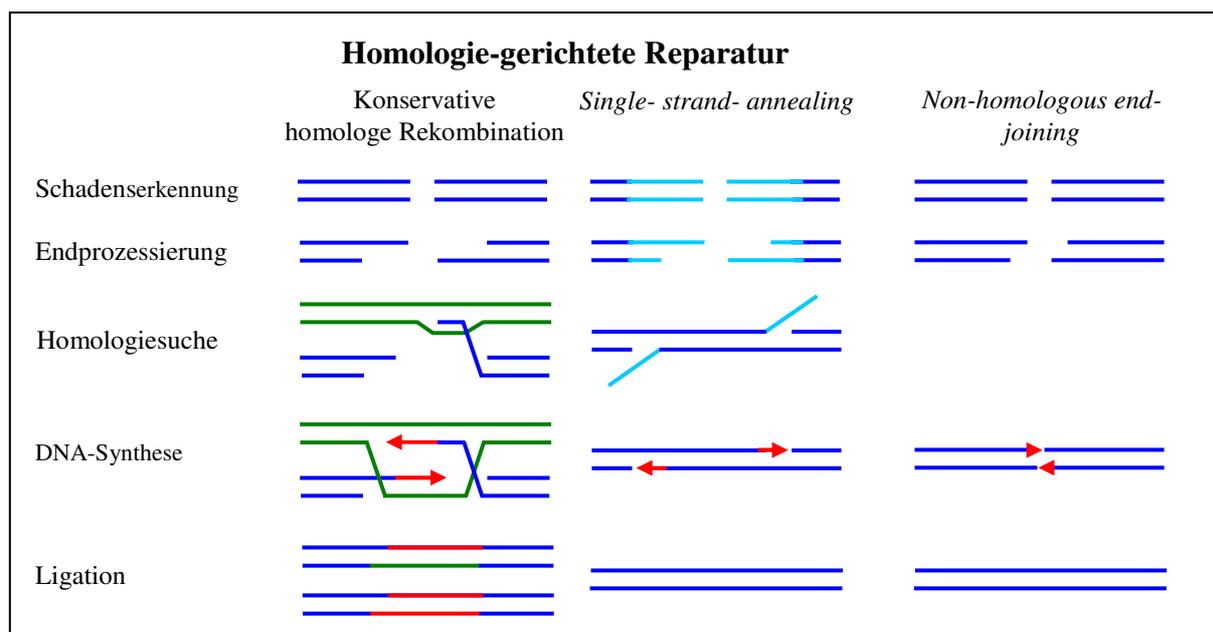
In Abhängigkeit von repetitiven Sequenzen der DNA wird sowohl die Beteiligung der HR als auch des SSA an der Entstehung von genomischen Rearrangements diskutiert (Agarwal *et al.*, 2006; Aplan, 2006; Hedges and Deininger, 2007). Solche repetitiven Elemente sind im humanen Genom mit mindestens 45 % sehr häufig vertreten. Die größte Familie der repetitiven Sequenzen sind die Alu-Elemente mit ca. 11 % (Lander *et al.*, 2001). Sie bestehen aus ca. 300 bp mit ähnlichen, aber nicht identischen Sequenzen. Die intrachromosomale Alu-Alu Rekombination ist für meiotische Zellen ein gut dokumentiertes Ereignis (Kolomietz *et al.*, 2002). Die Vermittlung von interchromosomalen Translokationen über Alu-Elemente wurden z.B. für einige komplexe *BCR-ABL* Translokationen (Jeffs *et al.*, 1998) und einen AML-Fall mit *MLL-AF9* Translokation (Super *et al.*, 1997) beschrieben. Sie scheinen jedoch seltene Ereignisse zu sein (Kolomietz *et al.*, 2002). In den meisten Fällen von reziproken Translokationen mit implizierter Beteiligung von Alu-Elementen, ist eines der Alu-Elemente primär mit einer Alu-freien Sequenz oder einer stark divergierenden Alu-Sequenzen fusioniert. Des Weiteren sind die Alu-Elemente zwar meist in der näheren Umgebung des Bruchpunkts lokalisiert, aber nicht am Bruchpunkt selbst (Blanco *et al.*, 2001; Kolomietz *et al.*, 2002).

Wesentlich häufiger wurde die Rekombination zwischen Alu-Elementen im Fall von *MLL*-PTDn in AML-Patienten ohne zytogenetische Defekte ermittelt (Caligiuri *et al.*, 1994; Schichman *et al.*, 1994; So *et al.*, 1997; Strout *et al.*, 1998). Strout *et al.* detektierte z.B. in sieben von neun analysierten *MLL*-PTD-Fällen Rekombination zwischen den Alu-Elementen des *MLL* Lokus, die konsistent mit einer Reparatur über den *single-strand-annealing* (SSA)

Signalweg waren (Strout *et al.*, 1998).

Ein interessanter Zusammenhang zeigte sich in einem Modellsystem mit Translokations-Reportern zur Analyse der verwendeten Reparaturform zwischen Sequenzen mit unterschiedlich stark divergierenden Alu-Elementen. Innerhalb dieses Systems wurde mit steigender Divergenz der Alu-Elemente eine Verlagerung der Reparatur von *single-strand-annealing* zu *non-homologous end-joining* (NHEJ) detektiert. Die Experimente demonstrierten, dass die Sequenzdivergenz in Säugerzellen einen markanten Einfluss auf die Wahl des Reparaturwegs während der Translokationsformation hat (Elliott *et al.*, 2005).

Das, in dieser Arbeit analysierte, *MLLbcr*-Fragment (Abb. 1) weist selbst keine Alu-Elemente auf, doch stellt das hier verwendete Vektor-basierte Modellsystem in Form von mutierten *EGFP*-Genen zwei lange repetitive Sequenzen zur Verfügung, die nach Bruch-Induktion im *MLLbcr*-Fragment sowohl zur Reparatur über die HR als auch über das SSA beitragen können (Akyüz, 2001; Akyüz *et al.*, 2002).



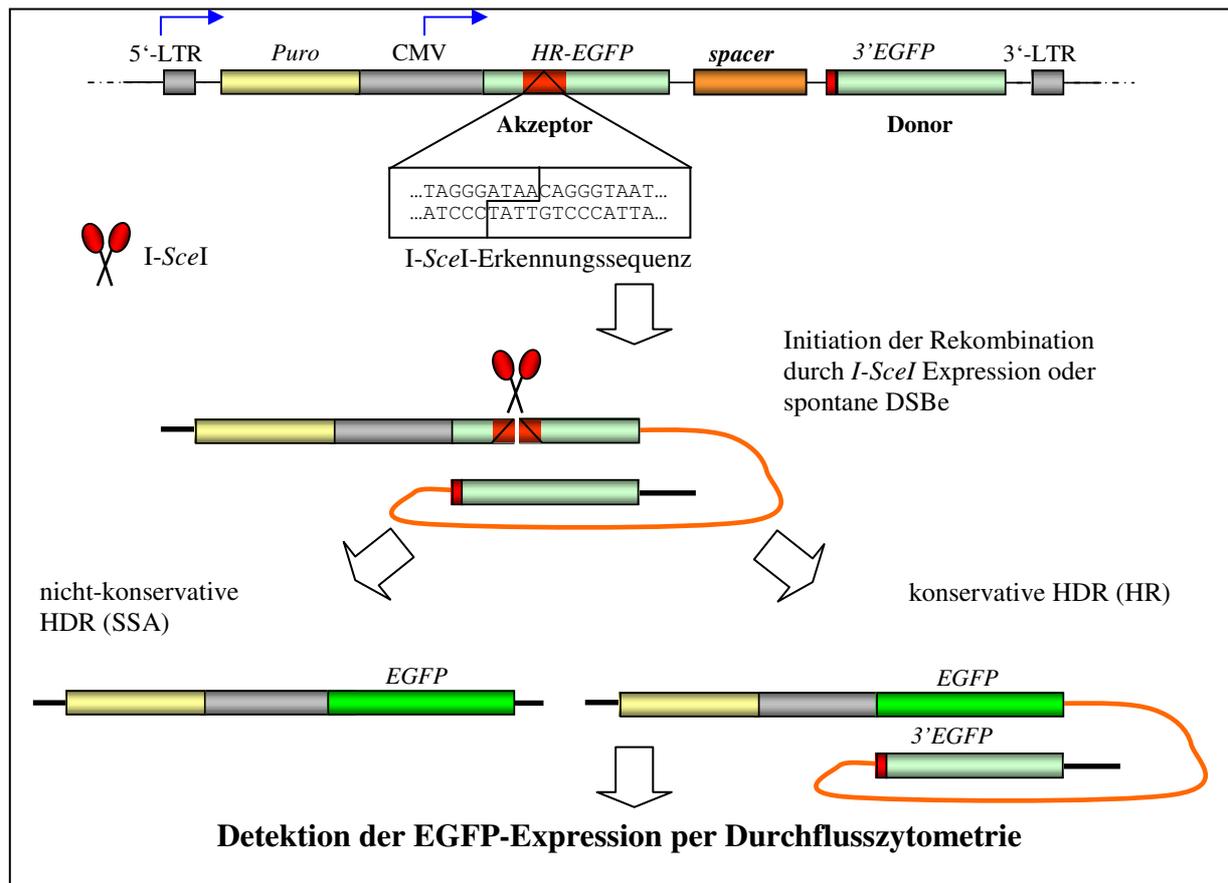
**Abb. 2 Schematische Darstellung der DNA-DSB Reparatur-Wege.**

Das gebrochene DNA-Molekül wird über die blaue Doppellinie dargestellt. Innerhalb der HR symbolisiert die grüne Doppellinie die zur akkuraten Reparatur benötigte homologe doppelsträngige DNA-Matrize. Strang-Invasion, Ausbildung der Holliday-Strukturen und *branch migration* der HR werden unter den Abbildungsteilen „Homologiesuche“ und „DNA-Synthese“ grafisch dargestellt. Die beiden untersten Duplexe der HR weisen auf die Möglichkeit der Reparaturprodukte mit (obere Duplex) und ohne (untere Duplex) *crossing over* Ereignisse hin. Die hellblauen Linien des *single-strand-annealing* (SSA) verdeutlichen die nicht-homologen intermediären Regionen angrenzend zu homologen Bereichen in blau. Im Fall des *non-homologous end-joining* wurde eine Endprozessierung aufgezeigt, die für die fehlerfreie Variante des NHEJ nicht nötig ist. Die roten Pfeile symbolisieren stets Polymerase-getriebene DNA-Synthese-Reaktionen.

## 1.5 Das Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem

Um einerseits die Homologie-gerichtete Reparatur und andererseits indirekt die Bruchinduktion an DNA-*cis*-Elementen, wie der *MLLbcr*, zu detektieren, wurde das Fluoreszenz-basierte Testsystem modifiziert, indem die zu analysierenden DNA-*cis*-Elemente als *spacer*-Region in den Testvektor pHR-EGFP/3'EGFP integriert wurden. Dieser Vektor umfasst zwei mutierte *EGFP* (*enhanced green fluorescent protein*)-Gene, die kein grün fluoreszierendes Protein exprimieren können. Im *HR-EGFP*-Gen wurden 4 bp der Chromophorregion durch eine I-*SceI*-Schnittstelle ersetzt und im 3'EGFP wurde das ATG-Startkodon durch die Stopkodons TAG/TGA ersetzt (Akyüz *et al.*, 2002). Die I-*SceI* Erkennungssequenz der aus den Mitochondrien der Hefe isolierten Endonuklease I-*SceI* umfasst 18 Nukleotide und existiert nur sehr selten in Mammaliazellen. Sie bietet die Möglichkeit einen spezifischen künstlichen DSB in den Reparaturvektor pHR-EGFP/3'EGFP einzuführen und somit das Reparaturverhalten in Mammaliazellen zu untersuchen (Akyüz *et al.*, 2002; Rouet *et al.*, 1994b). Wird diese Schnittstelle nicht genutzt, können mit dem Vektor-basierten System spontane DSBs innerhalb der mutierten *EGFP*-Gene und *spacer*-Region über deren Reparatur detektiert werden. Die HR und das SSA sind die, durch den in dieser Arbeit verwendeten Basisvektor pHR-EGFP/3'EGFP, erfassbaren Reparaturarten. Die erfolgreiche Reparatur des DSBs führt zur Rekonstitution des wt-*EGFP*-Gens und folglich zur Expression des grün leuchtenden Proteins innerhalb einer Zelle, welches über Durchflusszytometrie detektiert und analysiert werden kann (Abb. 3). Der Vektor ermöglicht Experimente im transienten und chromosomalen Kontext. Bei transienten Untersuchungen wird der Vektor über Transfektion von Säugerzellen für mehrere Tage in die Zellen eingeschleust. Bei chromosomalen Experimenten werden Zellen mit dem Vektor transfiziert und das Rekombinationskonstrukt (CMV-*HR-EGFP-spacer-3'EGFP*) stabil in das Genom der Zelle integriert. Über Puromycin-Selektion werden die Zellen mit chromosomal integriertem Rekombinationskonstrukt und vorgelagerter Puromycin-Resistenz-Kassette (*Puro*) vereinzelt (Abb. 3).

Neben der Analyse genetischer Rearrangements am *MLLbcr*-Fragment wurde in einem weiteren Teilprojekt dieser Arbeit das Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem für Untersuchungen des Zusammenspiels der regulatorischen Faktoren PARP-1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1), p53 und Topo I in der HDR eingesetzt.



**Abb. 3 Prinzip des Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystems**

Die Initiierung der Rekombination erfolgt entweder über spontane DSBs oder kann künstlich über einen spezifischen DSB an der I-SceI-Erkennungsstelle durch die Expression der Meganuklease I-SceI induziert werden. Unter Beteiligung der mutierten EGFP-Gene führt die Rekombination (SSA oder HR) zur Rekonstitution des wt-EGFP-Gens. Dieses wt-Gen führt zur Expression eines grün fluoreszierenden Proteins (EGFP), welches mittels Durchflusszytometrie detektiert werden kann.

## 1.6 PARP-1, p53 und Topo I im Kontext der HDR

PARP-1 spielt eine fundamentale Rolle in der Rekrutierung und Modulation enzymatischer und regulatorischer Faktoren, die in die Transkription, DNA-Replikation, Reparatur und Rekombination involviert sind (Burkle, 2005; Faraone-Mennella, 2005; Huber *et al.*, 2004). PARP-1 katalysiert hauptsächlich die Poly(ADP-ribosyl)ierung vieler dieser Proteine, inklusive seiner eigenen, die nach dessen Automodifikation zur Dissoziation des Faktors von der DNA führt (Ferro and Olivera, 1982). Da PARP-1 neben SSBs auch an DSBen bindet, mit Ku70/80 und WRN interagiert sowie die biochemische Aktivität von DNA-PK<sub>cs</sub> und WRN reguliert, wurde bereits von einigen Forschergruppen die potentielle Aktivität von PARP-1 in der DSB-Reparatur untersucht (Ariumi *et al.*, 1999; Galande and Kohwi-Shigematsu, 1999; Ruscetti *et al.*, 1998; von Kobbe *et al.*, 2004).

Es wurde gezeigt, dass es nach der Behandlung von Säugerzellen mit einem Inhibitor der Poly(ADPribosyl)ierung zu niedrigeren Frequenzen der illegitimen Rekombination kommt

(Waldman and Waldman, 1990). In Konsistenz mit diesen Daten fand Rudat *et al.* 2001, dass die Überexpression der bloßen DNA-Bindedomäne von PARP (PARP-DBD), welche eine *trans*-dominante Inhibition der Poly(ADPribose)lierung verursacht, die Wiederverknüpfung von IR (*ionizing radiation*)-induzierten DSBen hemmt. Dies impliziert, dass PARP-1 dem NHEJ entgegenwirkt, wenn es stabil gebunden an DNA-Strang-Unterbrechungen vorliegt (Rudat *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu zeigte eine biochemische Studie, dass PARP-1 auf einem alternativen Zweig der DSB-Religation, die den DNA-PK-abhängigen Signalweg komplementiert, Synapsis-Aktivität vermittelt (Audebert *et al.*, 2004). Hohe Niveaus an Schwesterchromatid-Austauschen (SCE) in Zellen von PARP-1<sup>-/-</sup> Mäusen indizierten eine Rolle von PARP-1 beim Schutz gegen exzessive HR (de Murcia *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997). Des Weiteren wurde durch den Anstieg der nukleären Rad51 Foci-Formation, ein Phänotyp der Hyperrekombination in Zellen von PARP-1<sup>-/-</sup> Mäusen und in wt-Zellen nach Behandlung mit einem Inhibitor der Poly(ADPribose)lierung, impliziert (Schultz *et al.*, 2003). Die Ergebnisse früherer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur besseren Diskriminierung zwischen zeitiger DSB-Reparatur und darauffolgenden apoptotischen Prozessen, welche möglicherweise indirekt die DSB-Reparatur erhöhen, demonstrierten eine Reduktion der HDR-Frequenz über exogen exprimiertes PARP-1 (Susse *et al.*, 2004). Hingegen fand Yang *et al.*, unter Benutzung eines ähnlichen Testsystems, keinen Beweis für die Interferenz von PARP-1 mit der DSB-Reparatur, obwohl die Steigerung der Rad51 Foci-Formation und des SCE in Zellen von PARP-1<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigt war (Yang *et al.*, 2004).

Der Tumorsuppressor p53 repräsentiert ein weiteres PARP-1 Zielprotein und ist als ein Antagonist der fehlerhaften HDR etabliert (Bertrand *et al.*, 2004; Gatz and Wiesmuller, 2006; Kumari *et al.*, 1998; Sengupta and Harris, 2005; Vaziri *et al.*, 1997; Wesierska-Gadek *et al.*, 1996). Eine steigende Anzahl von Beweisen hat demonstriert, dass p53 die HR unabhängig von seinen transkriptionellen Transaktivierungs-, Zellzyklus-Kontroll- und proapoptischen Funktionen reguliert. Es zeigte sich vielmehr, dass p53 möglicherweise über physikalische Interaktionen mit Rad51, Rad54, RPA, BRCA1, BRCA2, BLM und/oder WRN sowie DNA-Intermediaten des homologen Austausches mit der HR interferiert. In Analogie dazu wurde für p53 die Inhibition des fehlerhaften NHEJ impliziert (Akyüz *et al.*, 2002; Dahm-Daphi *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2003). Interessanterweise entdeckte unsere Arbeitsgruppe unter Anwendung eines SV40-basierten Rekombinations-Testsystem, dass p53 die Rekombination innerhalb eines Fragments der *retinoic acid receptor  $\alpha$*  Bruchpunktregion (*RAR $\alpha$ bc*) steigerte. Dieses kurze Fragment enthält zwei Topo I Erkennungssequenzen und ist innerhalb des Testsystems responsiv auf den Topo I-Inhibitor Camptothecin (Boehden *et al.*, 2004). Da p53

zusammen mit Topo I stabile Komplexe bildet und die Topo I-vermittelte Relaxation von *supercoiled* DNA steigert, wurde bereits früher eine funktionelle Verbindung zwischen p53 und Topo I angenommen (Albor *et al.*, 1998; Gobert *et al.*, 1999). Mutanten-Analysen zeigten, dass Mitglieder der *Rad52* Epistasegruppe in die Reparatur der Topo I-DNA Komplexe involviert sind und indizierten somit eine kritische Rolle des HDR-Wegs (Pommier *et al.*, 2003; Vance and Wilson, 2001). Im Zusammenhang mit PARP-1 konnte für Topo I sowohl die physikalische Interaktion mit PARP-1 als auch die katalytische Modifikation durch PARP-1 gezeigt werden (Bauer *et al.*, 2001). Die bisherigen Daten der verschiedenen Forschergruppen untermauern demzufolge eine mögliche Beteiligung der Faktoren PARP-1, p53 und Topo I an der Regulation der HDR und deuten auf ein Zusammenspiel der Proteine innerhalb dieser Regulation hin.

## 1.7 Problemstellung

Leukämien mit *MLL*-Beteiligung sind aufgrund ihrer geringen Heilungschancen bei Kleinkindern (Ayton and Cleary, 2001; Felix *et al.*, 2000) und ihrer hohen Inzidenz bei Sekundärleukämien (Felix, 1998) ein wichtiges Forschungsgebiet. Zur Entwicklung einer verbesserten Prävention, Diagnose und Therapie dieser Erkrankung ist die Aufklärung der grundlegenden Mechanismen, die zur Entstehung *MLL*-involvierter Leukämien beitragen, von großer Bedeutung.

Aufgrund der Anhäufung von leukämogenen Bruchpunkten innerhalb einer 8,3 kb großen Region des *MLL*-Gens, die sogenannte *bcr*, ist dieser DNA-Bereich von besonderem Interesse. Die Kartierung einer Vielzahl von Bruchpunkten in dieser Region führte zur Annahme, dass die *MLLbcr* eine hochfragile DNA-Sequenz ist. Dies konnte bisher jedoch nicht eindeutig bewiesen werden. So könnte die häufige Beteiligung von *MLL*-Rearrangements an Leukämien ebenso im Zusammenhang mit einem über die onkogenen *MLL*-Fusionsproteine vermittelten Wachstums-/Überlebensvorteil stehen (Harper and Aplan, 2008).

Um die Instabilität der *MLLbcr* näher zu untersuchen sollte das Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem im ersten Teil dieser Arbeit in einer Weise modifiziert werden, die den Vergleich des *MLLbcr*-Fragments mit einer Vielzahl anderer DNA-Sequenzen, im transienten und chromosomalen Kontext, erlaubt. Die Ermittlung der Suszeptibilität der DNA-Sequenzen gegenüber DSBen, im zweiten Teil der Arbeit, sollte dabei über die Detektion von Reparaturereignissen nach spontaner Bruchentstehung erfolgen.

Mehrere Studien brachten die implizierte Fragilität der *MLLbcr* in Zusammenhang mit dem

Einfluss von Chemotherapeutika, insbesondere von Topo II-Inhibitoren (Felix, 1998; Lovett *et al.*, 2001; Whitmarsh *et al.*, 2003). Um zu klären welche Auswirkungen verschiedene biologische und chemische Agenzien auf genetische Rearrangements am *MLLbcr*-Fragment haben, sollten lymphoblastoide Zellen systematisch mit Chemotherapeutika unterschiedlicher Wirkstoffklassen behandelt und die Rekombination am *MLLbcr*-Fragment im Vergleich zu Kontrollsequenzen über das Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem analysiert werden.

Aufgrund einer möglichen Beteiligung des CD95-Rezeptor-vermittelten Apoptose-Signalwegs an der *MLLbcr*-Bruchinduktion (Betti *et al.*, 2001; Betti *et al.*, 2003) sollte des Weiteren der Einfluss eines Induktors dieser apoptotischen Kaskade auf das Rekombinationsverhalten am *MLLbcr*-Fragment untersucht werden.

Parallel zu den Rekombinationsanalysen sollten Veränderungen in der Zellzyklusverteilung und dem Zelltodanteil ermittelt werden. Diese Untersuchungen ermöglichten eine Diskriminierung dieser von anderen Prozessen, die die Rekombination beeinflussen können.

Zur Klärung der Beteiligung von Chemotherapeutika an der direkten Bruchinduktion am *MLLbcr*-Fragment sollte ein PCR-basiertes semiquantitatives DSB-Nachweisverfahren eingesetzt werden.

Zur weiteren Diskriminierung von Signalwegen, die die Rekombination an den DNA-*cis*-Elementen oder die Bruchinduktion beeinflussen, sollten im weiteren Verlauf verschiedene regulatorische Faktoren gehemmt werden. Alle Analysen sollten sowohl im transienten, als auch im chromosomalen Kontext erfolgen. Die Untersuchungen von Kontroll- vs. *MLLbcr*-Sequenzen sollte die Bewertung Sequenz-unabhängiger und *MLL*-spezifischer Einflussfaktoren der genetischen Rearrangements ermöglichen.

Im dritten Teil dieser Arbeit sollte, basierend auf der Entdeckung, dass p53 die HDR an der Topo I-Erkennungssequenzen-tragenden Bruchpunktregion *RAR $\alpha$*  (*retinoic acid receptor  $\alpha$* ) in einem SV40-basierten Rekombinations-Testsystem stimuliert (Boehden *et al.*, 2004), weiterführende Untersuchungen im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang sollten mittels Repressions- und Überexpressionsexperimenten insbesondere das Zusammenspiel der regulatorischen Reparatur-modifizierenden Faktoren p53, PARP-1 und Topo I analysiert werden. Wie im zweiten Teil der Arbeit sollte das Rekombinationsverhalten im transienten und chromosomalen Kontext untersucht werden. Um die möglichen Einflüsse der direkten physikalischen Interaktion von der enzymatischen Aktivität von PARP-1 zu unterscheiden, sollten zusätzlich die C-terminal trunkeerte PARP-1 Mutante PARP-DBD analysiert werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Agarosegelelektrophorese-Kammern:

*RunOne* Embitec, San Diego, CA, USA

*PerfectBlue Mini* PeqLab, Erlangen

Analysenwaage:

P1200 Mettler, Gießen

Sartorius BP61 Sartorius, Göttingen

Autoklav:

Varioklav 75S H+P, Oberschleißheim

Brutschränke:

Inkubator B6760 Heraeus, Hanau

Inkubator 311 Thermo, Egelsbach

Inkubator 3862 Forma Scientific, Marietta, OH, USA

*Concentrator 5301*

Eppendorf, Hamburg

Durchflusszytometer:

FACSCalibur™ Becton Dickinson, Heidelberg

FACSCalibur™ HTS Becton Dickinson, Heidelberg

Eismaschine

Ziegra, Isernhagen

Gefrier-und Kühlsysteme:

-86 °C, HFU3285SITOP-V37 Kendro, Asheville, NC, USA

-86 °C, *Forma Scientific 917* Thermo, Fremont, CA, USA

*Premium NoFrost* Liebherr, Ochsenhausen

*Froster-520* Kirsch, Offenburg

Geldokumentationsanlage:

*MultiImage™ Light Cabinet* Biozym Diagnostik, Oldenburg

Gelgießkammer SE200 Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA

*Gene Pulser®* mit *Pulse Controller*:

Biorad, München

Magnetrührer:

Heidolph MR1 Heidolph Instruments, Schwabach

IKA-Combimag RCO	Janke&Kunkel, Staufen im Breisgau
Mikroskope:	
Axiovert 25	Zeiss, Jena
Olympus IX50-S8F	Olympus, Tokyo, Japan
Olympus BX51	Olympus, Tokyo, Japan
Mikrotiterplatten-Photometer MRX	Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA
Mikrowelle MS-1915H	LG Electronics, Seoul, Korea
PCR-Geräte Primus	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter MP230	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Photometer DU640	Beckman, München
Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem:	
SE250	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>Mighty Small II</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Stromversorgungsgeräte:	
EPS 1000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EPS 1001	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
EPS 2A 200	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
Schüttelinkubatoren:	
Certomat <sup>®</sup> R	B. Braun Biotech Int., Melsungen
<i>Phero-Shaker</i>	Biotec-Fischer, Reiskirchen
<i>Variospeed</i>	Biotec-Fischer, Reiskirchen
<i>Easia<sup>®</sup>Shaker</i>	Medgenix, Ratingen
Sterilbank:	
<i>Clean Air DLF/REC6</i>	Clean Air Techniek, Woerden, Niederlande
<i>Clean Air DLF/BSS6</i>	Clean Air Techniek, Woerden, Niederlande
Stickstofftanks:	
Apollo200	Messer-Griessheim, Euteneuen
BT40	L'air Liquide, Champigny, Frankreich
<i>Test-Tube-Rotator</i>	Snijders, Tilburg, Niederlande
Ultraschallbad Sonorex RK31	Bandelin, Berlin
Western-Blotkammer TE Series	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

VortexGenie 2 Bender und Hobein, Zürich

Zentrifugen:

Biofuge 13	Heraeus-Sepatech, Osterode
Biofuge pico	Kendro, Osterode
Multifuge 1 <sub>S-R</sub>	Kendro, Osterode
Multifuge 3 <sub>S-R</sub>	Kendro, Osterode
Rotanta 96R	Hettich, Tuttlingen

### 2.1.2 Software

<i>BD<sup>TM</sup> PlateManager 1.0.1</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>BD Cell Quest<sup>TM</sup> Pro 4.0.2</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>BD Cell Quest<sup>TM</sup> Pro 5.2.1</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Cell<sup>F</sup> 2.5</i>	Soft Imaging System, Münster
<i>ChemImager<sup>TM</sup> 5500</i>	Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA
<i>Clone Manager 7.04</i>	Scientific&Educational Software, Cary, NC, USA
DU640 Benutzersoftware	Beckman, München
Gimp 2.2	FSFE, Düsseldorf
Magellan 3	Tecan, Crailsheim
<i>Microsoft Office Professional 2003</i>	Microsoft, Redmond, WA, USA
<i>ModFit LT<sup>TM</sup> version 3</i>	Verity Software House, Topsham, ME USA
<i>Reference Manager Professional 10</i>	Thomson ResearchSoft, Stamford, CT, USA

### 2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG (Heidelberg), Riedel de Hën AG (Seelze) und Geschäftsbereich Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen. Spezielle Chemikalien, Enzyme und Produkte stammten von folgenden Firmen:

#### 2.1.3.1 Chemotherapeutika und Anti-CD95

5-Fluorouracil	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aphidicolin	MP-Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Camptothecin	Sigma-Aldrich, München

Etoposid	Sigma-Aldrich, München
MNNG	Prof. Alexander Bürkle, Konstanz
Paclitaxel	Sigma-Aldrich, München
Anti-CD95 (Klon7C11)	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

### 2.1.3.2 Enzyme

<i>Klenow-Fragment</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Proteinase K</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Pwo-DNA-Polymerase</i>	Peqlab, Erlangen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt/M. MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>RNAse A</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim Marligen, Ijamsville, MD, USA
<i>SAP (shrimp alkaline phosphatase)</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>T4-DNA-Ligase</i>	Roche, Mannheim
<i>T4-DNA-Polymerase</i>	New England Biolabs, Frankfurt/M.
<i>T4-Polynukleotid-Kinase</i>	New England Biolabs, Frankfurt/M.
<i>Taq-DNA-Polymerase</i>	Quiagen, Hilden; PeqLab, Erlangen

### 2.1.3.3 Chemikalien

Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamide/Bis Solution (19:1) 40% (w/v)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar, - Trypton, - Hefe-Extrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
$\beta$ -Glycerolphosphat	
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	New England Biolabs, Frankfurt/M.
Cryomaxx S (Einfriermedium)	PAA, Pasching
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
ddH <sub>2</sub> O	Fresenius Kabi, Bad Homburg

DMEM	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
dNTPs	Roche, Penzberg
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Applichem, Darmstadt
<i>epidermal growth factor</i> (EGF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EGTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Fetal Calf Serum Gold</i> (FCS)	PAA, Pasching
FACS-Clean, -Rinse, -Flow	Becton-Dickinson, Heidelberg
Glycerol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Glycerolphosphat	Merck, Darmstadt
Glycin	Applichem, Darmstadt
Größenstandards:	
<i>GeneRuler™DNA Ladder Mix</i> (100-10000 bp)	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
<i>PageRuler™Pre-Stained Protein Ladder</i>	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
<i>PageRuler™Pre-Stained Protein Ladder Plus</i>	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Hepes-Puffer	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Insulin	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Seelze
Isoseptol	Apotheke, Universität Ulm
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrome, Berlin
β-Mercaptoethanol	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Magermilchpulver (Marvel)	Premier Brands, Spalding, U.K.
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumchlorid	Applichem, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumperiodat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nicht essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
Nonident P40	Fluka, Neu Ulm
<i>Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium</i>	Invitrogen, Karlsruhe
PBS (1x/10x)	PAA, Pasching
PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1))	Biomol, Hamburg
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteaseinhibitor-Tabletten	Roche, Mannheim
Puromycin	Serva, Heidelberg
Refobacin	Merck, Darmstadt
Rotiphorese 10x SDS Page	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 ohne Phenolrot	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
RPMI 1640	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sterofundin	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
TEMED	Roth, Karlsruhe
Trisma-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching
Tween 20	Fluka, Neu Ulm
<b>2.1.4 Sonstige Materialien</b>	
<i>Annexin-V-FLUOS Staining Kit</i>	Roche, Penzberg
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	ThermoScientific, Rockford, IL, USA

<i>Blood and Cell Culture DNA Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Cryo IC Freezing Container</i>	Nalgene, Rochester, NY, USA
Chemilumineszenz Substrate:	
<i>SuperSignal West Pico</i>	ThermoScientific, Rockford, IL, USA
<i>SuperSignal West Dura Extended Duration</i>	ThermoScientific, Rockford, IL, USA
Dialyseplättchen	Millipore, Schwalbach
Einfrierröhrchen	Greiner-Bio-One, Frickenhausen
Elektroporationsküvetten (0,4 mm)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
FACS-Rundbodenröhrchen (5ml)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Falconröhrchen 15 ml/ 50 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg
Filterpapier Whatman 3 MM	Schleicher und Schüll, Dassel
<i>FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent</i>	Roche, Mannheim
Hybond-C-Extra, Nitrocellulose	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Immobilon-P Membran (PVDF)	Millipore, Eschborn
<i>Lipofectamine<sup>™</sup>2000 Reagent</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>PowerPrep<sup>™</sup> HP Plasmid Maxiprep Kits</i>	Marligen, Ijymsville, MD, USA
<i>Rapid DNA Ligation Kit</i>	Roche, Mannheim
Reaktionsgefäße 0,5ml/1,5ml/2ml	Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nürnbrecht
<i>Restore<sup>™</sup> Western Blot Stripping Buffer</i>	ThermoScientific, Rockford, IL, USA
<i>QIAEX II Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick PCR-Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
ZK 96-, 24- und 6-Loch-Platte	Sarstedt, Nürnbrecht; Nunc, Wiesbaden
ZK-Platte 9 cm/15 cm	Sarstedt, Nürnbrecht; Nunc, Wiesbaden

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

4x SDS Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
4x SDS-Trenngelpuffer	20 mM Tris/HCl, pH 7,6 0,4 % (w/v) SDS

---

<i>Annealing</i> -Puffer	100 mM Kaliumacetat 30 mM HEPES-KOH, pH 7,4 2 mM Magnesiumacetat
5 x DNA-Probenpuffer	50 % (v/v) Glycerin 0.1 g/l SDS 100 mM EDTA 0,25 % (w/v) Bromphenolblau (BPB)
Fixierlösung	40 % (v/v) Ethanol 50 % (v/v) Aceton 10 % (v/v) ddH <sub>2</sub> O
<i>10 x High-molecular-weight (HMW)</i> -Puffer	495 mM Tris-Base 400 mM Glycin
Lysepuffer M	0,45 % (v/v) Tween 20 0,45 % (v/v) NP40 1 % (v/v) Proteinase K (frisch zugeben)
PBS-T	0,05 % (v/v) Tween 20 in 1 l PBS (1x)
10 x PI-Färbelösung	500 µg/ml Propidiumiodid 38 mM Natriumcitrat, pH 7,0
1 x PI-Färbelösung zur Zellzyklusanalyse	50 µg/ml RNaseA in mit PBS verdünnter 1 x PI-Färbelösung
2 x SDS-Probenpuffer	125 mM Tris/HCl pH 6,8 3,1 % (w/v) DTT 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 4 % β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
6 x SDS-Probenpuffer	350 mM Tris/HCl pH 6,8 9,3 % (w/v) DTT 10 % (w/v) SDS 36 % (v/v) Glycerin 0,6 % (w/v) Bromphenolblau 5 % β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
Sterofundin/HEPES-Puffer	1% 1M HEPESpuffer in Sterofundinpuffer
50 x TAE	2 M Trisbase 1 M Eisessig 0,1 M EDTA pH 8,3 mit konzentrierter Essigsäure einstellen

TBS-T	20 mM Tris/HCl, pH 7,6 137 mM Natriumchlorid 0,2 % (v/v) Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA, pH 8,0
TFB-I-Puffer	100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub> 30 mM Kaliumacetat 15 % Glyzerin pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen
TFB-II-Puffer	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % (v/v) Glyzerin pH 7,0 mit NaOH einstellen
Tris-Glycin-Puffer	250 mM Glycin 50 mM Tris/HCl, pH 8,3
Zellysepuffer für Proteinextraktion	50 mM Tris-Base (pH 7,4) 150 mM NaCl 2 mM EGTA 2 mM EDTA 25 mM NaF 25 mM β-Glycerolphosphat 0,1 mM NaV 0,2 % (w/v) Triton-X-100 0,3 % (v/v) NP 40 1 Proteaseinhibitorcocktailtablette (frisch zugesetzt)

## 2.1.6 Nährmedien

### 2.1.6.1 Zellkulturmedien

Medium für Brustkrebszellen:

Erhaltungsmedium DMEM 1

12 % (v/v) FCS  
0,1 % (v/v) Refobacin  
1 % (v/v) L-Glutamin  
1 % (v/v) nicht essentielle Aminosäuren  
2,5 ng/ml EGF  
1 µg/ml Insulin  
in DMEM High Glucose-Medium

## Medien für Suspensionszellen:

Erhaltungsmedium RPMI $\phi$ 12/1	12 % (v/v) FCS (östradiolarm; Abschnitt 2.7.1) 0,1 % (v/v) Refobacin 1 % (v/v) L-Glutamin in phenolrotfreies RPMI 1640-Medium
Erhaltungsmedium RPMI 10/1	12 % (v/v) FCS 0,1 % (v/v) Refobacin 1 % (v/v) L-Glutamin in RPMI 1640-Medium
Selektionsmedium	12 % (v/v) FCS 0,1 % (v/v) Refobacin 1 % (v/v) L-Glutamin 0,15 $\mu$ g/ml Puromycin in RPMI 1640-Medium

**2.1.6.2 Bakterienkulturmedien**

LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl in 1 l ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4 Das LB-Medium wurde je nach Anforderung mit 100 $\mu$ g/ml Ampicillin versetzt.
LB-Agar	15 g Bacto-Agar in 1 l LB-Medium (autoklavieren, abkühlen, mit Antibiotika versetzen und ausplattieren)
$\Psi$ -Broth-Medium	10 mM MgSO <sub>4</sub> 10 mM MgCl <sub>2</sub> in LB-Medium mit KOH auf pH 7,6 einstellen

**2.2 Antikörper****2.2.1 Primärantikörper**

Die für Immunoblot-Analysen verwendeten Primärantikörper sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1 Primärantikörper

Name	Beschreibung/Arbeitskonzentration	Herkunft
Anti-Aktin	Polyklonales Ziegen Serum, Klon I-19, erkennt Epitop am C-Terminus von humanem Aktin/ 1/1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA

Anti-CAD	Polyklonales Kaninchenserum, detektiert das 40 kDa humane CAD-Protein/ 1/1000	Chemicon, Billerica, MA, USA
Anti- <i>active</i> Caspase 3	Polyklonales Kaninchenserum, detektiert die 17 kDa große Untereinheit der prozessierten Form von humaner Caspase 3/ 1/400	Chemicon, Billerica, MA, USA
Anti-GAPDH	Monoklonaler Maus-Antikörper, detektiert das 36 kDa humane GAPDH/ 1/2500	Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-HA-Tag (3F10)	Peroxidase-konjugierter Monoklonaler Ratte-Antikörper detektiert das Epitop YPYDVPDYA des Hämagglutinins (HA)/ 1/500	Roche, Penzberg
Anti-ICAD (FL-331)	Polyklonales Kaninchenserum detektiert das 30/45 kDa humane ICAD-Protein am Epitop As 1-331/ 1/4000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
Anti-I $\kappa$ B- $\alpha$ (C-21)	Polyklonales Kaninchenserum, detektiert das 35-37 kDa humane I $\kappa$ B- $\alpha$ Protein am C-Terminus/ 1/1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
Anti-p53 (DO1)	Monoklonaler Maus-Antikörper, detektiert das 53 kDa humane $\alpha$ -Tubulin am Epitop As 426-450/ 1/10000	BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA
Anti- <i>cleaved</i> -PARP	Polyklonales Kaninchenserum, detektiert das große Spaltprodukt, eine Untereinheit von 85 kDa, des humanen PARP/ 1/200	Chemicon, Billerica, MA, USA
Anti-PARP (N-20)	Polyklonales Ziegenserum, detektiert das 116 kDa humane PARP-1 Protein bzw. die 38 kDa PARP-DBD am N-Terminus/ 1/500	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA

Anti-Topoisomerase I (Sc1-70)	Polyklonaler Human-Antikörper aus Skleroderma Patienten, detektiert die 100 kDa humane Topoisomerase I/ 1/5000	TopoGen.Inc, Columbus, OH, USA
Anti- $\alpha$ -Tubulin	Monoklonaler Maus-Antikörper, detektiert das 57 kDa humane $\alpha$ -Tubulin am Epitop As 426-450/ 1/10000	Abcam, Cambridge, MA, USA

### 2.2.2 Sekundärantikörper

Die für Immunoblot-Analysen verwendeten Sekundärantikörper sind in Tab. 2 aufgelistet

**Tab. 2 Sekundärantikörper**

Name	Herkunft
Ziege-anti-Maus IgG, konjugiert mit <i>horse-radish-peroxidase</i> (HRP, affinitätsgereinigt)	Pierce/Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA/ (Arbeitskonzentration 1/5000)
Ziege-anti-Kaninchen IgG, konjugiert mit HRP (affinitätsgereinigt)	Pierce/Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA/ (Arbeitskonzentration 1/10000)
Esel-anti-Ziege IgG, konjugiert mit HRP (affinitätsgereinigt)	Dianova/Jackson, Hamburg / (Arbeitskonzentration 1/50000)

## 2.3 Vektoren und Oligonukleotide

### 2.3.1 Vektoren

Die verwendeten und selbst hergestellten Vektoren sind in Tab. 3 aufgeführt. Die Zielsequenzen für die selbst konstruierten shRNA-exprimierenden Vektoren wurden in der Oligonukleotidliste Tab. 4 angegeben. Alle angeführten Vektoren tragen eine Ampicillin-Resistenz-Kassette.

**Tab. 3 Vektoren**

Vektor	Insertion/Merkmal	Herkunft/Referenz
p5xtrEGFP	Auf dem retroviralen Vektor p5N-M (Laker <i>et al.</i> , 1998) basierend, mit integriertem Stop-EGFP-Gen, bei welchem das Start-Methionin des	(Akyüz, 2001)

	<i>EGFP</i> -Gens durch zwei Stopkodons (TAG-TGA) ersetzt wurde.	
pUC-Cla-Wt- <i>MLL</i> -BCR	Ein pUC18-Derivat, das ein 399 bp Fragment des <i>MLL</i> Genlokus enthält	(Boehden <i>et al.</i> , 2004)
pUC-Cla-Wt- <i>RARα</i> -BCR	Ein pUC18-Derivat, das ein 281 bp Fragment des <i>RARα</i> Genlokus enthält	(Boehden <i>et al.</i> , 2004)
pUC-Kpn-SV40	Das SV40-Genom (5243 bp) über <i>KpnI</i> -Schnittstelle in pUCΔBam kloniert	(Wiesmüller <i>et al.</i> , 1996)
pUC19-IgHE-MAR	Ein pUC19-Derivat, das ein 997 bp- <i>XbaI</i> -Fragment des 5'-MAR des Genlokus der schweren Kette der Immunglobuline der Maus enthält.	Von Dr. K. Will, Hamburg zur Verfügung gestellt
pUC-Puro-CMV-HR	<i>Puromycin-Resistenz-Gen</i> , CMV-Promotor und <i>HR-EGFP-Gen</i> (4 bp an der Chromophor-Region deletiertes <i>EGFP-Gen</i> ) tragender pUC18-Vektor	(Akyüz, 2001)
p3'EGFP- <i>MLL</i> bcr.fwd	Auf p5xtrEGFP basierende Klonierungszwischenstufe mit integriertem <i>MLL</i> bcr-Fragment in Leserichtung	diese Arbeit
p3'EGFP- <i>MLL</i> bcr.rev	Auf p5xtrEGFP basierende Klonierungszwischenstufe mit integriertem <i>MLL</i> bcr-Fragment entgegen Leserichtung	diese Arbeit
p3'EGFP- <i>RARα</i> bcr.fwd	Auf p5xtrEGFP basierende Klonierungszwischenstufe mit integriertem <i>RARα</i> bcr-Fragment in Leserichtung	diese Arbeit
p3'EGFP- <i>RARα</i> bcr.rev	Auf p5xtrEGFP basierende Klonierungszwischenstufe mit integriertem <i>RARα</i> bcr-Fragment	diese Arbeit

	entgegen Leserichtung	
p3'EGFP- <i>IgHE</i> mar.fwd	Auf p5xtrEGFP basierende Klonierungszwischenstufe mit integriertem <i>IgHE</i> mar-Fragment in Leserichtung	diese Arbeit
p3'EGFP- <i>IgHE</i> mar.rev	Auf p5xtrEGFP basierende Klonierungszwischenstufe mit integriertem <i>IgHE</i> mar-Fragment entgegen Leserichtung	diese Arbeit
p3'EGFP- <i>SV40</i> .fwd	Auf p5xtrEGFP basierende Klonierungszwischenstufe mit integriertem <i>SV40</i> -Fragment in Leserichtung	diese Arbeit
pHR-EGFP/3'EGFP- <i>MLL</i> bcr.fwd	Auf p5xtrEGFP basierender Rekombinationsvektor mit integriertem <i>MLL</i> bcr-Fragment in Leserichtung	diese Arbeit
pHR-EGFP/3'EGFP- <i>MLL</i> bcr.rev	Auf p5xtrEGFP basierender Rekombinationsvektor mit integriertem <i>MLL</i> bcr-Fragment entgegen Leserichtung	diese Arbeit
pHR-EGFP/3'EGFP- <i>Rara</i> bcr.fwd	Auf p5xtrEGFP basierender Rekombinationsvektor mit integriertem <i>Rara</i> bcr-Fragment in Leserichtung	diese Arbeit
pHR-EGFP/3'EGFP- <i>Rara</i> bcr.rev	Auf p5xtrEGFP basierender Rekombinationsvektor mit integriertem <i>Rara</i> bcr-Fragment entgegen Leserichtung	diese Arbeit
pHR-EGFP/3'EGFP- <i>IgHE</i> mar.fwd	Auf p5xtrEGFP basierender Rekombinationsvektor mit integriertem <i>IgHE</i> mar-Fragment in Leserichtung	diese Arbeit

pHR-EGFP/3'EGFP- <i>IgHE</i> mar.rev	Auf p5xtrEGFP basierender Rekombinationsvektor mit integriertem <i>IgHE</i> mar-Fragment entgegen Leserichtung	diese Arbeit
pHR-EGFP/3'EGFP- <i>SV40</i> .fwd	Auf p5xtrEGFP basierender Rekombinationsvektor mit integriertem <i>SV40</i> -Fragment in Leserichtung	diese Arbeit
pHR-EGFP/3'EGFP = p5xtrshSV40HygbPuro CMV-HR	Retroviraler Rekombinationsvektor mit ausreichender Homologielänge zur Bestimmung von konservativer und nichtkonservativer Rekombination	(Akyüz, 2001)
p5bPuroCMV-wtEGFP	Positivkontrolle und Wildtyp EGFP- Substrat zur Ermittlung der Transfektionseffizienz	(Akyüz, 2001)
pCMV-I-SceI	Vektor zur Expression der Meganuklease I-SceI unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	Dr. Maria Jasin, Cornell Universität, New York, NY, USA (Rouet <i>et al.</i> , 1994a; Rouet <i>et al.</i> , 1994b)
pcDNA3	Leervektor, zur Expression von cDNA unter der Kontrolle des CMV- Promotors.	Von Dr.B. Baumann, Physiologische Chemie, Universität Ulm zur Verfügung gestellt
pcDNA3-mutIkB $\alpha$	Vektor zur Expression des Superrepressors mutIkB $\alpha$ , in dem die ersten 54 Aminosäuren des <i>IkB<math>\alpha</math></i> - Gens deltiert sind	Von Dr.B. Baumann, Physiologische Chemie, Universität Ulm zur Verfügung gestellt
pLPCX	Retroviraler Leervektor	Clontech, Mountain View, CA, USA
pLPCX-mICAD	Retroviraler Expressionsvektor für punktmutiertes ICAD-Protein an den Spaltungsstellen D117E und D224E	Von B.Yan zur Verfügung gestellt (Yan <i>et al.</i> , 2006)

pSuper	shRNA Kontrollvektor	(Brummelkamp <i>et al.</i> , 2002)
pSuper-CAD.up	Expressionsvektor für humane CAD-shRNA	diese Arbeit
pSuper-CAD.mi	Expressionsvektor für humane CAD-shRNA	diese Arbeit
pSuper-CAD.do	Expressionsvektor für humane CAD-shRNA	diese Arbeit
pSuper-TopoI.9	Expressionsvektor für humane TopoI-shRNA	diese Arbeit
pSuper-TopoI.10	Expressionsvektor für humane TopoI-shRNA	diese Arbeit
pSuper-TopoI.11	Expressionsvektor für humane TopoI-shRNA	diese Arbeit
pPARP31	Vektor zur Expression des humanen PARP-1 mit vorgeschaltetem CMV-Promotor	Prof. Alexander Bürkle, AG Molekulare Toxikologie Universität Konstanz (Kupper <i>et al.</i> , 1990)
pPARP6	Vektor zur Expression der PARP-DBD mit vorgeschaltetem CMV-Promotor	Prof. Alexander Bürkle, AG Molekulare Toxikologie Universität Konstanz (Kupper <i>et al.</i> , 1995)
pCMV-p53	Vektor zur Expression des humanen wt-p53 unter der Kontrolle des CMV-Promotors.	BD Biosciences Clontech, Heidelberg. Von Dr. K. Roemer, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg (Roemer and Mueller-Lantzsch, 1996)

### 2.3.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 4 und Tab. 5 aufgeführt. Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden in 5'- zu 3'-Richtung angegeben. Alle synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron, Ulm bezogen.

**Tab. 4 Oligonukleotide zur Konstruktion von shRNA-exprimierenden Vektoren**

Die schwarz markierten Sequenzbereiche definieren die jeweilige shRNA-Zielsequenz während die blau markierten Bereiche, die zur Klonierung und zur *stem-loop* Ausbildung nötigen *spacer*-Regionen definieren.

Name	Sequenz
CAD.up-shRNA.fwd	GAT CCC CTC CAG CTC CCT GAG CGC GGT TCA AGA GAC CGC GCT CAG GGA GCT GGA TTT TTG GAA A
CAD.up-shRNA.rev	AGC TTT TCC AAA AAT CCA GCT CCC TGA GCG CGG TCT CTT GAA CCG CGC TCA GGG AGC TGG AGG G
CAD.mi-shRNA.fwd	GAT CCC CCA TCG CGG CCG AGA CCC GGT TCA AGA GAC CGG GTC TCG GCC GCG ATG TTT TTG GAA A
CAD.mi-shRNA.rev	AGC TTT TCC AAA AAC ATC GCG GCC GAG ACC CGG TCT CTT GAA CCG GGT CTC GGC CGC GAT GGG G
CAD.do-shRNA.fwd	GAT CCC CCA GGG AGA GCA GGA TCC TCT TCA AGA GAG AGG ATC CTG CTC TCC CTG TTT TTG GAA A
CAD.do-shRNA.rev	AGC TTT TCC AAA AAC AGG GAG AGC AGG ATC CTC TCT CTT GAA GAG GAT CCT GCT CTC CCT GGG G
TopoI.9-shRNA.fwd	GAT CCC CCA GTT GAT GAA GCT GGA AGT TCA AGA GAC TTC CAG CTT CAT CAA CTG TTT TTG GAA A
TopoI.9-shRNA.rev	AGC TTT TCC AAA AAC AGT TGA TGA AGC TGG AAG TCT CTT GAA CTT CCA GCT TCA TCA ACT GGG G
TopoI.10-shRNA.fwd	GAT CCC CAG CAG AGG AAG TAG CTA CGT TCA AGA GAC GTA GCT ACT TCC TCT GCT TTT TTG GAA A
TopoI.10-shRNA.rev	AGC TTT TCC AAA AAA GCA GAG GAA GTA GCT ACG TCT CTT GAA CGT AGC TAC TTC CTC TGC TGG G
TopoI.11-shRNA.fwd	GAT CCC CGC AGC CCG AGG ATG ATC TTT TCA AGA GAA AGA TCA TCC TCG GGC TGC TTT TTG GAA A
TopoI.11-shRNA.rev	AGC TTT TCC AAA AAG CAG CCC GAG GAT GAT CTT TCT CTT GAA AAG ATC ATC CTC GGG CTG CGG G

**Tab. 5 Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA-Substraten**

Die Pfeile markieren die Richtung der *Extension* durch die DNA-Polymerase. GAPDH.fwd und GAPDH.rev wurden bei einer Hybridisierungstemperatur ( $T_m$ ) von 60 °C eingesetzt. Die restlichen angegebenen Oligonukleotide bei 68 °C.

Name	Sequenz
cis-fwd	→ ACA TGG TCC TGC TGG AGT TC
cis-rev	← GAA CTT GTG GCC GTT TAC GT
inIgHE.fwd	→ TCA CTC CCA TTC CTC GGT TA
inIgHE.rev	← CCT GCA AAA GTC CAG CTT TC
inMLL.fwd.	→ GGC TCA CAA CAG ACT TGG CAA T
inMLL.rev	← TAT TTC CCC CAC CCC ACT CC
inSV40.fwd	→ TGT TGA CAT TTG TGG GCT GT
inSV40.rev	← CAG GAA GCT CCT CTG TGT CC
inRAR $\alpha$ .fwd.	→ TCC CTC CTC TTC AAG CGT TA
inRAR $\alpha$ .rev.	← TAT TTC CCC CAC CCC ACT CC
GAPDH.fwd	→ CCC AAC TTT CCC GCC TCT G
GAPDH.rev	← CAG CCG CCT GGT TCA ACT G

## 2.4 Eukaryotische Zelllinien und Bakterienstämme

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit genutzten eukaryotischen Zelllinien und Bakterienstämme sind in Tab. 6 bzw. Tab. 7 aufgelistet.

**Tab. 6 Eukaryotische Zelllinien**

Zelllinie	Merkmale/Herkunft/Referenz	Kultivierung
Jurkat	Humane, akute T-Zellleukämie (ATCC <sup>®</sup> TIB-152) mit endogenem Mutanten-p53 (Laumann <i>et al.</i> , 1992; Pan and Haines, 1999). Von Prof. S. Fulda, AG Apoptose und Tumorthherapie, Universitätskinderklinik Ulm, zur Verfügung gestellt.	RPMI 10/1
KMV5	Derivat der humanen, chronisch myeloischen Leukämie-Zelllinie K562 (ATCC <sup>®</sup> CCL-243), welches den durch Östradiol regulierbaren Transaktivator GalERVP nach stabiler Transfektion	RPMI $\phi$ 12/1

	mit dem Vektor <u>pMV-GalERVP</u> exprimiert (Akyüz <i>et al.</i> , 2002).	
KMV(HR-EGFP/3'EGFP) = MHHR4	Derivat der humanen, chronisch myeloischen Leukämie-Zelllinie KMV5 mit chromosomal integriertem Rekombinationskonstrukt HR-EGFP/3'EGFP (Akyüz <i>et al.</i> , 2002).	RPMI $\phi$ 12/1
T47D	Humane Mammakarzinom-Zelllinie (ATCC <sup>®</sup> HTB-133) mit endogenem Mutanten-p53 mit dem Aminosäureaustausch 194 Leucin zu Phenylalanin (O'Connor <i>et al.</i> , 1997) von Dr. S. Wang-Gohrke und M.Schleyer, Sektion. Gynäkologische Onkologie, Universitätsfrauenklinik Ulm zur Verfügung gestellt.	DMEM 1
TK6	Humane Lymphoblastenzelllinie (ATCC <sup>®</sup> CRL-8015) mit endogenem wtp53 (Xia <i>et al.</i> , 1995). Die Zelllinie wurde von Herrn Dr. J. Dahm-Daphi, Abt. Strahlentherapie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg, zur Verfügung gestellt.	RPMI 10/1
WTK1	Humane Lymphoblastenzelllinie (ATCC <sup>®</sup> CRL-8155) mit endogenem Mutanten-p53 mit dem Aminosäureaustausch 237 Methionin zu Isoleucin (Xia <i>et al.</i> , 1995). Die Zelllinie wurde von Herrn Dr. J. Dahm-Daphi, Abt. Strahlentherapie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg, zur Verfügung gestellt.	RPMI 10/1
WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-	Derivat der humanen Lymphoblastenzelllinie WTK1 mit endogenem	RPMI 10/1, 0,15 $\mu$ g/ml Puromycin

SV40.fwd)	Mutanten-p53 mit chromosomal integriertem Rekombinationskonstrukt HR-EGFP/3'EGFP- SV40.fwd (diese Arbeit)	
WTK1(HR-EGFP/3'EGFP- MLLbcr.fwd)	Derivat der humanen Lymphoblastenzelllinie WTK1 mit endogenem Mutanten-p53 mit chromosomal integriertem Rekombinationskonstrukt HR-EGFP/3'EGFP- MLLbcr.fwd (diese Arbeit)	RPMI 10/1, 0,15 µg/ml Puromycin
WTK1(HR-EGFP/3'EGFP- MLLbcr.rev)	Derivat der humanen Lymphoblastenzelllinie WTK1 mit endogenem Mutanten-p53 mit chromosomal integriertem Rekombinationskonstrukt HR-EGFP/3'EGFP- MLLbcr.rev (diese Arbeit)	RPMI 10/1, 0,15 µg/ml Puromycin

Tab. 7 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Merkmale/Verwendung	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> Δ-( <i>mrr hsdRMS-mcrBC</i> ), $\phi$ 80d <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ( <i>ara, leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ-, <i>rspL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> /zur Amplifikation von Vektoren	New England Biolabs, Frankfurt am Main, (Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> SURE	e14-(McrA-) Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )171 <i>endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (Kan <sup>r</sup> ) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> ΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]/zur Amplifikation von Vektoren	Stratagene, La Jolla, CA, USA

## 2.5 DNA-Techniken

### 2.5.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Von einer frisch ausgestrichenen Bakterienplatte (LB-Agar mit oder ohne Antibiotikum) wurde eine Einzelkolonie gepickt, in 5 ml LB-Medium angeimpft und im Schüttler (180 UpM, ü.N., 37 °C) inkubiert. Mit dieser Kultur wurde 50 ml-*Ψ*-Broth (je nach Bakterienstamm mit oder ohne Antibiotikum) angeimpft und bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,22-0,30 in einem Schüttler (180 UpM, 37 °C) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 15 min auf Eis gestellt und abzentrifugiert (2500 x g, 15 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 12 ml eiskaltem TFB-I-Puffer [100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 mM Kaliumacetat, 15 % Glycerin pH 5,8] resuspendiert und auf Eis für 15-45 min inkubiert. Die Bakterien wurden erneut abzentrifugiert (s.o.) und in 4 ml TFB-II-Puffer [10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerin pH 7,0] resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden je 100-200 µl-Aliquote in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zu acht Wochen gelagert.

### 2.5.2 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Durchführung einer Transformation wurde eine adequate Anzahl der unter Abschnitt 2.5.1 beschriebenen Aliquote kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Je nachdem ob die Bakterien mit Ligationsansätzen oder zur Reproduktion von Vektoren transformiert werden sollten, wurden 10 µl des Ligationsansatzes bzw. 0,5-1 µl (0,1-1 µg/µl) des zu amplifizierenden Vektors in 100 µl kompetente Bakteriensuspension gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Bakterien-DNA-Gemisch für 90 s auf 42 °C erhitzt, für 2 min auf Eis abgekühlt, danach mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 45-60 min bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikagehalt ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

### 2.5.3 Einfrieren von Bakterienkulturen

Die Bakterienkultur (in LB-Medium) wurde entweder mit Glycerin (Endkonzentration 30-50 %) oder mit DMSO (Endkonzentration 10 %) versetzt und bei -80 °C eingefroren und gelagert.

### 2.5.4 Isolierung von Vektor-DNA als Mini-Plasmidpräparation

Innerhalb der Klonierung von Vektorkonstrukten wurde zur Isolation einer größeren Anzahl

zu testender Vektoren die Mini-Plasmidpräparationen verwendet. Dazu wurden je 5 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit je einer transformierten Bakterienkolonie angeimpft und auf einem Schüttler (180 UpM, ü.N., 37 °C) inkubiert. 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (16000 x g, 1 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zur Isolierung der Plasmid-DNA mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) und Vakuumpumpe nach Anleitung des Herstellers bearbeitet. Die in TE-Puffer [10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0] aufgenommene Plasmid-DNA wurde durch Restriktion (2.5.8) und analytische Agarose-Gelelektrophorese (2.5.5) untersucht.

Für Maxi-Plasmidpräparation wurde eine Übernachtskultur von 300-600 ml in einem 1-2 l Kolben inkubiert (180 UpM, ü.N., 37 °C). Die Bakterien wurden pelletiert (4500 x g, 45 min) und der Überstand verworfen. Die Isolierung der Vektor-DNA aus dieser Kultur wurde mit Hilfe des *PowerPrep™ HP Plasmid Maxiprep Kits* (Marligen Biosciences Inc., Ijamsville, MD, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gewonnene Vektor-DNA wurde durch Restriktion mit verschiedenen Endonukleasen (2.5.8) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (2.5.5) oder durch Sequenzierung (2.5.15) charakterisiert.

### **2.5.5 Mikroplasmidpräparation**

Diese Methode nach Akada, 1994 diente der Größenabschätzung rekombinanter Vektoren. Aufgrund des geringen Aufwandes konnte so eine Vielzahl von Klonen einfach geprüft und eine Vorauswahl getroffen werden. Je 100 µl einer Übernachtskultur der zu untersuchenden Bakterienklone wurden in ein steriles 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und 50 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) sowie 10 µl 5 x DNA-Probenpuffer [50 % (v/v) Glycerin, 0,1 g/l SDS, 100 mM EDTA, 0,25 % (w/v) BPB] zugegeben. Nach Mischen mittels *Vortex Shaker* und Zentrifugation (16000 x g) für 3 min in einer Tischzentrifuge wurden ca. 25 µl der wässrigen Oberphase im 1 %igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt.

### **2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen Flachbett-Elektrophoresen. Als Elektrophorese-Puffer wurde 1 x TAE-Puffer [40 mM Trisbase, 20 mM Eisessig, 2 mM EDTA pH 8,3] eingesetzt. 0,5-2 % (w/v) Agarose wurde dem Puffer zugegeben, in der Mikrowelle gelöst, abgekühlt und in mit geeigneten Kämmen bestückten Gelgießkammern gefüllt. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurden die DNA-Proben, welche vorher mit 0,2-fachem Volumen 5 x DNA-Probenpuffer [50 % (v/v) Glycerin, 0,1 g/l SDS, 100 mM EDTA, 0,25 % (w/v) BPB] versetzt worden waren, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80–100 V bis die gesuchten Fragmente ausreichend aufgetrennt waren. Anschließend wurde das

Gel für 20 min in einem Ethidiumbromid-Bad [1 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer] gefärbt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte über UV-Licht (*MultiImage<sup>TM</sup>Light Cabinet*, Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA), die Dokumentation mittels *Image-Master* (*ChemImager<sup>TM</sup>5500*, Alpha Innotech, SanLeandro, CA USA).

### **2.5.7 DNA-Größenstandard**

Die Bestimmung der Größe linearer DNA-Fragmente in Agarose-Gelen erfolgte über den *GeneRuler<sup>TM</sup>DNA Ladder Mix* (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot, 21 Fragmente der Größen 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp).

### **2.5.8 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl (analytisch) bis 100 µl (präparativ). Die Enzymlösung nahm maximal 0.1 Volumen des Gesamtansatzes ein. Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, die zehnfach konzentriert vorlagen und auf einfache Konzentration im Ansatz verdünnt wurden. Pro µg DNA wurden 1-5 U Restriktionsendonuklease zugegeben und mindestens 1 h bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. 1 U eines Enzymes ist als die Aktivität definiert, die 1 µg DNA in 1 h bei 37°C spaltet. Nach Überprüfung auf vollständige Spaltung mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die Enzyme durch Ausheizen (10 min bei 70°C) inaktiviert oder mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) entfernt. Bei der ersten Variante wurden mittels Dialyseplättchen (Millipore, Schwalbach) gegebenenfalls die Salze der verwendeten Restriktionspuffer entfernt.

### **2.5.9 Reinigung und Konzentrierung von DNA**

#### **2.5.9.1 Ethanolpräzipitation**

Eine wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit 0,1-fachem Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5-fachem Vol. Ethanol absolut versetzt (1 h, -20 °C). Anschließend wurde die DNA pelletiert (16000 x g, 30 min, 4 °C), einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer [10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0] aufgenommen. Diese Methode diente der Konzentrierung von DNA.

#### **2.5.9.2 *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden)**

Die Reinigung der DNA erfolgte über den *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen GmbH,

Hilden). Dabei adsorbiert die DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silika-Gel-Membran, während Verunreinigungen (z.B. Enzyme) diese ungehindert passieren können. Nach vollständiger Entfernung der Verunreinigungen durch einen Waschschrift, erfolgte die Elution der DNA mittels 50 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O (niedrige Salzkonzentration). Es wurde nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers vorgegangen. Die Methode diente der Reinigung von PCR-Produkten und wurde auch zur Reinigung präparativer Restriktionen eingesetzt.

### 2.5.9.3 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt. Im langwelligen UV-Licht wurde das entsprechende Fragment rasch aus dem Gel herausgeschnitten. Unter Anwendung der Protokolle des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) oder *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) konnte das Fragment aus dem Agaroseblock isoliert werden.

### 2.5.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch bestimmt und das Ergebnis durch Agarose-Gelelektrophorese (2.5.5) überprüft. Die DNA-Lösung wurde 1:100 mit TE-Puffer [10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0] verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm (OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub>) gegen TE-Puffer als Referenz bestimmt. Für dsDNA gilt dabei folgender Richtwert:

OD<sub>260</sub> x 0,05 x Verdünnung entspricht der DNA-Konzentration in µg/µl. Ein Quotient von OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> von über 1,8 zeigt an, dass die DNA frei von Proteinen ist.

### 2.5.11 Herstellung von glatten DNA-Enden (*blunten*)

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

Das Auffüllen der 5'-Überhänge zur Erzeugung von dsDNA erfolgte durch Behandlung mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) unter folgenden Bedingungen:

0,1-4 µg	DNA
1 µl	dNTPs (Endkonz.: 0,05 mM)
2 µl	Klenow-Puffer (10 x)
1-5 U	Klenow-Fragment
ad 20 µl ddH <sub>2</sub> O.	

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion für 10 min

bei 75 °C gestoppt.

Die Abbaureaktion von einzelsträngigen 3'-Überhängen wurde durch die Behandlung mit *T4*-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt/M.) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1 µg	DNA
1 µl	dNTPs (Endkonz.: 0,1 mM)
4 µl	<i>T4</i> -DNA-Polymerase Puffer (5 x)
1-3 U	<i>T4</i> -DNA-Polymerase
ad 20 µl ddH <sub>2</sub> O.	

Der Ansatz wurde 20 min bei 11 °C inkubiert und anschließend die Reaktion für 10 min bei 75 °C inaktiviert.

### 2.5.12 Dephosphorylierung von Vektoren

Zur Dephosphorylierung geöffneter Vektoren wurden diese mit alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) behandelt.

Nach Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen wurde direkt zum Reaktionsansatz

<sup>1</sup> / <sub>10</sub> Volumen	SAP-Puffer (10 x) und
2,5 U	SAP pro 1 µg eingesetzter DNA
	zugegeben.

Die Inkubationsdauer bei 37 °C betrug bei Vektor-DNA mit überhängenden Enden 15 min und bei Vektor-DNA mit glatten Enden 1 h. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte bei 65 °C für 15 min.

### 2.5.13 Ligation

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

### 2.5.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

1-100 ng	DNA (1-10 ng Vektor-DNA bzw. 100 ng genomische DNA)
0,5 µl	Oligonukleotid 1 (100 pM/µl)
0,5 µl	Oligonukleotid 2 (100 pM/µl)

1,5 µl	dNTPs (5 mM)
5 µl	<i>Taq</i> -Puffer (10 x)
1 U	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
ad 50 µl ddH <sub>2</sub> O	

Der Ansatz wurde in einem Thermocycler unter folgender Standardeinstellung inkubiert:

Denaturierung	5 min	95 °C
---------------	-------	-------

zur Amplifikation 30 Zyklen:

Denaturierung	1-1,5 min	95 °C
Hybridisierung	1 min	$T_m$
Neustrangsynthese	0,5-1 min	72 °C

nach Ablauf der Zyklen

Neustrangsynthese	7 min	72 °C
Abkühlung auf		4 °C

Die Schmelztemperatur  $T_m$  für die Oligonukleotide wurde mittels dem *Oligonucleotide Properties Calculator* ([www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html](http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html)) abgeschätzt und die Hybridisierungstemperatur entsprechend gewählt.

### 2.5.15 Sequenzierung von DNA

Die zu sequenzierenden PCR-Produkte wurden mittels *Pwo*-DNA-Polymerase (PeqLab, Erlangen) amplifiziert, über *QIAquick PCR Purifikation Kit* (Qiagen GmbH, Hilden) gereinigt, in 5-10 mM Tris/Cl, pH 8,5 ohne EDTA gelöst und durch die Sequenzierfirma *Sequence Laboratories Göttingen GmbH* (Göttingen) analysiert.

### 2.5.16 Konstruktion von pSuper-shRNA Expressionsvektoren

Um die Expression von Proteinen selektiv über die Inhibition der zugehörigen mRNA zu hemmen, wurde eine Variante der siRNA-Technik nach Brummelkamp *et al.*, 2002 benutzt. Zunächst wurden nach folgenden Kriterien Oligonukleotide konstruiert und bestellt (Thermo Electron, Ulm):

Grundgerüst des Oligonukleotidpaares:

- GATCCCC - 19 nt *sense* Zielsequenz - TTCAAGAGA - 19 nt *antisense* Zielsequenz - TTTTGGAAA
- AGCTTTTCCAAAAA - 19 nt *sense* Zielsequenz - TCTCTTGAA - 19 nt *antisense* Zielsequenz – GGG

Die Zielsequenz sollte innerhalb der mRNA von AA am 5'- und TT am 3'- Ende flankiert sein. Dabei hat die AA 5'-Flankierung höhere Priorität. Des weiteren sollte die Sequenz bevorzugt in der kodierenden Region, 100 bp vom Translationstart und -endpunkt liegen. Der GC-Gehalt der Zielsequenz sollte über 30 % liegen. Die Sequenz sollte außerdem keinen Block von vier oder mehr Adeninen oder Thyminen tragen.

Die korrelierenden Oligonukleotide wurden nach folgendem Protokoll hybridisiert:

Oligonukleotide (0,04  $\mu\text{M}$ ) jeweils in 50  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O lösen

1  $\mu\text{l}$  jedes Oligonukleotids

48  $\mu\text{l}$  *Annealing*-Puffer [100 mM Kaliumacetat, 30 mM Hepes-KOH, pH 7,4,  
2 mM Magnesiumacetat]

Zunächst 4 min bei 95 °C, dann 10 min bei 70 °C inkubieren,  
dann langsam auf 4 °C abkühlen lassen

Anschließend wurden die hybridisierten Oligonukleotide unter folgenden Bedingungen phosphoryliert:

2 $\mu\text{l}$	hybridisierte Oligonukleotide
1 $\mu\text{l}$	dATP (10 mM)
1 $\mu\text{l}$	Kinase-Puffer (10 x)
1 $\mu\text{l}$	<i>T4</i> -Polynukleotidkinase ( <i>PNK</i> , 10 U/ $\mu\text{l}$ )
ad 10 $\mu\text{l}$ ddH <sub>2</sub> O.	

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C und anschließend zur Hitzeinaktivierung der *PNK* für 10 min bei 70 °C inkubiert. Mittels Dialyseplättchen (Millipore, Schwalbach) wurden die Salze der Reaktionsspuffer entfernt.

Die hybridisierten und phosphorylierten Oligonukleotide wurden mit dem *Bgl*III/*Hind*III restringierten (2.5.8) und SAP dephosphorylierten (2.5.12) Vektor pSuper (Amp<sup>r</sup>) ligiert (2.5.13). Der Bakterienstamm *E. coli DH5 $\alpha$*  wurde mit dem Ligationsansatz transformiert (2.5.2), aus den gewonnenen Klonen die Vektor-DNA isoliert (2.5.4) und mittels einer *Eco*RI/*Hind*III-Restriktion auf die Oligonukleotid-Insertion geprüft. Positive Klone zeigten ein 360 bp Bande im Agarose-Gel (2.5.6), negative Klone eine 300 bp Bande.

## 2.6 Proteinbiochemische Methoden

### 2.6.1 Probenaufbereitung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### 2.6.1.1 Präparation von Totalhomogenaten

Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen 5 min bei  $300 \times g$  zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet so mit 2 x SDS Probenpuffer [125 mM Tris/HCl pH 6,8, 3,1 % DTT, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) BPB, 4 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (frisch zugeben)] versetzt, dass eine Zellkonzentration von  $0,5 - 1 \times 10^4$  Zellen/ $\mu$ l SDS-Probenpuffer erreicht wurde. Die Proben wurden 15 min auf  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.6.1.2 Präparation von Zelllysaten

Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen 5 min bei  $300 \times g$  zentrifugiert, mit kaltem PBS gewaschen und erneut bei  $300 \times g$  für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit der 2-3 fachen Volumenmenge Lysepuffer [50 mM Tris-Base pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 25 mM NaF, 25 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat, 0,1 mM NaV, 0,2 % (w/v) Triton-X-100, 0,3 % (v/v) NP 40, 1 Proteaseinhibitor-Cocktailtablette pro 10 ml (frisch zugesetzt)] versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt ( $16000 \times g$ , 15 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) um unlösliche Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration (2.6.1.3) bestimmt. Die löslichen Proteinfractionen wurden mit Lysepuffer auf die gleichen Konzentrationen eingestellt und 6 x SDS-Probenpuffer [350 mM Tris/HCl pH 6,8, 9,3 % (w/v) DTT, 10 % (w/v) SDS, 36 % (v/v) Glycerin, 0,6 % (w/v) BPB, 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (frisch zugeben)] im Verhältnis 1:6 dazugegeben. Die Proben wurden 15 min auf  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.6.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts in Zelllysaten (2.6.1.2) wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* (ThermoScientific, Rockford, IL, USA) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die photometrische Messung des gebildeten Farbstoffs erfolgte mittels Mikrotiterplatten-Photometer MRX (*Dynatech Laboratories*, Chantilly, VA, USA) bei 570 nm.

### 2.6.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierfür wurde das Gelsystem von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) eingesetzt (Gelgröße: 8 x 10 x 0,075 cm). Die Zusammensetzung für jeweils fünf SDS-PAGE-Gele ist in der Tab. 8 aufgeführt. Alle Lösungen für das Trenngel wurden in ein Becherglas gefüllt und gemischt, wobei APS und TEMED als letztes hinzugefügt wurde, da durch sie die Polymerisation induziert wird. Das Trenngel-Gemisch wurde in die Gelgieß-Kammer SE 200 (Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA) zwischen einer Glas- und Aluminiumplatte (beide getrennt durch 0,1 cm *spacer*) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol dekantiert, auf das Trenngel das Sammelgel gegossen und der Kamm (0,1 cm) eingesteckt. Nach Aushärten des Gels wurde es in eine Gellauf-Kammer (SE250 oder *Mighty Small II*, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) eingespannt, die mit 1 x Rotiphorese SDS-Page Puffer (Roth, Karlsruhe) befüllt wurde. Der Gelkamm wurde entfernt und zur Größenbestimmung der Proteine 10 µl eines Molekulargewichtsstandard in eine Geltasche pipettiert. Vor dem Auftragen, der zu analysierenden Proteinproben wurden diese zunächst für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel. Nach der Elektrophorese erfolgte die Darstellung der Proteine durch eine Western-Blot Analyse.

**Tab. 8 Pipettierschema für jeweils fünf SDS-PAGE-Gele.**

<b>Proteingröße</b>	<b>60-200 kDa Trenngel 8 %ig</b>	<b>16-70 kDa Trenngel 10 %ig</b>	<b>16-70 kDa Trenngel 12 %ig</b>	<b>12-45 kDa Trenngel 15 %ig</b>	<b>Sammelgel</b>
Acrylamid 30 %, 0,8 % Bisacrylamid	12 ml	15 ml	18 ml	22,5 ml	3,9 ml
4 x SDS/Tris pH 8,8 (Trenngelpuffer)	11,25 ml	11,25 ml	11,25 ml	11,25 ml	-
4 x SDS/Tris pH 6,8 (Sammelgelpuffer)	-	-	-	-	7,5 ml
H <sub>2</sub> O	21,75 ml	18,75 ml	15,75 ml	11,25 ml	18,3 ml
10 % APS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

### **2.6.1.5 Protein-Größenstandard**

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamid-Gel wurden auf dieses Gel Protein-Marker aufgetragen. Dabei wurden die MBI-Fermentas-Marker *PageRuler™Pre-Stained Protein Ladder* mit 10 Proteinen der Größen 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17 und 10 kDa sowie der *PageRuler™Pre-Stained Protein Ladder Plus* mit 9 Proteinen von 250, 130, 100, 70, 55, 35, 27, 15 und 10 kDa verwendet.

### **2.6.1.6 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot, Towbin *et al.* 1992)**

Nach der SDS-Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine auf PVDF (Immobilon™-P, Millipore) oder Nitrocellulose Membranen (Hybond™ Extra, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mittels einer Nassblot-Apparatur (TE Series, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

Die PVDF Membran wurde vor dem Proteintransfer 1 min in Methanol geschwenkt, 2 mal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in Western-Blot 1 x HMW-Puffer [49,5 mM Tris-Base, 40 mM Glycin] äquilibriert. Die Nitrocellulose Membran wurde nur in 1 x HMW-Puffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte für 45-90 min bei 100 V auf Eis, je nach Größe der zu untersuchenden Proteine. Um den erfolgreichen Proteintransfer zu überprüfen, konnten die Proteine nach dem Transfer auf den Membranen mit Ponceau-Rot-Lösung angefärbt werden.

### **2.6.1.7 Proteinnachweis durch Immundetektion auf Western-Blot Membranen (Blake *et al.*, 1984)**

Der spezifische Nachweis beruht auf der Reaktion eines primären Antikörpers (AK) mit seinem Antigen und der Bindung eines sekundären AK an diesen Komplex. Die an den sekundären AK gekoppelte Enzymaktivität (Peroxidase) ermöglicht den Nachweis der gebildeten Antigen/Primärantikörper/Sekundärantikörper-Komplexe durch eine Lichtreaktion. Zur Immundetektion transferierter Proteine mussten zunächst unspezifische Bindungsstellen der Membranen mit PBS-T-Puffer [0,05 % (v/v) Tween 20 in 1x PBS] und 1-5 % Milchpulver 30 min bei RT abgesättigt werden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper in PBS-T-Puffer versetzt mit 1-5 % Milchpulver für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Dieser Antikörper erkennt spezifisch ein auf der Membran immobilisiertes Protein. Überschüssiger, ungebundener Primärantikörper wurde durch drei je fünfminütige Waschschrte mit PBS-T-Puffer entfernt.

Zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers wurde die Membran 1 h mit einem von der

Art des Primärantikörpers abhängigen Sekundärantikörper-Peroxidase (HRP)-Konjugats in PBS-T-Puffer mit 1-5 % Milchpulver inkubiert und wie nach der Inkubation mit dem Primärantikörper gewaschen.

Gebundene HRP-Sekundärantikörper wurden mit dem *SuperSignal West Pico* oder *SuperSignal West Dura Extended Duration* Substraten (ThermoScientific, Rockford, IL, USA) nach Anweisung des Herstellers in Form von Chemilumineszenzsignalen auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Freiburg) detektiert. Das Signal wurde als Schwärzung erkennbar.

Membranen mit den darauf gebundenen Proteinen konnten für mehrere Immundetektionen verwendet werden. Hierzu mussten bereits gebundene Antikörper-Komplexe wieder entfernt werden. Die Membran wurde für 5-30 min (abhängig von der Affinität des Antikörpers) in *Restore™ Western Blot Stripping* -Puffer (ThermoScientific/Pierce, Rockford, IL, USA) bei RT geschwenkt, anschließend zweimal 10 min in PBS-T-Puffer gewaschen. Die so behandelte Membran konnte dann für weitere Immundetektionen verwendet werden.

## 2.7 Zellkulturtechniken

### 2.7.1 Erhaltung und Kultivierung von Zellen

Inkubation der Zellen: Bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

Auftauen von Zellen: Der Inhalt eines Kryogefäßes wurde in 15 ml Medium aufgenommen und zentrifugiert (300 x g, 5 min, RT), um das DMSO des Einfriermediums zu entfernen. Die sedimentierten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und auf Gewebekulturschalen gegeben. Nach ca. 24 h wurde das Medium erneuert.

Erhaltung von Zellen: Die Kultivierung adhärenter Zelllinien erfolgte in beschichteten Gewebekulturschalen. Zum Passagieren wurden die Zellen mit PBS gespült, anschließend mit Trypsin-EDTA überschichtet und nach 5 min Inkubation bei 37 °C von der Kulturschale gelöst. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde das Trypsin-EDTA verdünnt. Die Zellsuspension wurde auf neuen Gewebekulturschalen verteilt und mit Kulturmedium aufgefüllt. Die Suspensionszelllinien wurden zur Vermehrung und zum Erhalt 1:6-1:10 mit Medium verdünnt und in neue unbeschichtete Zellkulturschalen überführt. Die Zelllinien MHHR4 und KMV5 wurden aufgrund der durch Östradiol induzierbaren Aktivität des GalERP-Transkriptionsfaktors in dem phenolrotfreien Medium RPMI $\alpha$ 12/1 mit östradiolarmem FCS gehalten. Durch Aktivkohlebehandlung des FCS wurde der Östradiolgehalt des Serums auf unter 10 % des Ausgangsgehaltes reduziert.

östradiolarmes FCS:

10 g Norit A (Aktivkohle)

1,2 g Dextran 35

1 l FCS

30 min rühren,

anschließend bei 10.000 x g abzentrifugieren, Überstand sterilfiltrieren.

Die zugehörigen Medien aller verwendeter Zelllinien sind in Tab. 6 angegeben.

Einfrieren von Zellen: Zur Lagerung der Zelllinien wurden diese zunächst von den konfluent bewachsenen Zellkulturschalen geerntet (300 x g, 5 min, RT) und in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryogefäße überführt und über Nacht bei -80 °C in Isopropanol gefüllten Einfrierbehältern (*Cryo 1C Freezing Container*, Nalgene, Rochester, NY, USA) eingefroren. Die so konservierten Zellen konnten bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

## 2.7.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur Bestimmung der Effizienz der angewendeten Transfektionsmethode wurden eukaryotische Zellen mit dem Plasmid p5bPuroCMV-wtEGFP transfiziert. 12-96 h nach Transfektion wurde der prozentuale Anteil der grünfluoreszierenden Zellen entweder am inversen Immunfluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Jena) oder am Durchflusszytometer (FACSCalibur™ oder FACSCalibur™ HTS, Becton Dickinson, Heidelberg) bestimmt.

### 2.7.2.1 Transfektion durch Elektroporation

Bei dieser Transfektionstechnik wurden Zellen einem elektrischen Feld ausgesetzt. Dabei entstehen für Millisekunden kleine elektrisch neutrale Poren in der Zellmembran, durch welche die Passage von Molekülen, wie DNA und RNA, in die Zelle möglich wird. Die Elektroporation wurde wie bei Baum *et al.*, 1994 beschrieben durchgeführt.

Für einen Elektroporationsansatz wurden  $0,2-0,4 \times 10^7$  Zellen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und in 400 µl Kulturmedium ohne FCS resuspendiert. In einer Elektroporationsküvette (0,4 cm Spaltweite) wurden 10 - 80 µg DNA vorgelegt, die 400 µl Zellsuspension zugefügt und durch auf- und abpipettieren gemischt. Die Elektroporation der Zellen erfolgte, abhängig von Zelltyp, nach den in Tab. 9 angegebenen Parametern. 100-400 µl der elektroporierten Zellen wurden nach der Elektroporation sofort in eine 12-Loch-Schale mit Erhaltungsmedium aufgenommen und nach Erreichen des Endvolumens von 2,5 ml 24-72 h im Brutschrank inkubiert. Im Falle einer Behandlung der Zellsuspensionen 4 h

nach Elektroporation mit Chemotherapeutika wurden die Zellen nach der Transfektion in ein adäquates Volumen Erhaltungsmedium (2 ml) überführt und später bei der Behandlung mit den gelösten Chemotherapeutika auf das Endvolumen von 2,5 ml gebracht.

**Tab. 9 Parameter zur exponentiellen Elektroporation bei einer Kapazität von 1050  $\mu$ F**

Zelllinie	Spannung (V)
Jurkat	250
KMV5	200
MHHR4	200
TK6	240
WTK1	240

### 2.7.2.2 Lipofektion mittels *FuGENE*<sup>®</sup> HD

*FuGENE*<sup>®</sup> HD (Roche, Penzberg) wurde zur effizienten Transfektion adhärenter eukaryotischer Zellen verwendet. Hierfür wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion in 6-Loch-Platten ausgesät (Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion: 60-80 %, in 2 ml Medium ohne Antibiotika). Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers (Roche, Penzberg) in einem Verhältnis von 2:1 (*FuGENE*<sup>®</sup> HD zu DNA) durchgeführt. Das raum-temperierte *FuGENE*<sup>®</sup> HD wurde in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen aus Polystyrol in 100  $\mu$ l vorgelegtes *Opti-MEM*<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium ohne FCS (oder andere Zusätze) pipettiert, geschüttelt und anschließend mit der in 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O verdünnten DNA gemischt. Es folgte eine Inkubation dieses Ansatzes von 30 min bei RT. Der Transfektionsmix (150  $\mu$ l) wurde vorsichtig in das Medium der Zellen geträufelt, die Schale kurz vorsichtig geschwenkt und bis Versuchsende bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### 2.7.2.3 Lipofektion mittels *Lipofectamine*<sup>™</sup>2000 Reagent

*Lipofectamine*<sup>™</sup>2000 Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) wurde zur effizienten Transfektion adhärenter eukaryotischer Zellen verwendet. Hierfür wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion in 6-Loch-Platten ausgesät (Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion: 80-95 %, in 2 ml Medium ohne Antibiotika). Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers in einem Verhältnis von 2,5:1 (*Lipofectamine*<sup>™</sup>2000 Reagent zu DNA) durchgeführt.

*Lipofectamine*<sup>™</sup>2000 Reagent wurde in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen aus Polystyrol in 250  $\mu$ l vorgelegtes *Opti-MEM*<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium ohne FCS (oder andere Zusätze) pipettiert,

gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit der in 250  $\mu\text{l}$  *Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium* ohne FCS verdünnten DNA gemischt. Es folgte eine Inkubation von 20 min bei RT. Der Transfektionsmix (500  $\mu\text{l}$ ) wurde vorsichtig in das Medium der Zellen geträufelt und die Schale kurz vorsichtig geschwenkt. Nach 4-6 h wurde das Medium mit frischem Medium ohne Transfektionsreagenz ersetzt und bis Versuchsende bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### **2.7.3 Selektion und Klonierung von Suspensionskultur-Zellen**

Zur Isolierung von Klonen, die ein gewünschtes DNA-Fragment in ihrem zellulären Genom integriert vorliegen haben, wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion durch zwei Klonierungsphasen vereinzelt:

1. Phase - Selektion aus 100: Die transfizierten Zellen wurden in Selektionsmedium auf eine Konzentration von 1000 Zellen/ml eingestellt. Es wurden je 100  $\mu\text{l}$  dieser Suspension pro Loch (100 Zellen pro Loch) einer 96-Loch-Platte pipettiert und für 16 Tage unter gewohnten Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach Ablauf der Zeit im Selektionsmedium wurden die Klone aus den konfluent bewachsenen Löchern in 6-Loch-Platten mit Selektionsmedium überführt und nach Anwachsen auf die genomische Integration der zu klonierenden DNA geprüft. Positive Klone wurden in 15 cm-Schalen angezogen, zum einen als Aliquote eingefroren und zum anderen zur weiteren Selektion verwendet.

2. Phase - Einzelzellklonierung: Die aus 100 Zellen entstandenen Zellklone wurden im Selektionsmedium auf eine Konzentration von 5 Zellen/ml gebracht. Es wurden je 100  $\mu\text{l}$  dieser Suspension pro Loch (0,5 Zellen pro Loch) in eine 96-Loch-Platte pipettiert und für 16 Tage unter gewohnten Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach Ablauf der Zeit im Selektionsmedium wurden die Klone aus den konfluent bewachsenen Löchern wiederum in 6-Loch-Platten mit Selektionsmedium überführt und nach Anwachsen auf die genomische Integration der zu klonierenden DNA geprüft. Positive Klone wurden in 15 cm-Schalen angezogen, gesichert und für weitere Untersuchungen kultiviert.

### **2.7.4 Semiquantitative Analyse der DNA-Bruchinduktion durch Chemotherapeutika**

Zur Klärung der Frage ob die Behandlung von Zellen mit Chemotherapeutika zur Induktion von DNA-Brüchen in definierten DNA-Fragmenten führt, wurde eine semiquantitative PCR-Analyse durchgeführt. Dazu wurden Zelllinien, die zu untersuchende DNA-Fragmente chromosomal integriert vorliegen haben, mit und ohne Chemotherapeutika behandelt. Nach

4 h, 8 h und 16 h Inkubationszeit wurden  $0,5 \times 10^7$  Zellen pelletiert, mittels *Blood and Cell Culture DNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden) die chromosomale DNA isoliert und auf eine Konzentration von 100 ng/ $\mu$ l justiert. Für die Analyse der Induktion von Brüchen wurden Standard-PCR-Ansätze (Abschnitt 2.5.14) pipettiert. In die Ansätze wurden jeweils 100 ng der isolierten chromosomalen DNA als Matrize gegeben. Eine PCR diente der Analyse der Bruchinduktion. Für sie wurde ein Oligonukleotidpaar verwendet, welches die zu analysierende DNA-Region flankiert. Für die in dieser Arbeit analysierten DNA-*cis*-Elemente wurden die Oligonukleotide *cis.fwd/cis.rev* benutzt. Eine weitere PCR (Kontroll-PCR) diente der quantitativen Kontrolle der eingesetzten DNA-Menge. Für sie wurden die Oligonukleotide *GAPDH.fwd/GAPDH.rev* verwendet, die mit dem *housekeeping* Gen *GAPDH* hybridisieren. Die Ansätze wurde in einem Thermocycler unter folgenden Einstellungen inkubiert:

	<b>Bruch-analytische-PCR der DNA-<i>cis</i>-Elemente</b>		<b>Kontroll-PCR</b>	
Denaturierung	5 min	95 °C	5 min	95 °C
zur Amplifikation:	20 Zyklen		30 Zyklen	
Denaturierung	1,5 min	95 °C	1,5 min	95 °C
Hybridisierung	1 min	68 °C	30 s	60 °C
Neustrangsynthese	40 s	72 °C	30 s	72 °C
nach Ablauf der Zyklen:				
Neustrangsynthese	7 min	72 °C	7 min	72 °C
Abkühlung auf		4 °C		4 °C

Für die Bruch-analytische-PCR wurde ein Produkt von ca. 600 bp erwartet und für die Kontroll-PCR ein Produkt von 293 bp. Die densitometrische Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte durch das *MultiImage<sup>TM</sup>Light Cabinet* und der Software *ChemImager<sup>TM</sup>5500* (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Die analysierten Banden der Bruch-analytischen-PCR wurden gegen die jeweiligen Banden der Kontroll-PCR (*GAPDH*) normalisiert.

### 2.7.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie diente der Messung der Frequenz der DSB-Reparatur, der Bestimmung der Zellverteilung in den Zellzyklus Phasen und der Analyse des Zelltodanteils. Diese Parameter wurden mit einem Durchflusszytometer (*FACSCalibur<sup>TM</sup>* oder *FACSCalibur<sup>TM</sup> HTS*) der Fa. Becton Dickinson bestimmt, welches ein optisches Meßsystem

darstellt, mit dem Fluoreszenz- und Streusignale von Zellen, die sich in Suspension befinden, analysiert werden können. Die Messmethode erlaubt die optische Analyse mehrerer Tausend bis Millionen Zellen innerhalb kürzester Zeit. Die Zellen werden hintereinander durch eine Messküvette gesogen und treffen auf einen Laserstrahl bestimmter Wellenlänge (Argon-Laser mit 488 nm), wodurch es zu mehreren Effekten kommt.

Die Streuung der Laserstrahlen nach vorn (Vorwärtsstreulicht, FSC) stellt die Lichtbeugung dar, welche proportional zur Zelloberfläche steht und damit die Zellgröße detektiert. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) stellt die Lichtbrechung und Reflexion dar, die sich proportional zur Zellkomplexität und -granularität verhalten.

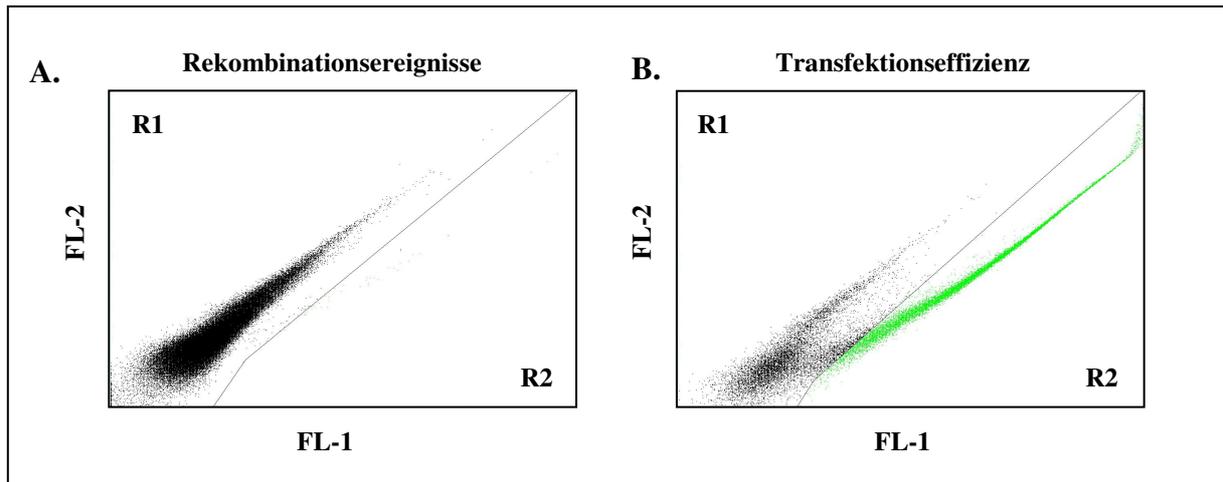
Vorangehende Färbungen von Zellbestandteilen (z. B. DNA) mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes oder Expression eines Fluoreszenzfarbstoffes in der Zelle (z. B. EGFP) werden durch ein, nach Anregung der Chromophore, emittiertes Fluoreszenzsignal detektiert. Das von der Zelle emittierte und gestreute Licht wird von verschiedenen Spiegeln mit unterschiedlichen Filtern erfasst, die Daten an einem Computer quantifiziert.

### 2.7.5.1 Rekombinationsfrequenzmessung (Akyüz, 2001)

Zur Analyse der Zellen wurde eine ausreichende Zellmenge zentrifugiert (300 x g, 5 min), das Zellpellet in 1 ml PBS / 0,2 % EDTA resuspendiert, erneut sedimentiert und in 100 µl PBS / 0,2 % EDTA resuspendiert, um eine Endkonzentration an Zellen von  $10^6$  Zellen/ml zu erreichen. Die Zellsuspension wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und die Fluoreszenzen der Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

Zur Darstellung der Zellen als Dot-Plot-Diagramm, mussten diese im FSC- und SSC-Kanal zunächst justiert werden. Zur Quantifizierung grün fluoreszierender Zellen wurden zwei Fluoreszenzkanäle gemessen, wobei FL-1 das grün fluoreszierende EGFP detektiert (Region 2, R2) und FL-2 die orangefarbene Eigenfluoreszenz der Zellen nachweist (Abb. 4, Region 1, R1). Um die DNA Reparaturfrequenz zu ermitteln, wurde zum einen die Anzahl der Rekombinationsereignisse bestimmt (Abb. 4 A.) und zum anderen die Transfektionseffizienz ermittelt (Abb. 4 B.). Für letztere wurden die Zellen zusätzlich mit dem wtEGFP exprimierenden Vektor p5bPuroCMV-wtEGFP transfiziert. Die Berechnung der Reparaturfrequenz erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Rekombinationsfrequenz [\%]} = \frac{\text{Rekombinationsereignisse pro Zellzahl [\%]}}{\text{Transfektionseffizienz [\%]}}$$



**Abb. 4 Messdokumente zur Bestimmung der Rekombinationsfrequenz mittels Durchflusszytometrie (Dot-Plots)**

In (A.) ist der *Dot-Plot* zur Bestimmung der Rekombinationsereignisse gezeigt. R1 zeigt die Zellen in denen keine EGFP-Expression stattgefunden hat. R2 zeigt die Zellen in denen EGFP exprimiert und damit messbare Reparatur vollzogen wurde. (B.) zeigt den Anteil der Zellen (R2) in der Gesamtpopulation (R1+R2), der durch Transfektion p5bPuroCMV-wtEGFP aufgenommen hat und daraufhin wtEGFP exprimiert (R2).

### 2.7.5.2 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung des Zellzyklus am Durchflusszytometer wurde die DNA mit 80 % (v/v) Ethanol/Aceton (1:1) fixierten Zellen mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt.

Zunächst wurde ein Zellpellet von  $10^6$  Zellen mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Zur Fixierung der Zellen wurde auf einem Vortexer 9 ml eiskalte Fixierlösung [40 % (v/v) Ethanol, 50 % (v/v) Aceton, 10 % (v/v) ddH<sub>2</sub>O] langsam dazugetropft, anschließend erfolgte eine Inkubation von 15 min auf Eis. Danach mussten die fixierten Zellen für mindestens 1 h bei -20°C gelagert werden. Die Aufbewahrung der Proben war bis zu zwei Wochen möglich.

Für die Färbung wurden die fixierten Zellen in zwei Schritten mit zunächst 1:1 Fixierlösung/PBS anschließend mit PBS gewaschen und rehydriert. Das Zellpellet wurde mit 250 - 500  $\mu$ l 1x PI-Färbelösung [50  $\mu$ g/ml PI, 3,8 mM Natriumcitrat, pH 7,0, 50  $\mu$ g/ml RnaseA (frisch ansetzen) in 1 x PBS] resuspendiert und nach 30 min Inkubation bei 37 °C im Dunkeln am Durchflusszytometer gemessen.

Propidiumiodid färbte die Zell-DNA quantitativ, so dass die verschiedenen Zellzyklusphasen von einander unterschieden werden konnten. Bei der Zellteilung diploider Zellen sind verschiedene Phasen (G1, S, G2/M) abgrenzbar. Eine Phase, die als G0-Phase bezeichnet wird, steht für ein Stadium der Zellen in dem sie sich nicht mehr teilen. Sie ist anhand ihres DNA-Gehaltes, ähnlich wie die G2-Phase von der M-Phase, nicht von G1 unterscheidbar. Die Phasen werden deshalb auch kollektiv als G2/M und G0/G1 bezeichnet.

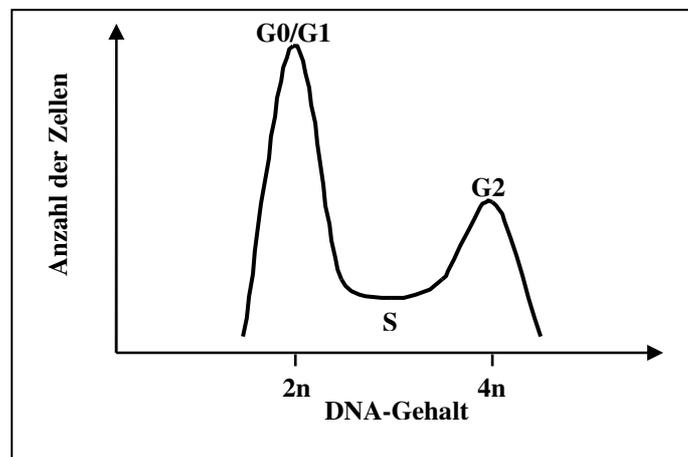
**G1-Phase:** Wachstumsphase der Zelle, Synthese von RNA und Proteinen, der DNA-Gehalt bleibt konstant bei  $2n$ .

**S-Phase:** DNA-Synthesephase. Reduplikation (Replikation) der DNA. Der DNA-Gehalt ändert sich in dieser Phase von  $2n$  auf  $4n$ .

**G2-Phase:** Nach der S-Phase geht die Zelle in die G2-Phase über. Während die Zelle die eigentliche Teilung vorbereitet, bleibt der DNA-Gehalt bei  $4n$ .

**M-Phase:** Hier findet die Mitose statt. Der DNA-Gehalt bleibt bei  $4n$ , bis die Tochterzellen mit einem DNA Gehalt von je  $2n$  entstanden sind.

Die Intensität des bei der durchflusszytometrischen Messung erhaltenen PI-Fluoreszenzsignals ist abhängig vom DNA-Gehalt der Zelle und wird für die Phase, in welcher sich die diploiden Zellen nicht teilen (G0/G1) mit  $2n$  angegeben.



**Abb. 5** Histogramm der Verteilung des DNA-Gehaltes in einer diploiden Zellpopulation mit normalem Zellzyklus.

Zur Auswertung der Zellzyklusdaten nach Anfärbung der DNA mittels PI, wurden die Zellen zunächst in einem, zur PI Detektion geeigneten Fluoreszenzkanal FL-2 als *Dot-Plot* Diagramm dargestellt (FL-2-A gegen FL-2-W). Hierbei steht FL-2-A für die Fläche und FL-2-W für die Weite des Spannungspulses, der über die Laserdetektion der Zelle erzeugt wird. Über diese Art der Darstellung konnten die Dupletten dirkrimiert werden, indem die Region unter einer imaginären Diagonalen, die durch den Nullpunkt führt und das Diagramm halbiert, auf der Seite des Weitensignals (FL-2-W) für die Analyse ausgegrenzt wurde. Dupletten sind nicht vollständig separierte Zellen, welche vom Durchflusszytometer als eine Zelle erkannt werden, wodurch „falsche“ DNA Mengen detektiert werden. Die selektierte Zellpopulation konnte nun als Histogramm dargestellt werden (Abb. 5), wobei der DNA Gehalt gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen wurde. Es konnte nun der jeweilige prozentuale Anteil der Zellzyklus-Phasen ermittelt werden.

### 2.7.5.3 Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie

Um innerhalb einer Zellpopulation den Zelltodanteil (Nekrose/Apoptose) zu bestimmen wurden zunächst wie unter Abschnitt 2.7.5.2 beschrieben, die Zellen fixiert und mit 1 x PI-Färbelösung inkubiert. Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde ein modifiziertes Messdokument der Zellzyklusanalyse (2.7.5.2) verwendet, in dem der DNA-Gehalt im Histogramm logarithmisch dargestellt wurde. Dies führte zur optischen Vergrößerung des Zelltodanteils gegenüber des Zellzyklus im Diagramm und erleichterte die Diskriminierung beider. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass im *Dot-Plot* Diagramm zur Duplettendiskriminierung, die ausgegrenzte Region nicht den Zelltodanteil betraf.

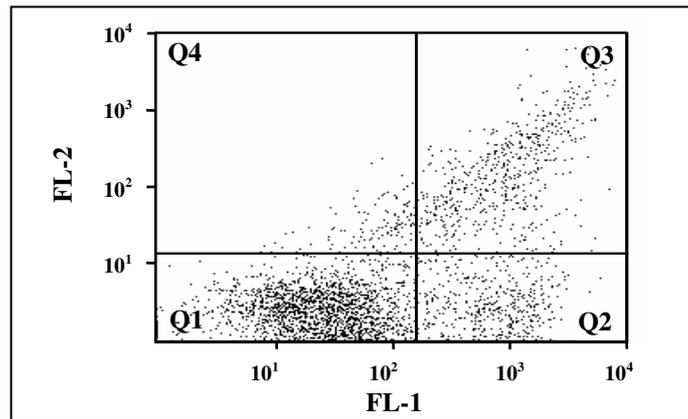
Unter diesen modifizierten Bedingungen war es möglich den prozentualen Zelltodanteil der gemessenen Population zu ermitteln.

### 2.7.5.4 Bestimmung von Apoptose und Nekrose mittels Annexin-V-FLUOS/PI-Färbung

Die Annexin-V-FLUOS/PI-Färbung von Zellen wurde nach den Anweisungen zum *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (Roche, Penzberg) durchgeführt. Die Methode basiert auf der Bindung von Annexin-V-Fluorescein an die Phosphatidylserinreste, die sich in intakten Zellen ausschließlich auf der Innenseite der Zellmembran befinden, jedoch während der frühen Apoptose auf die Aussenseite umgelagert werden. Im Gegensatz zur späten Apoptose und Nekrose werden in der frühapoptotischen Phase noch keine Poren in der Zellmembran gebildet, welche das Eindringen von PI in die Zellen möglich machen würden. Auf Grund dieser Mechanismen ist die Diskriminierung von frühapoptotischen Zellen möglich.

Zur Durchführung der Methode wurden zunächst  $10^6$  Zellen abzentrifugiert (300 x g, 5 min) und mit Sterofundin/Hepes-Puffer [1 % (v/v) 1 M Hepespuffer in Sterofundinpuffer] gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl der *Annexin-V-FLUOS labeling* – Lösung [für 10 Ansätze: 20 µl *Annexin-V-FLUOS labeling* Reagenz in 1 ml Inkubationspuffer geben und 20 µl PI-Lösung zufügen] resuspendiert. Diese Suspension wurde für 10 – 15 min bei 15-25 °C im Dunkeln inkubiert und danach am Durchflusszytometer analysiert. Dazu wurden die Zellen im *Dot-Plot*-Diagramm dargestellt. Die Annexin-V-Fluorescein markierten Zellen wurden im Fluoreszenzkanal FL-1 detektiert und die PI-Einlagerung in FL-2 gemessen. Um eine Überlappung der beiden Emissionsspektren zu verhindern wurde eine elektronische Kompensation vorgenommen. Die Trennung zwischen lebenden Zellen, frühapoptotischen Zellen und spätapoptotisch/nekrotischen Zellen erfolgte durch regionale Abgrenzung (Abb. 6), womit die verschiedenen Zellzustände prozentual quantifizierbar

wurden.



**Abb. 6 Annexin-V-FLUOS/PI-Färbung zur Bestimmung von Apoptose und Nekrose am FACS.**

Das Dot-Plot-Diagramm zeigt beispielhaft die Einteilung der Zellfraktionen in lebende Zellen (Annexin-V-FLUOS-negativ/PI-negativ, Quadrant 1, Q1), frühapoptotische Zellen (Annexin-V-FLUOS-positiv/PI-negativ, Q2), spätapoptotisch/nekrotische Zellen (Annexin-V-FLUOS-positiv/PI-positiv gefärbt, Q3) und nekrotische Zellen (Annexin-V-FLUOS-negativ/PI-positiv, Q4)

### 3 ERGEBNISSE

Im Vordergrund dieser Arbeit standen zwei Hauptprojekte, die die Analyse des Rekombinationsverhaltens an verschiedenen DNA-Sequenzen (DNA-*cis*-Elementen) betrafen. Zum einen wurde das Rekombinations- und indirekt das Bruchverhalten am leukämogenen *MLLbcr*-Fragment im Vergleich zu Kontrollsequenzen untersucht und zum anderen wurde der Einfluss verschiedener Reparaturfaktoren auf die Rekombination an Topo I-Erkennungssequenzen-tragenden DNA-Elementen analysiert.

Zur Untersuchung dieser Themenkomplexe wurde im ersten Teil dieser Arbeit das bereits etablierte Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem (Akyüz *et al.*, 2002) adaptiert. Dazu wurden die DNA-*cis*-Elemente von Interesse über verschiedene Klonierungsstufen zwischen die zwei mutierten *EGFP*-Gene des Rekombinationsvektors pHR-EGFP/3'EGFP (Akyüz *et al.*, 2002) integriert. Sequenziell wurde dafür, *upstream* zum 3'EGFP des Ursprungsvektors p5xtrEGFP, das jeweilige DNA-*cis*-Element und anschließend, das *HR-EGFP*-Gen unter vorgeschalteteten CMV-Promotor und Puromycin-Resistenzkassette integriert. Die derart konstruierten Rekombinationsvektoren eigneten sich zur Analyse der HDR (SSA und HR) in Nachbarschaft der DNA-*cis*-Elemente. Zum einen wurden sie in transienten Experimenten eingesetzt und zum anderen wurden sie zur chromosomalen Integration der verschiedenen Rekombinationskonstrukte verwendet. Letzteres ermöglichte die Analyse der Rekombination im chromosomalen Kontext.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde über das modifizierte Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem zunächst die intrinsische Fragilität des *MLLbcr*-Fragments im Vergleich zu Kontroll-*cis*-Elementen im transienten und chromosomalen Kontext bestimmt. Ausgehend von den dabei gewonnenen Erkenntnissen wurden die Bruch- und Rekombinationseigenschaften am *MLLbcr*-Fragment in Abhängigkeit von Chemotherapeutika- und CD95-Antikörper-Behandlung untersucht. Parallel dazu wurde stets, Zellzyklusverteilung und Apoptoseinduktion in den behandelten Zellen bestimmt. Dies ermöglichte die Detektion von Veränderungen dieser Zellprozesse nach Agens-Behandlung, die möglicherweise einen Einfluss auf das Rekombinationsverhalten haben.

Im weiteren Verlauf wurden die Auswirkungen verschiedener anti-apoptotischer und pro-apoptotischer Faktoren auf das Rekombinations- und Bruchverhalten am *MLLbcr*-Fragment näher untersucht. Dies diente der Unterscheidung nukleolytischer von Reparatur-Prozessen, die beide zur Entstehung von *MLL*-Rearrangements bei Leukämieentwicklung beitragen könnten.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde das Rekombinationsverhalten an Topo I-Erkennungssequenz tragenden DNA-*cis*-Elementen unter Modifikation des Expressionsstatus von p53, PARP-1 und Topo I, untersucht. Basis dieser Analysen waren vorrangigene Erkenntnisse von G.Boehden mit einem SV40-basierten Rekombinations-Testsystem. Hierbei wurde in Abhängigkeit von p53-Expression, eine Stimulierung der Rekombination an einem Topo I-Erkennungssequenz-tragenden *RAR $\alpha$ bcr*-Fragment detektiert (Boehden *et al.*, 2004). Um mögliche SV40-spezifische Effekte auszuschließen, wurde in diesem Teil der Arbeit wiederum das Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem appliziert. Dies ermöglichte die Analyse der Rekombination im transienten und chromosomalen Kontext. Des Weiteren gestattete das Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem im Gegensatz zum SV40-basierten Rekombinations-Testsystem, bei dem SV40 die Zellen in der S-Phase synchronisiert, eine von der Zellzyklus-Phase unabhängige Analyse.

### **3.1 Etablierung modifizierter Rekombinationsvektoren und chromosomal integrierter Rekombinationskonstrukte zur Analyse des Bruch- und Reparaturverhaltens an DNA-*cis*-Elementen**

Unter diesem Abschnitt wird beschrieben, wie die DNA-*cis*-Elemente von Interesse zunächst in die *spacer*-Region des Rekombinationsvektors pHR-EGFP/3'EGFP integriert wurden und anschließend die neu generierten Vektoren über ein Puromycin-Selektionsverfahren zur Etablierung stabiler Zelllinien mit chromosomal integrierten Rekombinationskonstrukten benutzt wurden.

#### **3.1.1 Klonierungsstufen zur Erzeugung von retroviralen Rekombinationsvektoren mit integrierten DNA-*cis*-Elemente**

Um die Teilsequenzen der leukämogenen *MLLbcr* (*MLLbcr*-Fragment, Abb. 1) und *RAR $\alpha$ bcr* (*retinoic acid receptor  $\alpha$  breakpoint cluster region*, *RAR $\alpha$ bcr*-Fragment, Abb. 8), sowie die Kontrollsequenzen *SV40*-Fragment (Abb. 10) und *IgHEmar*-Fragment (*immunoglobulin heavy constant epsilon matrix attachment region*, Abb. 9), mittels Fluoreszenz-basiertem Rekombinations-Testsystem untersuchen zu können, wurden diese Sequenzen zunächst in den Rekombinationsvektor pHR-EGFP/3'EGFP integriert. Anschließend wurden die generierten DNA-*cis*-Elemente tragenden Rekombinationsvektoren über Restriktions-, PCR- und Sequenzieranalysen auf ihre Korrektheit überprüft.

### 3.1.1.1 Integration des *MLLbcr*-Fragments

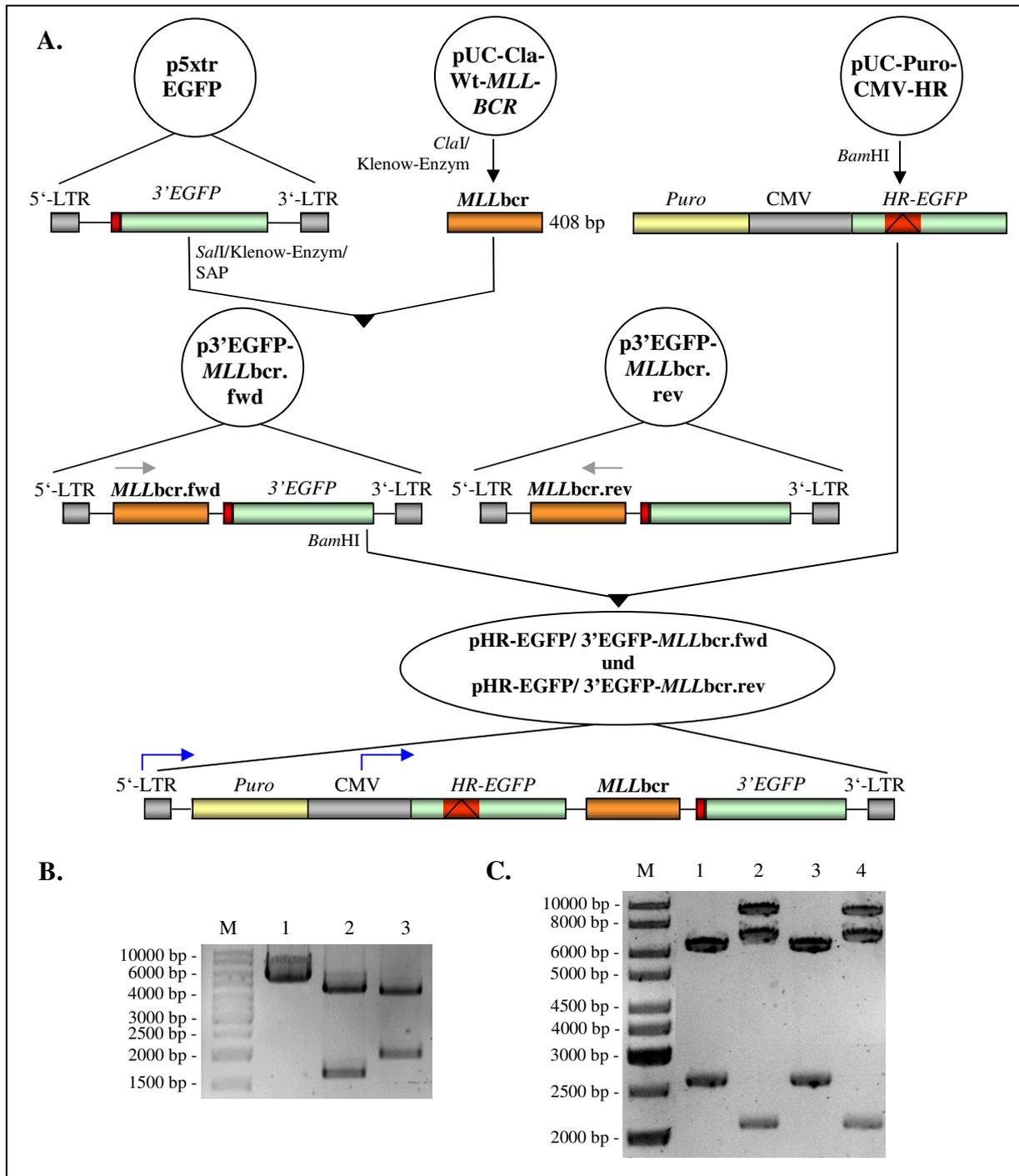
Das *MLLbcr*-Fragment ist eine 399 bp große Subregion des *MLLbcr* (Stanulla *et al.*, 1997; Strissel *et al.*, 1998), für die zahlreiche Translokationsbruchpunkte beschrieben sind (Betti *et al.*, 2001; Gillert *et al.*, 1999; Langer *et al.*, 2003; Reichel *et al.*, 2001a; Zhang *et al.*, 2004) und in der mehrere Topoisomerase-Schnittstellen sowie *hotspots* für apoptotische Spaltung lokalisiert wurden (Mirault *et al.*, 2006). Das *MLLbcr*-Fragment ist eine Teilsequenz des humanen *MLL*-Gens, die unter der *GenBank accession number* AY373585.1 (Nukleotid 53719-54117) zu finden ist und dem in Abb. 1 gelb markierten Bereich entspricht. Zur Analyse des Bruch- und Rekombinationsverhaltens dieses *MLLbcr*-Fragments wurde es in die *spacer*-Region des Rekombinationsvektors pHR-EGFP/3'EGFP integriert.

Die Klonierungsstrategie wurde in Abb. 7 schematisch dargestellt. Das *MLLbcr*-Fragment wurde aus dem, von G. Boehden generierten Vektor pUC-Cla-Wt-*MLL*-BCR (Boehden *et al.*, 2004) über eine *ClaI* Restriktion isoliert und durch eine Auffüll-Reaktion (*fill-in reaction*) des Klenow-Enzyms geglättet (*blunten*). Das auf diese Weise gewonnene 408 bp Produkt setzte sich aus dem 399 bp großen *MLLbcr*-Fragment und den Resten der *ClaI*-Erkennungssequenz des Ursprungsvektors zusammen. Das *MLLbcr*-Fragment wurde über eine *blunt end* Ligation in den mit *SalI* restringierten, Klenow-Enzym behandelten und *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) dephosphorylierten Vektor p5xtrEGFP integriert. Dieser von N. Akyüz generierte Vektor basiert auf dem retroviralen Vektor p5N-M (Laker *et al.*, 1998) mit einem integrierten 3'EGFP-Gen, in welchem das Start-Methionin des *EGFP*-Gens durch zwei Stopkodons (TAG-TGA) ersetzt wurde (Akyüz, 2001).

Für die generierten Vektoren p3'EGFP-*MLLbcr* wurden über eine Restriktionsanalyse mit *PmeI* und *NdeI*, wobei *PmeI* einzig im *MLLbcr*-Fragment spaltet, die Orientierung und integrierte Anzahl des *MLLbcr*-Fragments festgestellt. Dabei wurden zwei Fragmente von 4850 bp und 1732 bp erwartet, wenn das *MLLbcr*-Fragment einmal in Leserichtung integriert (fwd) war oder 2064 bp und 4518 bp wenn es in der entgegengesetzten Richtung (rev) enthalten war. p5xtrEGFP wurde bei der Restriktion als Kontrollvektor mitgeführt (Abb. 7 B.). Die überprüften Vektoren wurden, abhängig von der Orientierung des *MLLbcr*-Fragments, p3'EGFP-*MLLbcr*.fwd und p3'EGFP-*MLLbcr*.rev benannt.

Sie wurden mit *BamHI* geschnitten und mit SAP dephosphoryliert. Zusätzlich wurde ein 2 kb langes Fragment, bestehend aus dem *Puromycin-Resistenz*-Gen, dem CMV-Promotor und dem Rekombinationsakzeptor *HR-EGFP* mit *BamHI* aus pUC-Puro-CMV-HR isoliert, wobei das *HR-EGFP* ein um 4 bp an der Chromophor-Region deletiertes *EGFP*-Gen ist (Akyüz, 2001). Dieses Fragment wurde mit den Vektoren p3'EGFP-*MLLbcr*.fwd und p3'EGFP-

*MLLbcr.rev* ligiert. Die erhaltenen Vektoren *pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.fwd* und *pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev* wurden anschließend mit *Bgl*III auf Orientierung und mit *Nde*I auf die Anzahl des integrierten 2 kb Fragments überprüft. Selektiert wurden Vektoren, in denen das Fragment je nach Transkriptionsrichtung einmal integriert vorlag.



**Abb. 7** Klonierungsschema für die Rekombinationsvektoren *pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.fwd* und *pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev* mit integriertem *MLLbcr*-Fragment

In (A.) ist die Klonierung des *MLLbcr*-Fragments schematisch dargestellt. Kreise und Ellipsen symbolisieren Vektorkonstrukte. Die grauen Pfeile markieren die Leserichtung des *MLLbcr*-Fragments. Die blauen Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtungen. An den schwarzen Pfeilen wurden die verwendeten Vektor- oder Fragment-modifizierenden Enzymen angegeben. In (B.) ist die Restriktion mit *Pme*I und *Nde*I zur Analyse der *MLLbcr*-Fragment Orientierung dargestellt. Spur 1: Kontrollspaltung von *p5xtrEGFP*; Spur 2: Spaltung von

p3'EGFP-*MLL*bcr.fwd; Spur 3: Spaltung von p3'EGFP-*MLL*bcr.rev. (C.) zeigt die Restriktion mit *Nde*I, zur Analyse der Anzahl der integrierten *Puro*-CMV-*HR*-*EGFP* Kassetten, und mit *Bgl*II, zur Analyse der Orientierung dieser Kasette. Spur 1: Spaltung von pHR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.rev mit *Nde*I; Spur 2: Spaltung von pHR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.rev mit *Bgl*II; Spur 3: Spaltung von pHR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd mit *Nde*I Spur 4: Spaltung von pHR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.rev mit *Bgl*II

Die Restriktion mit *Bgl*II führte zu einem 2 kb und 6,5 kb großen Fragment, sowie einer dritten Bande des partiell verdauten Vektors von 8,5 kb (Abb. 7 C.; Spur 2 und 4). Die Spaltung mit *Nde*I führte, bei Orientierung in Transkriptionsrichtung, zu 2,5 kb und 6 kb großen Restriktionsprodukten (Abb. 7 C.; Spur 1 und 3).

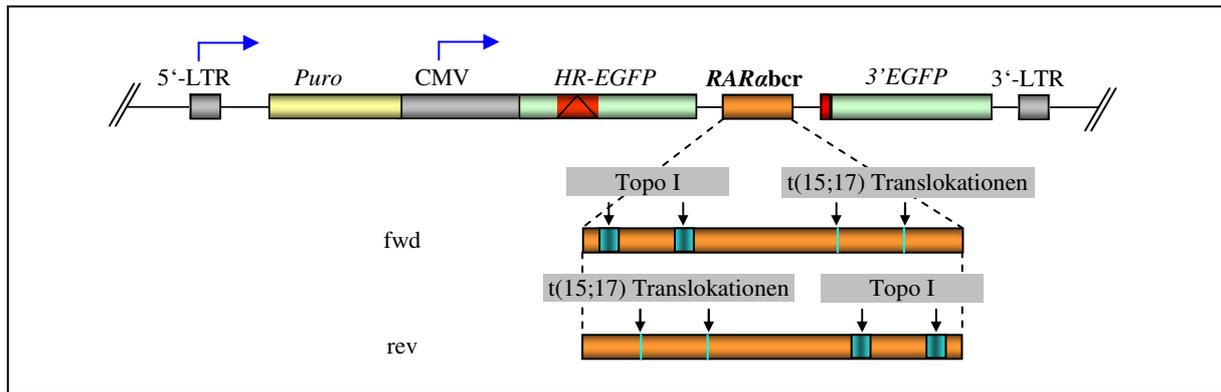
### 3.1.1.2 Integration des *RAR* $\alpha$ bcr-Fragments

Die *RAR* $\alpha$ bcr liegt innerhalb des, bei APL (Akute Promyelozytenleukämie) Patienten betroffenen, 12 kb großen *RAR* $\alpha$ -Gens, (*GenBank accession number* NT 010755.15 Alcalay *et al.*, 1991). Innerhalb dieser Region wurden zwei t(5;17)-Translokationspunkte (Alcalay *et al.*, 1991; de The *et al.*, 1990) und zwei Topo I-Erkennungsstellen (A/TGATG), nach den stringenten Kriterien von Jaxel *et al.* 1988 und Tsui *et al.* 1989, identifiziert (Abb. 8).

Das *RAR* $\alpha$ bcr-Fragment wurde aus dem, von G. Boehden generierten Vektor pUC-Cla-Wt-*RAR* $\alpha$ -BCR (Boehden *et al.*, 2004) über eine *Cla*I Restriktion isoliert und mit einer Auffüllreaktion des Klenow-Enzyms geglättet. Das auf diese Weise gewonnene Produkt enthielt das *RAR* $\alpha$ bcr-Fragment in Größe von 281 bp. Die Gesamtgröße betrug 289 bp, was auf enthaltene Reste der *Cla*I-Erkennungssequenz des Ursprungsvektors zurückzuführen ist. Das *RAR* $\alpha$ bcr-Fragment wurde über eine *blunt end* Ligation in den, mit *Sal*I restringierten, Klenow-Enzym behandelten und SAP dephosphorylierten, Vektor p5xtrEGFP integriert.

Durch eine Restriktionsanalyse der erhaltenen Vektoren p3'EGFP-*RAR* $\alpha$ bcr.fwd und p3'EGFP-*RAR* $\alpha$ bcr.rev mit *Xba*I und *Xcm*I wurde die Orientierung und integrierte Anzahl des *RAR* $\alpha$ bcr-Fragments festgestellt. Dabei wurden fünf Fragmente 2995 bp, 1460 bp, 1219 bp, 702 bp und 87 bp erwartet, wenn das *RAR* $\alpha$ bcr-Fragment einmal in Leserichtung integriert (fwd) war oder 2995 bp, 1220 bp, 1219 bp, 702 bp und 327 bp wenn es in der entgegengesetzten Richtung (rev) enthalten war.

Die so überprüften Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-*RAR* $\alpha$ bcr.fwd und pHR-EGFP/3'EGFP-*RAR* $\alpha$ bcr.rev wurden, wie unter Abschnitt 3.1.1.1 beschrieben, weiter behandelt, um das 2 kb große *Puro*-CMV-*HR*-*EGFP*-Konstrukt *upstream* zum *RAR* $\alpha$ bcr-Fragment zu integrieren. In Abb. 8 sind die beiden Vektoren grafisch dargestellt und die Unterschiede der Orientierung des *RAR* $\alpha$ bcr-Fragments innerhalb des Vektors verdeutlicht.



**Abb. 8 Grafische Darstellung der Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP-RARabc.fwd und pHR-EGFP/3'EGFP-RARabc.rev mit integriertem RARabc-Fragment.**

Das RARabc-Fragment liegt zwischen den beiden mutierten EGFP-Genen, HR-EGFP und 3'EGFP, als interstitielle Sequenz vor. Innerhalb dieser Position wurde das RARabc-Fragment jeweils in der Leserichtung (fwd), gemäß der DNA-Sequenz der GenBank accession number NT 010755.15 Alcalay *et al.*, 1991, und entgegen der Leserichtung (rev) integriert, so dass zwei Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-RARabc.fwd und pHR-EGFP/3'EGFP-RARabc.rev generiert wurden. Die blauen Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtungen.

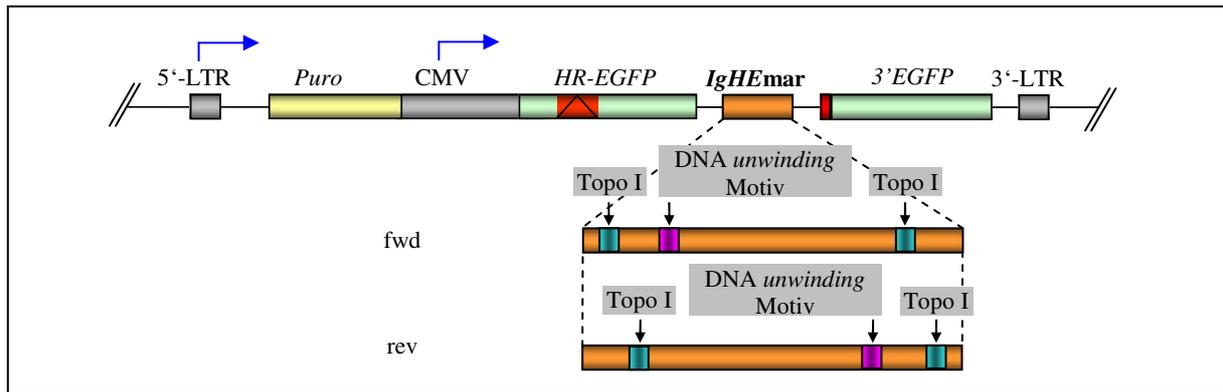
### 3.1.1.3 Integration des IgHEmar-Fragments

Das IgHEmar-Fragment ist eine AT-reiche Sequenz aus der 5'-mar (*matrix attachment region*) des Genlokus der schweren Kette der Immunglobuline der Maus (IgHE; GenBank accession number NT 114985.2). Es enthält ein DNA *unwinding*-Motiv (AAATATTT), ein Element, für das eine rekombinationssteigernde Wirkung angenommen wird (Boulikas, 1995; Will *et al.*, 1998a) und zwei Topo I-Erkennungssequenzen nach den stringenten Kriterien von Jaxel *et al.* 1988 und Tsui *et al.* 1989 (Abb. 9).

Das IgHEmar-Fragment wurde aus dem Vektor pUC19-IgHE-MAR (Will *et al.*, 1998a) mit *Xba*I und *Pst*I isoliert und mit T4-Polymerase behandelt. Das auf diese Weise gewonnene Produkt enthielt das IgHEmar-Fragment in Größe von 376 bp. Das IgHEmar-Fragment wurde über eine *blunt end* Ligation in den mit *Sal*I restringierten, Klenow-Enzym behandelten und SAP dephosphorylierten Vektor p5xtrEGFP integriert.

Durch eine Restriktionsanalyse der erhaltenen Vektoren p3'EGFP-IgHEmar mit *Afl*III wurde die Orientierung und integrierte Anzahl des IgHEmar-Fragments festgestellt. Dabei wurden vier Fragmente von 3773 bp, 1031 bp, 986 bp und 762 bp erwartet, wenn das IgHEmar-Fragment einmal in Leserichtung integriert (fwd) war oder 3773 bp, 1223 bp, 986 bp und 570 bp wenn es in der entgegengesetzten Richtung (rev) enthalten war.

Die Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.fwd und pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.rev (Abb. 9) wurden, wie unter Abschnitt 3.1.1.1 beschrieben, weiter behandelt, um das 2 kb große Puro-CMV-HR-EGFP-Konstrukt *upstream* zum IgHEmar-Fragment zu integrieren.



**Abb. 9 Grafische Darstellung der Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.fwd und pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.rev mit integriertem IgHEmar-Fragment.**

Das *IgHEmar*-Fragment liegt zwischen den beiden mutierten *EGFP*-Genen, *HR-EGFP* und *3'EGFP*, als interstitielle Sequenz vor. Innerhalb dieser Position wurde das *IgHEmar*-Fragment jeweils in der Leserichtung (fwd), gemäß der DNA-Sequenz der *GenBank accession number* NT 114985.2, und entgegen der Leserichtung (rev) integriert, so dass zwei Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.fwd und pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.rev generiert wurden. Die blauen Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtungen.

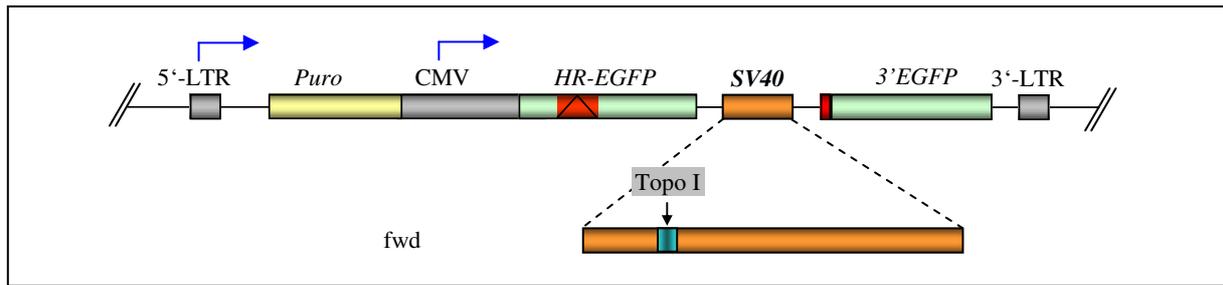
### 3.1.1.4 Integration des SV40-Fragments

Das als Kontrollsequenz dienende *SV40*-Fragment enthält eine Topo I-Erkennungsstelle, nach den stringenten Kriterien von Jaxel *et al.* 1988 und Tsui *et al.* 1989 (Abb. 10) und ist in einem Abschnitt der späten Region des *SV40* Genoms lokalisiert (*GenBank accession number* NC 001669), die für das Kapsidprotein VP1 kodiert (Fiers *et al.*, 1978). Innerhalb des *SV40*-Fragments wurden keine DNA-Elemente bzw. -Charakteristika beschrieben, die zu dessen Instabilität beitragen könnten.

Es wurde aus dem Vektor pUC-Kpn-SV40 mit *XcmI* und *BamHI* isoliert und mit T4-Polymerase behandelt. Das auf diese Weise gewonnene Produkt enthielt das *SV40*-Fragment von 413 bp. Das *SV40*-Fragment wurde über eine *blunt end* Ligation in den mit *SalI* restringierten, Klenow-Enzym behandelten und SAP dephosphorylierten Vektor p5xtrEGFP integriert.

Durch eine Restriktionsanalyse der erhaltenen Vektoren p3'EGFP-SV40.fwd mit *HincII* wurde die Orientierung und integrierte Anzahl des *SV40*-Fragments festgestellt. Dabei wurden zwei Fragmente 882 bp und 5703 bp erwartet, wenn das *SV40*-Fragment einmal in Leserichtung integriert (fwd) war oder 5640 bp und 945 bp wenn es in der entgegengesetzten Richtung (rev) enthalten war.

Der Vektor pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd (Abb. 10) wurde, wie unter Abschnitt 3.1.1.1 beschrieben, weiter behandelt, um das 2 kb große *Puro*-*CMV*-*HR-EGFP*-Konstrukt *upstream* zum *SV40*-Fragment zu integrieren.



**Abb. 10 Grafische Darstellung des Rekombinationsvektors pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd mit integriertem SV40-Fragment.**

Das SV40-Fragment liegt zwischen den beiden mutierten EGFP-Genen, HR-EGFP und 3'EGFP, als interstitielle Sequenz vor. Innerhalb dieser Position wurde das SV40-Fragment in der Leserichtung (fwd), gemäß der DNA-Sequenz der GenBank accession number NC 001669 integriert, so dass ein Vektor pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd generiert wurde. Eine Integration entgegen der Leserichtung war trotz wiederholter Klonierungsversuche nicht möglich. Die blauen Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtungen.

### 3.1.1.5 PCR-Analyse und Sequenzierung zur Überprüfung der DNA-cis-Elemente tragenden Rekombinationsvektoren

Die Integration der korrekten DNA-cis-Elemente in die Rekombinationsvektoren wurde mittels PCR-Analyse überprüft. Die dafür verwendeten Oligonukleotide (in-Primer) binden jeweils innerhalb des zugehörigen DNA-cis-Elements. So wurde mit den Primern inMLL.fwd und inMLL.rev ein 356 bp großes Produkt aus den Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.fwd und pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev amplifiziert (Abb. 11 A.). Die für unter Abschnitt 3.1.1.1 - 3.1.1.4 beschriebenen Rekombinationsvektoren verwendeten Oligonukleotide und erhaltenen PCR-Produkte wurden in Tab. 10 zusammengefasst.

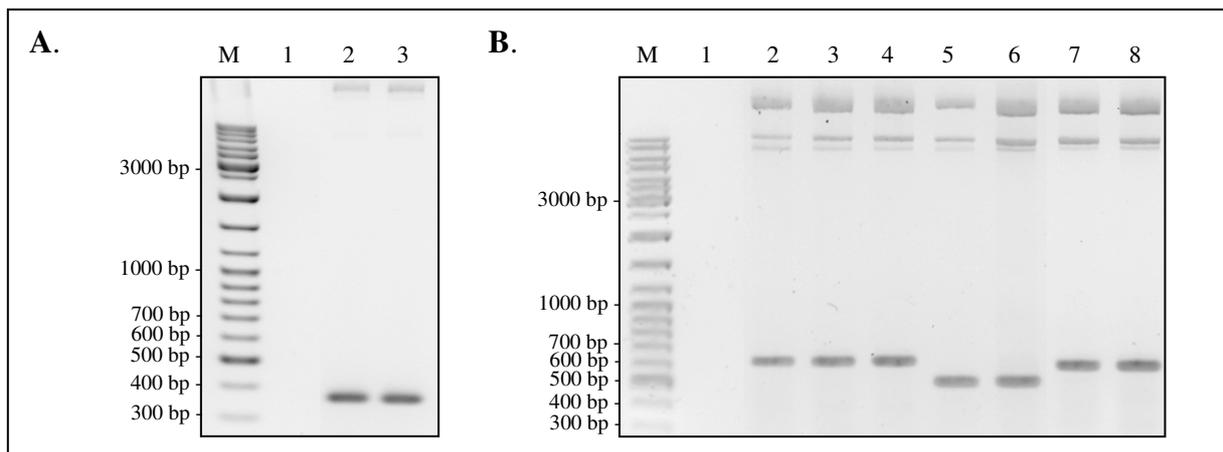
**Tab. 10 Oligonukleotide zur Analyse der DNA-cis-Elemente innerhalb der Rekombinationsvektoren und die Größen der amplifizierten PCR-Produkte**

Die verschiedenen in-Primer binden jeweils innerhalb des zugehörigen DNA-cis-Elements. Die cis-Primer binden an die mutierten EGFP-Gene, die den DNA-cis-Elementen innerhalb der Rekombinationsvektoren beidseitig angelagert sind.

Vektor	in-Primer	PCR-Produkte mit in-Primern	PCR-Produkte mit cis-Primern
pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.fwd	inMLL.fwd/ inMLL.rev	356 bp	633 bp*
pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev	inMLL.fwd/ inMLL.rev	356 bp	635 bp
pHR-EGFP/3'EGFP-RARabcr.fwd	inRARα.fwd/ inRARα.rev	205 bp	514 bp
pHR-EGFP/3'EGFP-RARabcr.rev	inRARα.fwd/ inRARα.rev	205 bp	514 bp
pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.fwd	inIgHE.fwd/ inIgHE.rev	236 bp	601 bp
pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.rev	inIgHE.fwd/inIgHE.rev	236 bp	601 bp
pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd	inSV40.fwd/inSV40.rev	236 bp	638 bp

\* Die Diskrepanz zwischen den PCR-Produkten der Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.fwd und pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev unter Verwendung der cis-Primer liegt an dem Verlust von zwei Nukleotiden im Ersteren. Die fehlenden Nukleotide liegen nicht im Bereich des MLLbcr-Fragments selbst, sondern im nicht-kodierenden Übergangsbereich zum Vektorrückgrat.

Die DNA-*cis*-Elemente der Rekombinationsvektoren wurden des Weiteren mit den Oligonukleotiden *cis.fwd* und *cis.rev* analysiert, die in den angrenzenden mutierten *EGFP*-Genen binden (Abb. 11 B.). Dies hatte zur Folge, dass sowohl *cis.fwd* als auch *cis.rev* im Akzeptor-*EGFP* und im Donor-*EGFP* der Vektoren binden konnten. Aufgrund der gewählten PCR Bedingungen führte dies jedoch nicht zu einem zweiten unerwünschten Amplikon. Die PCR-Produkte gemäß Tab. 10 wurden von der Fa. Thermo Electron GmbH (Ulm) sequenziert. Die Sequenzierung ergab für *pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.fwd* zwei fehlende Nukleotide in der interstitiellen Sequenz zwischen DNA-*cis*-Element und Donor-*EGFP* und hatte somit keine Auswirkung auf das *MLLbcr*-Fragment und das mutierte *EGFP*-Gen. Die PCR-Produkte der Vektoren *pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev*, *pHR-EGFP/3'EGFP-RARabcr.fwd*, *pHR-EGFP/3'EGFP-RARabcr.rev*, *pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.fwd*, *pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.rev* und *pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd* waren vollständig korrekt (Anhang 8.4).



**Abb. 11 Überprüfung der in die Rekombinationsvektoren integrierten DNA-*cis*-Elemente per PCR-Analyse.**

In (A.) sind beispielhaft die Produkte der PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden *inMLL.fwd* und *inMLL.rev*, die im *MLLbcr*-Fragment binden, gezeigt. Spur 1: Negativkontrolle; Spur 2: PCR-Produkt der Matrize *pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.fwd*; Spur 3: PCR-Produkt der Matrize *pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev*. In (B.) ist die PCR-Analyse mit den Primern *cis.fwd* und *cis.rev*, die in den die *cis*-Elemente umgebenden mutierten *EGFP*-Genen der Rekombinationsvektoren binden, dargestellt. Spur 1: Negativkontrolle; Spur 2: PCR-Produkt der Matrize *pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd*; Spur 3: PCR-Produkt der Matrize *pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.fwd*; Spur 4: PCR-Produkt der Matrize *pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev*; Spur 5: PCR-Produkt des templates *pHR-EGFP/3'EGFP-RARabcr.fwd*; Spur 6: PCR-Produkt der Matrize *pHR-EGFP/3'EGFP-RARabcr.rev*; Spur 7: PCR-Produkt der Matrize *pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.fwd*; Spur 8: PCR-Produkt der Matrize *pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.rev*.

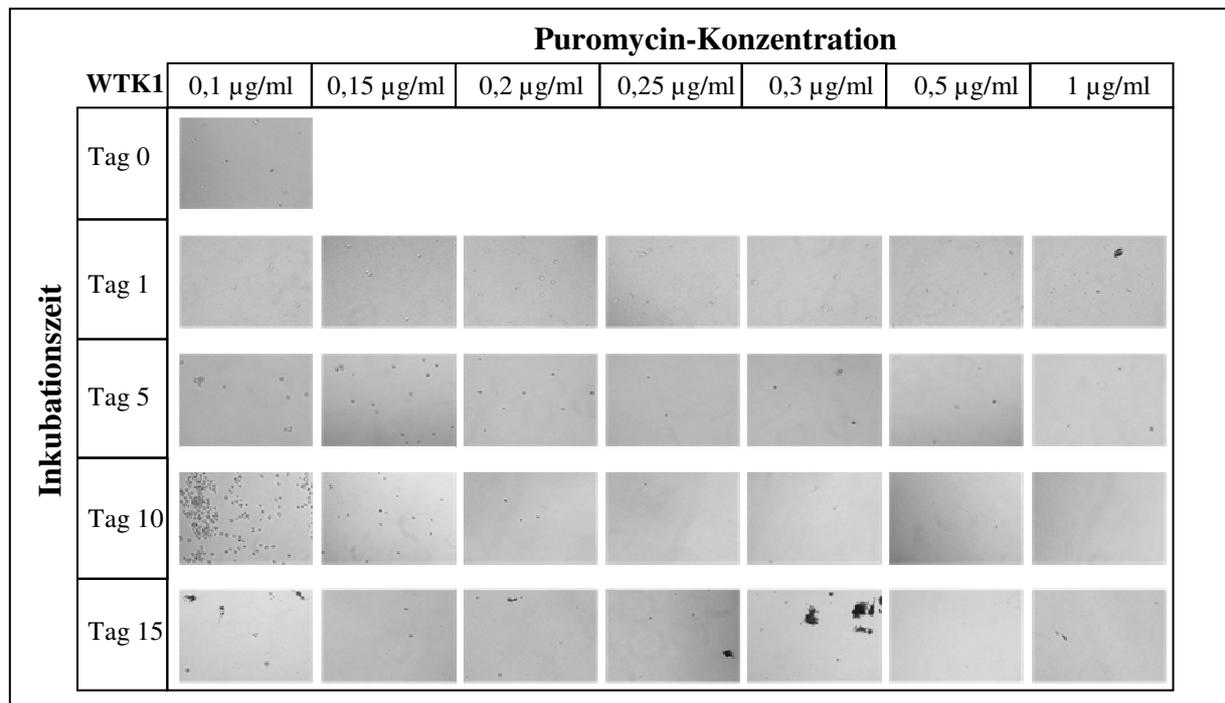
### 3.1.2 Etablierung der stabilen Zelllinien WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd*), WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev*) und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd*)

Um neben transienten Experimenten, bei denen verschiedene Zelllinien mit den unter Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Rekombinationsvektoren temporär transfiziert werden, die

Analyse des *MLLbcr*- und *SV40*-Fragments im chromosomalen Kontext zu ermöglichen, wurden die Rekombinationskonstrukte HR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd*, HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* und HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev* aus den jeweiligen Rekombinationsvektoren stabil in die lymphoblastoide Zelllinie WTK1 integriert. Diese humane Zelllinie trägt eine Mutation im *p53*-Gen, die zum Aminosäureaustausch M237I in der DNA-Bindedomäne von p53 führt (Xia *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde versucht die genannten Rekombinationskonstrukte in die lymphoblastoide p53-wt Zelllinie TK6 (Xia *et al.*, 1995), die der selben parentalen Zelllinie wie WTK1 entstammt, zu integrieren. Trotz mehrfacher Versuche gelang dies, möglicherweise aufgrund der starken apoptotischen Wirkung von wt-p53 in Kombination mit Puromycin-Stress, nicht.

### **3.1.2.1 Bestimmung der optimalen Puromycin-Konzentration zur Selektion von WTK1 Zellklonen mit chromosomal integrierten Rekombinationskonstrukten**

Damit die Rekombinationskonstrukte chromosomal in WTK1 integriert werden konnten, erfolgte die Selektion der stabilen WTK1 Zellen mittels Puromycin. Dies war möglich durch die den Rekombinationskonstrukten vorgelagerte *Puromycin*-Resistenz-Kassette der Vektoren, da stabile Klone nach randomisierter Integration dieses Resistenzgens ins Chromosom überlebensfähig sind. Um die optimale Puromycin-Konzentration zu bestimmen, bei der ausschließlich die Zellen mit chromosomal integrierter Resistenz-Kassette überleben, wurde die Ursprungszelllinie WTK1 zunächst auf die lethale Dosis von Puromycin untersucht (Abb. 12). Dazu wurden  $2 \cdot 10^6$  WTK1 Zellen mit 30 µg pBS (Kontrollvektor ohne *Puromycin*-Resistenz-Gen) elektroporiert und in Puromycin-freiem Medium für 48 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Selektionsmedium mit unterschiedlichen Puromycin-Konzentrationen (0,1 µg/ml – 1 µg/ml) transferiert und jeweils 100 Zellen/100 µl in 16 Vertiefungen einer 96-Loch-Platte ausgesät. Über einen Zeitraum von 16 Tagen wurde täglich eine Vertiefung der 16 pro Puromycinkonzentration mit Trypanblau gefärbt und mikroskopiert (Abb. 12). Die optimale Puromycin-Konzentration wurde auf 0,15 µg/ml festgelegt, da bei dieser Konzentration die gesamte Zellpopulation abgestorben war. Diese Konzentration wurde im weiteren Verlauf für die Etablierung der stabilen Zelllinien verwendet.



**Abb. 12 Detektion der optimalen Puromycin-Konzentration für die Etablierung der stabilen Zelllinien WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd), WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.rev) und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*SV40*.fwd)**

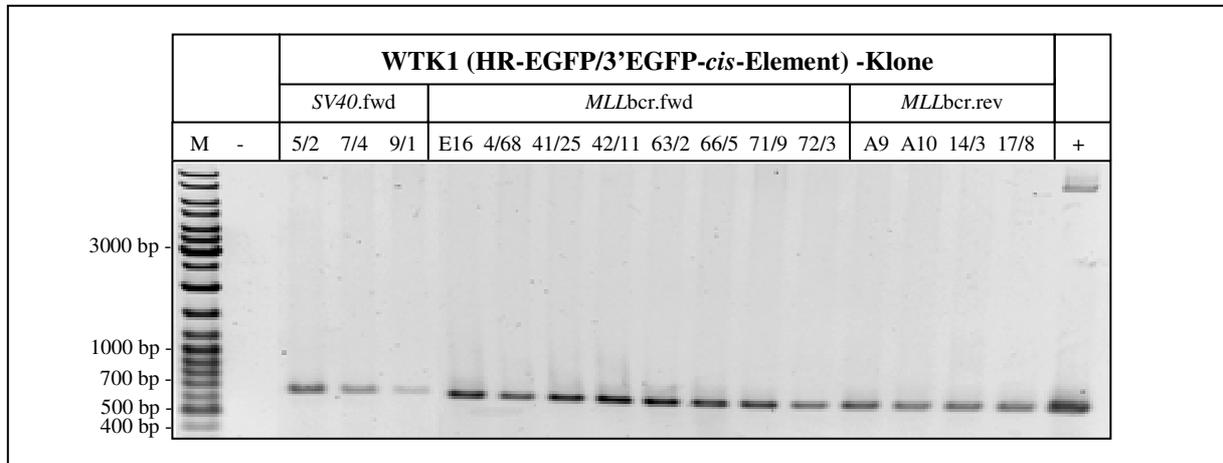
Die Ursprungszelllinie WTK1 wurde nach Transfektion mit pBS (Kontrollvektor) 48 h in Puromycin-freiem Medium kultiviert und anschließend 100 Zellen pro 100 µl 16 Tage lang in Selektionsmedium mit verschiedenen Puromycinkonzentrationen inkubiert. Die Zellen wurden täglich nach einer Trypanblau-Färbung mikroskopiert und alle fünf Tage fotografiert. Die optimale Konzentration, bei der die WTK1 Zellen nach 16 Tagen tot waren, betrug 0,15 µg/ml.

### 3.1.2.2 Etablierung und Überprüfung der WTK1 Zellklone mit chromosomal integrierten Rekombinationskonstrukten

Um die stabilen Zelllinien WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd), WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.rev) und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*SV40*.fwd) zu generieren, wurden  $2 \cdot 10^6$  Zellen der Ursprungszelllinie WTK1 mit 30 µg des jeweiligen Rekombinationsvektors pHR-EGFP/3'EGFP-*SV40*.fwd, pHR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd oder pHR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.rev elektroporiert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen 48 h in Medium ohne Puromycin kultiviert, danach in Selektionsmedium mit 0,15 µg/ml Puromycin überführt und schließlich 100 Zellen/100 µl in 96-Loch-Platten ausgesät. Die angewachsenen Zellsuspensionen in 6-Loch-Platten überführt und nach Erreichen einer adequaten Zelldichte von mindestens  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml mit 10 µg pBS oder dem Meganuklease I-*SceI* exprimierenden Vektor pCMV-I-*SceI* elektroporiert. Nach 48 h Kultivierung wurden die Rekombinationsereignisse in den Zellen mittels FACS-Analyse detektiert. Klone, die nach Induktion mit I-*SceI* den Schwellenwert der Rekombinationsfrequenz von 0,02 % erreicht oder überschritten hatten, wurden in 15 cm Schalen angezogen, Aliquote bei -80 °C aufbewahrt und für eine 2. Selektionsphase zur

Gewinnung von Klonen aus Einzelzellen eingesetzt.

Dazu wurde die Zelldichte für jeden, aus 100 Zellen entstandenen Klon auf 5 Zellen/ml in Puromycin-haltigem Selektionsmedium eingestellt. Je 100 µl dieser Zellsuspension wurde pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte ausgesät. Das entsprach 0,5 Zellen pro Vertiefung. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen/Vertiefung mikroskopisch bestimmt und markiert. Wie in der ersten Selektionsphase wurden die Zellen kultiviert und die angewachsenen Zellsuspensionen in 6-Well-Platten überführt. Anschließend wurden die Zellen mit pBS oder dem pCMV-I-SceI elektroporiert und die Rekombinationsereignisse der Zellen nach 48 h mittels FACS-Analyse detektiert. Klone, die nach Induktion mit I-SceI den Schwellenwert der Rekombinationsfrequenz von 0,02 % erreicht oder überschritten hatten, wurden in 15 cm Schalen angezogen und Aliquote bei -80 °C eingefroren. Von ausgewählten Klonen wurde mittels QIAGEN *Blood & Cell Culture DNA Kit* (QIAGEN, Hilden) die chromosomale DNA isoliert. Diese wurde per PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden cis.fwd und cis.rev auf die Integration der Regionen HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd, HR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.fwd oder HR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev überprüft. Die analysierten Klone zeigten alle ein ca. 630 bp großes PCR-Produkt (Abb. 13) und bestätigten somit die erfolgreiche Integration der Rekombinationskonstrukte in das Genom der Zelllinie WTK1.

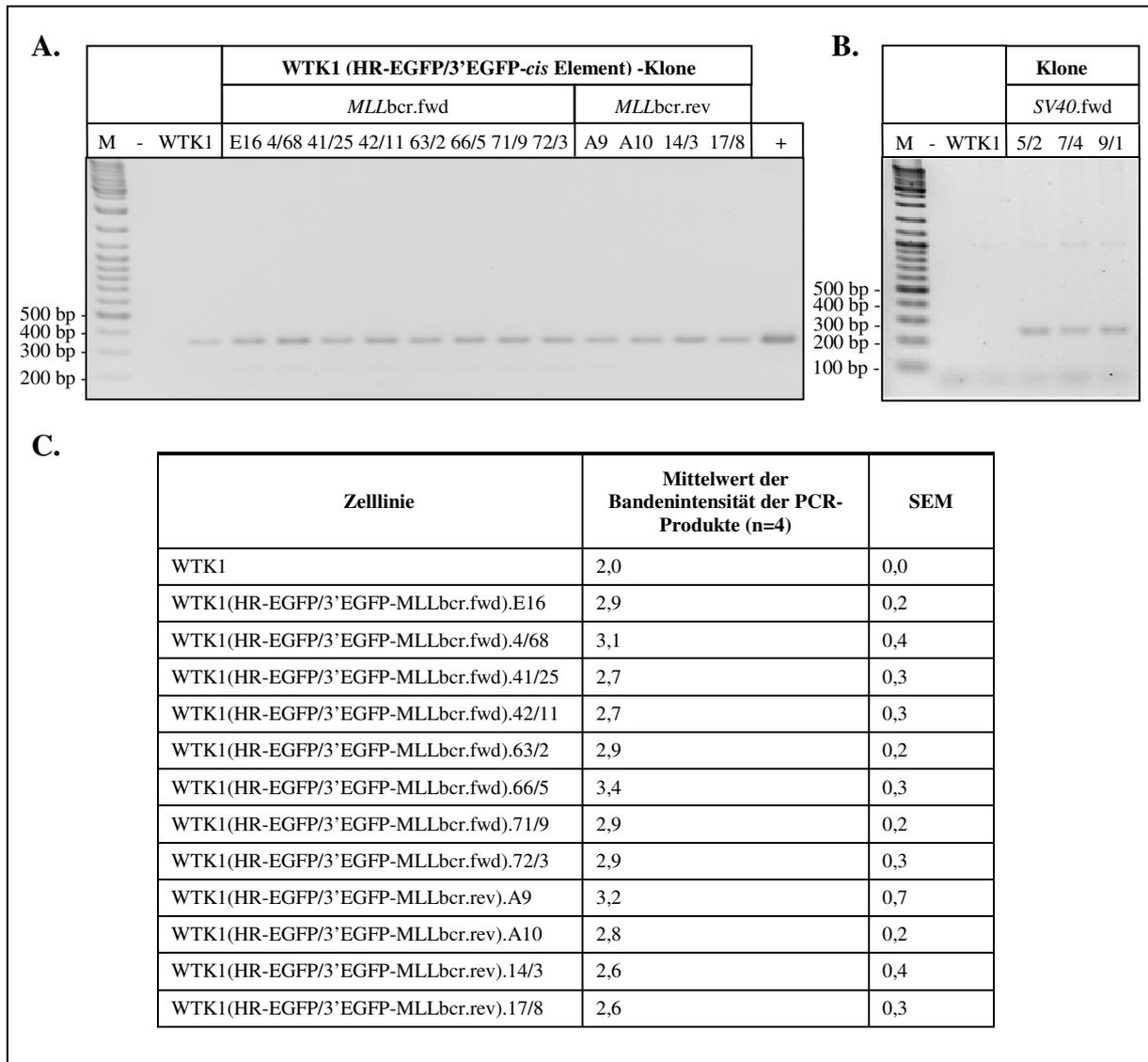


**Abb. 13 PCR-Analyse zur Überprüfung der chromosomalen Integration der Rekombinationskonstrukte HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd, HR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.fwd und HR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev in einzelnen WTK1-Klonen**

Dargestellt ist die Auftrennung der PCR-Produkte erhalten mit den Oligonukleotiden cis.fwd und cis.rev, die in den mutierten *EGFP*-Genen der Rekombinationskonstrukte binden. Das Minus (-) markiert die Spur der Negativkontrolle. Die PCR-Produkte der stabilen Zelllinien wurden mit ihrer jeweiligen Klonnummer und dem integrierten DNA-cis-Element markiert. Die letzte Spur (+) zeigt das PCR-Produkt der Matrize pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.fwd (Positivkontrolle). Die Klone A9 und A10 sind aus der gleichen Zellklonpopulation, der ersten Selektionsphase aus 100 entstanden.

### 3.1.2.3 Analyse der Anzahl an chromosomal integrierten DNA-*cis*-Element-tragenden Rekombinationskonstrukten innerhalb der WTK1 Zellklone

Um zu überprüfen, wie oft die DNA-*cis*-Element-tragenden Rekombinationskonstrukte in die stabilen WTK1 Zelllinien integriert wurden, erfolgte die Analyse der isolierten chromosomalen DNA der Zellen mit integriertem HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* oder HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev* mit den Oligonukleotiden *inMLL.fwd* und *inMLL.rev* per PCR. Die chromosomale DNA mit integrierten HR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd* wurde mit den Oligonukleotiden *inSV40.fwd* und *inSV40.rev* untersucht (Abb. 14). Beide Primerpaare binden innerhalb der DNA-*cis*-Elemente und nicht in den mutierten *EGFP*-Genen. Zusätzlich diente die Ursprungszelllinie WTK1 als Standard für die *MLLbcr*-Fragment Integration, da das *MLL*-Gen bereits zweimal natürlich im doppelten Chromosomensatz in der Zelllinie vorliegt. Somit konnten die PCR-Produkte der natürlich vorliegenden *MLLbcr*-Genabschnitte aus WTK1 zum quantitativen Vergleich, mit den PCR-Produkten der Klone mit nativen und künstlich integrierten *MLLbcr*-Fragmente, genutzt werden (Abb. 14 A. und C.). Es zeigte sich, dass die Bandenintensität des PCR-Produkts der chromosomalen DNA aus WTK1 im Vergleich zu den Intensitäten der PCR-Produkte der Klone um ca. 1/3 schwächer ist. In Abb. 14 C. sind vier PCR-Analysen für die Anzahl der integrierten HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd*- oder HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev*-Regionen tabellarisch zusammengefasst. Diese Tabelle verdeutlicht, dass alle analysierten Klone die jeweiligen Rekombinationskonstrukte nur einmal chromosomal integriert hatten, da sich die festgelegte Basisintensität für das PCR-Produkt des *MLLbcr*-Fragments von 2,0 für WTK1 in Bezug auf die Klone maximal auf 3,4 erhöhte. Daraus ergibt sich die chromosomale Integration eines Rekombinationskonstrukts pro Klon. Für die Klone mit dem integrierten HR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd*-Substrat wurde WTK1 in der PCR-Analyse als Negativkontrolle genutzt (Abb. 14 B.). Ein quantitativer Vergleich war hier nicht möglich, da das virale *SV40*-Fragment nicht innerhalb von WTK1 vorkommt. Aufgrund der geringen Bandenintensität der PCR-Produkte zu den *SV40*-Klonen mit integriertem HR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd*-Substrat lässt sich jedoch annehmen, dass sie nur einmal integriert wurden (Abb. 14 C.). Da alle HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* oder HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev* tragenden Klone das Rekombinationssubstrat ebenfalls nur einmal inseriert hatten, untermauert diese Annahme, da alle Klone sowohl qualitativ als auch quantitativ in gleicher Weise generiert wurden.



**Abb. 14 PCR-Analyse zur Anzahl von den in WTK1-Klonen chromosomal integrierten Rekombinationskonstrukten HR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd*, HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* und HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev*.**

Die chromosomal isolierte DNA der WTK1-Klone wurde als Matrize zur Bestimmung der Anzahl der chromosomal integrierten Rekombinationskonstrukte per PCR-Analyse eingesetzt. (A.) Gezeigt sind die, mit den innerhalb des *MLLbcr*-Fragments bindenden Oligonukleotiden in *MLL.fwd* und in *MLL.rev*, entstandenen PCR-Produkte zu Klone mit den Rekombinationskonstrukten HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* und HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev* und zu der Ursprungszelllinie WTK1. Das Minus (-) markiert die Spur der Negativkontrolle. Das Plus (+) markiert die Spur der Ladekontrolle, für welche der Vektor pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* verwendet wurde. Die Klone A9 und A10 sind aus der gleichen Zellklonpopulation, also der ersten Selektionsphase aus 100 entstanden. (B.) Gezeigt sind die, mit den innerhalb des *SV40*-Fragments bindenden Oligonukleotiden in *SV40.fwd* und in *SV40.rev* entstandenen PCR-Produkte zu Klone mit HR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd*. Die chromosomale Matrizen-DNA der Ursprungszelllinie WTK1 und eine Matrizen-freier PCR-Ansatz (-) wurden als Negativkontrollen mitgeführt. Eine zusätzliche schwache unspezifische Bande auf 1000 bp Markerhöhe findet sich in allen Spuren (Ladekontrolle), außer der mit Minus (-) markierten Spur. In (C.) sind die Mittelwerte der Bandenintensitäten der PCR-Produkte aus vier Experimenten für die HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* und HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev* tragenden Klone tabellarisch zusammengefasst. Als Bezugspunkt der Kalkulation wurde die Bandenintensität des *MLLbcr*-PCR-Produkts für WTK1 auf 2,0 gesetzt, da die *MLLbcr*-Region im doppelten Chromosomensatz zweimal vorliegt und so eine entsprechende Bewertung der Anzahl der künstlich integrierten Rekombinationskassetten ermöglicht.

## **3.2 Analyse des Bruch- und Rekombinationsverhaltens des *MLLbcr*-Fragments**

Die unter Abschnitt 3.1.1.1. beschriebene Klonierung des *MLLbcr*-Fragments und anderer DNA-*cis*-Elemente in die Rekombinationsvektoren ermöglichte die Analyse der basalen Fragilität der Leukämie-relevanten *MLLbcr*, sowie deren Bruch- und Rekombinationsverhalten unter Manipulation verschiedenster intrinsischer und extrinsischer Faktoren im Vergleich zu anderen DNA-Sequenzen. Die Anwendung des Systems basierte dabei im extrachromosomalen Kontext auf der Transfektion adäquater Zelllinien mit den Rekombinationsvektoren oder im chromosomalen Kontext auf Zelllinien mit stabil integrierten Rekombinationskonstrukten (Abschnitt 3.1.2). Je nach Fragestellung wurden die Zellen mit Chemotherapeutika oder anderen Agenzien behandelt oder die Expression von Zielproteinen über vektorielle Expressionssysteme und shRNA-Methodik modifiziert. Komplementierend zur kombinierten Analyse des Bruch- und Rekombinationsverhaltens des *MLLbcr*-Fragments und seiner Kontrollsequenzen über das Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem wurde ein PCR-basiertes Verfahren zur isolierten Bruchanalyse und verschiedene Methoden zur Bestimmung von Apoptose- und Zellzyklusverhalten eingesetzt.

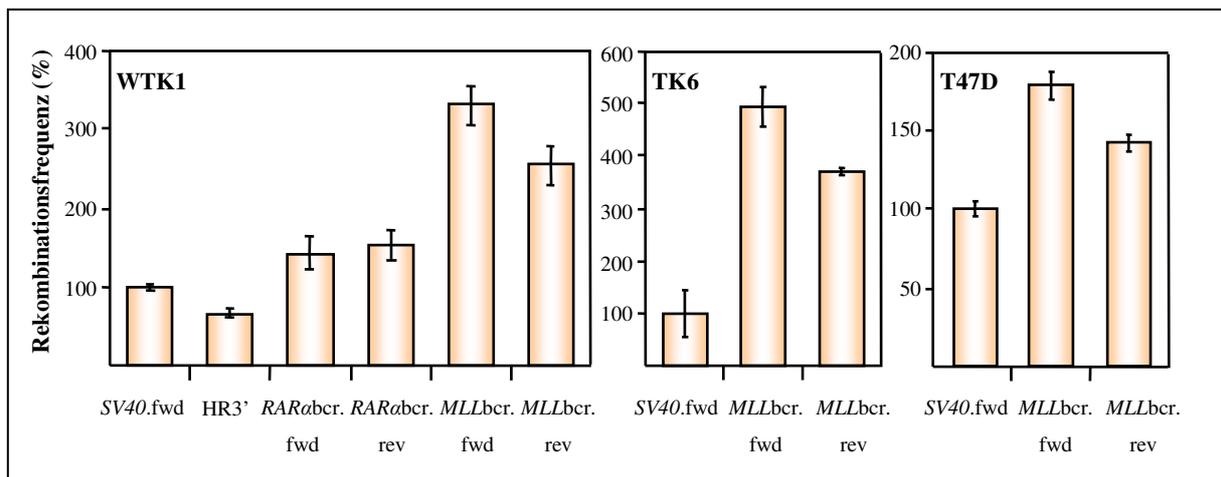
### **3.2.1 Analyse der Rekombination am transient eingeführten *MLLbcr*-Fragment**

Bisher konnte nie ausreichend belegt werden, dass die *MLLbcr* im Vergleich zu anderen DNA-Sequenzen eine hochfragile Region ist und aus diesem Grund möglicherweise zur hohen Beteiligung von *MLL*-Rearrangements in Leukämien beiträgt (Harper and Aplan, 2008).

Durch das modifizierte Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem wurde es jedoch möglich die Fragilität der *MLLbcr* zu bewerten. Dazu wurde ein ca. 400 bp großer Abschnitt der *MLLbcr*, das *MLLbcr*-Fragment, und ähnlich große Kontroll-Fragmente im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem untersucht. Zusätzlich zu den, unter den Abschnitten 3.1.1.1-3.1.1.4 beschriebenen, DNA-*cis*-Element-tragenden Rekombinationsvektoren wurde auch der Rekombinationsvektor pHR-EGFP/3'EGFP (HR3'), welcher in der Position der *spacer*-Region, zwischen den mutierten *EGFP*-Genen, eine Hygromycin-Resistenz-Kassette trägt, als Kontrolle eingesetzt. Die Analyse erfolgte für die lymphoblastoiden Zelllinien WTK1 und TK6 sowie für die Brustkrebszelllinie T47D, wobei die Experimente für die

letztere Zelllinie unter meiner Anleitung von Angela Dacke durchgeführt wurden. WTK1 und TK6 entstammen der selben parentalen Zelllinie, wobei WTK1 in p53 mutiert und TK6 wt-p53 ist (Xia *et al.*, 1995). T47D ist ähnlich wie WTK1 in der DNA-Bindedomäne von p53 (L194F) mutiert (O'Connor *et al.*, 1997).

Zunächst wurden die verschiedenen Zelllinien mit den jeweiligen Rekombinationsvektoren transfiziert. Die lymphoblastoiden Zelllinien wurden mit 10 µg Rekombinationsvektor und 20 µg pBS-Leervektor, also 30 µg Gesamt-DNA Menge elektroporiert. T47D wurde mit 2 µg Rekombinationsvektor und 4 µg pBS unter Anwendung von *Fugene*<sup>®</sup>HD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) transfiziert. Nach 24 h Inkubationszeit und ohne weitere Behandlung wurden die Rekombinationsereignisse der Zellen mittels FACS-Analyse detektiert. Da unter diesen Bedingungen die spontane Rekombination gemessen wurde und dieser, aufgrund des Testprinzips, ein DNA-Bruch vorausgegangen sein muss, ist die Rekombination indirekt auch ein Maß für die Bruchentstehung innerhalb der untersuchten DNA-*cis*-Elemente.



**Abb. 15 Analyse der Rekombination der *MLLbcr*-Fragment-tragenden Rekombinationsvektoren im Vergleich zu Kontrollsequenzen-tragenden Vektoren in verschiedenen Zelllinien.**

Die drei Zelllinien WTK1, TK6 und T47D wurden jeweils mit den Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd, pHR-EGFP/3'EGFP, pHR-EGFP/3'EGFP-RARαbcr.fwd, pHR-EGFP/3'EGFP-RARαbcr.rev, pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.fwd oder pHR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev transfiziert. Danach wurden die transfizierten Zellen 24 h kultiviert und anschließend per FACS-Analyse die Rekombinationsfrequenz bestimmt. Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet indem jeweils die Frequenz der Kontrollexperimente mit pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd auf 100 % gesetzt wurde (Absolutwerte: 0,25 % für WTK1, 0,34 % für TK6 und 0,31 % für T47D). Der Mittelwert und Standardfehler von 12-27 Rekombinationsmessungen ist jeweils gezeigt.

In allen drei Zelllinien war die Rekombinationsfrequenz für pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* und pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev* im Vergleich zu den Kontrollsequenz-tragenden Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd, pHR-EGFP/3'EGFP, pHR-EGFP/3'EGFP-RARαbcr.fwd und pHR-EGFP/3'EGFP-RARαbcr.rev (1,7-5-fach,  $P \leq 0,0001-0,0039$  für *MLLbcr.fwd*, und 1,4-3,8-fach,  $P \leq 0,0001-0,0039$  für *MLLbcr.rev*; Einzelwerte unter Abschnitt 8.5) signifikant erhöht. Dieser Vergleich inkludierte sogar eine andere bcr mit bekannter

Leukämieeteiligung (*RARαbcr*). Zusätzlich wurde festgestellt (Abb. 15), dass die Rekombinationsfrequenz für das in Leserichtung (fwd) integrierte *MLLbcr*-Fragment gegenüber dem entgegen Leserichtung integrierten (rev) Fragment für die drei untersuchten Zelllinien 1,3-fach stimuliert war ( $P < 0,0001$  für WTK1,  $P = 0,0019$  für TK6 und  $P = 0,0214$  für T47D). Das *MLLbcr*-Fragment weist demzufolge unabhängig von Zelllinie und Orientierung im Vergleich zu anderen DNA-Sequenzen die höchste spontane Rekombinationsrate und damit höchste Fragilität auf.

### 3.2.2 Analyse der Rekombination am *IgHEmar*-Fragment im Vergleich zum *MLLbcr*-Fragment in Apoptose-resistenten Zellen

Es wird angenommen, dass eine gesteigerte Fragilität von DNA-Sequenzen im Zusammenhang mit *scaffold* bzw. *matrix attachment regions* (s/mar) steht (Kas and Laemmli, 1992). Diese Sequenzen definieren die Verbindungsstellen der genomischen DNA eukaryotischer Chromosomen mit den Proteinen der nukleären Matrix. Es sind Regionen hoher transkriptioneller Aktivität, die leicht zugänglich für Nukleasen und andere DNA-modifizierende Enzyme sind (Kas and Laemmli, 1992; Stanulla *et al.*, 1997). Aufgrund der erleichterten Zugänglichkeit dieser Bereiche wird angenommen, dass sie die Wahrscheinlichkeit für DSBe erhöhen (Stanulla *et al.*, 1997).

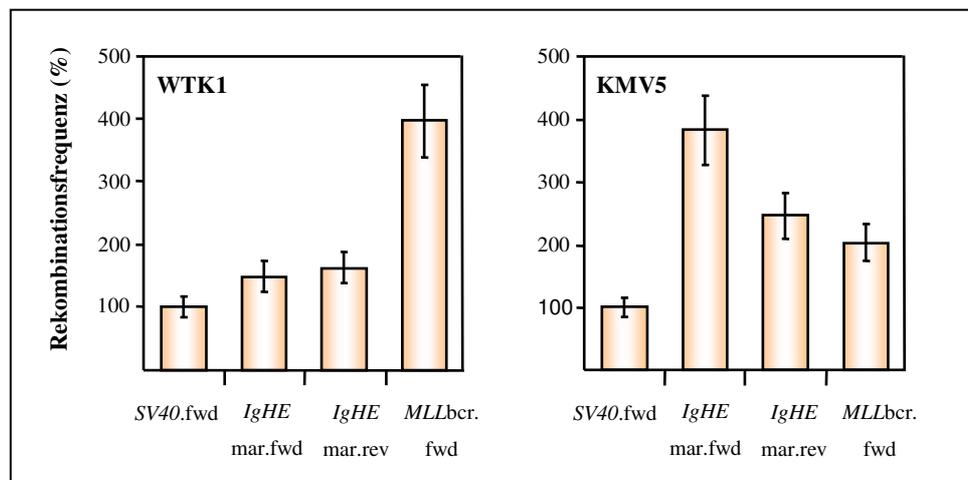
Das *MLLbcr*-Fragment kolokalisiert mit einer solchen *matrix attachment region* (mar) (Broeker *et al.*, 1996; Hensel *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Kolokalisation von *bcr* und *mar* wurde das Rekombinationsverhalten des *MLLbcr*-Fragments mit dem *IgHEmar*-Fragment verglichen, dessen Eigenschaften als *mar* gut beschrieben sind (Boulikas, 1995; Staudt and Lenardo, 1991).

Für die Experimente wurde die human lymphoblastoide Zelllinie WTK1 und die Apoptose-resistente erythroblastoide Zelllinie KMV5 verwendet. KMV5 ist ein Derivat der p53-negativen Zelllinie K562 (Akyüz *et al.*, 2002). Sie ermöglichte einen Vergleich der beiden s/mar-Fragmente unter Minimierung spontaner Apoptose-induzierter Fragilität, die für das *MLLbcr*-Fragment in Diskussion steht (Betti *et al.*, 2001; Stanulla *et al.*, 1997).

Die beiden Zelllinien wurden mit den Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd*, pHR-EGFP/3'EGFP-*IgHEmar.fwd*, pHR-EGFP/3'EGFP-*IgHEmar.rev* oder pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* transfiziert. Die lymphoblastoide Zelllinie WTK1 wurde mit 10 µg Rekombinationsvektor und 20 µg pBS Leervektor elektroporiert. KMV5 wurde mit 0,5 µg Rekombinationsvektor und 3,5 µg pBS lipofiziert (*Lipofectamine™ 2000 Reagent*, Invitrogen, Karlsruhe). Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Rekombinationsereignisse

mittels FACS-Analyse detektiert.

In WTK1 war die Rekombinationsfrequenz für pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd*- im Vergleich zu den *IgHEmar*-tragenden Rekombinationsvektoren und dem Kontrollvektor pHR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd* stimuliert (4-fach,  $P < 0,0001$  gegenüber *SV40.fwd*, 2,7-fach,  $P < 0,0001$  gegenüber *IgHEmar.fwd* und 2,4-fach gegenüber *IgHEmar.rev*). In der Apoptose resistenten Zelllinie KMV5 jedoch, war die Rekombination der *IgHEmar*-tragenden Vektoren gegenüber pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* (1,9-fach bzw. 1,2-fach,  $P = 0,0313$  für *IgHEmar.fwd* bzw. *IgHEmar.rev*) ähnlich oder erhöht (Abb. 16). Die Rekombinationsfrequenz beider *s/mars*, des *IgHEmar*- und *MLLbcr*-Fragments, ist im Vergleich zur *SV40*-Kontrolle erhöht (Abb. 16 in WTK1: 4-fach,  $P < 0,0001$  für *MLLbcr.fwd*, 1,5-fach,  $P = 0,0313$  für *IgHEmar.fwd*, 1,6-fach,  $P = 0,0313$  für *IgHEmar.rev*; in KMV5: 2-fach für *MLLbcr.fwd*, 3,8-fach für *IgHEmar.fwd*, 2,5-fach für *IgHEmar.rev*,  $P = 0,0313$ ). Beide weisen somit eine erhöhte Fragilität auf, die in Abhängigkeit von der Zelllinie unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Diese Daten deuten darauf hin, dass für die hohe Fragilität des *MLLbcr*-Fragments, neben der Kolokalisation mit einer *s/mar*, weitere Charakteristika von Bedeutung sind.

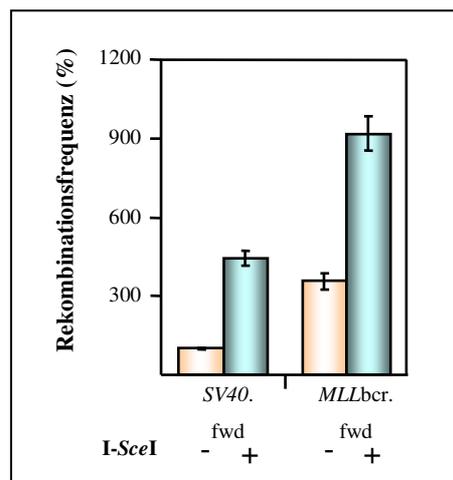


**Abb. 16 Analyse der Rekombination für pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* im Vergleich zu den *IgHEmar*-tragenden Rekombinationsvektoren in WTK1 und der Apoptose-resistenten Zelllinie KMV5.** Die zwei Zelllinien WTK1 und KMV5 wurden jeweils mit den Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd*, pHR-EGFP/3'EGFP-*IgHEmar.fwd*, pHR-EGFP/3'EGFP-*IgHEmar.rev* und pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* transfiziert. Danach wurden die transfizierten Zellen 24 h kultiviert und anschließend per FACS-Analyse die Rekombinationsfrequenz bestimmt. Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet indem die Frequenz der Kontrollexperimente mit pHR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd* jeweils auf 100 % gesetzt wurden (Absolutwerte: 0,12 % für WTK1 und 0,033 % für KMV5). Der Mittelwert und Standardfehler von jeweils 6 Rekombinationsmessungen ist gezeigt.

### 3.2.3 Einfluss künstlich erzeugter DSBe auf die Rekombination am transient eingeführten *MLLbcr*-Fragment

Um festzustellen, ob ein starkes DSB-induzierendes Signal die spezifische und spontane

Rekombinations- bzw. Bruchstimulierung des *MLLbcr*-Fragments überlagert, wurden WTK1 Zellen mit den Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd* oder pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* und dem Leervektor pBS oder dem Meganuklease *I-SceI* exprimierenden Vektor pCMV-*I-SceI* elektroporiert. Die Expression der Meganuklease *I-SceI* diente dabei der Erzeugung künstlicher DSBe im jeweiligen Rekombinationssubstrat. Diese Substrate sind alle so konstruiert, dass sie eine Erkennungsstelle für *I-SceI* im mutierten *HR-EGFP*-Gen tragen, die die gezielte Spaltung durch *I-SceI* erlaubt (Abb. 36 A., Aküyz *et al.* 2002). 24 h nach Elektroporation der Zellen wurden die Rekombinationereignisse per FACS-Analyse quantifiziert. Es wurde festgestellt, dass Rekombinationsstimulierung durch das *MLLbcr*-Fragment selbst nach *I-SceI*-Expression und folglich nach künstlicher DSB-Induktion erhalten blieb, wenn auch quantitativ reduziert (Abb. 17, *MLLbcr.fwd* vs. *SV40.fwd* 3,6-fach,  $P=0,0039$  und *MLLbcr.fwd/I-SceI* vs. *SV40.fwd/I-SceI* 2-fach,  $P=0,0039$ ). Dieser Erhalt könnte im Zusammenhang mit der bereits basal starken Fragilität des *MLLbcr*-Fragments stehen, die durch künstlich erzeugte DSBe im transienten Kontext nicht vollständig überlagert werden kann.



**Abb. 17 Einfluss der durch die Meganuklease *I-SceI* induzierten DSBe auf das Rekombinationsverhalten am *MLLbcr*-Fragment im transienten Kontext.**

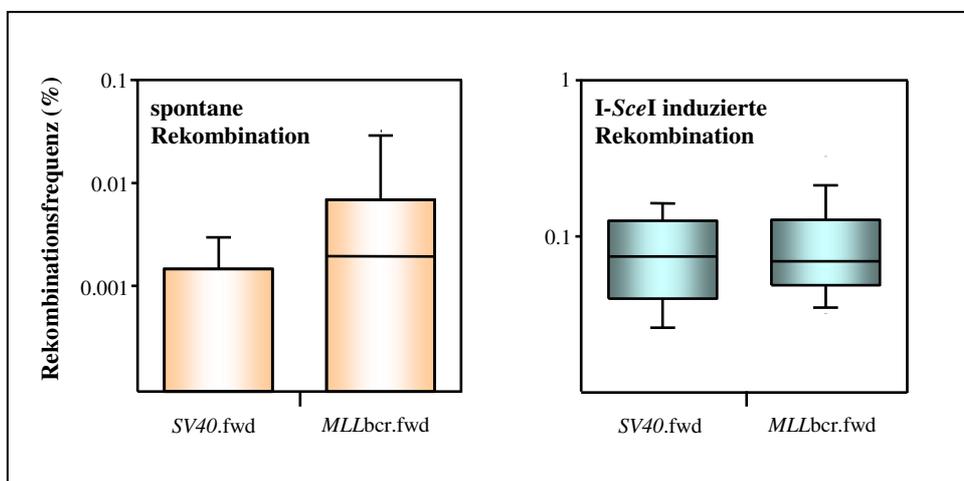
Mittels FACS-Analyse wurde die Rekombination an den Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd* und pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* in der Zelllinie WTK1 unter Einfluß von *I-SceI* analysiert. *I-SceI* wurde mittels pCMV-*I-SceI* innerhalb der Zellen exprimiert. Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet indem die Frequenz mit pHR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd* auf 100 % gesetzt wurden (Absolutwert: 0,55 %). Der Mittelwert und Standardfehler von 9 Rekombinationsmessungen ist gezeigt.

### 3.2.4 Analyse der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment und Einfluss künstlich induzierter DSBe im chromosomalen Kontext

Nachdem durch die unter Abschnitt 3.2.1 beschriebenen transienten Rekombinationsanalysen gezeigt werden konnte, dass das *MLLbcr*-Fragment im Vergleich zu Kontrollsequenzen hochfragil ist und reparaturstimulierend wirkt, wurden die unter Abschnitt 3.1.2

beschriebenen WTK1 Klongemische der 1. Selektionsphase (aus 100 Zellen entstanden) hinsichtlich ihres Bruch- und Rekombinationsverhaltens ausgewertet.

In Abb. 18 ist die Rekombinationsanalyse der Klongemische WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd) und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd) dargestellt, dabei wurden nur Gemische einbezogen, die nach DSB-Induktion mit *I-SceI* den Schwellenwert der Rekombinationsfrequenz von 0,02 % erreicht oder überschritten hatten. Für WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd) konnten fünf Klongemische und für WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd) 16 Klongemische analysiert werden. Für WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.rev) konnten in dieser 1. Selektionsphase nur zwei induzierbare Klongemische festgestellt werden, womit eine statistische Auswertung mit den Rekombinationsfrequenzen dieser Klongemische nicht möglich war. Der linke Graph von Abb. 18 zeigt eine nicht signifikante 10,5-fache Stimulierung der spontanen Rekombination, 48 h nach Elektroporation mit dem Leervektor pBS für die Klongemische WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd) gegenüber den Kontroll-Klongemischen WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd). Die *I-SceI* induzierte Rekombination, bei der parallel zur spontanen Rekombinationsanalyse die Klone mit dem Vektor pCMV-*I-SceI* elektroporiert wurden, zeigt die Angleichung der Rekombinationsfrequenzen für beide Klonpopulationen nach dieser künstlichen Induktion von DSBen (Abb. 18 rechter Graph).



**Abb. 18 Analyse der Rekombinationsfrequenz der stabilen Klone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd) und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd) aus der 1. Selektionsphase**

Von den mit pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd und pHR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd elektroporierten WTK1 Zellen wurden nach 48 h Kultivierung je 100 Zellen pro Loch einer 96-Loch-Platte in Puromycin-haltiges Selektionsmedium ausgesät und für 16 Tage inkubiert. Die entstandenen Klone wurden mittels Elektroporation von pBS oder dem Meganuklease *I-SceI* exprimierenden Vektor pCMV-*I-SceI* auf ihre Rekombinations-Induzierbarkeit überprüft, womit gleichzeitig die Integration des jeweiligen Rekombinationskonstrukts HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd oder HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd angezeigt wurde. Der linke Graph (beige) zeigt die spontane Rekombination von fünf Klonen WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd) und 16 Klonen WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd). Diese Klone erreichten oder überschritten nach Induktion mit *I-SceI* einen ohne *I-SceI* nicht erreichten Schwellenwert der Rekombinationsfrequenz von 0,02 % und galten somit als induzierbar (rechter Graph, hellblau). Gezeigt sind Box (Whisker)-Diagramme. Der Median wird innerhalb der Boxen über

eine Gerade symbolisiert. Der Bereich, der von den Whiskern in dem Box-Diagrammen dargestellt wird, liegt zwischen dem 10. und 90. Perzentil

Im Gegensatz zur transienten Analyse der Rekombination, bei welcher der Anstieg der Reparatur für das *MLLbcr*- vs. Kontroll-Fragment trotz *I-SceI*-Expression erhalten blieb (Abb. 17), führte die Induktion von künstlichen DSBen im chromosomalen Kontext zu einem Angleich der Rekombinationsfrequenzen für beide DNA-*cis*-Elemente (Abb. 18 rechtes Diagramm). Es wird angenommen, dass der auf spontaner Fragilität beruhende Rekombinationsanstieg am *MLLbcr*-Fragment durch die *I-SceI*-erzeugten DSBen überlagert wird.

In transienten Experimenten ist der Erhalt des Rekombinationsanstiegs für das *MLLbcr*- vs. Kontroll-Fragment möglicherweise auf die schwache Steigerung der Rekombination nach *I-SceI*-Expression zurückzuführen (Abb. 17; 2,4- bzw. 4,4-fach). Dies lässt eine unvollständige Spaltung der großen Anzahl von transient in die Zelle eingeführten DNA-Substrate nach *I-SceI*-Expression vermuten.

Im chromosomalen Kontext hingegen vermittelte die *I-SceI*-Expression ein starkes Rekombinations-Induktionssignal (15- bzw. 133-fach), welches zu einem Angleich der Rekombinationsfrequenzen für das jeweils in der Zelle einmalige *SV40.fwd*- bzw. *MLLbcr.fwd*-Substrat führte. Dies untermauert die Annahme, dass die Fragilität des *MLLbcr*-Fragments durch eine künstliche Bruchinduktion im Vergleich zu Kontrollsequenzen überlagert und damit unsichtbar wird.

### **3.2.5 Analyse der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment nach Behandlung mit Chemotherapeutika oder Anti-CD95 Antikörper**

Es ist bekannt, dass zwischen 5-10 % der *MLL*-assoziierten Leukämien Therapie-abhängig sind. Solche sekundären Leukämien sind ein ernsthaftes Problem der primären Krebstherapie und stehen vor allem im Zusammenhang mit der Behandlung durch Chemotherapeutika (McLaughlin *et al.*, 2005). Die Mehrheit der Leukämien, die durch Therapien mit zytotoxischen Medikamenten verursacht werden, lassen sich, abhängig davon, ob Patienten mit alkylierenden Agenzien (z.B. Melphalan und MNNG) oder Topoisomerase-Inhibitoren (z.B. Etoposid und Camptothecin) behandelt wurden, in zwei Gruppen einteilen (Felix, 1998; Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003). Sekundäre Leukämien in Verbindung mit Antimetaboliten, wie 5-Fluorouracil, oder Mikrotubuli-interferierenden Agenzien, wie Paclitaxel treten selten auf (See *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2003).

Die Entwicklung von *MLL*-Translokationen wurde insbesondere mit Topo II-Inhibitoren, wie Etoposid, assoziiert (Haupt *et al.*, 1994; Pedersen-Bjergaard *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1996),

indem diese möglicherweise zur Induktion von DSBen innerhalb der *MLLbcr* beitragen. Trotzdem wurden *MLLbcr*-Spaltungen und -Rearrangements auch nach der Exposition der Zellen mit multiplen nicht-genotoxischen Agenzien, wie dem Rezeptor-vermittelten Apoptose-Induktor Anti-CD95 Antikörper, detektiert (Betti *et al.*, 2001; Betti *et al.*, 2003; Ploski and Aplan, 2001; Vaughan *et al.*, 2002).

Aufgrund der implizierten Beteiligung einer Vielzahl von Agenzien in die *MLLbcr*-Bruch- und Rearrangement-Entstehung wurde die Wirkung verschiedener Chemotherapeutika und des Anti-CD95 Antikörpers auf das Bruch- und Rekombinationsverhalten am *MLLbcr*-Fragment untersucht. Die für die Bruch- und Rekombinationsanalysen eingesetzten Agenzien und ihre Wirkmechanismen sind in Tab. 11 zusammengefasst.

**Tab. 11** Verwendete zytotoxische Agenzien und ihre Wirkmechanismen zur Analyse des Bruch- und Rekombinationsverhaltens am *MLLbcr*-Fragment.

Agens	Gruppe	Zytotoxischer Wirkmechanismus	Genotoxische Substanz
Aphidicolin	Replikations-Inhibitoren	Inhibiert die DNA-Polymerase $\alpha$ , $\delta$ und $\epsilon$ und blockiert folglich die Replikation (Glover <i>et al.</i> , 2005; Ikegami <i>et al.</i> , 1978)	ja*
Camptothecin	Topoisomerase-hemmer	Inhibiert Topo I über die Stabilisierung von Topo I-DNA Komplexen und führt folglich zur Hemmung des DNA-Religationsschritts am Topo I-induzierten SSB (Adams <i>et al.</i> , 2006; Redinbo <i>et al.</i> , 1998)	ja
Etoposid	Topoisomerase-hemmer	Inhibiert Topo II über die Stabilisierung von Topo II-DNA Komplexen und führt folglich zur Hemmung des DNA-Religationsschritts am Topo II-induzierten DSB (Baldwin and Osheroff, 2005; van Maanen <i>et al.</i> , 1988)	ja
5-Fluorouracil	Antimetabolite (Pyrimidinanaloga)	Inhibiert die DNA und RNA-Synthese auf verschiedenen Ebenen: Hemmung der Thymidylat-Synthetase-Aktivität und Induktion von Strangbrüchen durch fälschliche Inkorporation in DNA und RNA (Longley <i>et al.</i> , 2003)	ja
MNNG	Alkylantien	Inhibiert die Replikation durch die Übertragung von Alkylgruppen auf die DNA, was zur Vernetzung der DNA und Induktion verschiedener DNA-Läsionen führt. (Gichner and Veleminsky, 1982)	ja
Paclitaxel	Taxane	Inhibiert die Zellmitose über die Hemmung des Abbaus von Mikrotubuli im Spindelapparat (Altmann and Gertsch, 2007; Reshkin <i>et al.</i> , 2003)	nein
Anti-CD95 Antikörper	Proapoptotische Antikörper	Direkte Apoptose-Induktion über den CD95-Rezeptor-vermittelten Signalweg, (Prasad <i>et al.</i> , 1998)	nein

\* Die Genotoxizität für Aphidicolin bezieht sich nicht auf die transient eingesetzten replikationsinaktiven Rekombinationsvektoren, sondern auf das replizierbare Genom der Zelle.

### **3.2.5.1 Bestimmung der geeigneten Konzentration und Inkubationszeit von Zellen mit zytotoxischen Agenzien zur Bruch- und Rekombinationsanalyse am transient eingeführten *MLLbcr*-Fragment am Beispiel von Aphidicolin**

In diesem Abschnitt werden zunächst die Vorexperimente zur Bestimmung der adequate Konzentration und Inkubationszeit am Beispiel von Aphidicolin beschrieben.

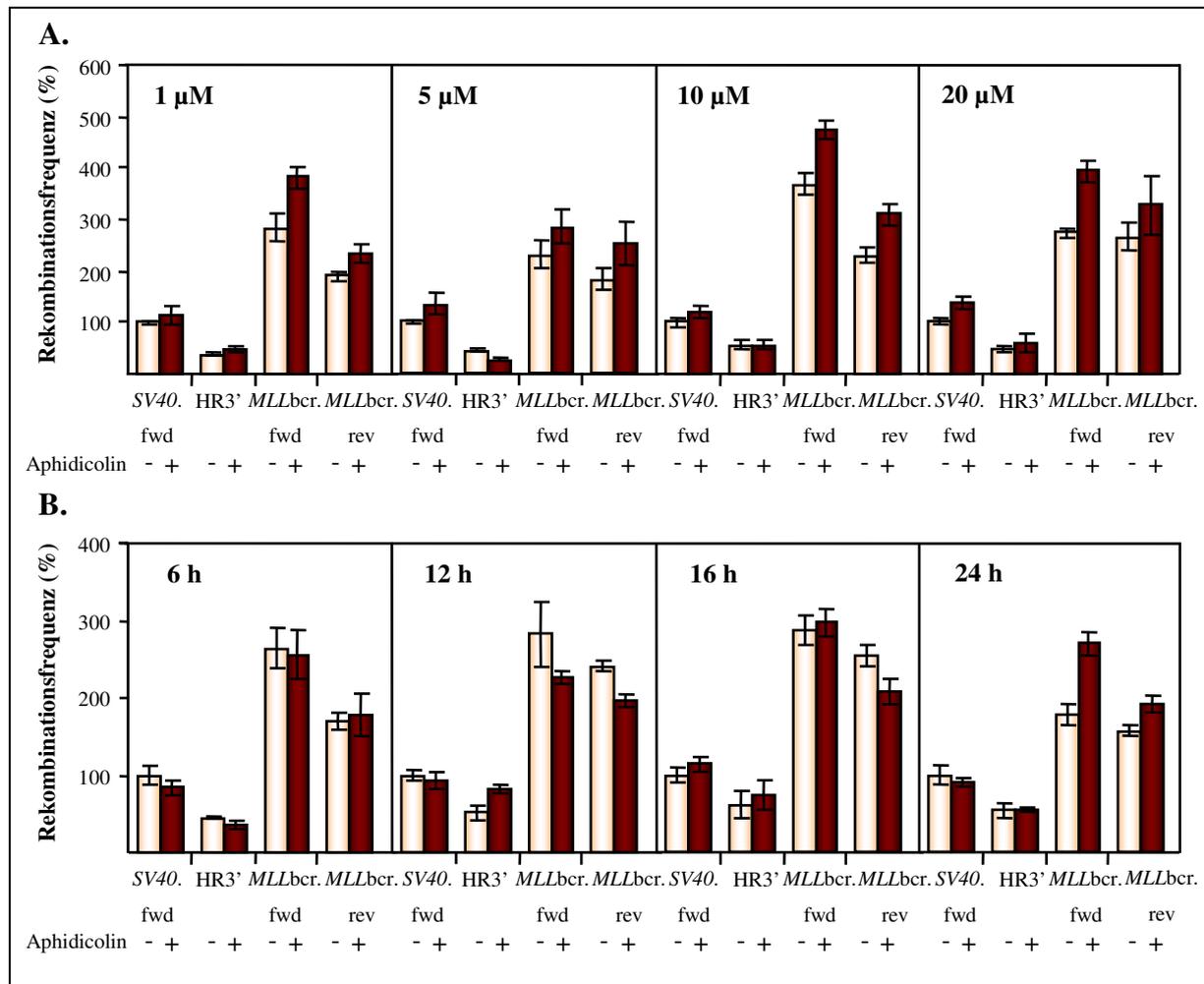
Aphidicolin ist ein gut beschriebener Inhibitor der DNA-Polymerase  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  und führt demzufolge zur Blockierung der DNA-Replikation (Glover *et al.*, 2005; Ikegami *et al.*, 1978). Über die Behandlung von Zellen mit Aphidicolin wurden viele fragile Stellen im Genom identifiziert. Diese fragilen Stellen sind spezifische Loci, die DNA-Lücken, -Brüche oder Rearrangements in Metaphasen-Chromosomen aufweisen, welche über Blockierung der Replikation entstanden sind (Glover, 1998; Glover *et al.*, 1984; Richards, 2001; Yunis and Soreng, 1984; Yunis *et al.*, 1987). Sind die durch Aphidicolin induzierten DNA-Läsionen irreparabel leitet die betroffene Zelle das Apoptose-Programm ein, welches zunächst im frühen Stadium zur DNA-Fragmentierung höherer Ordnung führt und im weiteren Verlauf zum Tod der Zelle (Glynn *et al.*, 1992; Oberhammer *et al.*, 1993).

Für die Analyse der Rekombination an den *MLLbcr*- und Kontroll-Fragmenten nach Aphidicolin-Behandlung im transienten Kontext ist es von Bedeutung, dass die Rekombinationsvektoren keinen eukaryotischen Replikationsstart besitzen, an dem DNA-Polymerasen angreifen könnten. Über die Blockierung der Replikation entstandene, genotoxisch wirkende Brüche finden sich somit ausschließlich im Genom der Zelle, nicht jedoch in den Rekombinationsvektoren. Eine Aphidicolin-abhängige Bruchinduktion in die transient transfizierten Rekombinationskonstrukte ist demzufolge nur indirekt über apoptotische Spaltungsereignisse möglich.

Um die geeignete Konzentration und Inkubationszeit von Aphidicolin für die Analyse der Reparatur im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem zu bestimmen, wurde die Zelllinie WTK1 mit den Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd, pHR-EGFP/3'EGFP, pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.fwd und pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.rev elektroporiert. Nach einer Regenerationsphase von vier Stunden wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Aphidicolin (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M oder 20  $\mu$ M) behandelt und für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Rekombinationsfrequenz mittels FACS-Analyse bestimmt.

Bei der Inkubation der WTK1 Zellen mit 10  $\mu$ M und 20  $\mu$ M Aphidicolin, zeigte sich ein Rekombinationsanstieg für die *MLLbcr*-Fragmente beider Orientierungen, der jedoch in

diesen Experimenten meist keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 19 A., für 10  $\mu$ M Aphidicolin: 1,3-fach für *MLLbcr.fwd* und 1,3-fach für *MLLbcr.rev*; für 20  $\mu$ M Aphidicolin: 1,4-fach,  $P=0,0313$  für *MLLbcr.fwd* und 1,2-fach für *MLLbcr.rev*).



**Abb. 19 Bestimmung der Rekombinationsfrequenz in Abhängigkeit von der Konzentration und der Inkubationszeit für die Behandlung Rekombinationsplasmid-transfizierter WTK1 Zellen mit Aphidicolin.** (A.) zeigt die Rekombinationsfrequenz an den Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd, pHR-EGFP/3'EGFP, pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* und pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev* 24 h nach Inkubation der transfizierten WTK1 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Aphidicolin. Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet, indem die Frequenz der Kontrolleexperimente mit pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd auf 100 % gesetzt wurde (Absolutwerte von links nach rechts: 0,24 %, 0,27 %, 0,17 % und 0,22 %). Der Mittelwert und Standardfehler von 6 Rekombinationsmessungen ist jeweils gezeigt. In (B.) ist die Rekombinationsfrequenz der Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd, pHR-EGFP/3'EGFP, pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* und pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev* für 10  $\mu$ M Aphidicolin nach verschiedenen Inkubationszeiten dargestellt. Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet indem die Frequenz der Kontrolleexperimente mit pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd jeweils auf 100 % gesetzt wurden (Absolutwerte von links nach rechts: 0,13 %, 0,14 %, 0,14 % und 0,19 %). Der Mittelwert und Standardfehler von jeweils 3 Rekombinationsmessungen ist gezeigt.

Zur Bestimmung des Zeitverlaufs dieses Rekombinationsanstiegs wurden verschiedene Inkubationszeiten für diese Aphidicolin-Konzentration getestet. Dazu wurden die elektroporierten WTK1 Zellen nach vierstündiger Regeneration mit der im vorangegangenen Experiment festgelegten Konzentration von 10  $\mu$ M Aphidicolin behandelt und für 6h, 12h, 16h oder 24 h inkubiert. Danach wurde die Rekombinationsfrequenz mittels FACS-Analyse

bestimmt.

Die Untersuchung ergab, dass die optimale Inkubationszeit zur Detektion der *MLLbcr* Fragment-spezifischen Rekombinationssteigerung bei 24 h liegt (1,5-fach für *MLLbcr.fwd* und 1,2-fach für *MLLbcr.rev*), da kürzere Inkubationszeiten unvollständigen Stimulation bewirkten (Abb. 19 B.). Längere Inkubationszeiten hingegen erhöhten das Risiko einer verstärkten Zellzyklusverschiebung und führten damit zur Möglichkeit von indirekten Rekombinationseffekten. Methodisch vergleichbare Experimente wurden für alle verwendeten Chemotherapeutika durchgeführt.

### **3.2.5.2 Analyse der Rekombination am transient eingeführten *MLLbcr*-Fragment nach Behandlung mit Chemotherapeutika unterschiedlicher Wirkklassen**

Nachdem mit den unter Abschnitt 3.2.5.1 beschriebenen Vorexperimenten, die geeignete Konzentration und Inkubationszeit für alle Chemotherapeutika bestimmt worden war, wurden die Rekombinationsfrequenzen an den Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd*, pHR-EGFP/3'EGFP, pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* und pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev* unter diesen festgelegten Bedingungen validiert.

Zusätzlich wurde mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung die Zellzyklusverteilung und Induktion des Zelltods in den transfizierten WTK1 Zellen für jede Chemotherapeutika-Behandlung bestimmt. Dazu wurden die WTK1 Zellen mit dem Leervektor pBS elektroporiert und nach 4 h Regeneration mit den für die Rekombinationsanalysen bestimmten Chemotherapeutika-Konzentrationen oder der zugehörigen Lösungsmittelmenge (Kontrolle) behandelt und für die festgelegte Zeitspanne inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und anschließend mittels PI-Färbung Zellzyklusverteilung und Induktion des Zelltods per FACS-Detektion ermittelt.

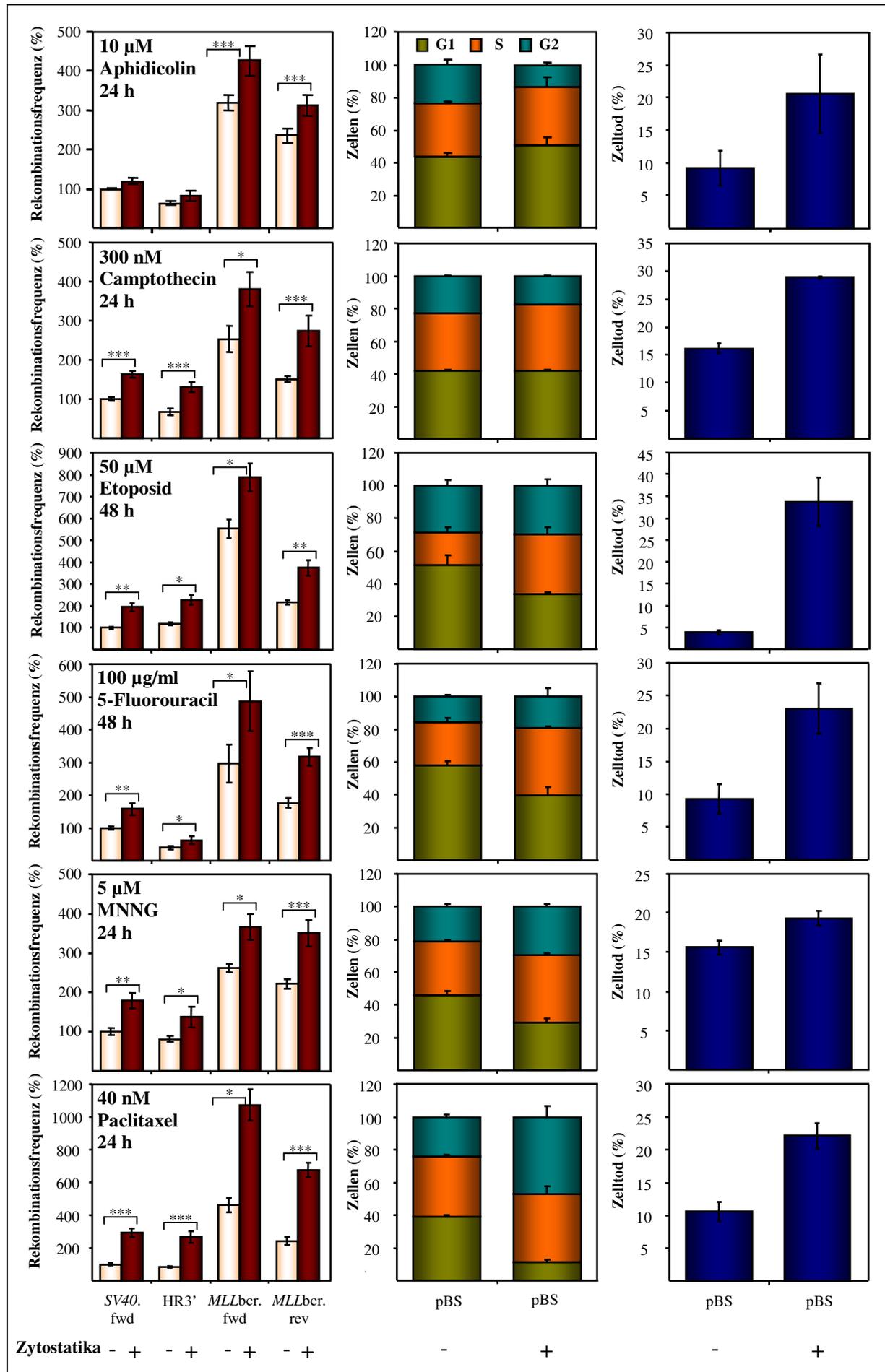
Über die Bruch- und Rekombinationsanalyse zeigte sich für Aphidicolin eine Stimulierung der Reparatur spezifisch an den *MLLbcr*-Fragmenten im Vergleich zu den Kontrollsequenzen *SV40.fwd* und *Hygromycin* (Abb. 20, 1. Reihe links, 1,3-fach,  $P < 0,0001$  für *MLLbcr.fwd* und  $P = 0,001$  für *MLLbcr.rev*). Dabei war besonders auffällig dass Aphidicolin nach der Inkubationszeit von 24 h im Gegensatz zu allen anderen Chemotherapeutika einen G1/S Arrest induzierte (Abb. 20, 1. Reihe Mitte, Erhöhung des Zellanteils in der G1-Phase um 7 %, und in der S-Phase um 3 %; d.h. in der G1/S-Phase um 10 %).

Die Topoisomerase-Inhibitoren Camptothecin und Etoposid sowie das Pyrimidin-Analogon 5-Fluorouracil zeigten eine Sequenz-unabhängige Stimulierung der Rekombination für alle Vektoren (Abb. 20, 2.-4. Reihe, links, 1,4-2-fach,  $P = 0,0003-0,0313$ ; Einzelwerte unter

Abschnitt 8.5) und leiteten S-Phase Arrest in den WTK1 Zellen ein (Abb. 20, 2.-4. Reihe, Mitte, Erhöhung des Zellanteils in der S-Phase um 7 %, für Camptothecin; um 16 %, für Etoposid; um 15 % für 5-Fluorouracil). Für Etoposid wurde bereits nach 24 h ein leichter Rekombinationsanstieg gemessen (Daten nicht gezeigt), während 5-Fluorouracil erst nach 48 h Inkubationszeit reagierte. Das Alkylanz MNNG sowie das Taxan Paclitaxel führten ebenfalls zur Sequenz-unabhängigen Rekombinationsstimulierung (Abb. 20, 5.-6. Reihe, links, 1,4-3,1-fach,  $P=0,0005-0,0313$ ; Einzelwerte unter Abschnitt 8.5), wobei MNNG einen S/G2-Arrest (Abb. 20, 5. Reihe, Mitte, Erhöhung der Zellen in der S-Phase um 9 % und in der G2-Phase um 8 %; d.h. in der S/G2-Phase um 17 %) und Paclitaxel einen G2-Arrest einleitete (Abb. 20, 6. Reihe, Mitte, Erhöhung des Zellanteils in der G2-Phase um 23 %).

Zellen, die in der späten S- und G2-Phase arretiert vorliegen, zeigen neben Sequenz-spezifischen Reparaturereignissen, auch eine Sequenz-unabhängige Rekombinationssteigerung. In diesen Phasen dominiert wahrscheinlich die HR, da nur hier leicht zugängliche homologe Matrizen zur Verfügung stehen und die Expression HR-spezifischer Proteine wie Rad51 ansteigt (Takata *et al.*, 1998). Die HR ist ebenso wie das SSA über das Fluoreszenz-basierte Testsystem detektierbar. SSA ist in allen Zellzyklusphasen möglich und wird wahrscheinlich in keiner Phase des Zellzyklus spezifisch aktiviert. Die Aktivierung erfolgt möglicherweise vielmehr über den Bruch selbst und nicht über die Arretierung der Zelle in einer bestimmten Zellzyklusphase. Während der G1-Phase und möglicherweise auch in der frühen S-Phase erfolgt die Reparatur von Brüchen über SSA oder NHEJ, wobei letzteres über den hier eingesetzten Vektor nicht detektiert werden kann. HR wird demzufolge nicht genutzt und kann nach Arretierung der Zellen in G1/S, wie nach Aphidicolin-Behandlung, nicht zu einem Sequenz-unabhängigen Anstieg der Rekombination beitragen.

In Abhängigkeit vom eingeleiteten Zellzyklusarrest führte demzufolge Chemotherapeutika-Behandlung zu einer Sequenz-spezifischen oder –unabhängigen Rekombinationsstimulierung. Alle untersuchten Chemotherapeutika führten zur Induktion des Zelltods (Abb. 20, rechts, Aphidicolin: 2,23-fach; Camptothecin: 1,78-fach; Etoposid: 8,96-fach; 5-Fluorouracil: 2,5-fach,  $P=0,0313$ ; MNNG: 1,24-fach; Paclitaxel: 2,1-fach) dessen Ausmaß abhängig von Wirkmechanismus, Inkubationszeit und Konzentration war.



**Abb. 20 Analyse der Rekombination an verschiedenen DNA-*cis*-Elementen und Bestimmung von Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion für WTK1 Zellen nach Chemotherapeutika-Behandlung.**

Die Zelllinie WTK1 wurde jeweils mit den Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd, pHR-EGFP/3'EGFP, pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.fwd oder pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.rev elektroporiert. Danach wurden die transfizierten Zellen für eine Regenerationsphase von 4 h kultiviert und anschließend mit der in Vorexperimenten bestimmten Konzentration an Chemotherapeutika behandelt. Nach der festgelegten Inkubationszeit wurde die Rekombinationsfrequenz per FACS-Analyse bestimmt (Diagramme links). Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet, indem die jeweilige Frequenz mit pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd auf 100 % gesetzt wurde (Absolutwerte: 0,26 % für Aphidicolin, 0,16 % Camptothecin, 0,14 % für Etoposid, 0,18 % für 5-Fluorouracil, 0,12 % für MNNG 0,18 % für Paclitaxel). Mittelwerte und Standardfehler von 12-39 Rekombinationsmessungen sind gezeigt. Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden die WTK1 Zellen ebenso wie zur Rekombinationsanalyse behandelt, wobei die Zellen ausschließlich mit dem Kontrollvektor pBS transfiziert wurden. Die Zellen wurden fixiert und PI-gefärbt. Per FACS-Analyse wurden anschließend Zellzyklusverteilung (Diagramme Mitte) und Zelltodinduktion (Diagramme rechts) bestimmt. Für die Zellzyklus- und Zelltodanalyse sind Mittelwerte und Standardfehler von jeweils 4-6 Messungen gezeigt.

Die Detektion dieser Zelltodaktivierung für alle Chemotherapeutika ist vereinbar mit der Möglichkeit, dass Brüche für das *MLLbcr*-Fragment Apoptose-induziert sind. Zusammengefasst bedeutet dies, dass alle getesteten Chemotherapeutika zu einer Rekombinationssteigerung am *MLLbcr*-Fragment beitragen, die jedoch nur bei leichter G1/S Zellzyklusverschiebung für die *MLLbcr* Sequenz-spezifisch war. So führte ausschließlich die Behandlung mit Aphidicolin zu einem *MLLbcr*-spezifischen Rekombinationsanstieg.

Dieser Anstieg konnte nicht über die direkten genotoxischen Eigenschaften Aphidicolins hervorgerufen werden, da diese vom chromosomalen Kontext abhängen. Vielmehr indizieren die Daten eine Apoptose-abhängige Bruch- und folglich Rekombinationssteigerung, die möglicherweise allen Chemotherapeutika gemein ist, bei fehlender Zellzyklusverschiebung in die späte S- oder S/G2-Phase jedoch deutlich wird.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Wechselwirkungen zwischen Bruch-abhängiger Reparatursteigerung und anderen reparatursteigernden Effekten, wie z.B. Zellzyklusarrest nach Behandlung mit zytotoxischen Agenzien sehr komplex sind. Gerade da das Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem im Vergleich zu den klassischen, auf Selektionsmarkern beruhenden Testsystemen sehr kurze Reaktionszeiten hat, besitzt es das Potential zur verbesserten Analyse der vielfältigen Mechanismen, die zur DNA-Fragilität und zum Reparaturverhalten an solchen DNA-Sequenzen beitragen.

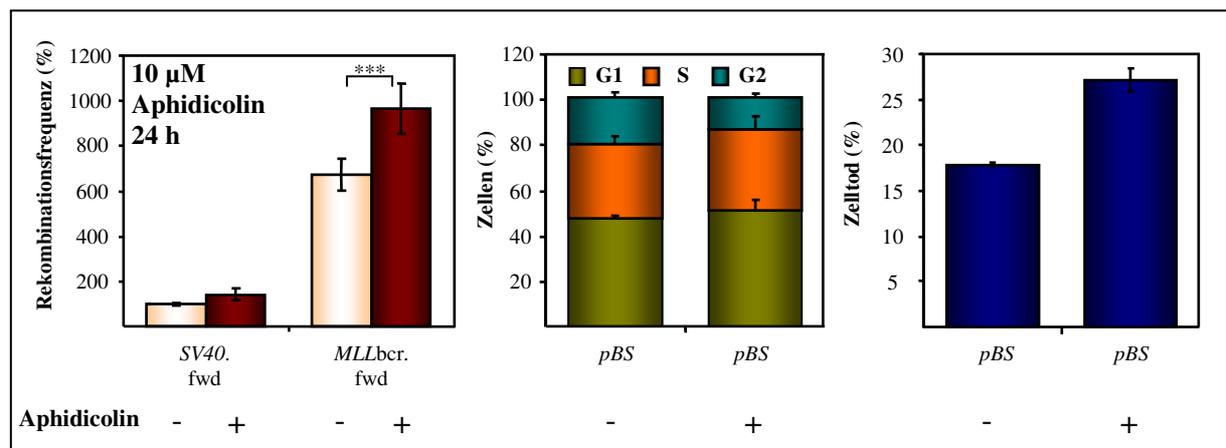
**3.2.5.3 Analyse der Rekombination am transient eingeführten *MLLbcr*-Fragment in TK6 Zellen nach Behandlung mit Aphidicolin**

Um den Einfluss der in WTK1-Zellen vorliegenden *p53*-Mutation auf die *MLLbcr*-spezifische Rekombinationsstimulierung bewerten zu können, wurde die Rekombination am *MLLbcr*-Fragment zusätzlich in der wt-*p53* Zelllinie TK6 analysiert (Skopek *et al.*, 1978; Xia *et al.*, 1995). TK6 stammt vom gleichen Individuum wie WTK1 und unterscheidet sich demzufolge nur im *p53* Status.

Die Zellen wurden mit den Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd oder pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.fwd elektroporiert, 4 h kultiviert und anschließend mit 10 µM Aphidicolin für 24 h inkubiert. Die Rekombinationsfrequenz wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Zusätzlich wurden analog zur Beschreibung in Abschnitt 3.2.5.2 die Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion bestimmt.

Es zeigte sich ebenso wie für WTK1 eine spezifische Stimulierung der Rekombination am *MLLbcr*-Substrat (Abb. 21, 1,4-fach, P=0,001), wobei Aphidicolin in TK6 ebenfalls einen G1/S-Phase-Arrest einleitete (Abb. 21 1. Erhöhung des Zellanteils in der G1/S-Phase um 6,4 %) und zu einer Steigerung des Zelltods führte (Abb. 21, 1,41-fach). Die Expression von wt-p53 beeinflusst demzufolge die *MLLbcr*-spezifische Steigerung der Rekombination durch Aphidicolin nicht.

Da der basale Zelltodanteil aufgrund der Elektroporation für TK6 zumeist größer war als für WTK1 und für TK6 keine stabilen Klone mit chromosomal integrierten Rekombinationskonstrukten isoliert werden konnten, wurden die weiteren Experimente ausschließlich für WTK1 durchgeführt.



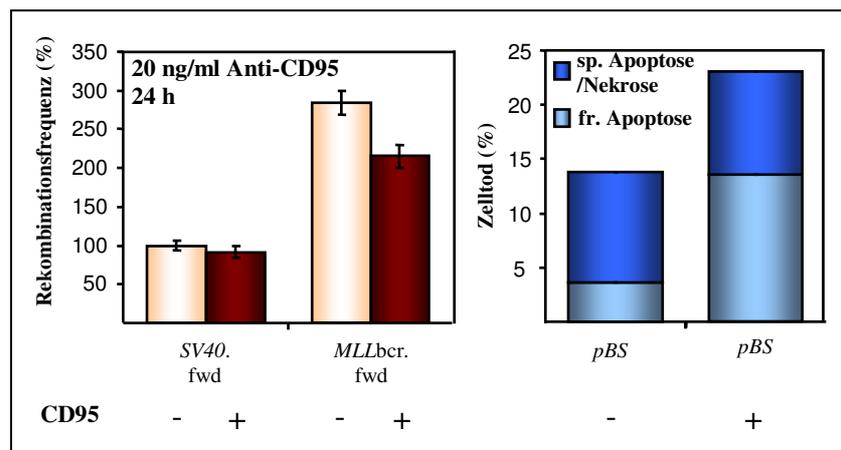
**Abb. 21 Analyse der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment und Bestimmung von Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion für TK6 Zellen nach Aphidicolin-Behandlung.**

Die Zelllinie TK6 wurde jeweils mit den Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd oder pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.fwd elektroporiert. Danach wurden die transfizierten Zellen für eine Regenerationsphase von 4h kultiviert und anschließend mit 10 µM Aphidicolin behandelt. Nach 24 h Kultivierung wurde die Rekombinationsfrequenz per FACS-Analyse bestimmt (Diagramm links). Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet indem die Frequenz der Kontrolleexperimente mit pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd jeweils auf 100 % gesetzt wurden (Absolutwert: 0,047 %). Mittelwerte und Standardfehler von 12 Rekombinationsmessungen sind gezeigt. Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden die TK6 Zellen ebenso wie zur Rekombinationsanalyse behandelt, wobei die Zellen ausschließlich mit dem Kontrollvektor pBS transfiziert wurden. Die Zellen wurden fixiert und PI-gefärbt. Per FACS-Analyse wurde anschließend Zellzyklusverteilung (Diagramm Mitte) und Zelltodinduktion (Diagramm rechts) bestimmt. Für Zellzyklus- und Zelltodanalysen sind Mittelwerte und Standardfehler von 4 Messungen gezeigt.

### 3.2.5.4 Analyse der Rekombination am transient eingeführten *MLLbcr*-Fragment nach Behandlung mit Anti-CD95 Antikörper

Für die Behandlung mit dem Antikörper Anti-CD95, der CD95-Rezeptor-vermittelte Apoptose aktiviert, wurde über eine Ligations-vermittelte PCR eine spezifische Spaltung nahe der Exon 12-Grenze des *MLLbcr* in TK6-Zellen nachgewiesen (Betti *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Daten wurde der Einfluss von Anti-CD95 Antikörper (Klon 7C11, BeckmanCoulter, Brea, USA) auf das Reparaturverhalten am *MLLbcr*- vs. Kontroll-Fragment im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem näher untersucht.

Dazu wurden die WTK1 Zellen mit pHR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd* oder pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* zunächst elektroporiert und analog zu den Experimenten der Chemotherapeutika-Behandlung (Abschnitt 3.2.5.2-3.2.5.4) mit 20 ng/ml Anti-CD95 behandelt und die Rekombinationsfrequenz nach 24 h am FACS gemessen. Des weiteren wurde für die Behandlung der WTK1 Zellen mit und ohne Anti-CD95 über den *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (Roche, Penzberg) die frühe Apoptose quantifiziert und von der späten Apoptose/Nekrose separiert.



**Abb. 22 Analyse der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment und Quantifizierung der Apoptose mittels Annexin-PI-Färbung für WTK1 nach Anti-CD95 Antikörper-Behandlung.**

Die Zelllinie WTK1 wurde jeweils mit den Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd* und pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* elektroporiert. Danach wurden die transfizierten Zellen für eine Regenerationsphase von 4h kultiviert und anschließend mit 20 ng/ml anti-CD95 Antikörper behandelt. Nach 24 h Kultivierung wurde die Rekombinationsfrequenz per FACS-Analyse bestimmt (Diagramm links). Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet indem die Frequenzen der Kontrollexperimente mit pHR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd* auf jeweils 100 % gesetzt wurden (Absolutwerte: 0,2 %). Mittelwerte und Standardfehler von 6 Rekombinationsmessungen sind gezeigt. Zur Quantifizierung der Apoptose wurden die WTK1 Zellen ebenso wie für die Rekombinationsanalyse behandelt, wobei die Zellen ausschließlich mit dem Kontrollvektor pBS transfiziert wurden. Die Zellen wurden dann nach den Anweisungen des *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (Roche, Penzberg) weiterbehandelt und per FACS-Analyse frühe (fr.) Apoptose und späte (sp.) Apoptose/Nekrose quantifiziert (einfache Bestimmung).

Die Analyse zeigte, dass Anti-CD95 zwar zur Induktion von früher Apoptose führte (Abb. 22, rechtes Diagramm, 3,7-fach), jedoch keine Stimulierung der Rekombination am *MLLbcr*- und

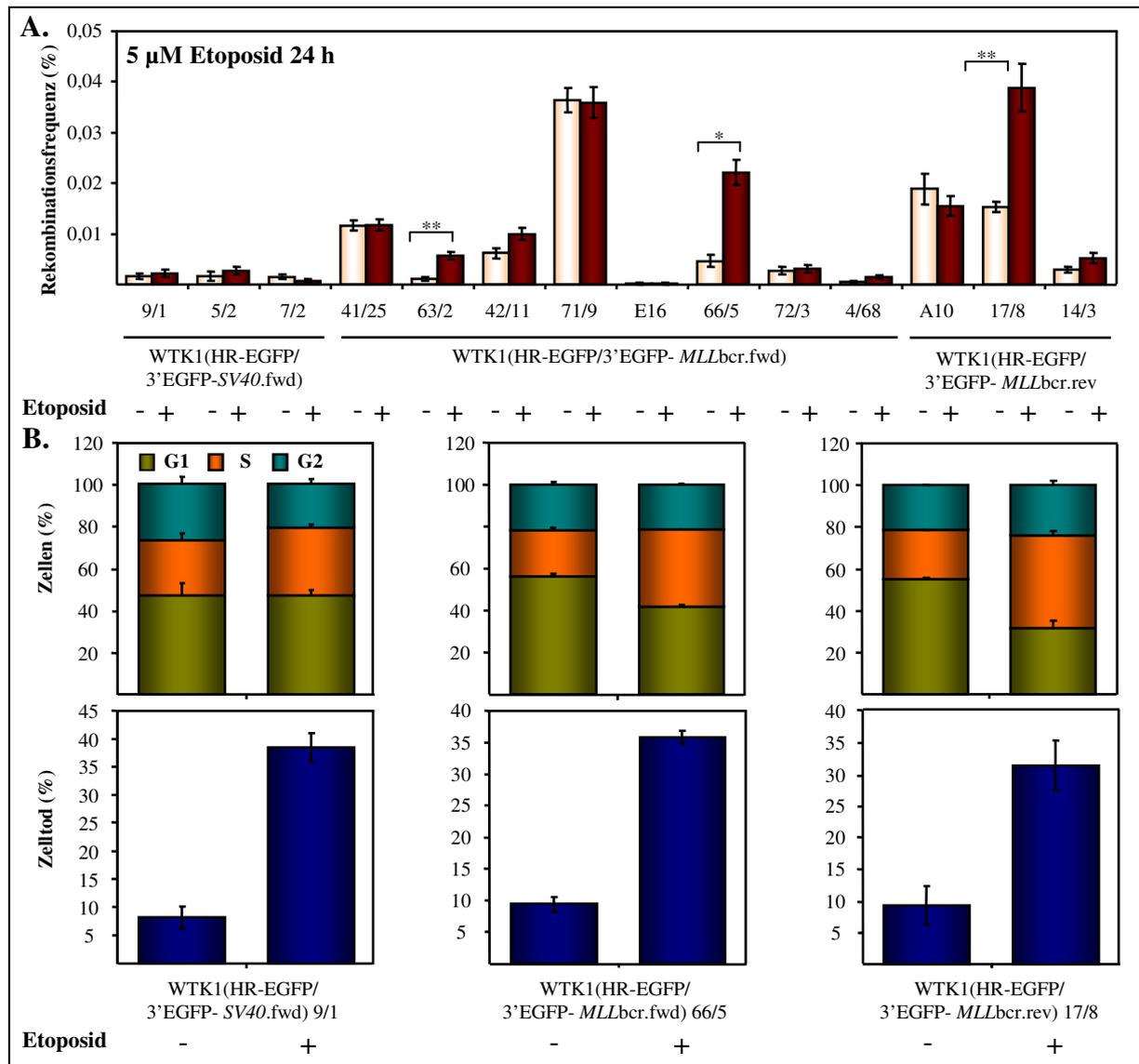
SV40-Kontrollfragment verursachte. Vielmehr wurde eine nicht signifikante Senkung der Rekombinationsfrequenz für das *MLLbcr*-Fragment detektiert (Abb. 22, linkes Diagramm, 24 % Reduktion). Variation des Zelltyps (WTK1, TK6 und Jurkat), Inkubationszeit (12 h-72 h) oder Konzentration (0,1-100 ng/ml) führten ebenfalls zu keiner Steigerung der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment (Daten nicht gezeigt). Die Rezeptor-induzierte Apoptose mittels Anti-CD95 führte demzufolge unter den experimentellen Bedingungen zu keiner Steigerung der Rekombination innerhalb des *MLLbcr*-Fragments. Die Reduktion der Rekombinationsfrequenz für das *MLLbcr*-Fragment ist möglicherweise erklärbar durch die Kinetik der CD95-vermittelten Apoptosereaktion, die zum frühzeitigen Abbau von Reparaturproteinen führt und so selbst bei Vorhandensein von *MLLbcr*-Brüchen eher Reparatur an selbigen verhindert als stimuliert.

### **3.2.5.5 Analyse der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment im chromosomalen Kontext nach Behandlung mit Etoposid**

Die bisher dargestellten Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Bruch- und Rekombinationsverhalten am *MLLbcr*-Fragment nach Chemotherapeutika-Behandlung waren gänzlich nach transienter Transfektion der Rekombinationskonstrukte erhalten worden. Durch die Etablierung stabiler WTK1-Klone, die die Rekombinationskonstrukte chromosomal integriert vorliegen haben (Abschnitt 3.1.2), war es möglich die Rekombinationsanalysen in Abhängigkeit vom chromosomalen Kontext durchzuführen. Die Experimente erfolgten in Analogie zu den transienten Untersuchungen. Aufgrund der Erkenntnisse anderer Gruppen (Aplan *et al.*, 1996; Felix, 1998; Felix, 2001; Stanulla *et al.*, 2001; Strissel *et al.*, 1998) und eigener Daten in Bezug auf die Beteiligung von Etoposid (Abschnitt 3.2.5.2) bei der *MLLbcr*-Bruchinduktion bzw. -Rekombinationssteigerung wurden die initialen Experimente im chromosomalen Kontext mit diesem Chemotherapeutikum durchgeführt.

Dazu wurden, nach neuer Optimierung in Bezug auf Konzentration und Inkubationsdauer, die Klone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd), WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.fwd) und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.rev) zunächst ohne Elektroporation für 24 h mit 5 µM Etoposid inkubiert und die Rekombination mittels FACS-Analyse bestimmt. Für alle untersuchten Kontrollklone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd) ergaben die Untersuchungen keine Stimulierung der Rekombination. Unter den *MLLbcr*-Klonen WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.fwd) und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.rev) konnten jedoch drei Klone identifiziert werden, die eine signifikante Erhöhung der Rekombination nach Etoposid-Behandlung aufwiesen (Abb. 23 A., 5,2-fach, P=0,0091 für

Klon 63/2, 4,7-fach,  $P=0,0313$  für Klon 66/5 und 2,5-fach,  $P=0,0078$  für Klon 17/8). Für diese *MLLbcr*-Klone war die Erhöhung der Rekombination nach Etoposid-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollklonen demzufolge spezifisch.



**Abb. 23 Analyse der Rekombination am chromosomal integrierten *MLLbcr*- und *SV40*-Fragment sowie Bestimmung von Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion nach Etoposid-Behandlung**

Die aus der 2. Selektionsphase entstandenen Zellklone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd), WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd*) und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev*) wurden für 24 h mit 5  $\mu$ M Etoposid behandelt. (A.) zeigt die per FACS-Analyse bestimmte Rekombinationsfrequenz in den Zellklonen. Mittelwerte und Standardfehler von 6-9 Rekombinationsmessungen sind jeweils gezeigt. (B.) zeigt die Zellzyklusverteilung (obere Reihe) und Zelltodinduktion (untere Reihe) für ausgewählte Klone. Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden die WTK1 Zellklone ebenso wie für die Rekombinationsanalyse behandelt. Die Zellen wurden fixiert und PI-gefärbt. Per FACS-Analyse wurde anschließend der DNA-Gehalt bestimmt. Für die Zellzyklus- und Zelltodanalysen sind jeweils Mittelwerte und Standardfehler von 4 Messungen gezeigt.

Da jedoch nicht alle *MLLbcr*-Klone mit einer Stimulierung der Rekombination reagierten, ist anzunehmen, dass für die spezifische Stimulierung am *MLLbcr*-Fragment der chromosomale Locus eine wichtige Rolle spielt.

Des Weiteren ist die basale Rekombinationsfrequenz in den meisten *MLLbcr*-Fragment-

gegenüber den SV40-Fragment-tragenden Klonen erhöht (Abb. 23 A.). Dies war jedoch keine Bedingung für die Stimulierung der Rekombination nach Etoposid-Behandlung (Abb. 23 A., Klon 63/2). Die Zellzyklusdaten sowie die Ergebnisse zur Zelltodinduktion zeigen analog zu den transienten Experimenten die Induktion eines S-Phase Arrests (Abb. 23 B. obere Reihe, Erhöhung des Zellanteils in der S-Phase um 6 % für Klon 9/1; um 14,8 % für Klon 66/5; um 11,7 % für Klon 17/8) und die Zunahme toter Zellen nach Etoposid-Behandlung (Abb. 23 B. untere Reihe, 4,7-fach für Klon 9/1; 3,8-fach für Klon 66/5; 3,4-fach für Klon 17/8). Experimente bei denen die Zellklone vor der Behandlung mit Etoposid mit 30 µg pBS Leervektor elektroporiert wurden, führten zu ähnlichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). Nach Elektroporation zeigten die Kontrollklone, aufgrund der gesteigerten Sensibilität gegenüber Reparaturereignissen, jedoch ebenfalls eine erhöhte wenn auch meist nicht signifikant erhöhte Rekombinationsaktivität nach Chemotherapeutika-Behandlung.

Zusammengefasst induziert Etoposid in Abhängigkeit vom chromosomalen Lokus eine Steigerung der Rekombination spezifisch am *MLLbcr*-Fragment. Der Einfluss des *MLLbcr*-Fragments kann im chromosomalen Kontext trotz Zellzyklusarrest festgestellt werden. Eine Beteiligung apoptotischer DNA-Spaltung an der *MLLbcr*-spezifischen Rekombinationssteigerung ist aufgrund der starken Induktion des Zelltods in den behandelten WTK1-Klonen möglich.

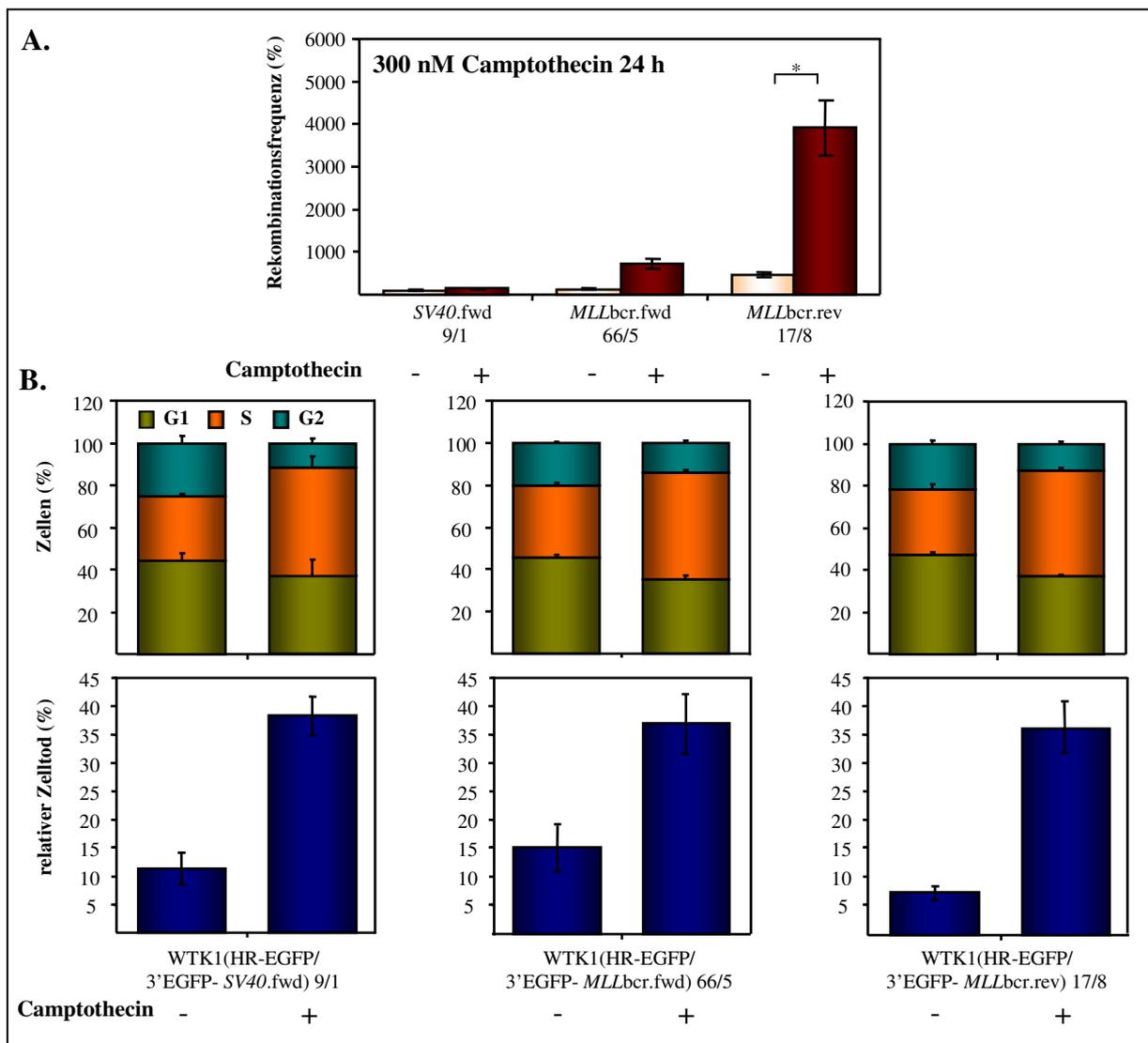
### **3.2.5.6 Analyse der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment im chromosomalen Kontext nach Behandlung mit Camptothecin**

Um zu analysieren, ob die Rekombinationssteigernden Effekte im chromosomalen Kontext wie nach transientser Einführung der Substrate auch durch andere Chemotherapeutika hervorgerufen werden, wurde zunächst Camptothecin als weiteres Zytostatikum getestet.

Dazu wurden die Klone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd), WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.fwd) und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.rev) zunächst mit 30 µg Leervektor pBS elektroporiert. Nach 4 h Regenerationsphase wurden sie für 24 h mit 300 nM Camptothecin inkubiert und die Rekombination mittels FACS-Analyse bestimmt.

Die Analyse ergab eine spezifische Stimulierung der Rekombination für die *MLLbcr* Klone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.fwd).66/5 und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.rev).17/8 (Abb. 24 A., 6-fach, P=0,0625 für Klon 66/5 und 8,6-fach, P=0,0108 für Klon 17/8). Die Zellzyklusdaten sowie die Daten zur Induktion des Zelltods zeigen analog zu den transienten Experimenten die Induktion eines S-Phase Arrests (Abb. 24 B. obere Reihe, Erhöhung des Zellanteils in der S-Phase um 20,3 % für Klon 9/1; um 16,5 % für Klon 66/5;

um 18,3 % für Klon 17/8) und Steigerung des Anteils toter Zellen nach Camptothecin-Behandlung (Abb. 24 B. untere Reihe, 3,4-fach für Klon 9/1; 2,5-fach für Klon 66/5; 5-fach für Klon 17/8). Zusammengefasst verursacht demzufolge neben Etoposid auch Camptothecin eine spezifischen Steigerung der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment. Dabei beeinflusst der beobachtete Zellzyklusarrest wiederum die Sequenz-unabhängige Reparatur nicht signifikant. Eine Beteiligung apoptotischer DNA-Spaltung an der *MLLbcr*-spezifischen Rekombinationssteigerung ist aufgrund der starken Induktion des Zelltods in den behandelten WTK1-Klonen auch in diesem Fall möglich.



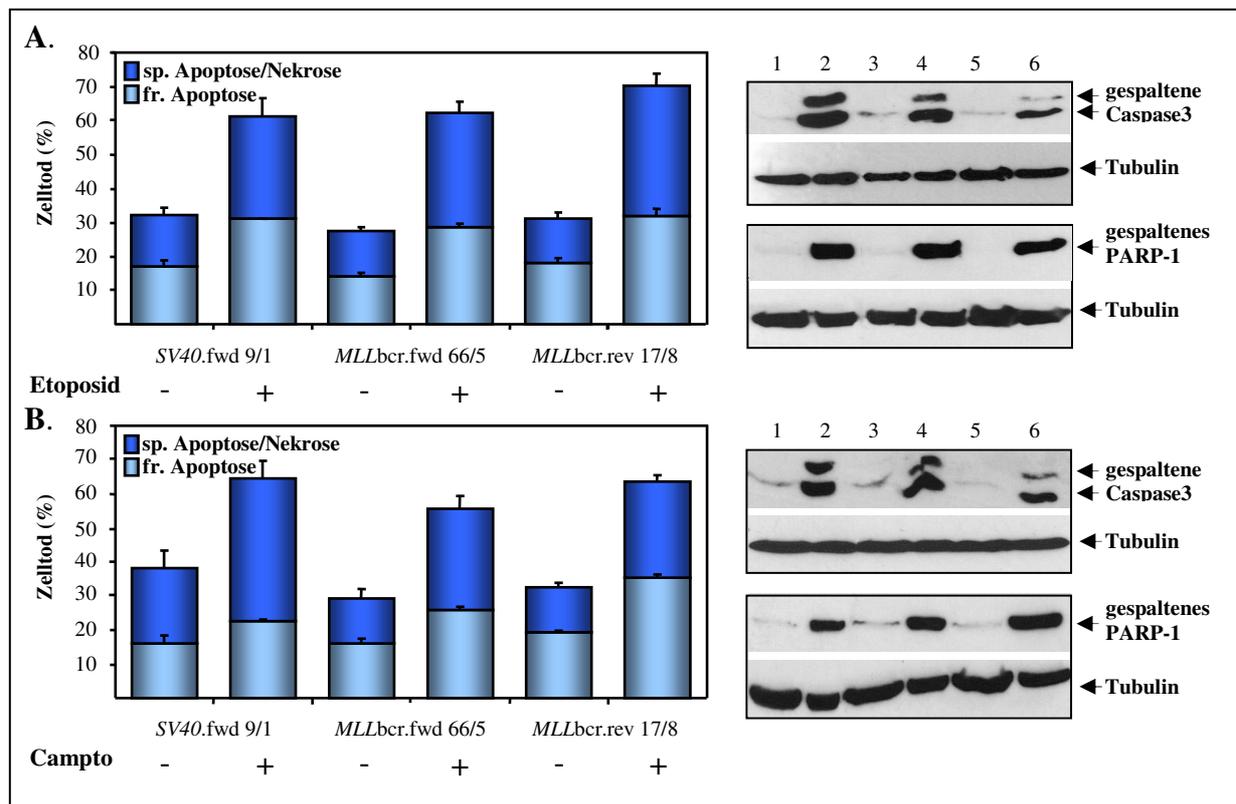
**Abb. 24 Analyse der Rekombination am chromosomal integrierten *MLLbcr*- und *SV40*-Fragment sowie Bestimmung von Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion nach Camptothecin-Behandlung**

Die Zellklone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd*).9/1, WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd*).66/5 und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev*).17/8 wurden mit dem Leervektor pBS elektroporiert und nach 4 h Regeneration für 24 h mit 300 nM Camptothecin behandelt. (A.) zeigt die per FACS-Analyse bestimmte Rekombinationsfrequenz in den Zellklonen. Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet indem die Frequenz in den Kontrollexperimenten mit WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd*).9/1 auf 100 % gesetzt wurde (Absolutwert: 0,0048 %). Der Mittelwert und Standardfehler von 6 Rekombinationsmessungen ist gezeigt. (B.) zeigt Zellzyklusverteilung (obere Reihe) und Zelltodinduktion (untere Reihe). Hierfür wurden die WTK1 Zellklone ebenso wie für die Rekombinationsanalyse behandelt. Die Zellen wurden fixiert und PI-gefärbt. Per

FACS-Analyse wurde anschließend der DNA-Gehalt bestimmt. Für die Zellzyklus- und Zelltodanalyse ist jeweils der Mittelwert und Standardfehler von 4 Messungen gezeigt.

### 3.2.5.7 Analyse der Apoptose in den stabilen WTK1 Zellklonen nach Behandlung mit Etoposid und Camptothecin

Da Zelltodbestimmung nach PI-Färbung nicht zwischen den verschiedenen Typen des Zelltods diskriminiert, wurde mittels *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (Roche, Penzberg) sowie Westernblot-Analysen zur Caspase-3 und PARP-1-Spaltung die Einleitung der Apoptose (aktiver Zelltod) durch Etoposid- oder Camptothecin-Behandlung überprüft. Die Annexin-V-FLUOS-Färbung beruht auf der Detektion von Phosphatidylserin auf der Membran-Außenseite früh-apoptotischer Zellen und der PI-Färbung spät-apoptotischer und nekrotischer Zellen. Die Westernblot-Analysen detektieren zum einen die proapoptotische Aktivierung der Caspase 3 durch ihre Spaltung und zum anderen die nach Apoptose-Induktion über Caspase 3 vermittelte Spaltung des modifizierenden Faktors PARP-1.



**Abb. 25 Quantifizierung der Apoptose mittels Annexin-V-FLUOS-Färbung und Westernblot-Analyse zu gespaltenen Caspase-3 und PARP-1 für die stabilen WTK1 Klone nach Etoposid- und Camptothecin-Behandlung.**

(A.) zeigt die Annexin-V-FLUOS Färbung und Westernblot-Analyse der WTK1 Klone für die Behandlung mit und ohne Etoposid. Dazu wurden die WTK1 Zellen ebenso wie zur Rekombinationsanalyse unter Elektroporationsbedingungen behandelt, wobei die Zellen mit dem Leervektor pBS transfiziert wurden. Die Zellen wurden dann nach den Anweisungen des *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (Roche, Penzberg) weiterbehandelt und per FACS-Analyse Apoptose und Nekrose quantifiziert. Zelltodanalyse wurden nach Etoposid-Behandlung jeweils vier mal durchgeführt (linkes Diagramm). Die rechten Bilder zeigen die Spaltung von Caspase 3 und PARP-1 sowie die zugehörigen Tubulinkontrollen in den WTK1 Zellklonen 24 h nach Behandlung. Für die Immunoblot-Reaktionen wurden die polyklonalen Kaninchenserum Anti-cleaved-PARP,

1/200 und Anti-*active*-Caspase 3, 1/400 (Millipore, Billerica, MA, USA) eingesetzt. Die Detektion der Ladekontrolle Tubulin erfolgte über einen monoklonalen Antikörper Maus-Anti-Tubulin, 1/5000 (Abcam, Cambridge, UK). Spur 1: WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd).9/1, ohne Etoposid, Spur 2: WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd).9/1, mit Etoposid, Spur 3: WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*.fwd).66/5, ohne Etoposid, Spur 4: WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*.fwd).66/5, mit Etoposid, Spur 5: WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*.rev).17/8, ohne Etoposid, Spur 6: WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*.rev).17/8, mit Etoposid. (**B.**) zeigt die analogen Daten für Camptothecin-Behandlung.

Die Annexin-V-FLUOS-Färbung zeigte für die Behandlung der WTK1-Klone mit beiden Chemotherapeutika nach 24 h sowohl eine Zunahme der frühen Apoptose als auch der späten Apoptose/Nekrose (Abb. 25 A. und B. links, Etoposid/Camptothecin: Klon 9/1 1,8/1,4-facher; Klon 66/5 2/1,6-facher; Klon 17/8 1,8/1,8-facher Anstieg für die frühe Apoptose; Klon 9/1 2/1,9-facher; Klon 66/5 2,5/2,2-facher; Klon 17/8 2,9/2,2-facher Anstieg für die späte Apoptose/Nekrose). Zum Nachweis von gespaltener Caspase-3 (17/19 kDa) und PARP-1 (89 kDa) mittels Westernblot-Analyse wurden polyklonale Kaninchenseren Anti-*cleaved*-PARP bzw. Anti-*active*-Caspase 3 eingesetzt. Die Behandlung der Klone mit jedem der beiden Chemotherapeutika führte zur Spaltung von Caspase-3 und PARP-1 (Abb. 25 A. und B. rechts) innerhalb der Zellen. Alle drei Nachweise zeigten demzufolge die Induktion von Apoptose nach Chemotherapeutika-Behandlung.

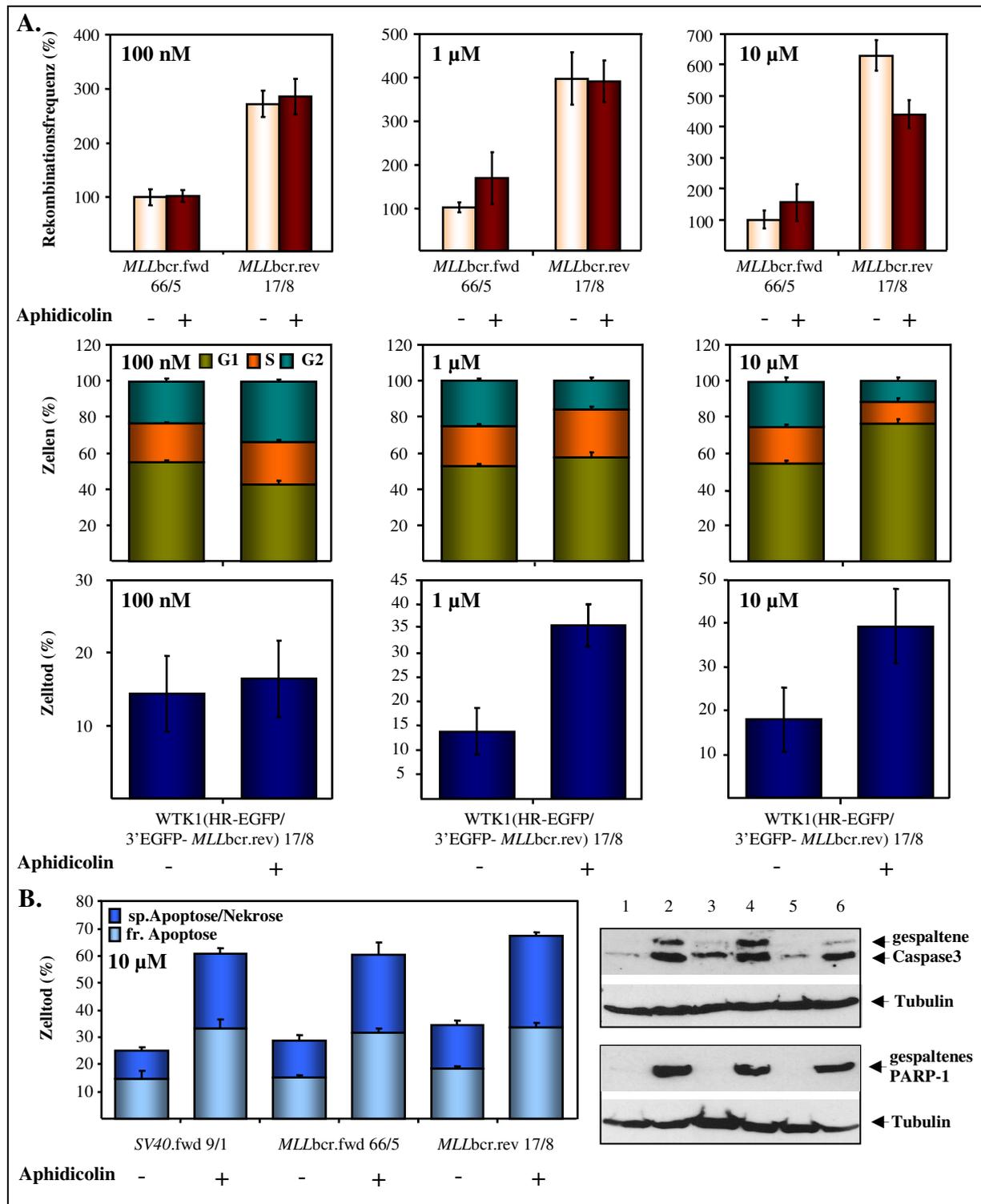
### **3.2.5.8 Analyse von Rekombination am *MLL*bcr-Fragment und Apoptose in den stabilen WTK1-Klonen nach Behandlung mit Aphidicolin**

Neben Etoposid und Camptothecin wurde im chromosomalen Kontext das unter transienten Bedingungen auf die Rekombination am *MLL*bcr-Fragment spezifisch wirkende Agens Aphidicolin getestet.

Dazu wurden die Klone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd).66/5 und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.rev).17/8 mit 30 µg Leervektor pBS elektroporiert und nach einer vierstündigen Regenerationsphase für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen (100 nM, 1 µM 10 µM) Aphidicolin inkubiert und die Rekombination mittels FACS-Analyse bestimmt.

Die Analyse ergab unter den getesteten Bedingungen keine Stimulierung der Rekombination für die *MLL*bcr-Klone nach Aphidicolin-Behandlung. Die Zellzyklus- und Zelltoddaten offenbarten im Gegensatz zu den transienten Experimenten jedoch, eine starke Erhöhung des Zellanteils in der G1-Phase um 22 % und eine 2,2-fache Steigerung des Anteils toter Zellen nach Behandlung mit 10 µM Aphidicolin (Abb. 26 A.). Zusätzlich zeigte die Analyse von Nekrose und Apoptose mittels *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (Roche, Penzberg) sowie der Caspase-3 (17/19 kDa) und PARP-1 (89 kDa)-Spaltung eine Induktion der Apoptose nach Behandlung mit 10 µM Aphidicolin (Abb. 26 B. links, Klon 9/1 2,2-facher; Klon 66/5 2,1-facher; Klon 17/8 1,8-facher Anstieg für die frühe Apoptose; Klon 9/1 2,7-facher; Klon

66/5 2,1-facher; Klon 17/8 2,1-facher Anstieg für die späte Apoptose/Nekrose). Weitere Experimente mit unterschiedlichen Inkubationszeiten sowie ohne Elektroporation der Zellklone führten ebenso zu keiner gesteigerten Rekombinationsrate (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 26** Analyse der Rekombination am chromosomal integrierten *MLLbcr*-Fragment sowie Bestimmung von Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion für die WTK1 Zellklone nach Aphidicolin-Behandlung. Die Zellklone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd*).66/5 und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev*).17/8 wurden mit dem Leervektor pBS elektroporiert und nach 4 h Regeneration für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Aphidicolin behandelt. (A.) zeigt die per FACS-Analyse bestimmte Rekombinationsfrequenz in den Zellklonen (obere Reihe) sowie die Zellzyklus- (mittlere Reihe) und

Zelltoddaten (untere Reihe) am Beispiel von WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.rev).17/8. Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet indem die Frequenz der Kontrollexperimente mit WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd).66/5 jeweils auf 100 % gesetzt wurde (Absolutwerte: 0,0064 % für 100 nM, 0,0054 % für 1 µM, 0,0033 % für 10 µM). Der Mittelwert und Standardfehler von 3-9 Rekombinations-, Zellzyklus- und Zelltodanalysen ist jeweils gezeigt. (B.) zeigt die Annexin-V-FLUOS Färbung und Westernblot-Analyse der WTK1 Klone nach Behandlung mit und ohne 10 µM Aphidicolin. Dazu wurden die WTK1 Klon-Zellen ebenso wie für die Rekombinationsanalyse behandelt, wobei die Zellen mit dem Leervektor pBS elektroporiert wurden. Die Zellen wurden dann nach den Anweisungen des *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (Roche, Penzberg) weiterbehandelt und per FACS-Analyse Apoptose und Nekrose quantifiziert. Die Bestimmung des Anteils toter Zellen nach Aphidicolin-Behandlung wurde jeweils vier mal durchgeführt (linkes Diagramm). Die rechten Bilder demonstrieren die Spaltung von Caspase 3 und PARP-1 sowie die zugehörigen Tubulinkontrollen in den WTK1 Zellklonen nach 24 h. Für die Immunoblot-Reaktionen wurden die polyklonalen Kaninchenserum Anti-*cleaved*-PARP, 1/200 und Anti-*active*-Caspase 3, 1/400 (Millipore, Billerica, MA, USA) eingesetzt. Die Detektion der Ladekontrolle Tubulin erfolgte über einen monoklonalen Antikörper Maus-Anti-Tubulin, 1/5000 (Abcam, Cambridge, UK).. Spur 1: WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*SV40*.fwd).9/1, ohne Aphidicolin, Spur 2: WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*SV40*.fwd).9/1, mit Aphidicolin, Spur 3: WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*.fwd).66/5, ohne Aphidicolin, Spur 4: WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*.fwd).66/5, mit Aphidicolin, Spur 5: WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*.rev).17/8, ohne Aphidicolin, Spur 6: WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*.rev).17/8, mit Aphidicolin.

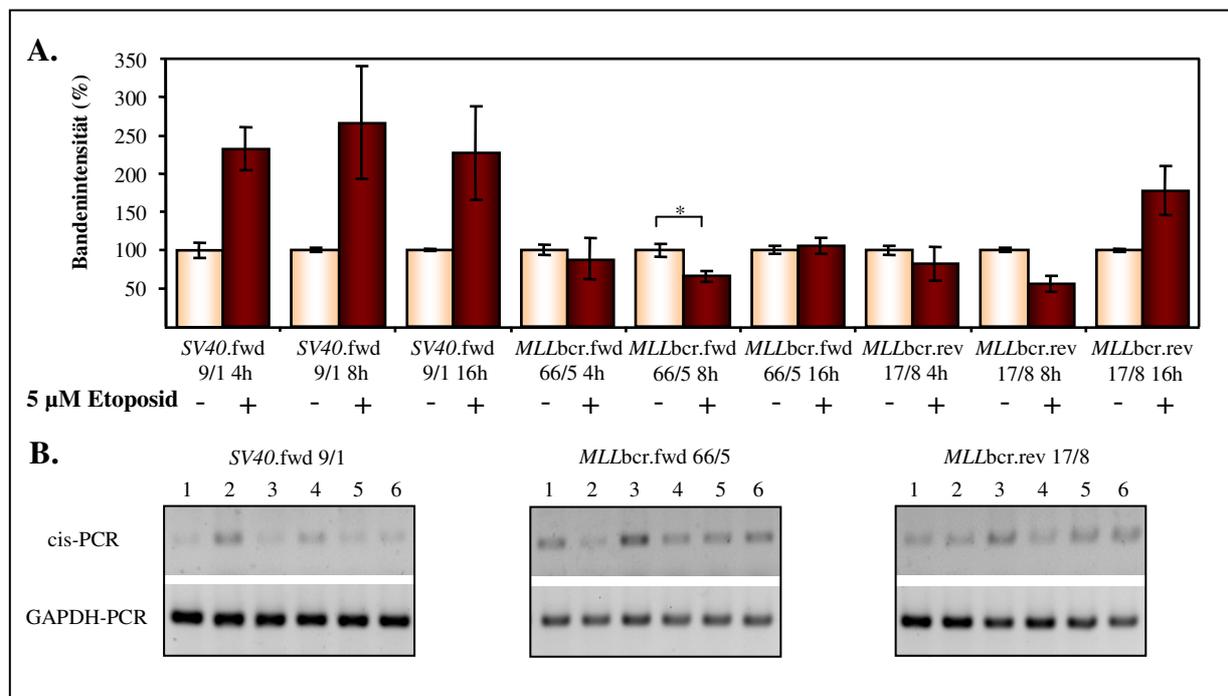
Der *MLL*bcr-Fragment spezifische rekombinationsstimulierende Effekt von Aphidicolin konnte für WTK1 demzufolge ausschließlich im extrachromosomalen Kontext festgestellt werden. Möglicherweise ist das rekombinationsinduzierende Signal von Aphidicolin im chromosomalen Kontext zu schwach und führt deswegen zu keiner detektierbaren Steigerung der Reparatur.

### **3.2.6 PCR-Analyse zur Detektion von DNA-Brüchen im *MLL*bcr-Fragment im chromosomalen Kontext nach Behandlung mit Etoposid**

Die unter Abschnitt 3.2.5 dargestellten Daten erlauben keine Unterscheidung zwischen dem Einfluss von Chemotherapeutika auf die Entstehung von Brüchen im *MLL*bcr-Fragment und die Rekombination am *MLL*bcr-Fragment bzw. an den Kontrollsequenzen. Die Auswirkungen auf die Fragilität der Fragmente wird über die Technik des Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem nur indirekt bestimmt und ist oftmals mit Reparatur-modifizierenden Nebeneffekten kombiniert. So sind mögliche Ursachen für eine Rekombinationssteigerung nach Behandlung mit Chemotherapeutika nicht nur die Induktion von DNA-Brüchen und Aktivitätsänderungen in den Reparatursystemen sondern auch Zellzyklusverschiebungen, welche die Reparatur-Aktivitäten indirekt steuern.

Um direkt nachzuweisen, dass Chemotherapeutika DNA-Brüche spezifisch im *MLL*bcr-Fragment induzieren, wurden die stabilen Zelllinien WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*SV40*.fwd).9/1, WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd).66/5 und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.rev).17/8 zunächst ohne Elektroporation mit und ohne Etoposid für verschiedene Inkubationszeiten (4 h, 8 h, 16 h) behandelt. Anschließend wurde aus den Zellen mittels *Qiagen Blood & Cell Culture DNA Kit* (Qiagen, Hilden) die chromosomale DNA

isoliert. Die so gewonnene DNA wurde auf eine Konzentration von 100 ng/μl eingestellt. Die Proben wurden mittels semiquantitativer PCR hinsichtlich der Bruchinduktion durch Etoposid untersucht. Für die Analyse wurden die cis-Primer verwendet, die an die mutierten *EGFP*-Gene binden, welche die DNA-*cis*-Sequenzen innerhalb der Rekombinationsonstrukture umschließen. Dies gewährleistet, dass ausschließlich Amplifikationssignale von den künstlich integrierten DNA-*cis*-Elementen detektiert werden. Führt die Behandlung mit Etoposid nach einer bestimmten Inkubationszeit zu Brüchen innerhalb des DNA-*cis*-Elements wird das Amplifikationssignal im Vergleich zur unbehandelten Probe schwächer ausfallen. Als Kontrolle für Menge und Qualität der DNA wurde eine zweite PCR mit GAPDH-Primern, welche innerhalb des *housekeeping* Gens *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) binden, durchgeführt. Die PCRs wurden jeweils dreimal durchgeführt und zweimal mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.



**Abb. 27 Analyse von DNA-Brüchen innerhalb der artifizell integrierten DNA-*cis*-Elemente der WTK1 Zellklone nach Behandlung mit Etoposid per PCR.**

Die Zellklone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd).9/1, WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.fwd).66/5 und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev).17/8 wurden ohne oder mit 5 μM Etoposid behandelt. Anschließend wurde die chromosomale DNA isoliert. Diese DNA wurde auf eine Konzentration von 100 ng/μl eingestellt. Über eine semiquantitative PCR-Analyse wurde die Bruchinduktion innerhalb der DNA-*cis*-Elemente ohne und mit Chemotherapeutika-Behandlung bestimmt. Dazu wurden zum einen PCRs mit den cis-Primern und zum anderen Kontroll-PCRs mit GAPDH-Primern durchgeführt. Erstere führte zur quantitativen Amplifikation der DNA-*cis*-Elemente, wobei eine Senkung der Bandenintensität im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe eine verstärkte Bruchinduktion anzeigte. Zweitere dient der Überprüfung der DNA-Menge und -Qualität, indem ein *housekeeping* Gen amplifiziert wurde. (A.) zeigt die grafische Zusammenfassung der gegen die Kontrolle korrigierten Bandenintensitäten. Die semiquantitative PCR wurde dreimal durchgeführt und jeweils zweimal gelelektrophoretisch untersucht. Die so erhaltenen Bandenintensitäten wurden mit den Mittelwerten der Kontroll-PCR korrigiert. Es wurde die relative Intensität der Banden errechnet indem die Werte für ohne Etoposid-Behandlung auf 100 % gesetzt wurden. (B.) zeigt Beispiele der semiquantitativen PCR-Analysen (obere Gelbilder) und Kontroll-PCRs (untere Gelbilder) von WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd).9/1,

WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd*).66/5 und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev*).17/8.

Spur 1: 4 h Inkubation ohne Etoposid, Spur 2: 4 h Inkubation mit Etoposid, Spur 3: 8 h Inkubation ohne Etoposid, Spur 4: 8 h Inkubation mit Etoposid, Spur 5: 16 h Inkubation ohne Etoposid, Spur 6: 16 h Inkubation mit Etoposid.

Abb. 27 A. zeigt die Zusammenfassung der über die Kontroll-PCR quantitativ korrigierten Bandenintensitäten der verschieden behandelten Proben. Es zeigte sich eine Abnahme der Bandenintensität für die Zellklone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd*).66/5 und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev*).17/8 nach 8 h Inkubationszeit mit Etoposid (33 % Reduktion,  $P=0,0313$ , für *MLLbcr.fwd* 66/5, 44 % Reduktion,  $P=0,0625$ , für *MLLbcr.rev*.17/8). Nach 16 h nimmt die Bandenintensität der behandelten Proben wieder zu, was auf eine erfolgte Reparatur der Brüche zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu wurde für WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd*).9/1 keinerlei Abnahme der Intensität nach verschiedenen Inkubationszeiten detektiert, eher sogar eine jedoch nicht signifikante Zunahmen (2,3-2,7-fach), was insgesamt die fehlende Bruchinduktion durch Etoposid innerhalb des *SV40*-Kontrollsequenz belegt. Abb. 27 B. zeigt beispielhaft die Ergebnisse der Bruchanalyse- und Kontroll-PCR nach der Agarose-Gelelektrophorese für die drei ausgewählten Zellklone.

Zusammengefasst konnte die Induktion von DNA-Brüchen spezifisch am *MLLbcr*-Fragment nach Chemotherapeutika-Behandlung am Beispiel von Etoposid nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese spezifischen Brüche innerhalb der *MLLbcr* im Zeitrahmen des Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystems repariert werden.

### **3.2.7 Einfluss von Caspase-Inhibition auf die Stimulierung der Rekombination nach Behandlung mit Apoptose-induzierenden Agenzien**

Bisher konnte in Abhängigkeit vom angewendeten Chemotherapeutikum und experimentellen Aufbau zum Teil eine *MLLbcr*-spezifische Steigerung der Rekombination nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in anderen Fällen ein Sequenz-unabhängige Anstieg der Reparatur beobachtet, der einen darunter verborgenen *MLLbcr*-spezifischen Effekt nicht ausschließt. Da die *MLLbcr*-spezifische Reparatur nicht auf allgemeine rekombinationsteigernde Mechanismen wie Zellzyklusarrest zurückzuführen ist, implizieren die Daten vielmehr eine Erhöhung der Bruchinduktion innerhalb des *MLLbcr*-Fragments nach Chemotherapeutika-Behandlung. Für Etoposid konnte im chromosomalen Kontext über eine semi-quantitative PCR-Analyse diese direkte Bruchinduktion am *MLLbcr*-Fragment nachgewiesen werden (Abschnitt 3.2.6).

Ob der spezifische Anstieg der Reparatur möglicherweise auf der durch früh-apoptotische Bruchinduktion gesteigerten *MLLbcr*-Fragilität basiert, konnte bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Apoptose-Induktion und gesteigerter Fragilität am *MLLbcr*-Fragment zu klären, wurde in den folgenden Experimenten die Apoptose über den Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk unterdrückt. Dieser Peptidinhibitor bindet irreversibel an die katalytischen Zentren mehrerer Caspase-Proteasen, wie Caspase 3, 7, 8 und 9 und kann dadurch die Induktion Caspase-abhängiger Apoptose und folglich die Aktivierung verschiedener apoptotischer Nukleasen verhindern.

### **3.2.7.1 Einfluss von Caspase-Inhibition auf die der Rekombination im extrachromosomalen Kontext**

Um den Einfluss von Caspasen auf die Stimulierung der Rekombination im extrachromosomalen Kontext zu überprüfen, wurden die WTK1 Zellen mit den Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd* oder pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* und pBS elektroporiert. Sofort nach Elektroporation wurden die Zellen in 50 µM zVAD-fmk (Pan-Caspase-Inhibitor)-haltiges Medium überführt.

Nach einer Regenerationsphase von 4 h wurden die Zellen mit 50 µM Etoposid, 300 nM Camptothecin oder 10 µM Aphidicolin behandelt und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Rekombinationsfrequenz mittels FACS-Analyse bestimmt und für die verschiedenen experimentellen Bedingungen Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion bestimmt.

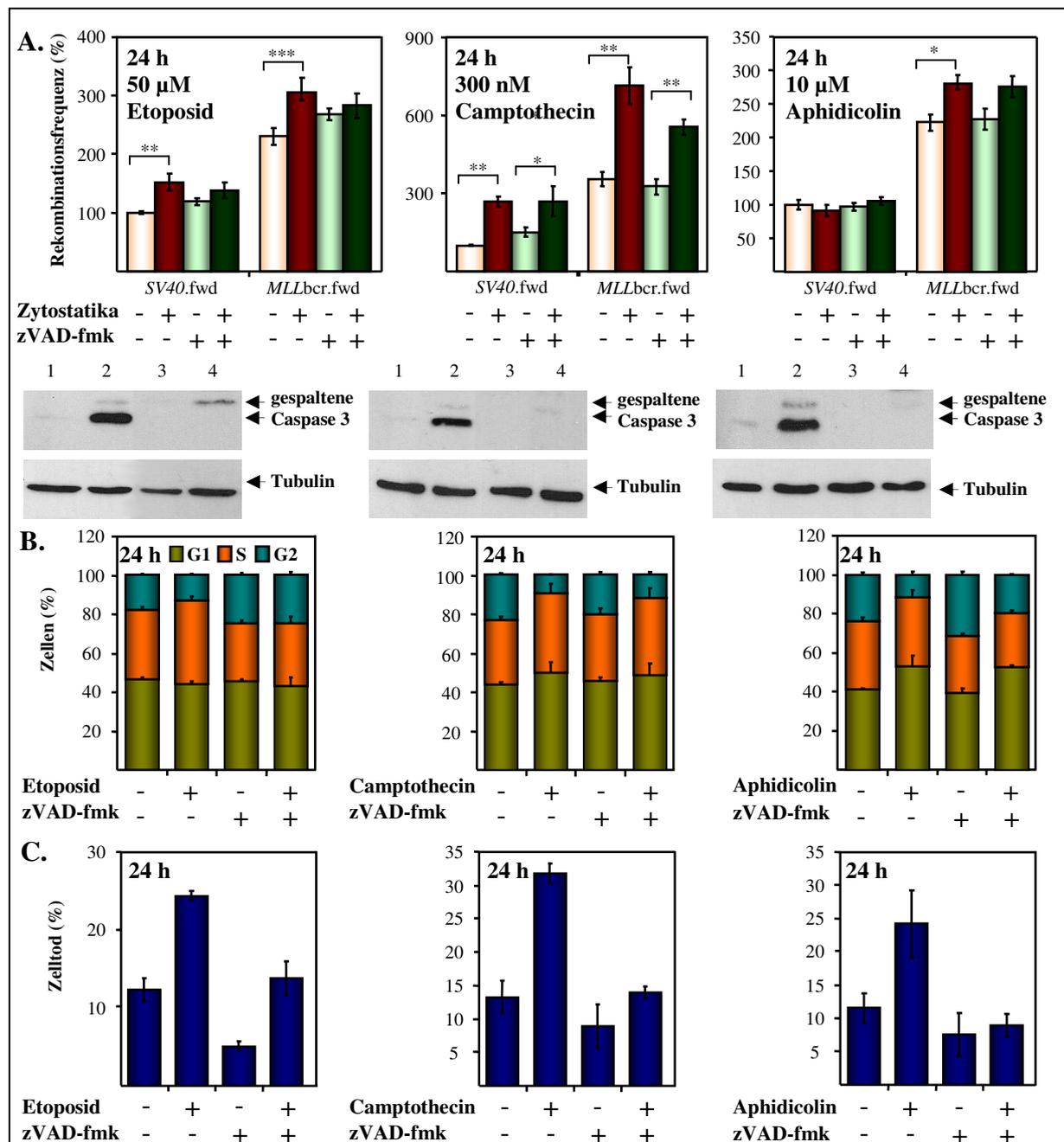
Mittels Westernblot-Analyse wurde die Akkumulation von aktivierter gespaltener Caspase 3 (17/19 kDa) mit und ohne zVAD-fmk Peptidinhibitor geprüft. Hierzu wurde ein polyklonales Kaninchenserum Anti-*active*-Caspase 3, 1/400 (Millipore, Billerica, MA, USA) verwendet, dass ausschließlich das gespaltene Caspase3-Fragment detektiert.

Für alle drei getesteten Chemotherapeutika wurde eine Induktion der Caspase 3-Spaltung und damit Aktivierung detektiert (Abb. 28 A., Spur 2) sowie der Verlust der gespaltenen Caspase 3-Fragmente nach zVAD-fmk-Inkubation nachgewiesen (Abb. 28 A., Spur 3 und 4).

Die Rekombinationsanalysen zeigten für Etoposid- und Camptothecin-Behandlung einen Verlust der Stimulierung nach zVAD-fmk Inkubation sowohl für *MLLbcr.fwd* als auch *SV40.fwd* (Abb. 28 A. links und Mitte, für *MLLbcr.fwd* bzw. *SV40.fwd* von 1,3/1,5-fach,  $P=0,0003/0,002$  auf 1/1,16-fach für Etoposid bzw. von 2/2,7-fach,  $P=0,0039/0,0039$  auf 1,7/1,8-fach,  $P=0,078/0,0391$  für Camptothecin). Für Aphidicolin wurde keine Senkung des Rekombinationsanstiegs detektiert, doch ging die statistische Signifikanz für die Differenz

verloren (Abb. 28 A. rechts, für *MLLbcr.fwd* von 1,3-fach,  $P=0,0313$  auf 1,2,  $P=0,0625$ ).

Die Zellzyklusdaten wiesen für Etoposid und Camptothecin einen S-Phase Arrest nach, der unter zVAD-fmk Einfluss teilweise abgeschwächt wurde (Abb. 28 B. links und Mitte, 1,2-facher Anstieg des S-Phaseanteils von Etoposid und Camptothecin). Für Aphidicolin wurde sowohl ohne als auch mit zVAD-fmk-Behandlung ein leichter G1-Arrest detektiert (Abb. 28 B. rechts, 1,3-facher Anstieg des G1-Phaseanteils).



**Abb. 28 Inhibition von Caspasen bei gleichzeitiger Behandlung mit Etoposid oder Camptothecin. Rekombinationsanalyse im extrachromosomalen Kontext. Zellzyklus- und Zelltod- sowie Westerblot-Analyse von gespaltenen Caspase 3**

Die Diagramme in (A.) zeigen die Rekombinationsfrequenz der Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd und pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* 24 h nach Inkubation der mit den Rekombinationsvektoren transfizierten, WTK1 Zellen ohne oder mit 50  $\mu$ M Etoposid (links) oder 300 nM Camptothecin (mitte) oder 10  $\mu$ M Aphidicolin (rechts) sowie mit dem Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk. Die relative Rekombinationsfrequenz wurde

errechnet indem die Frequenz der Kontrollexperimente mit pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd auf 100 % gesetzt wurden (Absolutwert: 0,31 % linkes Diagramm, 0,55 % mittleres Diagramm, 0,34 % rechtes Diagramm). Mittelwerte und Standardfehler von 6-15 Rekombinationsmessungen sind gezeigt. Unter den Diagrammen sind die zugehörigen Westernblot-Analysen dargestellt, in denen die aktivierende Spaltung von Caspase 3 (17/19 kDa) und der Hemmung dieser Spaltung durch zVAD-fmk nachgewiesen wurde. Für die Immunoblot-Reaktionen wurden das polyklonale Kaninchenserum Anti-*active*-Caspase 3, 1/400 (Millipore, Billerica, MA, USA) eingesetzt. Die Detektion der Ladekontrolle Tubulin erfolgte über einen monoklonalen Antikörper Maus-Anti-Tubulin, 1/5000 (Abcam, Cambridge, UK). Gezeigt sind die Western zu den WTK1 Zellen, die mit pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd transfiziert wurden. Spur 1: ohne Chemotherapeutika; Spur 2: mit Chemotherapeutika; Spur 3: zVAD-fmk behandelt, ohne Chemotherapeutika; Spur 4: zVAD-fmk behandelt, mit Chemotherapeutika. In (B.) sind die korrespondierenden Zellzyklus- und in (C.) die Zelltoddaten dargestellt. Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden die WTK1 Zellen ebenso wie für die Rekombinations-Analyse behandelt, die Rekombinationsvektoren jedoch durch pBS ersetzt. Die Zellen wurden fixiert und PI-gefärbt. Per FACS-Analyse wurden anschließend Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion bestimmt. Für die Zellzyklus- und Zelltodanalyse ist jeweils der Mittelwert und Standardfehler von 4 Messungen gezeigt.

Die Zelltoddaten zeigten die Induktion des Zelltods durch alle drei Chemotherapeutika (Abb. 28 C., 2-fach für Etoposid, 2,4-fach für Camptothecin und 2,1-fach für Aphidicolin). Nach zVAD-fmk-Behandlung kam es zu einer Reduktion des Zelltods, sowohl für die Chemotherapeutika-behandelten als auch –unbehandelten Zellen (Abb. 28 C., Etoposid/Camptothecin/Aphidicolin: Reduktion um 59 %/33 %/35 % für unbehandelte und 44 %/56 %/63 % für behandelte Zellen).

Zusammenfassend konnte nur ein geringfügiger Einfluss der Caspase-Aktivierung auf die Rekombinationsstimulation im extrachromosomalen Kontext durch Aphidicolin detektiert werden. Für Etoposid und Camptothecin ist die Stimulierung der Rekombination jedoch abhängig von der Caspase-Aktivierung und damit von der Caspase-abhängigen Apoptoseinduktion. Dabei betrifft die Caspase-Abhängigkeit auch die Kontrollsequenz.

### **3.2.7.2 Einfluss von Caspase-Inhibition auf die Rekombination im chromosomalen Kontext**

Nachdem die unter Abschnitt 3.2.7.1 dargestellten Daten zeigten, dass die Inhibition von Caspasen mittels zVAD-fmk zu einer Reduktion der Etoposid- und Camptothecin-induzierten Rekombinationsstimulierung führt, wurde die Wirkung des Pan-Caspase-Inhibitors auf die Rekombination im chromosomalen Kontext getestet.

Dazu wurden die Klone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd).9/1 und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.rev).17/8 mit pBS elektroporiert, in Medium mit 50  $\mu$ M zVAD-fmk überführt und nach einer Regenerationsphase von 4 h für 48 h mit oder ohne 5  $\mu$ M Etoposid oder 300 nM Camptothecin inkubiert. Die Rekombinationsfrequenz wurde mittels FACS-Analyse bestimmt.

Des Weiteren wurden Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion sowie per Westernblot die Spaltung von Caspase 3 analysiert. Sowohl nach Etoposid- als auch Camptothecin-Behandlung wurde eine Caspase 3-Spaltung detektiert (Abb. 29 A., Spur 2), welche nach

zVAD-fmk Inkubation nicht auftrat (Abb. 29 A., Spur 3 und 4).

Trotzdem zeigte die Rekombinationsfrequenz weder für Behandlung mit Etoposid noch mit Camptothecin nach 48 h eine Unterdrückung der Stimulierung nach Caspase-Inhibition sondern großteils einen weiteren Anstieg der Rekombinationsfrequenz (Abb. 29 A., für Etoposid, *SV40.fwd.9/1* bzw. *MLLbcr.rev.17/8* von 6,9/30,6-fach,  $P=0,2188/0,0313$  auf 4,7/39-fach,  $P=0,5271/0,0313$  nach zVAD-fmk Behandlung bzw. für Camptothecin von 5,7/26,6-fache,  $P=0,4375/0,0313$  auf 15,2/39,13-fach,  $P=0,2188/0,0313$  nach zVAD-fmk Behandlung). Ebenso zeigten Daten für 24 h Behandlung, dass keine Unterdrückung der Etoposid-induzierten Rekombinationsstimulierung nach zVAD-fmk Behandlung zu verzeichnen war (Daten nicht gezeigt).

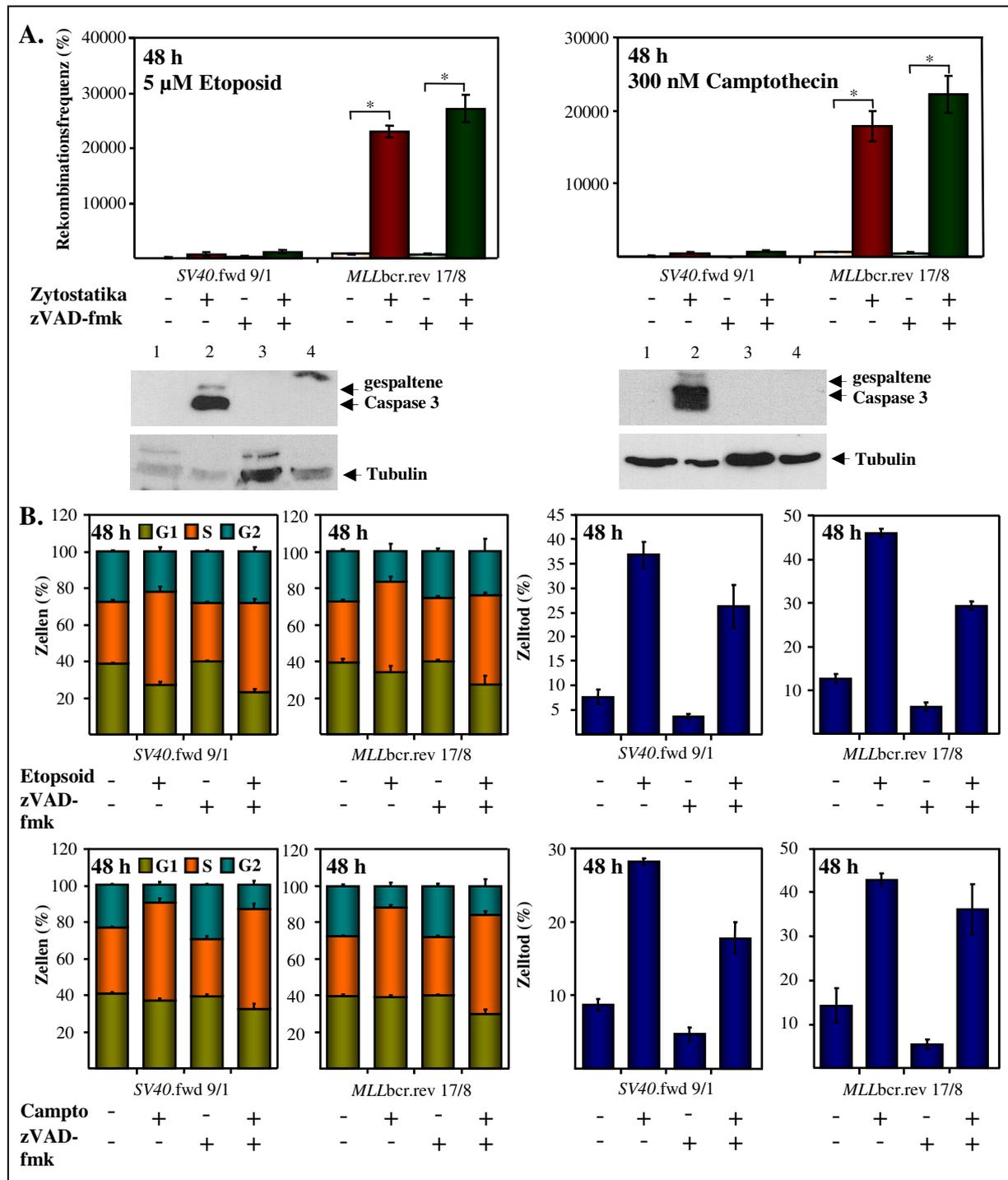
Außerdem war zu erkennen, dass nach einer Inkubationszeit von 48 h mit Chemotherapeutikum auch *WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd).9/1* einen Anstieg der Rekombination zeigte, der jedoch nicht signifikant war (Abb. 29 A.). Messungen nach 24 h zeigten für Etoposid keinen Anstieg der Rekombination für *WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd).9/1* (Daten nicht gezeigt, Messungen für Camptothecin nach 24 h liegen nicht vor). Die Reparatursteigerung in der Kontrollzelllinie steht also in Verbindung mit der Inkubationszeit von 48 h, nach welcher sich der Einfluss des Zellzyklusarrests, wie bereits für andere Messungen beschrieben wurde, verstärkt. Gemäß statistischer Auswertung bleibt die Steigerung der Rekombination spezifisch für das *MLLbcr*-Fragment (Abb. 29 A.).

Die Zellzyklusanalysen zeigten ähnlich wie nach transients Transfektion des Substrates zu transienten Ergebnissen die Induktion eines S-Phasearrests (für Etoposid, Klon 9/1 bzw. Klon 17/8: 1,5/1,5-fach ohne zVAD.fmk, 1,5/1,4-fach mit zVAD.fmk; für Camptothecin, Klon 9/1 bzw. Klon 17/8: 1,5/1,5-fach ohne zVAD.fmk, 1,7/1,7-fach mit zVAD-fmk).

Etoposid und Camptothecin führten zur Induktion des Zelltods (Abb. 29 B. für Etoposid, Klon 9/1 bzw. Klon17/8: 4,8/3,6-fach für Camptothecin, Klon 9/1 bzw. Klon17/8: 3,2/3-fach). Nach zVAD-fmk Behandlung kam es zu einer Reduktion des Zelltods für Chemotherapeutika-behandelte und unbehandelte Zellen (Abb. 29 B. Etoposid, Klon 9/1/ Klon17/8: Reduktion um 52 %/51 % für unbehandelte und 29 %/36 % für behandelte Zellen; Camptothecin, Klon 9/1/Klon17/8: Reduktion um 46 %/63 % für unbehandelte und 37 %/16 % für behandelte Zellen)

Zusammengefasst führte die Caspase-Inhibition nicht zur Reduktion der Rekombinationstimulation am *MLLbcr*-Fragment im chromosomalen Kontext nach Chemotherapeutika-Behandlung. Vielmehr war ein weiterer Anstieg der Stimulation zu verzeichnen, der möglicherweise im Zusammenhang mit einem fehlenden Abbau von

Reparaturproteinen nach Caspase 3- Inhibition steht.



**Abb. 29 Inhibition von Caspasen bei gleichzeitiger Behandlung mit Etoposid oder Camptothecin. Rekombinationsanalyse im chromosomalen Kontext. Zellzyklus- und Zelltod- sowie Westernblot-Analyse von gespalteener Caspase 3**

Die Diagramme in (A.) zeigen die Rekombinationsfrequenz an den Rekombinationskonstrukten HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd und HR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev 48 h nach Inkubation der mit pBS transfizierten WTK1 Klone ohne oder mit 5 µM Etoposid (links) oder 300 nM Camptothecin (rechts), sowie mit dem Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk. Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet indem die Frequenz der Kontrollexperimente mit WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd).9/1 jeweils auf 100 % gesetzt wurden (Absolutwerte: 0,0026 % linkes Diagramm, 0,0035 % rechtes Diagramm). Mittelwerte und Standardfehler von 6 Rekombinationsmessungen sind gezeigt. Unter den Diagrammen sind die zugehörigen Westernblot-Analysen dargestellt in denen die aktivierende Spaltung von Caspase 3 (17/19 kDa) und der Hemmung dieser Spaltung durch zVAD-fmk nachgewiesen wurde. Für die Immunoblot-Reaktionen wurden das polyklonale

Kaninchenserum Anti-*active*-Caspase 3, 1/400 (Millipore, Billerica, MA, USA) eingesetzt. Die Detektion der Ladekontrolle Tubulin erfolgte über einen monoklonalen Antikörper Maus-Anti-Tubulin, 1/5000 (Abcam, Cambridge, UK). Gezeigt sind die Western von den WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd).9/1. Spur 1: ohne Chemotherapeutika; Spur 2: mit Chemotherapeutika; Spur 3: zVAD-fmk behandelt, ohne Chemotherapeutika; Spur 4: zVAD-fmk behandelt, mit Chemotherapeutika. In (B.) sind die korrespondierenden Zellzyklus- und in Zelltoddaten dargestellt. Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden die WTK1 Zellklone ebenso wie für die Rekombinationsanalyse behandelt. Die Zellen wurden fixiert und PI-gefärbt. Per FACS-Analyse wurden anschließend Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion bestimmt. Für die Zellzyklus- und Zelltodanalyse ist jeweils der Mittelwert und Standardfehler von 4 Messungen gezeigt.

### **3.2.8 Einfluss der apoptotischen Nuklease CAD (*caspase-activated DNase*) auf die Stimulierung der Rekombination**

Die unter Abschnitt 3.2.7.1 dargestellte partielle Caspase-Abhängigkeit der Rekombination im transienten Kontext zeigte, dass apoptotische Prozesse bei der Stimulierung der Rekombination an den DNA-*cis*-Elementen eine Rolle spielen. Sie impliziert, dass apoptotische Nukleasen möglicherweise Brüche in den DNA-*cis*-Sequenzen induzieren. Eine für die frühe und späte DNA-Fragmentierungsphase der Apoptose bedeutende Nuklease ist CAD. Die Aktivität von CAD wird normalerweise in proliferierenden Zellen über die Komplexbildung mit ICAD (*inhibitor of CAD*) blockiert. Kommt es zur Induktion der Apoptose-Signalkaskade wird ICAD von Caspase 3 gespalten, degradiert und somit CAD freigesetzt. Neben Caspase 3 können weitere Enzyme wie Caspase-7 und Granzym B, mit einer geringeren Effizienz, ICAD spalten. Die Spaltung von ICAD ist demzufolge nicht ausschließlich von Caspase 3 abhängig (Nagata *et al.*, 2003; Widlak, 2000).

Um zu testen, ob die Steigerung der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment in Verbindung mit der DNA-Spaltung über apoptische Nukleasen steht, wurde im extrachromosomalen und chromosomalen Kontext die Aktivität von CAD über verschiedene Methoden blockiert.

#### **3.2.8.1 Einfluss von CAD auf die Stimulierung der Rekombination im extrachromosomalen Kontext**

Am Beispiel von Aphidicolin wurde im extrachromosomalen Kontext der Einfluss von CAD auf die Stimulierung der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment analysiert. Dazu wurde die Zelllinie WTK1 mit je 10 µg der Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP-*RARαbcr*.rev oder pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.rev, 10 µg pBS, sowie je 20 µg von der gegen CAD gerichteten, Plasmid-basierten shRNA pSuper-CAD (Gemisch aus pSuper-CAD.up, mi und do) oder dem Kontrollvektor pSuper elektroporiert. pSuper-CAD diente der direkten Hemmung der CAD-Proteinexpression über mRNA Interferenz. Je nach Behandlungsschema wurden die Zellen sofort nach Elektroporation in 50 µM zVAD-fmk (Pan-Caspase-Inhibitor)-haltiges Medium überführt. Nach einer Regenerationsphase von 4 h wurden die Zellen mit

10  $\mu$ M Aphidicolin behandelt und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Rekombinationsfrequenz mittels FACS-Analyse bestimmt.

Mittels Westernblot-Analyse wurde die Effizienz der CAD-Herabregulation für drei verschiedene, selbst generierte, CAD-shRNA exprimierende Vektoren pSuper-CAD.up, pSuper-CAD.mi und pSuper-CAD.do sowie deren Mischung (pSuper-CAD) untersucht. Die Detektion von CAD (40 kDa) erfolgte über das polyklonale Kaninchenserum Anti-CAD, 1/10000 (Millipore, Billerica, MA, USA). Mit allen drei pSuper-CAD-Vektoren wurde eine Reduktion der CAD-Expression um 39-75 % erreicht. Die Applikation einer Mischung aus den drei Vektoren führte zu einer Expressionsreduktion von 77 % für CAD (Abb. 30).

Im Gegensatz zur bisher verwendeten *SV40.fwd*-Kontrollsequenz wurde hier eine weitere Bruchpunktregion *RAR $\alpha$ bcr.rev* als Vergleichsgröße herangezogen. Für beide Bruchpunktregionen *RAR $\alpha$ bcr.rev* und *MLLbcr.rev* zeigte sich nach Aphidicolin-Behandlung ein Anstieg der Rekombination (Abb. 30, 1,3-fach für *RAR $\alpha$ bcr.rev*,  $P=0,01$  und *MLLbcr.rev*,  $P=0,0015$ ). Beide zeigten keine oder nur eine geringfügige Senkung der Reparatur-Stimulation nach zVAD-fmk-Behandlung (Abb. 30).

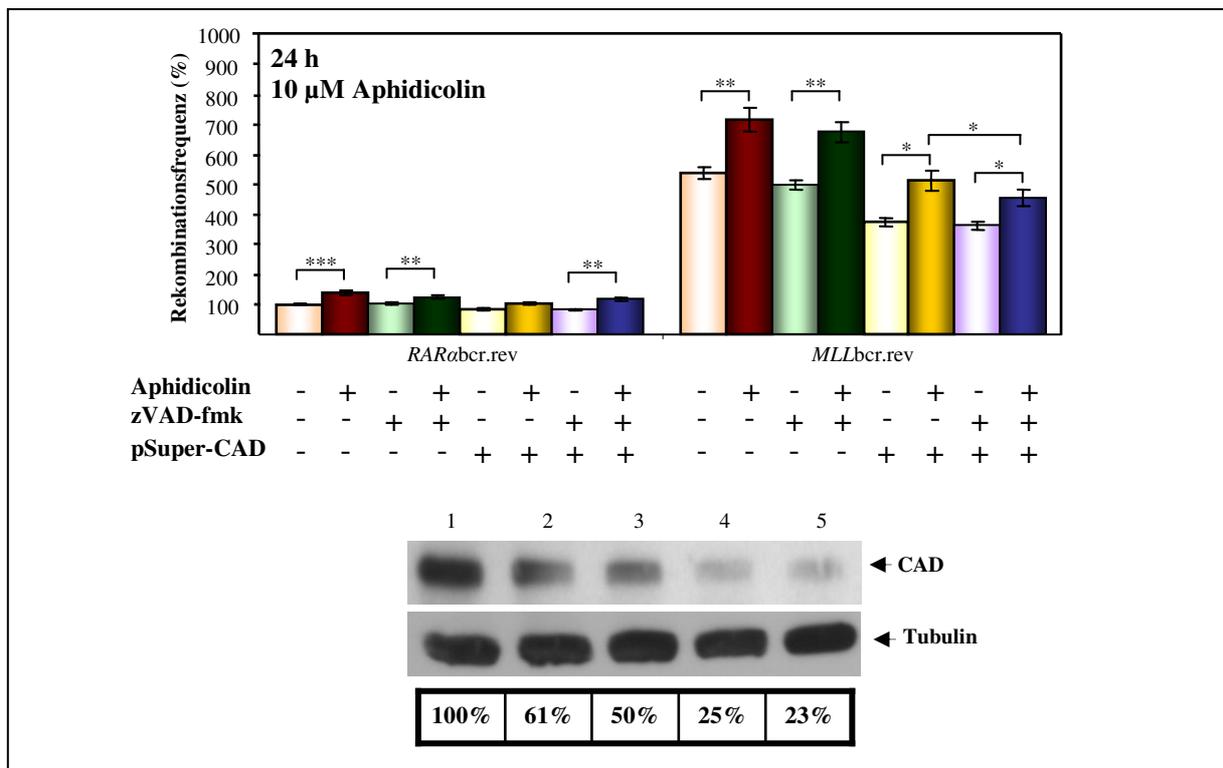
Die Inhibition von CAD führte beim Vergleich der Aphidicolin-behandelten und – unbehandelten Proben zu keiner Senkung der Rekombinationsstimulation für *RAR $\alpha$ bcr.rev* bzw. *MLLbcr.rev* (Abb. 30, 1,23-fach,  $P=0,052$  bzw. 1,37-fach,  $P=0,0122$  für *RAR $\alpha$ bcr.rev* bzw. *MLLbcr.rev*).

Es zeigte sich jedoch für beide Fragmente, *RAR $\alpha$ bcr.rev* bzw. *MLLbcr.rev*, eine signifikante Reduktion der Rekombination von 16 %,  $P=0,021$  bzw. 30 %,  $P=0,0068$  zwischen den CAD-profizient und CAD-defizienten Proben ohne Aphidicolin-Behandlung (Abb. 30, beige Balken vs. hellgelbe Balken) und von 25 %,  $P=0,0425$  bzw. 28 %,  $P=0,0161$  mit Aphidicolin-Behandlung (Abb. 30, je *cis*-Element Balken dunkelrot vs. gelb). Das bedeutet, dass die Nuklease CAD möglicherweise nach toxischen Stimuli wie der Elektroporation, die zur Einführung der Vektoren in die Zellen notwendig war, aktiviert wird, was zur Bruchinduktion und nachfolgenden Reparatur führt. Die Aktivierung von CAD konnte somit jedoch nicht spezifisch auf Aphidicolin zurückgeführt werden, da bereits die unbehandelten, elektroporierten Proben den Einfluss von CAD aufwiesen.

Interessanterweise senkte die zusätzliche Behandlung mit zVAD-fmk jedoch ausschließlich die Rekombination der Aphidicolin/pSuper-CAD-behandelten Zellen am *MLLbcr*-Fragment um weitere 11 %,  $P=0,0161$  (Abb. 30, für *MLLbcr.rev* Balken gelb vs. dunkelblau). Die Rekombinationsinhibition am *MLLbcr*-Fragment zwischen zVAD-fmk/pSuper-CAD/Aphidicolin-behandelten Zellen (Balken dunkelblau) im Vergleich zu ausschließlich mit

Aphidicolin-behandelten Zellen (Balken dunkelrot) beträgt 36 %,  $P=0,0024$  und ist somit im Vergleich zum *RARabcr*-Fragment mit 15 % ( $P=0,1294$ ) um mehr als das doppelte ausgeprägter. Dies impliziert einen synergistischen Effekt von Caspase- und CAD-Aktivierung auf die spezifische Bruchinduktion am *MLLbcr*-Fragment nach Aphidicolin-Behandlung.

Zusammengefasst führte die Inhibition von CAD zur Reduktion der Rekombination an den Bruchpunkt-Fragmenten *RARabcr* und *MLLbcr*. Diese Reduktion hängt zwar von toxischen Stimuli ab, ist jedoch nur im Zusammenhang mit Caspase-Hemmung spezifisch für Aphidicolin und *MLLbcr*.



**Abb. 30 Analyse der Rekombination an den bcr-Fragmenten *RARabcr.rev* und *MLLbcr.rev* im extrachromosomalen Kontext nach Inhibition der Caspase- und/oder CAD-Aktivität bei gleichzeitiger Behandlung mit und ohne Aphidicolin. Bestimmung der Expressionsinhibition von CAD für shRNA-exprimierende Vektoren.**

Das Diagramm zeigt die Rekombinationsfrequenz der Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-*RARabcr.rev* und pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev* 24 h nach Inkubation der mit den Rekombinationsvektoren und mit oder ohne pSuper-CAD transfizierten WTK1 Zellen ohne oder mit 10  $\mu$ M Aphidicolin sowie ohne oder mit dem Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk. Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet indem die Frequenz der Kontrollexperimente mit pHR-EGFP/3'EGFP-*RARabcr.rev* jeweils auf 100 % gesetzt wurde (Absolutwert: 0,22 %). Mittelwerte und Standardfehler von 9 Rekombinationsmessungen sind gezeigt. Signifikante Unterschiede wurden teils über Sterne angezeigt. Unter dem Diagramm sind die Westernblot-Analysen 24 h nach WTK1 Transfektion dargestellt, in denen die Inhibition der CAD-Expression (40 kDa) nachgewiesen wurde. Für die Immunoblot-Reaktionen wurde polyklonales Kaninchenserum Anti-CAD, 1/10000 (Millipore, Billerica, MA, USA) eingesetzt. Die Detektion der Ladekontrolle Tubulin erfolgte über einen monoklonalen Antikörper Maus-Anti-Tubulin, 1/5000 (Abcam, Cambridge, UK). Spur 1: pSuper-Kontrolle; Spur 2: pSuper-CAD.up; Spur 3: pSuper-CAD.mi; Spur 4: pSuper-CAD.do; Spur 5: alle drei pSuper-CAD-Vektoren

### 3.2.8.2 Einfluss von CAD auf die Stimulierung der Rekombination im chromosomalen Kontext

Um den Einfluss von CAD auf die Rekombination an *MLLbcr* in den stabilen WTK1-Klonen zu bestimmen, wurde die Aktivierung von CAD über ein vektoriiell exprimiertes mutantes ICAD inhibiert. Der dazu verwendete Vektor pLPCX-mICAD wurde von B.Yan zur Verfügung gestellt. ICAD wurde, über Punktmutationen an den zwei Caspase-Schnittstellen, D117E and D224E, derart modifiziert, dass eine Caspase-Spaltung von ICAD nicht mehr möglich war. Dies führte dazu, dass die Freisetzung von CAD und dessen nukleolytische Aktivität inhibiert wurde (Yan *et al.*, 2006).

Die stabilen Zelllinien WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*SV40.fwd*).9/1, WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd*).66/5 und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev*).17/8 wurden mit 10 µg pBS und 60 µg pLPCX-mICAD oder pLPCX-Leervektor elektroporiert. Nach einer Regenerationsphase von 4 h wurden die Zellen mit 5 µM Etoposid behandelt und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Rekombinationsfrequenz mittels FACS-Analyse bestimmt. Mittels Westernblot-Analyse wurde die Expression von mICAD (45 kDa) und der endogenen ICAD-Isoformen, ICAD-L (45 kDa) und ICAD-S (30 kDa), nachgewiesen. Die Detektion von mICAD (45 kDa) erfolgte über einen monoklonalen anti-HA-Tag-Antikörper aus der Ratte (Klon3F10) gegen ein an mICAD fusioniertes Epitop des Hämagglutinin (HA, 1/500, Roche, Penzberg). Die Detektion von endogenem ICAD und mICAD erfolgte über ein polyklonales Kaninchenserum FL-331, 1/400 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).

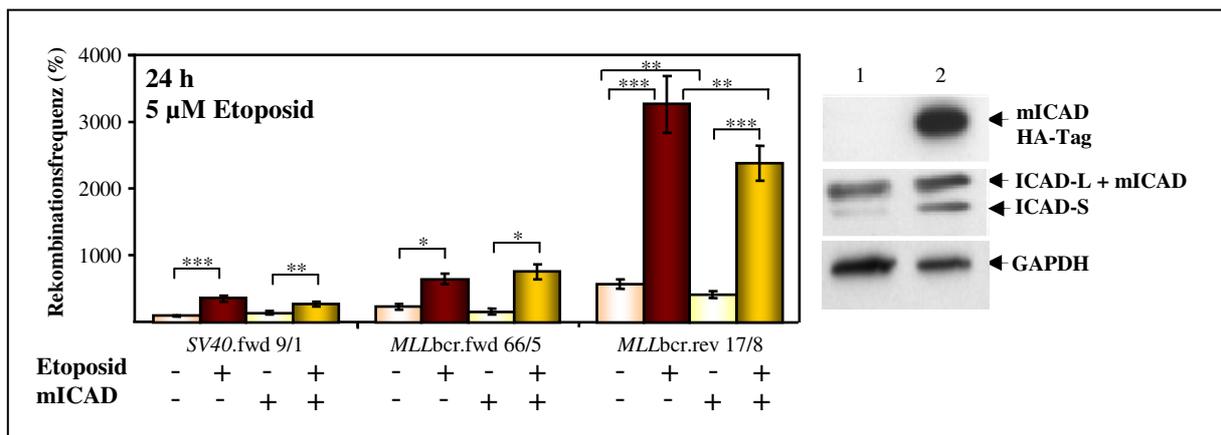
Alle drei Klone zeigten eine Stimulation der Rekombination nach Etoposid-Behandlung (Abb. 31, 3,6-fach,  $P < 0,0001$  für *SV40.fwd*.9/1, 2,8-fach,  $P = 0,0313$  für *MLLbcr.fwd*.66/5 und 5,7-fach,  $P < 0,0001$  für *MLLbcr.rev*.17/8), die vermutlich neben den spezifischen Effekten für das *MLLbcr*-Fragment auf DNA-Schädigungen durch die Elektroporation zurückzuführen ist.

Die Stimulierung der Rekombination blieb für *MLLbcr.rev*.17/8 nach mICAD-Expression gleich. Es zeigte sich jedoch eine Reduktion der Rekombination für die Etoposid-behandelten und unbehandelten *MLLbcr.rev*.17/8-Zellen von je 27 %,  $P = 0,0018-0,009$  nach mICAD-Expression.

Für die Kontrollzelllinie *SV40.fwd*.9/1 wurde eine nicht signifikante Reduktion der Rekombination von 22 %,  $P = 0,1285$  nach mICAD-Expression in Etoposid-behandelten Zellen bzw. keine Reduktion nach mICAD-Expression in Zellen ohne Etoposid-Behandlung detektiert. Mit der *MLLbcr.fwd*.66/5 Zelllinie konnte keinerlei Einfluss von mICAD detektiert werden.

Die Westernblot-Analyse (Abb. 31) zeigte die Expression von mICAD 24 h nach der Transfektion mit pLPCX-mICAD. Ebenso konnte die Expression der endogenen Isoformen ICAD-L und ICAD-S nachgewiesen werden.

Zusammengefasst kann in Abhängigkeit vom jeweiligen chromosomalen Locus ein aktivierender Einfluss von CAD auf die Rekombination bzw. Bruchinduktion am stabil integrierten *MLLbcr*-Fragment bestehen. Der Einfluss von CAD scheint im Zusammenhang mit der chromosomalen Umgebung spezifisch für das *MLLbcr*-Fragment zu sein. Dabei ist als toxischer Stimulus wahrscheinlich die Elektroporation ausreichend.



**Abb. 31 Analyse der Rekombination an den chromosomal integrierten DNA-*cis*-Elementen nach Inhibition der CAD-Aktivität durch Expression von mICAD bei gleichzeitiger Behandlung mit und ohne Etoposid.**

Das Diagramm zeigt die Rekombinationsfrequenz für HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd.9/1, HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd.66/5* und HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.rev.17/8* 24 h nach Inkubation der mit pLPCX oder pLPCX-mICAD transfizierten stabilen WTK1 Zellklone ohne oder mit 5 µM Etoposid. Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet indem die Frequenz der Kontrollexperimente mit HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd.9/1 jeweils auf 100 % gesetzt wurden (Absolutwert: 0,0056 %). Mittelwerte und Standardfehler von 6-21 Rekombinationsmessungen ist gezeigt. Die Signifikanzen wurden über Sterne angezeigt. Neben dem Diagramm sind die Westernblot-Analysen 24 h nach Transfektion dargestellt, in denen die Expression des mICAD (45 kDa) nachgewiesen wurde. Des Weiteren ist die Expression der endogenen Isoformen ICAD-L und ICAD-S gezeigt. Spur 1: 24 h nach Transfektion mit pLPCX; Spur 2: 24 h nach Transfektion mit pLPCX-mICAD. Für die Immunoblot-Reaktionen des HA-Tag wurde monoklonaler Antikörper Klon 3F10, 1/500 (Roche, Penzberg) eingesetzt. Die Detektion von endogenem und mutierten ICAD erfolgte über ein polyklonales Kaninchenserum FL-331, 1/400 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA). Die Detektion der Ladekontrolle GAPDH erfolgte über einen monoklonalen Antikörper Maus-Anti-GAPDH, FL-331, 1/2500 (Abcam, Cambridge, UK).

### 3.2.9 Einfluss von NFκB auf die Stimulierung der Rekombination

Die Erkenntnis, dass sowohl Bruch-induzierende Prozesse, wie Genotoxizität oder Apoptose, als auch Zellzyklusverschiebung eine Steigerung der Rekombination nach Chemotherapeutika-Behandlung auslösen können, führte zu der Frage ob über Chemotherapeutika weitere Signalwege aktiviert werden, die ebenfalls zur Stimulierung der Reparatur beitragen. Um also besser zu verstehen, welche Prozesse an einer fehlerhaften Religation von Brüchen beteiligt sind, versuchte ich neue Faktoren zu identifizieren, die bei der Aktivierung von Reparatur nach Chemotherapeutika-Behandlung eine Rolle spielen.

Verschiedener Erkenntnisse implizierten, dass der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) in die Chemotherapeutika-abhängige Reparaturstimulation involviert sein könnte. So wurde z.B. nachgewiesen, dass NF $\kappa$ B nach Behandlung von humanen T-Leukämiezellen (CEM) mit Etoposid und Camptothecin aktiviert wird (Wuerzberger-Davis *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde nach einer spezifische Aktivierung von NF $\kappa$ B eine Stimulierung der Rekombination in verschiedenen Zelltypen registriert (Meta Volčič, AG Wiesmüller, mündlich).

Im inaktiven Zustand befinden sich die NF $\kappa$ B-Untereinheiten hauptsächlich im Zytoplasma gebunden an die inhibitorischen Proteine der I $\kappa$ B (*inhibitor of NF $\kappa$ B*)- Familie, welche zum Teil die konservierte nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) der NF $\kappa$ B Untereinheiten maskieren (Hayden and Ghosh, 2004). Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  führt zu dessen Degradation über den Ubiquitin-Proteasom-Weg (Chen, 2005; Karin and Ben-Neriah, 2000) und zur folglich Freisetzung von NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B transloziert daraufhin in den Nukleus und reguliert dort die Expression multipler Zielgene, die in verschiedene physiologische und pathologische Prozesse wie Inflammation, Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Zellüberleben involviert sind (Hayden and Ghosh, 2004; Karin and Ben-Neriah, 2000).

Um zu untersuchen, ob die Behandlung der hier verwendeten Zelllinie WTK1 mit Etoposid und Camptothecin NF $\kappa$ B aktiviert und wenn ja, ob diese Aktivierung eine Rolle bei der Sequenz-unabhängigen Stimulierung der Rekombination an den untersuchten DNA-*cis*-Elementen spielt, wurde die Aktivierung von NF $\kappa$ B mithilfe des Superrepressors I $\kappa$ B $\alpha$ -DeltaN gehemmt. Diesem mutierten I $\kappa$ B $\alpha$  (mutI $\kappa$ B $\alpha$ ) fehlen die ersten 54 Aminosäuren, darunter die Lysine, die normalerweise ubiquitiniert werden und das Tyrosin 42, das nach Phosphorylierung die Dissoziation von NF $\kappa$ B einleitet. Das Expressionsprodukt mutI $\kappa$ B $\alpha$  kann demzufolge nicht mehr ubiquitiniert und somit nicht mehr abgebaut werden. Es bleibt an NF $\kappa$ B gebunden und verhindert dessen Freisetzung (Erlandsson *et al.*, 2002).

### **3.2.9.1 Einfluss von NF $\kappa$ B auf die Sequenz-unabhängige Stimulierung der Rekombination im extrachromosomalen Kontext**

Für die Untersuchung des Einflusses von NF $\kappa$ B auf die Rekombinationssteigerung im extrachromosomalen Kontext wurde die Zelllinie WTK1 mit je 10  $\mu$ g der Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd oder pHR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd, 10  $\mu$ g pBS, sowie je 40  $\mu$ g von dem den Superrepressor mutI $\kappa$ B $\alpha$  exprimierenden Vektor pcDNA3-mutI $\kappa$ B $\alpha$  (zur Verfügung gestellt von Dr. B. Baumann, Ulm) gehemmt oder pcDNA3 elektroporiert. Nach einer Regenerationsphase von 4 h wurden

die Zellen mit 50  $\mu$ M Etoposid oder 300 nM Camptothecin behandelt und für 24-48 h inkubiert. Anschließend wurde die Rekombinationsfrequenz mittels FACS-Analyse bestimmt. Zusätzlich wurden für die Zellen unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion bestimmt.

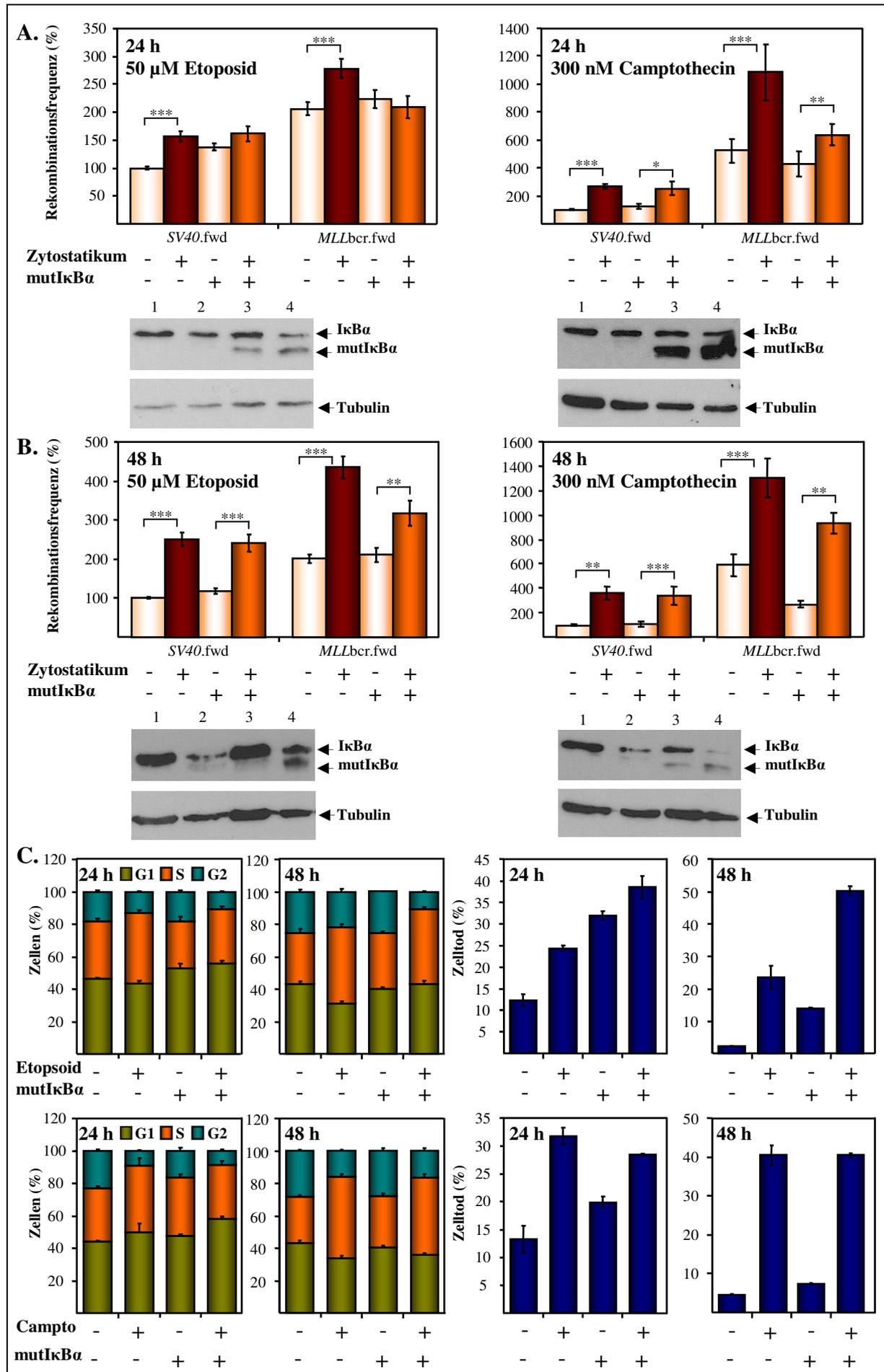
Mittels Westernblot-Analyse wurde die Expression von nativem I $\kappa$ B $\alpha$  (35-37 kDa) und mutI $\kappa$ B $\alpha$  (ca. 30 kDa) überprüft sowie der durch die Chemotherapeutika eingeleitete Abbau von nativem I $\kappa$ B $\alpha$  analysiert. Hierzu wurde das polyklonale Kaninchenserum C-21, 1/1000 verwendet (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).

Wie bereits gezeigt (Abschnitt 3.2.5.2) ergab sich nach Etoposid oder Camptothecin-Behandlung sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine Sequenz-unabhängige Stimulierung der Rekombination an *SV40.fwd* oder *MLLbcr.fwd*.

Nach Inhibition der NF $\kappa$ B-Aktivität zeigte sich eine Sequenz-unabhängige Abnahme dieses Rekombinationsanstiegs nach 24 h und 48 h sowohl für Etoposid als auch für Camptothecin (Abb. 32 A. und B.). Diese Abnahme der Rekombinationsstimulierung war bei frühen Messwerten noch 24 h besonders deutlich (Abb. 32 A.). Die signifikante 1,6- bzw. 1,3-fache ( $P < 0,0001$ ) Stimulierung für *SV40.fwd* bzw. *MLLbcr.fwd* 24 h nach Etoposid-Behandlung ging nach Inhibition von NF $\kappa$ B komplett verloren (Abb. 32 A. links). Für Camptothecin sank die 2,7- bzw. 2-fache ( $P = 0,0005$ ) Steigerung auf das 2- bzw. 1,5-fache ( $P = 0,0161/0,0049$ ) für *SV40.fwd* bzw. *MLLbcr.fwd* (Abb. 32 A. rechts).

Nach 48 h Inkubationszeit mit Etoposid war für pHR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr.fwd* noch eine Verminderung der Rekombinationsstimulierung zu detektieren (Abb. 32 B. links, von 2,2-fach,  $P < 0,0001$  auf 1,5-fach,  $P = 0,0036$ ). Zu diesem späteren Messzeitpunkt war jedoch bereits zu erkennen, dass andere Rekombinationssteigernde Effekte den Einfluss von NF $\kappa$ B überlagerten (Abb. 32 B.). Aufgrund der vorangegangenen Beobachtungen könnte ein solcher Effekt ein sich über die Inkubationszeit stärker manifestierender Zellzyklusarrest sein. So befanden sich nach 24 h Etoposid- bzw. Camptothecin-Behandlung 43 % bzw. 41 % der Zellen in der S-Phase, nach 48 h bereits 47 % bzw. 50 % (Abb. 32 C. links). Nach Chemotherapeutika-Behandlung und NF $\kappa$ B-Inhibition war eine Akkumulation der Zellen in der S-Phase erst nach 48 h detektierbar (Abb. 32 C. links, Anstieg der S-Phase von 33 % nach 24 h auf 46 % nach 48 h für Etoposid und von 33 % nach 24 h auf 48 % nach 48 h für Camptothecin).

Weiter zeigte sich eine Erhöhung des Anteils toter Zellen nach Chemotherapeutika-Behandlung (Abb. 32 C. rechts, 2- bzw. 10-fach für 24 h bzw. 48 h Etoposid, 2,4- bzw. 8,9-fach für 24 h bzw. 48 h Camptothecin).



**Abb. 32 Inhibition von NFκB bei gleichzeitiger Behandlung mit Etoposid oder Camptothecin. Rekombinationsanalyse im extrachromosomalen Kontext. Zellzyklus- und Zelltod- sowie Westernblot-Analyse von IκBα und mutIκBα.**

Die Diagramme in (A.) zeigen die Rekombinationsfrequenz mit den Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd und pHR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd 24 h nach Inkubation der mit den Rekombinationsvektoren und mit pcDNA3 oder pcDNA3-mutIκBα transfizierten WTK1 Zellen ohne oder mit 50 μM Etoposid (links) oder 300 nM Camptothecin (rechts). pcDNA3-mutIκBα kodiert dabei für einen Repressor von NFκB, der dessen Freisetzung verhindert. Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet, indem die Frequenz der Kontrollexperimente mit pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd jeweils auf 100 % gesetzt wurden (Absolutwerte: 0,43 % linkes Diagramm, 0,42 % rechtes Diagramm). Mittelwerte und Standardfehler von 15-27 Rekombinationsmessungen sind gezeigt. Unter den Diagrammen sind die zugehörigen Westernblot-Analysen dargestellt, in denen die Expression von IκBα (35-37 kDa) und mutIκBα (ca. 30 kDa) nachgewiesen wurde. Für die Immunoblot-Reaktionen wurde polyklonales Kaninchenserum C-21, 1/1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) eingesetzt. Die Detektion der Ladekontrolle Tubulin erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper Maus-Anti-Tubulin, 1/5000 (Abcam, Cambridge, UK). Gezeigt sind die Westernblots von den WTK1 Zellen, die stets mit pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd transfiziert wurden. Spur 1: pcDNA3 transfiziert, ohne Chemotherapeutika; Spur 2: pcDNA3 transfiziert, mit Chemotherapeutika; Spur 3: pcDNA3-mutIκBα transfiziert, ohne Chemotherapeutika; Spur 4: pcDNA3-mutIκBα transfiziert, mit Chemotherapeutika. (B.) zeigt die gleichen Analysen wie unter A. für 48 h. In (C.) sind die korrespondierenden Zellzyklus- (linke Hälfte) und Zelltoddaten (rechte Hälfte) dargestellt. Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden die WTK1 Zellen ebenso wie für die Rekombinationsanalyse behandelt, die Rekombinationsvektoren jedoch durch pBS ersetzt. Die Zellen wurden fixiert und PI-gefärbt. Per FACS-Analyse wurden anschließend Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion bestimmt. Für die Zellzyklus- und Zelltodanalyse ist jeweils der Mittelwert und Standardfehler von 4 Messungen gezeigt.

Allein durch die Hemmung von NFκB stieg der Anteil toter Zellen an (Abb. 32 C. rechts, ohne Etoposid, 24h/48h: 2,5-fach/6-fach; ohne Camptothecin, 24h/48h: 1,5-fach/1,6-fach). Auch nach der Behandlung mit Chemotherapeutika blieb diese zusätzliche Steigerung des Anteils toter Zellen nach NFκB-Inhibition zumindest für Etoposid weiterhin erkennbar (Abb. 32 C. rechts oben, für Etoposid, 24h/48h: 1,6-fach/2,1-fach). Beides ist ein Indiz für die anti-apoptotische Wirkungsweise von NFκB in WTK1.

Die Westernblot-Analysen für IκBα verifizierten die Expression von mutIκBα. Des Weiteren zeigten die Blots eine Abnahme des endogenem IκBαs nach Chemotherapeutika-Behandlung was auf die Degradation nach Phosphorylierung zurückzuführen ist und normalerweise (ohne mut IκBα) Freisetzung und Aktivierung von NFκB zur Folge hat (Abb. 32 A. und B, unterhalb der Diagramme, Spur 1 vs. 2 und 3 vs. 4). Während für Etoposid die Abnahme von endogenem IκBα bereits nach 24 h detektierbar war, konnte sie für Camptothecin erst nach 48 h eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 32 A. und B, rechts, unterhalb der Diagramme). Im Vergleich zu Etoposid- verursachte Camptothecin-Behandlung demzufolge eine andere Kinetik der IκBα-Degradation. Trotzdem waren die Auswirkungen von Camptothecin-vermittelter NFκB-Aktivierung auf die Rekombination bereits nach 24 h zu sehen (Abb. 32 A. rechts).

In den Extrakten aus Zellen ohne Etoposid-Behandlung wurde nach 48 h in allen Westernblot-Experimenten mutIκBα nicht mehr detektiert, was entweder auf Abbau dieses Proteins, Verlust der Expression oder Eliminierung der IκBα-positiven Zellen zurückgeführt

werden könnte (Abb. 32 B. links, Spur 3). Diese Beobachtung erklärt die Rekombinationsdaten, da hier die Wirkung von *mutIkB $\alpha$*  nach 48 h nachzulassen beginnt. Zusammengefasst weisen die Daten nach, dass der NF $\kappa$ B-Signalweg durch Behandlung der WTK1 Zellen mit Etoposid und Camptothecin aktiviert wird, was zu einer Sequenz-unabhängigen Steigerung der Rekombination im extrachromosomalen Kontext beiträgt. Bestimmte Chemotherapeutika verursachen folglich Apoptose-Induktion und steigern auch die DSB-Reparatur über NF $\kappa$ B-Aktivierung. Würde es demzufolge zu einem Abbruch des Apoptose-Programms in der frühen Phase kommen, könnte dieser Reparatur-steigernde Mechanismus zur Religation von frühapoptotischen Brüchen beitragen.

### 3.2.9.2 Einfluss von NF $\kappa$ B auf die Rekombination im chromosomalen Kontext

Nachdem gezeigt werden konnte, dass NF $\kappa$ B zu einer generellen, also Sequenz-unabhängigen Steigerung der Rekombination im extrachromosomalen Kontext führt, wurde getestet welche Wirkung NF $\kappa$ B auf die Rekombination an DNA-*cis*-Elementen in den stabilen WTK1-Klone hat.

Dazu wurden die Klone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd).9/1 und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLLbcr*.rev).17/8 mit 40  $\mu$ g pcDNA3 oder pcDNA3-*mutIkB $\alpha$*  und 10  $\mu$ g pBS elektroporiert. Nach einer Regenerationsphase von 4 h wurden sie für 24 h mit oder ohne 5  $\mu$ M Etoposid oder 300 nM Camptothecin inkubiert und die Rekombination mittels FACS-Analyse bestimmt.

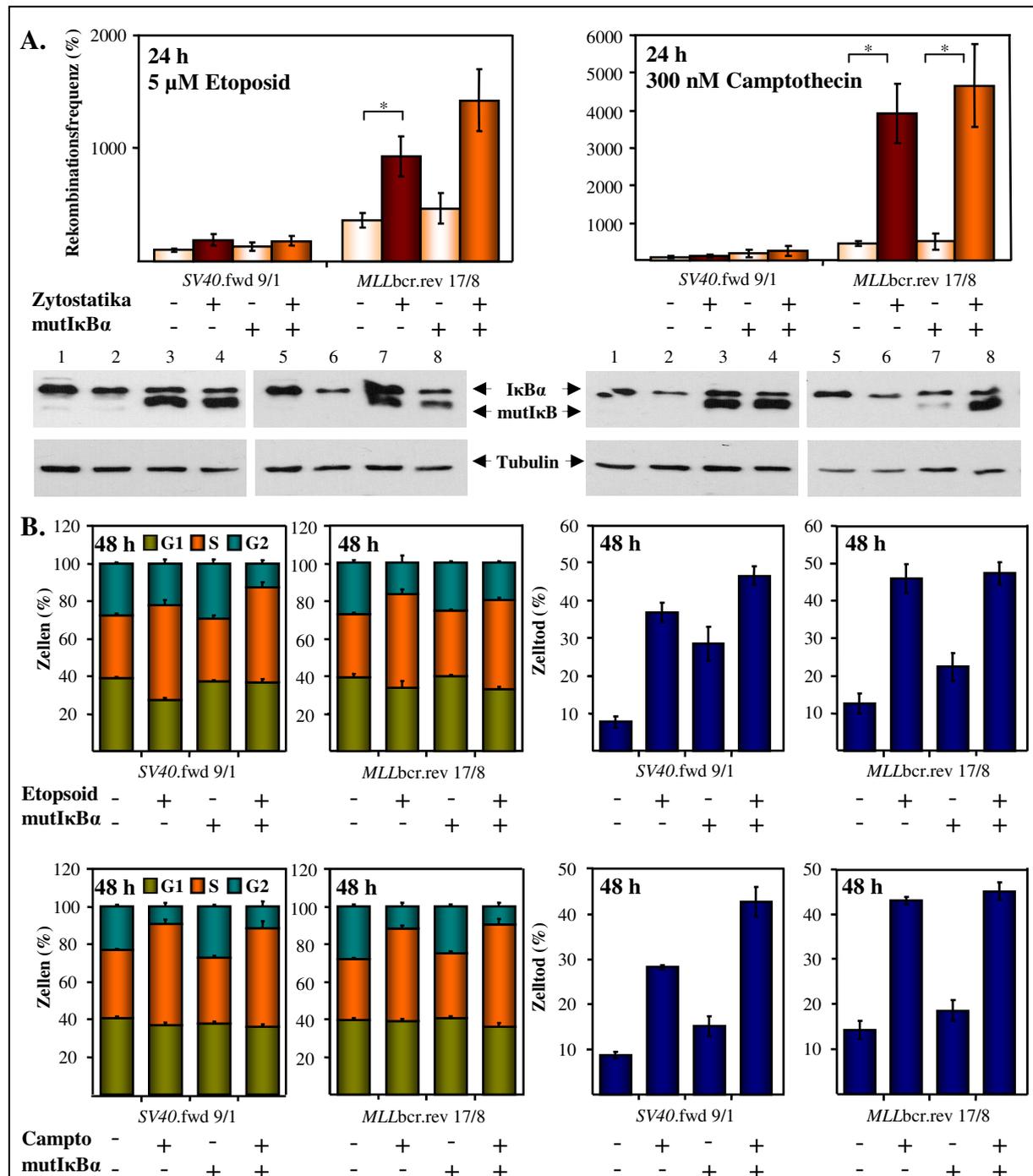
Des Weiteren wurde Zellzyklus und Zelltod sowie per Westernblot *IkB $\alpha$*  analysiert.

In Abb. 33 A. konnte wie bereits gezeigt (Abschnitt 3.2.5.5 und 3.2.5.6) für Etoposid und Camptothecin nach 24 h eine spezifische Stimulierung der Rekombination am chromosomal integrierten *MLLbcr*-Fragment detektiert werden. Interessanterweise zeigte sich weder für Etoposid noch für Camptothecin eine Unterdrückung der Rekombinationsstimulierung nach Inhibition von NF $\kappa$ B durch *mutIkB $\alpha$*  im *MLLbcr*-Klon 17/8 (Abb. 33 A., 2,6 bzw. 3-fache,  $P=0,0313/0,1169$  Rekombinationssteigerung für Etoposid ohne bzw. mit *mutIkB $\alpha$* , 8,6- bzw. 9-fache,  $P=0,0313$  Rekombinationssteigerung für Camptothecin ohne bzw. mit *mutIkB $\alpha$* ).

Durch Westernblot-Analysen konnte *IkB $\alpha$* -Abnahme nach Chemotherapeutika-Behandlung festgestellt werden (Abb. 33 A., Spur 1/5 vs. 2/6). Dies bestätigt die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs durch Etoposid und Camptothecin, welcher wiederum durch die *mutIkB $\alpha$* -Expression gehemmt wurde (Abb. 33 A., Spur 3, 4, 7 und 8).

Die Zellzyklus- und Zelltodanalysen zeigten analog zu den Ergebnissen nach transienter Transfektion mit DNA-*cis*-Elementen die Induktion eines S-Phasearrests (Abb. 33 B. links, 1,5-fache Steigerung der S-Phase für Etoposid und Camptothecin in allen Klonen nach 48 h)

sowie die Einleitung des Zelltods durch Etoposid und Camptothecin (Abb. 33 B. rechts, für Etoposid, Klon 9/1/Klon 17/8: 4,8-/3,6-fach; für Camptothecin, Klon 9/1/Klon 17/8: 3,2-/3-fach).



**Abb. 33 Inhibition von NFκB bei gleichzeitiger Behandlung mit Etoposid oder Camptothecin. Rekombinationsanalyse im chromosomalen Kontext. Zellzyklus- und Zelltod- sowie Westernblot-Analyse von IκBa und mutIκBa.**

Die Diagramme in (A.) zeigen die Rekombinationsfrequenz für die Rekombinationskonstrukte HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd und HR-EGFP/3'EGFP-MLLbcr.rev 24 h nach Inkubation der mit pcDNA3 oder pcDNA3-mutIκBa transfizierten WTK1 Klone ohne oder mit 5 µM Etoposid (links) oder 300 nM Camptothecin (rechts). Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet indem die Frequenz der Kontrolleexperimente WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd).9/1 jeweils auf 100 % gesetzt wurden (Absolutwerte: 0,0057% linkes Diagramm, 0,0048% rechtes Diagramm). Mittelwerte und Standardfehler von 15-27 Rekombinationsmessungen sind gezeigt. Unter den Diagrammen sind die zugehörigen Westernblot-Analysen dargestellt in denen die

Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  und mutI $\kappa$ B $\alpha$  nachgewiesen wurde. Für die Immunoblot-Reaktionen wurde polyklonales Kaninchenserum C-21, 1/1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) eingesetzt. Die Detektion der Ladekontrolle Tubulin erfolgte über einen monoklonalen Antikörper Maus-Anti-Tubulin, 1/5000 (Abcam, Cambridge, UK). Gezeigt sind in Spur 1-4 jeweils die Western von WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd).9/1 und in Spur 5-8 die von WTK1(HR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.rev).17/8 nach 24 h. Spur 1/5: pcDNA3 transfiziert, ohne Chemotherapeutika; Spur 2/6: pcDNA3 transfiziert, mit Chemotherapeutika; Spur 3/7: pcDNA3-mutI $\kappa$ B $\alpha$  transfiziert, ohne Chemotherapeutika; Spur 4/8: pcDNA3-mutI $\kappa$ B $\alpha$  transfiziert, mit Chemotherapeutika. In (B.) sind die korrespondierenden Zellzyklus- (linke Hälfte) und Zelltodaten (rechte Hälfte) dargestellt. Zur Bestimmung des Zellzyklus wurden die WTK1 Zellklone ebenso wie zur Rekombinationsanalyse behandelt. Die Zellen wurden fixiert und PI-gefärbt. Per FACS-Analyse wurde anschließend Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion bestimmt. Für die Zellzyklus- und Zelltodanalyse ist jeweils der Mittelwert und Standardfehler von 4 Messungen gezeigt.

### 3.3 Der Einfluss von p53, PARP-1 und Topo I auf die Rekombination an Topo I-Erkennungsstellen tragenden DNA-Sequenzen

Der Genomstabilitäts-Überwachungsfaktor p53 steht in Zusammenhang mit DNA-Sequenz-unabhängiger Herunterregulation der HR (Bertrand *et al.*, 2004; Boehden *et al.*, 2004; Gatz and Wiesmuller, 2006; Sengupta and Harris, 2005). Im Gegensatz dazu konnte für ein *RARabcr*-DNA-Fragment, welches zwei Topo I-Erkennungssequenzen trägt, eine stimulatorische Rekombinationsaktivität von p53 detektiert werden (Boehden *et al.*, 2004). p53 wurde mit dem regulatorischen Protein PARP-1 in Verbindung gebracht. Doch gibt es Kontroversen über die Details der funktionellen Verknüpfungen zwischen PARP-1 und p53 (Agarwal *et al.*, 2006; Mendoza-Alvarez and Alvarez-Gonzalez, 2001; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2001; Valenzuela *et al.*, 2002; Vaziri *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Wesierska-Gadek *et al.*, 1999; Wieler *et al.*, 2003) sowie über die mögliche Rolle von PARP-1 in der HDR (Schultz *et al.*, 2003; Susse *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004).

Um diese Implikationen in Bezug auf die positiven oder negativen regulatorischen Effekte von p53 näher zu untersuchen, wurde von G. Boehden innerhalb unseres Labors das SV40-basierte Rekombinations-Testsystem modifiziert und appliziert (Boehden *et al.*, 2004).

Dieses System basiert auf der Quantifizierung von viralen Partikeln nach rekonstituierender Rekombination zwischen zwei SV40 Minichromosomen mit unterschiedlich mutierten *VP1* (*viral protein*)-Genen, die Temperatursensitivität vermitteln. Die Viruspartikel wurden bei einer permissiven Temperatur von 32 °C hergestellt und die DNA Rekombination nach Koinfektion der Zielzellen mit zwei SV40-ts(*temperature sensitive*) VP1 Mutanten bei einer nicht-permissiven Temperatur von 39 °C detektiert. Um Rekombinationsfrequenzen zu quantifizieren, wurde die Virusfreisetzung Plaquebildung in Relation zu Kontrollinfektionen mit den gleichen infektiösen Einheiten an SV40-wt Viren gesetzt (Boehden *et al.*, 2004).

Um DNA-*cis*-Elemente, wie das *RARabcr*-Fragment mit dem SV40-basierten

Rekombinations-Testsystem analysieren zu können, wurden die Genome der Virenstämme verkleinert und die gewünschten Sequenzen integriert. Die Ergebnisse mit dem modifizierten SV40-Rekombinations-Testsystem zeigten im Unterschied zu anderen DNA-*cis*-Elementen ohne Topo I-Erkennungssequenzen eine Stimulierung der Rekombination an der *RARα*bcr in Abhängigkeit von p53 (Boehden *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte über dieses System gezeigt werden, dass PARP-1 der p53-vermittelten Rekombinationsstimulation zwischen SV40 Minichromosomen mit der *RARα*bcr-Subregion entgegenwirkt (Baumann *et al.*, 2006). Um den Einfluss von p53 und PARP1 auf das *RARα*bcr-Fragment weitergehend zu analysieren und mögliche SV40-spezifische Effekte auszuschließen, wurde in meinen Untersuchungen das modifizierte Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem appliziert.

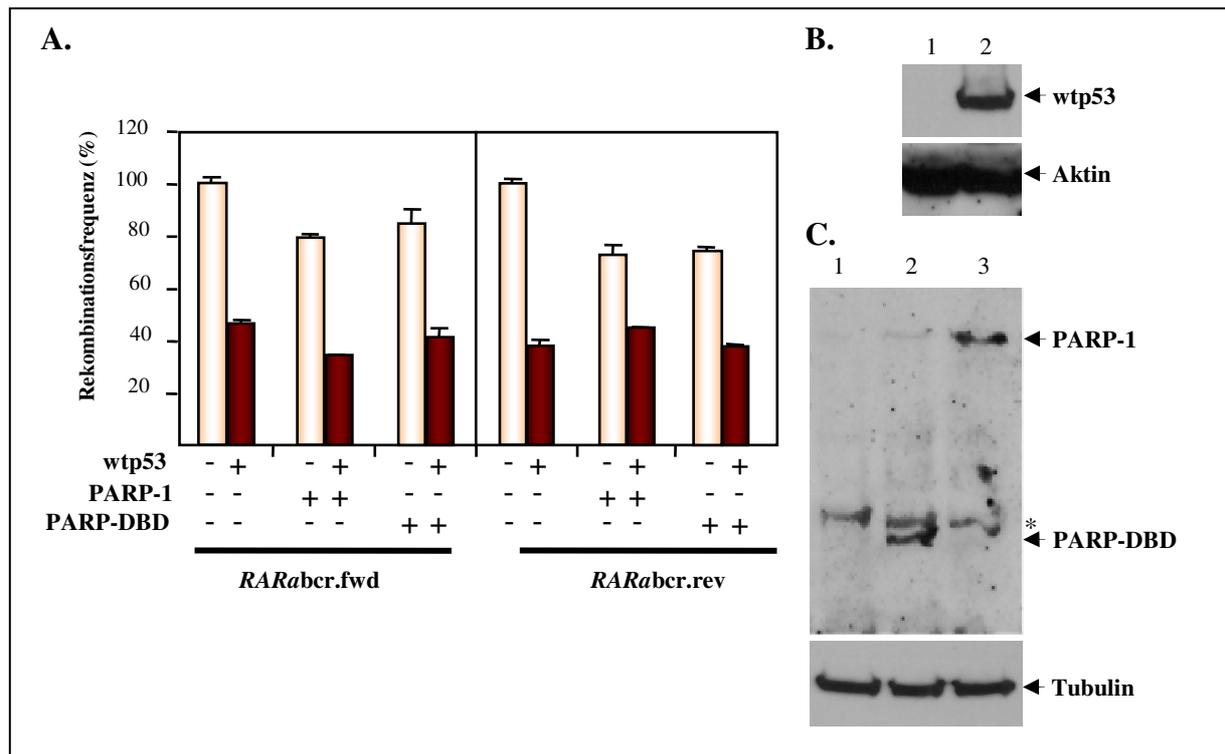
### **3.3.1 p53 und PARP-1 inhibieren die Rekombination am extrachromosomalen *RARα*bcr-Fragment im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem**

Für die Analyse der Rekombination am *RARα*bcr-Fragment im Zusammenhang mit p53 und PARP1 wurde die Zelllinie KMV5 eingesetzt. Sie entstammt der parentalen Linie K562, in welcher *p53* homozygot deletiert ist (Akyüz *et al.*, 2002). KMV5 wurde mit den unter Abschnitt 3.1.1.2 beschriebenen Rekombinations-Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-*RARα*bcr.fwd oder pHR-EGFP/3'EGFP-*RARα*bcr.rev und parallel dazu mit dem Leervektor pBS oder pCMV-p53 lipofiziert, wobei pCMV-p53 ein Expressionsvektor für wt-p53 ist (Abb. 34 B.; Akyüz *et al.*, 2002.). Die Reparaturereignisse wurden nach 48 h Inkubationszeit per FACS-Analyse quantifiziert.

Im Unterschied zur Analyse von *RARα*bcr im SV40-basierten Rekombinations-Testsystem, in welchem durch G. Boehden an der *RARα*bcr-Region eine p53-abhängige Rekombinationsstimulierung detektiert wurde, war im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem die Reparatur in den ektopisch p53 exprimierenden KMV5 Zellen um 54 % gesenkt (Abb. 34 A.). Da G. Boehden des Weiteren zeigen konnte, dass PARP1 dieser Stimulierung entgegen wirkt (Baumann *et al.*, 2006), habe ich die Rolle von PARP-1 im Zusammenhang mit der Rekombination an pHR-EGFP/3'EGFP-*RARα*bcr.fwd oder pHR-EGFP/3'EGFP-*RARα*bcr.rev im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem untersucht.

Um die enzymatische PARP-1 Funktion von der DNA-Bindeaktivität zu separieren, wurden die Expressionsvektoren pPARP31 zur Expression des volle Länge PARP-1 (116 kDa) Proteins und pPARP6 zur Expression der DNA-Bindedomäne von PARP-1 (PARP-DBD,

36 kDa) eingesetzt. Die PARP-DBD besitzt keine enzymatische Aktivität und verursacht sogar eine *trans*-dominante Inhibition der Poly(ADP-ribosyl)ierung durch endogene PARP-1 (Küpper *et al.*, 1990; Küpper *et al.*, 1995). KMV5 wurde folglich nicht nur mit einem der Rekombinationsvektoren zusammen mit oder ohne pCMV-p53 transfiziert sondern auch zusätzlich mit den Vektoren pPARP31 oder pPARP6. In Abwesenheit von p53 wurde nach PARP-1 oder PARP-DBD-Expression (Abb. 34 C.) eine Reduktion der Rekombination für pHR-EGFP/3'EGFP-*RARabcr.fwd* von 21 % ( $P < 0,0001$ ) bzw. 16 % ( $P = 0,030$ ) detektiert, welche ähnlich der Reduktion von 27 % ( $P < 0,0001$ ) und 26 % ( $P < 0,0001$ ) an pHR-EGFP/3'EGFP-*RARabcr.rev* war (Abb. 34 A). In Anwesenheit von p53 verursachte die Expression von PARP-1 und PARP-DBD keine signifikanten Veränderungen der Rekombinationsfrequenz bei dem hier gewählten Protein/DNA-Substrat Verhältnis (Abb. 34 A.). Zusammengefasst wirken p53 und PARP-1 ebenso wie die PARP-DBD rekombinationssenkend auf das *RARabcr*-Fragment in transienten Experimenten mit dem Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystems.



**Abb. 34 Einfluss von p53-, PARP-1- und PARP-DBD-Expression auf die Rekombination an den Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP-*RARabcr.fwd* oder pHR-EGFP/3'EGFP-*RARabcr.rev***

In (A.) ist die Rekombination nach p53-, PARP-1- oder PARP-DBD- Expression graphisch dargestellt. KMV5 Zellen wurden mit den Vektoren pBS oder pCMV-p53 zusammen mit pBS, pPARP31 oder pPARP6 lipofiziert, für die Expression von wt-p53, PARP-1 bzw. PARP-DBD. Zur Bestimmung der Rekombinationsfrequenz wurde pHR-EGFP/3'EGFP-*RARabcr.fwd* oder pHR-EGFP/3'EGFP-*RARabcr.rev* mit diesen Expressionsvektoren kotransfiziert. Nach der Lipofektion wurden die Zellen für 48 h kultiviert. Die Rekombinationsfrequenz wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Die relative Rekombinationsfrequenz wurde errechnet, indem die Frequenz der Kontrollexperimente mit pHR-EGFP/3'EGFP-*RARabcr.fwd* oder pHR-EGFP/3'EGFP-*RARabcr.rev* als 100 % definiert wurden (Absolutwerte:  $4,3 \times 10^2$  % für *RARabcr.fwd*,  $4,3 \times 10^2$  % für *RARabcr.rev*). Mittelwerte und Standardfehler von 6-9 Rekombinationsmessungen sind gezeigt. (B.) zeigt die Proteinexpression von p53 in

den mit pHR-EGFP/3'EGFP-*RAR*abc<sub>r</sub>.rev und pBS (Kontrolle, Spur 1) oder pCMV-p53 (Spur 2) lipofizierten p53-negativen KMV5 Zellen nach 48 h. Für die Immunoblot-Reaktionen wurde der Antikörper DO1 1/10000 (BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA) eingesetzt. Die Detektion der Ladekontrolle Aktin erfolgte über das polyklonale Ziegenserum I-19, 1/1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). In (C.) ist die Proteinexpression von PARP-1 (116 kDa) beziehungsweise PARP-DBD (38 kDa) in den mit pHR-EGFP/3'EGFP-*RAR*abc<sub>r</sub>.rev und pBS (Kontrolle, Spur 1) oder pPARP6 (*PARP-DBD*, Spur 2) oder pPARP31 (*PARP-1*, Spur 3) lipofizierten KMV5 nach 48 h dargestellt. Für die Immunoblot-Reaktionen wurde polyklonales Ziegenserum N-20 1/500 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) eingesetzt. Die Detektion der Ladekontrolle Tubulin erfolgte über einen monoklonalen Antikörper Maus-Anti-Tubulin, 1/5000 (Abcam, Cambridge, UK). Der Stern markiert eine Bande, die unabhängig von der Inklusion der Expressionsvektoren mit dem N-20 Serum detektiert wurde.

### **3.3.2 p53 stimuliert die Rekombination an zellulären Chromosomen via Topo I während PARP-1 diesem stimulatorischen Effekt entgegenwirkt.**

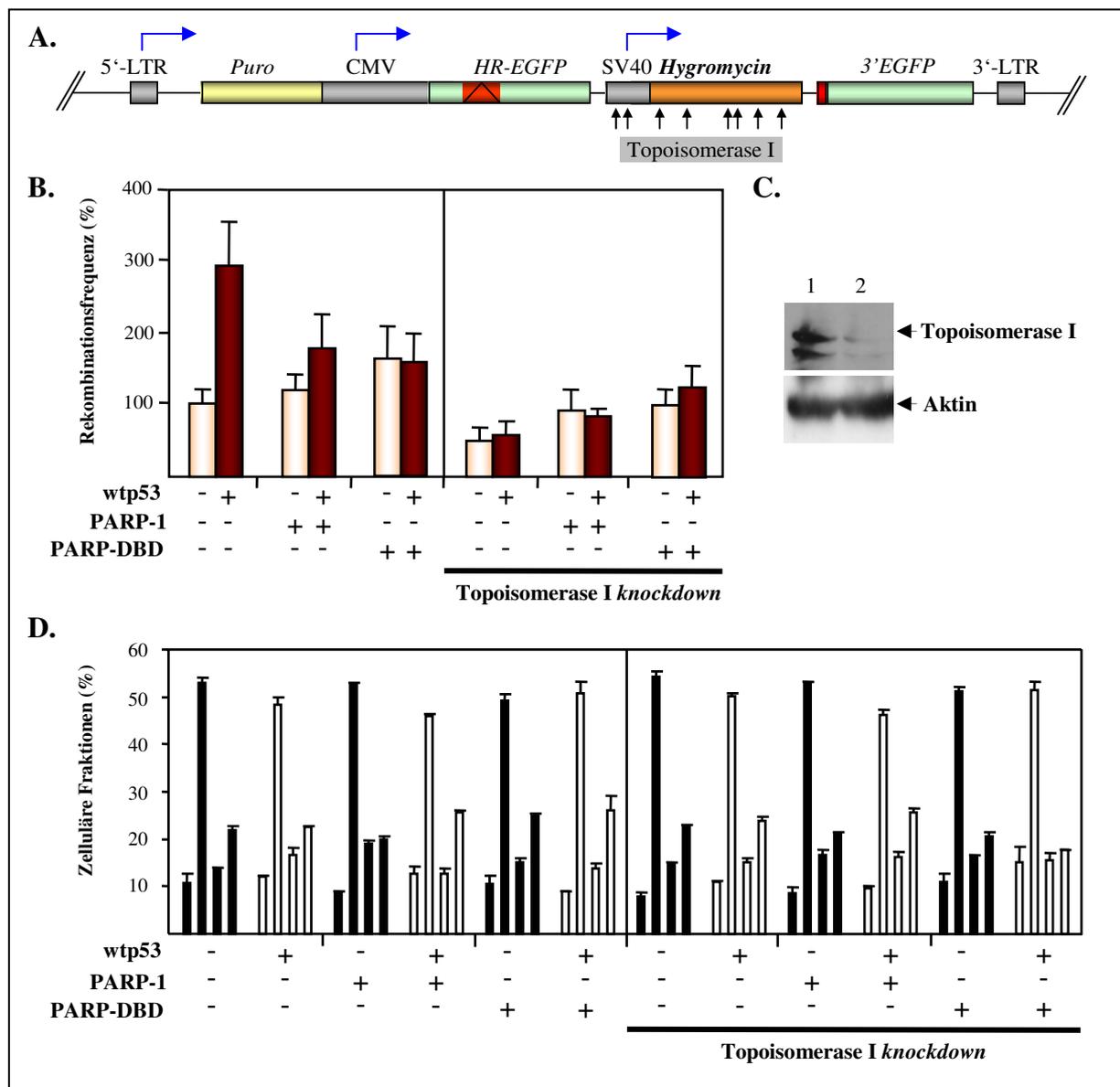
Bisher wurde die Stimulierung der Rekombination durch p53 nur in den SV40-Minichromosomen beobachtet (Boehden *et al.*, 2004). Um aufzuklären, ob chromosomale Eigenschaften für diesen Effekt entscheidend sind, wurde die gut charakterisierte p53-defiziente KMV5 Zelllinie mit stabil integriertem HR-EGFP/3'EGFP Rekombinationssubstrat im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem eingesetzt (Akyüz *et al.*, 2002). Innerhalb des HR-EGFP/3'EGFP Substrats flankieren die mutierten *EGFP*-Gene eine interstitielle Region von 1.7 kb bestehend aus einem SV40-Promotor und einer Hygromycin Resistenz-Kassette (Abb. 35 A.). Diese Kassette trägt acht spezifische Topo I-Erkennungsstellen (Jaxel *et al.*, 1988; Tsui *et al.*, 1989). KMV5(HR-EGFP/3'EGFP) wurde mit pBS oder pCMV-p53 und zusätzlich mit pSuper-Topo I oder mit dem pSuper-Kontrollvektor elektroporiert. Der Vektor pSuper-Topo I wurde von mir kloniert und hier eingesetzt um die Synthese einer shRNA zur selektiven Hemmung der Topo I-Genexpression über RNA Interferenz zu erreichen (Abb. 35 C.).

Die p53-Expression resultierte in einer 2,9-fachen Stimulierung der spontanen Rekombination (Abb. 35 B.,  $P=0,011$ ). Die Hemmung der Expression von endogenem Topo I in Zellen ohne p53 führte zu einer Reduktion der Rekombinationsfrequenz um 51 % (nicht signifikant;  $P=0,087$ ). Durch die Hemmung der Topo I-Expression wurde jedoch die durch p53 verursachte Rekombinationsstimulierung vollständig unterdrückt (Abb. 35 B., 5,1-fach,  $P=0,002$ ).

Des Weiteren wurden KMV5(HR-EGFP/3'EGFP) Zellen zusätzlich mit den Vektoren pPARP31 und pPARP6, durch die PARP-1 bzw. PARP-DBD exprimiert werden konnte, transfiziert. In Abwesenheit von p53 alterierte weder PARP-1 noch PARP-DBD die Rekombinationsfrequenz signifikant (Abb. 35 B.). An den Einfluss von PARP-1 auf die Rekombination zwischen *RAR*abc<sub>r</sub>-tragenden SV40-Genomen erinnernd (Baumann *et al.*,

2006) wurde nach Kotransfektion mit pPARP31 oder pPARP6 detektiert keine signifikante p53-vermittelte Stimulierung der Rekombination am chromosomal integrierten HR-EGFP/3'EGFP Substrat.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch in Kotransfektionsexperimenten mit pSuper-Topo I gemacht (Abb. 35 B.). Die FACS-Analyse PI-gefärbter Zellen stellte sicher, dass weder der Topo I *knockdown* noch die p53-, PARP-1- oder PARP-DBD-Expression einen bedeutenden Einfluss auf den Zellzyklus oder die Apoptoserate unter den Bedingungen der Experimente hatten (Abb. 35 D.). Zusammengefasst implizieren die Daten, dass eine unterdrückte Topo I-Expression ebenso wie ein erhöhtes PARP-1- und PARP-DBD-Niveau der spontanen Rekombination an zellulären Chromosomen in Anwesenheit von p53 entgegenwirken.



**Abb. 35** Rekombination an zellulären Chromosomen nach der Expression von p53, PARP-1 oder PARP-DBD sowie bei gleichzeitigem *knockdown* der endogenen Topo I.

In (A.) ist die Struktur des DNA-Substrats für die Analyse der HDR im Kontext zellulärer Chromosomen graphisch dargestellt. In der Zelllinie KMV5(HR-EGFP/3'EGFP) liegt das Rekombinationssubstrat HR-

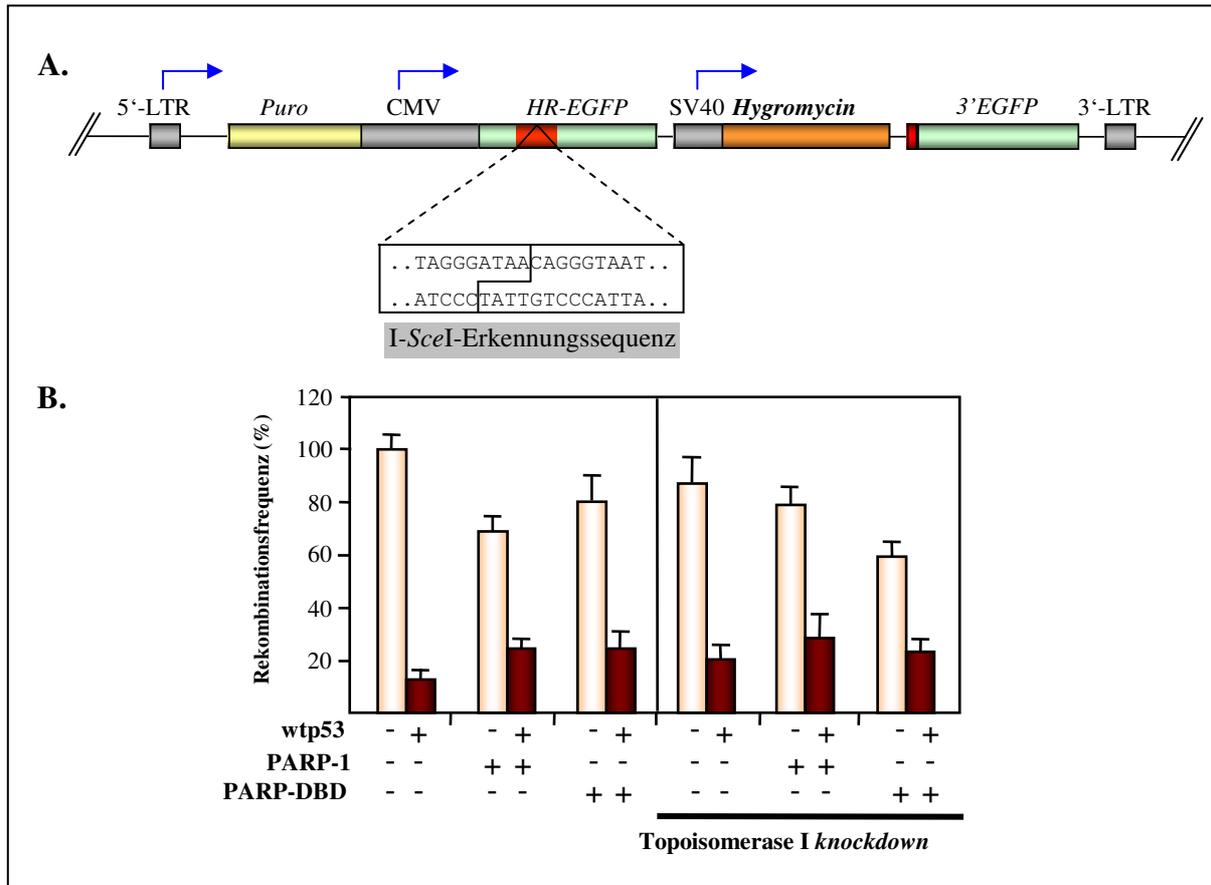
EGFP/3'EGFP chromosomal integriert in der p53-negativen Parentalzelllinie KMV5 vor (Akyüz *et al.*, 2002). HR-EGFP/3'EGFP trägt eine Puromycin-Resistenz-Kassette, das *HR-EGFP* und *3'EGFP* Gen. Die *spacer*-Region enthält eine Hygromycin-Resistenz-Kassette (SV40-Promotor grau unterlegt; *Hygromycin*-Resistenz Gen orange unterlegt) mit acht spezifischen Topo I-Erkennungssequenzen. Die blauen Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtungen. (B.) zeigt die Rekombination in Abhängigkeit von p53, PARP-1 und Topo I. KMV5(HR-EGFP/3'EGFP) Zellen wurden mit pBS oder pCMV-p53 (*wtp53*) zusammen mit pBS, pPARP31 (*PARP-1*) oder pPARP6 (*PARP-DBD*) und gleichzeitig mit pSuper oder pSuper-Topo I (Topo I *knockdown*) koelektroporiert. Der Koelektroporation folgte eine Kultivierung der Zellen von 72 h. Die mittleren Rekombinationsfrequenzen und Standardfehler wurden von jeweils 10 Rekombinationsmessungen bestimmt. Für die Bestimmung der relativen Rekombinationsfrequenz wurden die Frequenzen der Kontrollzellen mit pBS als 100 % ( $3 \times 10^{-5}$  %) definiert. (C.) zeigt die Inhibition der Topo I-Expression im Westernblot. Dazu wurden KMV5(HR-EGFP/3'EGFP) Zellen mit 40 µg pBS (Kontrolle, Spur 1) oder 15 µg pSuper-Topo I und 25 µg des pBS Kontrollvektors (Spur 2) elektroporiert und für 48 h kultiviert. Der Vektor pSuper-Topo I vermittelte die RNA-Interferenz zur Expressionsunterdrückung von Topo I. Der Status der Topo I-Expression wurde über Immundetektion mit dem humanen Antiserum Scl-70, 1/5000 (TopoGen.Inc, Columbus, OH, USA) visualisiert. Topo I wurde als vollständiges Protein von 100 kDa und als eine trunkierte Version dessen detektiert. Die Detektion der Ladekontrolle Aktin erfolgte über das polyklonale Ziegen Serum I-19, 1/1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). In (D.) ist die Zellzyklus-Analyse nach PI-Färbung und durchflußzytometrischer Auswertung der KMV5(HR-EGFP/3'EGFP) Zellen 72 h nach Transfektion und Kultivierung unter den Bedingungen der Rekombinationsanalyse dargestellt. Gezeigt ist die prozentuale zelluläre Fraktionierung in die sub-G1 Phase (Zelltod, jeweils 1. Säule), G1 Phase (jeweils 2. Säule), S (jeweils 3. Säule), und G2 Phase (jeweils 4. Säule). Die Zellen wurden mit pBS oder pCMV-p53 (*wtp53*) zusammen mit pBS, pPARP31(*PARP-1*) oder pPARP6 (*PARP-DBD*) und gleichzeitig mit pSuper oder pSuper-Topo I (Topoisomerase I *knockdown*) koelektroporiert. Es wurde die Mittelwerte und SDs von je zwei Messungen berechnet.

### 3.3.3 Die Rolle von p53, PARP-1 und Topo I in der DSB Reparatur nach gezielter Spaltung von chromosomaler Substrat-DNA

Nach der Etablierung des p53-Topo I Signalweges in der Regulation von spontanen Rekombinationsereignissen wurde die funktionelle Verbindung zwischen p53 und Topo I in Bezug auf die HDR an künstlich induzierten DSBen untersucht. Dazu wurden Rekombinationsmessungen mit KMV5(HR-EGFP/3'EGFP) Zellen vorgenommen, die mit dem Meganuklease I-*SceI* Expressionsvektor pCMV-I-*SceI* koelektroporiert worden waren. HR-EGFP/3'EGFP ist so konstruiert, dass es im *HR-EGFP* eine Erkennungsstelle für I-*SceI* trägt, die die gezielte Spaltung des stabil integrierten *HR-EGFP*-Rekombinationsmarkergens erlaubt (Abb. 36 A., Akyüz *et al.* 2002).

Die I-*SceI*-Expression führte zu einer 20-fachen Stimulierung der Rekombinationsfrequenz im Vergleich zum Basis-Niveau (Abb. 36 B.). Die p53 Expression resultierte in einer Abnahme der Rekombination um 88 %. In Zellen ohne p53 verursachte PARP-1- oder PARP-DBD-Expression eine Reduktion der Frequenz um 32 bzw. 21 %. Es wurden keine zusätzlichen Rekombinations-Änderungen in den mit pCMV-p53 elektroporierten Zellen durch PARP-1 bedingt. Ein ähnliches Bild zeigte sich in pSuper-Topo I Kotransfektionsexperimenten (Abb. 36 B.). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Topo I keinen bedeutenden Einfluss auf die HDR hat, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von wt-p53 oder PARP-1, sobald ein gezielter DSB in die DNA-Sequenz

eingeführt wurde.



**Abb. 36 Die Meganuklease I-SceI induzierte DSB-Reparatur an zellulären Chromosomen in Abhängigkeit von p53, PARP-1 und Topo I.**

In (A.) ist die Struktur des DNA-Substrats für die Analyse der Meganuklease I-SceI induzierten DSB-Reparatur im Kontext zellulärer Chromosomen graphisch dargestellt. Das chromosomal integrierte HR-EGFP/3'EGFP-Substrat in der Zelllinie KMV5(HR-EGFP/3'EGFP) enthält eine Erkennungssequenz (roter Bereich mit Dreieck) für die selten schneidende Meganuklease I-SceI innerhalb des HR-EGFP-Gens um die HDR nach I-SceI Expression und folgender gezielter Spaltung des DNA-Substrats zu induzieren (Akyüz *et al.*, 2002). Die blauen Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtungen. (B.) zeigt die I-SceI induzierten Rekombinationsfrequenzen. Nach Elektroporation mit pBS oder pCMV-p53 (*wtp53*) und pBS, pPARP31 (*PARP-1*) oder pPARP6 (*PARP-DBD*) zusammen mit pSuper oder pSuper-Topo I (Topoisomerase I *knockdown*) wurden die KMV5(HR-EGFP/3'EGFP) Zellen 72 h kultiviert. Für die Meganuklease vermittelte Spaltung des chromosomal integrierten HR-EGFP/3'EGFP Substrats wurde pCMV-I-SceI jeweils koelektroporiert. Mittelwerte unter Einbezug der Standardfehler der relativen Rekombinationsfrequenzen sind für jeweils 12 Messungen angegeben. Die Rekombinationsfrequenzen in KMV5(HR-EGFP/3'EGFP) Zellen mit dem pBS Kontrollvektor wurden als 100 % definiert ( $5,7 \times 10^{-4}$ ).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Das *MLLbcr*-Fragment eine hochfragile DNA-Sequenz

In einer Vielzahl genomischer Studien konnten chromosomale Bruchpunkte innerhalb der *MLLbcr* von Leukämie-Patienten detektiert werden (Cimino *et al.*, 1997; Hensel *et al.*, 2001; Marschalek *et al.*, 1997). Ob die *MLLbcr* im Vergleich zu anderen DNA-Sequenzen eine Region ist, die gegenüber der Induktion von DNA-Brüchen empfindlicher ist, konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden. So könnte die starke Präsenz von *MLL*-Translokationen in leukämischen Proben ausschließlich mit der Vermittlung von Wachstums- und Überlebensvorteilen über onkogene *MLL*-Fusionsproteine im Zusammenhang stehen (Harper and Aplan, 2008).

Des Weiteren könnte die häufige Beteiligung von *MLLbcr* an leukämogenen Rearrangements durch eine gesteigerte Sensibilität gegenüber der aberranten, fehlerhaften NHEJ-Reparatur von DSBen bedingt sein (Reichel *et al.*, 2001b; Reichel *et al.*, 1998).

Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass ein Abschnitt der *MLLbcr* (*MLLbcr*-Fragment) im Vergleich zu Kontroll-Sequenzen, unabhängig vom NHEJ-Reparaturweg, zu einer gesteigerten Rekombination im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem führte. Dieser spezifische Anstieg der Rekombination weist auf eine gesteigerte Fragilität des *MLLbcr*-Fragments gegenüber anderen DNA-Regionen hin. Dabei bezieht sich diese Fragilität auf die intrinsische Instabilität der primären *MLLbcr*-DNA-Struktur, da der spezifische Rekombinationsanstieg nicht nur im chromosomalen sondern auch im extrachromosomalen Kontext, an nackter DNA, detektierbar war.

Im chromosomalen Kontext konnte der Effekt der spontanen *MLLbcr*-spezifischen Rekombinationssteigerung über ein starkes, künstlich induziertes DSB-Signal (I-*Sce*-I-induzierter DSB im Rekombinationssubstrat) aufgehoben werden und führte zu einem Angleich der Rekombinationsfrequenzen für das *MLLbcr*-Fragment und die Kontrollsequenz. Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, dass der *MLLbcr*-Fragment-spezifische Anstieg der Rekombination von gesteigerter Induktion von Brüchen abhängt.

Diese intrinsische Fragilität ist möglicherweise mit dem AT-Reichtum (66 %) der *MLLbcr*-Sequenz assoziiert. So konnte gezeigt werden, dass die Wasserstoffbrücken von AT-Basenpaaren auf die DNA-Doppelhelix destabilisierend wirken. Des Weiteren sind AT-reiche Sequenzen aufgrund von Stapelwechselwirkungen (*stacking interactions*), die in der Doppelhelix zwischen aufeinanderfolgenden Basenpaaren auftreten, thermodynamisch

instabiler als GC-reiche DNA-Abschnitte (Yakovchuk *et al.*, 2006).

Trotz dieses hohen AT-Anteils konnten innerhalb des *MLLbcr*-Fragments jedoch keine langen destabilisierenden palindromischen Sequenzen identifiziert werden, die über ihre schnelle Relaxationskinetik zur Aufschmelzung der Doppelhelix und Ausbildung von Haarnadel- oder kruziformen Strukturen führen können (Bowater *et al.*, 1991; Dayn *et al.*, 1991).

Doch konnte gezeigt werden, dass die *MLLbcr*, und in diesem Zusammenhang auch das *MLLbcr*-Fragment, Eigenschaften einer *scaffold/matrix attachment region* (*s/mar*) aufweist (Hensel *et al.*, 2001; Stanulla *et al.*, 1997). Solche *s/mars* sind im allgemeinen AT-reiche DNA-Sequenzen von variabler Größe, die in spezifischen Chromatinregionen lokalisiert sind. Sie definieren die Andockstellen der genomischen DNA an das Protein-Rückgrat der Chromosomen und werden deshalb mit der Organisation der „Schleifen-Domänen“ des Chromatins assoziiert (Mirkovitch *et al.*, 1984; Saitoh and Laemmli, 1994). Aufgrund der Lokalisation einiger Deletions- und Translokations-Bruchpunkte in *s/mars* wurde angenommen, dass Rekombinationsprozesse präferentiell an DNA-Sequenzen mit *s/mar*-Eigenschaften stattfinden (Broeker *et al.*, 1996; Cairns *et al.*, 1994; Cockerill *et al.*, 1987; Sperry *et al.*, 1989; Strissel *et al.*, 1998b). Diese Implikation steht im Zusammenhang damit, dass *s/mars*, die als Orte hoher transkriptioneller Aktivität gelten (Kalos and Fournier, 1995; Klehr *et al.*, 1991; Klehr *et al.*, 1992; Poljak *et al.*, 1994; Stief *et al.*, 1989; Stunkel *et al.*, 2000), mit einer verstärkten Topo II-Aktivität in Verbindung gebracht werden (Perlmutter *et al.*, 1984; Shapiro and Weigert, 1987; Sperry *et al.*, 1989).

Ein Vergleich der Rekombination am *s/mar*-ähnlichen *MLLbcr*-Fragment (Hensel *et al.*, 2001), und *IgHEmar*-Fragment, einer *s/mar* des *immunoglobulin-heavy constant epsilon*-Gens der Maus, im extrachromosomalen Kontext zeigte, dass das *MLLbcr*-Fragment in der lymphoblastoiden Zelllinie WTK1 (p53 M237I) sogar stärker rekombinogen ist als das *IgHEmar*-Fragment, obwohl letzteres ein, für *s/mars* als charakteristisch und rekombinationsförderlich geltendes, DNA-entwindendes Motiv (AAATATTT) trägt (Boulikas, 1995; Will *et al.*, 1998a; Will *et al.*, 1998b). Im Gegensatz dazu konnte in der Zelllinie KMV5 (p53 negativ, Aküyz *et al.*, 2002) im Vergleich zum *MLLbcr*-Fragment ein Anstieg der Rekombination für das *IgHEmar.fwd*-Fragment beobachtet werden. Möglicherweise steht dieser Umkehreffekt im Zusammenhang mit der Apoptose-Resistenz der KMV5-Zelllinie.

In Verbindung damit ist interessant, dass in Blutproben gesunder Erwachsener, in Abhängigkeit von der Lagerzeit der Proben ohne Zellaufarbeitung, *MLL*-Rearrangements aufgrund spontan eintretender Apoptose detektiert werden konnten (Basecke *et al.*, 2006). In

Bezug auf die Sequenz-abhängige Instabilität des *MLLbcr*-Fragments könnte dieser Effekt über die apoptotische Aktivierung nukleolytischer Enzyme und einer darauf folgenden *MLL*-Bruchinduktion zur erhöhten Rekombination am *MLLbcr*-Fragment gegenüber dem *IgHEmar.fwd*-Fragment in unbehandelten WTK1 beitragen, nicht jedoch in Apoptose-resistenten KMV5. Für CD95-Rezeptor-induzierte Apoptose konnten Brüche im *MLLbcr*-Fragment bereits direkt nachgewiesen werden (Betti *et al.*, 2001).

*S/mars*, also auch *IgHEmar*, werden generell als Orte für apoptotische Spaltungen diskutiert, da impliziert wurde, dass die Fragmentierung höherer Ordnung in 50-100 kb große DNA-Fragmente der frühen Apoptose mit nukleolytischen Spaltungen in *s/mars* assoziiert ist (Gromova *et al.*, 1995; Khodarev *et al.*, 2000; Oberhammer *et al.*, 1993). Für die apoptotische Spaltung im *MLLbcr*-Fragment konnte diese Verbindung mittels LM-PCR (*ligation-mediated PCR*) direkt nachgewiesen werden, da in apoptotischen Zellen die Termini separierter 50 kb-DNA-Fragmente die apoptotische Spaltungsstelle der *MLLbcr* enthielten (Betti *et al.*, 2001). Da derartige Analysen für *IgHEmar* nicht vorliegen, steht eine endgültige Klärung des gegensätzlichen Rekombinationsverhaltens am *MLLbcr*- und *IgHEmar*-Fragment in den beiden Zelllinien noch aus. Beide Sequenzen weisen jedoch im Vergleich zum *SV40.fwd*-Kontrollfragment eine gesteigerte Rekombinationsfrequenz auf und sprechen damit für eine erhöhte Fragilität AT-reicher *s/mar*-Sequenzen (AT-Anteil: 66 % -*MLLbcr*-Fragment, 65 % -*IgHEmar*-Fragment und 54 % *SV40*-Fragment).

Für das *MLLbcr*-Fragment zeigte sich unabhängig von der Orientierung der Sequenz im extrachromosomalen Rekombinationssubstrat in WTK1 ein Anstieg der Rekombination sogar gegenüber einer anderen Bruchpunktregion (*RARabc*), die in die Entwicklung von Akuter Promyelozyten Leukämie (APL) involviert ist (Fenaux *et al.*, 2001; Lowenberg *et al.*, 1999). Ein ähnlicher Anstieg der Rekombination konnte auch für das *MLLbcr*- vs. *RARabc*-Fragment in p53 mutierten LLC-MK<sub>2</sub>(neo)-Zellen mittels *SV40*-basiertem Rekombinations-Testsystem detektiert werden (Boehden *et al.*, 2004).

Dieses System basiert auf der Rekombination der Genome zweier Virenstämme, deren Hüllproteingen *VPI* verschiedenartig punktmutiert vorliegt. Kommt es in den infizierten Wirtszellen zur Rekombination und damit zur Vermehrung konformationsstabiler Viren führt dies zur Lyse der Wirtszellen. Die Rekombinationsereignisse können deswegen über die Freisetzung intakter Virenpartikel damit über die Auszählung von Viren-Plaques quantifiziert werden (Wiesmüller *et al.*, 1996). Zur Analyse der Rekombination am *MLLbcr*- und *RARabc*-Fragment wurden diese in die mutierten Virusgenome integriert. Die verwendete Wirtszelllinie LLC-MK<sub>2</sub>(neo) aus Rhesusaffen (Hull *et al.*, 1956) trägt, ähnlich wie WTK1

(p53 M237I, Xia *et al.* 1995), eine Mutation in der DNA-Bindedomäne des *p53*-Gens (Deletion der Codons 237-239, Boehden *et al.* 2004). Nach Expression von wt-p53 zeigte sich im SV40-basiertem Rekombinations-Testsystem jedoch eine Erniedrigung der Rekombinationsstimulierung an der *MLLbcr* und eine Stimulierung am *RARαbcr*-Fragment (Boehden *et al.*, 2004). Dies deutet auf einen Einfluss von p53 bei der Entstehung genetischer Rearrangements in der *RARαbcr* hin (Baumann *et al.*, 2006; Boehden *et al.*, 2004).

Für das *MLLbcr*-Fragment war eine solche p53-Abhängigkeit nicht detektierbar, da der rekombinationssteigernde Effekt sowohl in p53-wt (TK6) als auch in p53-mutierten (WTK1, T47D) und p53-negativen Zelllinien (KMV5) detektierbar war.

Interessanterweise spielte für das Ausmaß der Rekombinationssteigerung die Leserichtung des *MLLbcr*-Fragments eine moderate Rolle. So verhielten sich zwar *MLLbcr.fwd* und *MLLbcr.rev* unabhängig von der Zelllinie gegenüber Kontrollsequenzen ähnlich, doch war der Anstieg der Rekombination für *MLLbcr.fwd* stets größer als für *MLLbcr.rev*. Dieser Unterschied steht möglicherweise im Zusammenhang mit der lokalen Verteilung der Bruchpunkte und topologischer Angriffsstellen im *MLLbcr*-Fragment in Bezug auf die benachbarten, mutierten *EGFP*-Gene im Rekombinationsvektor. So befinden sich z.B. die Topo I- und Topo II-Erkennungsstellen nach Mirault *et al.* 2006 verstärkt im 3'-Bereich der Leserichtung (*fwd*) des *MLLbcr*-Fragments (Abb. 1 und Abb. 2).

## **4.2 Einfluss zytotoxischer Agenzien auf die genetischen Rearrangements am *MLLbcr*-Fragment**

Aufgrund klinischer und molekulargenetischer Untersuchungen wurde die Entwicklung genetischer Rearrangements am *MLL*-Gen in Leukämiepatienten verstärkt mit der Behandlung mit Topo II-Inhibitoren, wie Etoposid in Verbindung gebracht (Cimino *et al.*, 1997; Felix, 1998; Felix, 2001; Haupt *et al.*, 1994; Ishii *et al.*, 2002; Moneypenny *et al.*, 2006; Super *et al.*, 1993; Whitmarsh *et al.*, 2003; Winick *et al.*, 1993). Zusätzlich wurde die Entstehung sekundärer Leukämien jedoch auch mit anderen zytotoxischen Agenzien wie Alkylantien und Antimetaboliten assoziiert (Langer *et al.*, 2003; Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; Wright, 2005). So konnten unbalancierte Rearrangements der Chromosomenbande 11q23, Lokalisationsorts des *MLL*-Gens, auch nach der alleinigen Behandlung mit alkylierenden Agenzien und Radiotherapie nachgewiesen werden (Larson *et al.*, 1992; Pedersen-Bjergaard and Philip, 1991).

In diesem Zusammenhang führte G. Boehden, eine Mitarbeiterin unserer Arbeitsgruppe, Vorstudien zum Einfluss verschiedener Chemotherapeutika auf *MLL*-Rearrangements im

SV40-basierten Rekombinations-Testsystem durch. Es zeigte sich für das *MLLbcr*-Fragment ein spezifischer Anstieg sowohl der basalen Rekombination als auch der Rekombination nach Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika verschiedener Wirkstoffklassen gegenüber den Kontrollen (Boehden *et al.* 2004).

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde für ein breites Spektrum an zytotoxischen Agenzien das Rekombinationsverhalten am *MLLbcr*-Fragment und an Kontrollsequenzen in humanen Zellen mit dem Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem analysiert. Dieses System bietet eine Vielzahl von Vorteilen, so ist eine schnellere Auswertung der Rekombinationsereignisse möglich, es ist auf humane Zellen applizierbar und bietet die Möglichkeit zur Analyse der Rekombination im Kontext zellulärer Chromosomen (Akyüz *et al.*, 2002).

Die Rekombinationsanalyse mit dem Fluoreszenz-basierten Testsystem zeigte, dass mit Ausnahme von Aphidicolin, alle getesteten Chemotherapeutika unabhängig von der Wirkstoffklasse zu einem Sequenz-unabhängigen Anstieg der Rekombination im extrachromosomalen Kontext führten. In Korrelation zu dieser Sequenz-unabhängigen Steigerung der Rekombination konnte nach Behandlung mit dem jeweiligen Chemotherapeutikum nicht nur ein Anstieg des Zelltods sondern auch des S- und/oder G2-Phase-Zellanteils detektiert werden. Diese Daten sind bzgl. der Stimulierung der Rekombination kompatibel mit der Beteiligung von zwei Mechanismen (i) Rekombinationssteigerung durch Arrest in der S- und G2-Phase des Zellzyklus und (ii) Induktion von DNA-Brüchen in den untersuchten Fragmenten aufgrund einer Sequenz-unabhängigen Genotoxizität der verwendeten Agenzien (Tab. 12).

Bestätigung für die erste Interpretation kommt aus einer Studie, in welcher für den Topo I-Inhibitor Camptothecin eine solche Induktion der HR nach Arretierung in der S- oder G2/M-Phase in HCT116-Kolonkarzinomzellen nachgewiesen wurde (Huang *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde beschrieben, dass der Topo II-Inhibitor Etoposid, das Alkylanz MNNG, der Antimetabolit 5-Fluorouracil (5-FU) und der Mitoseinhibitor Paclitaxel S- bzw. G2/M-Phase-Arrest auslösen (De Angelis *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2004; Sleiman and Stewart, 2000). Im Zusammenhang mit den verwendeten Rekombinationssubstraten ist hierbei nicht von Bedeutung, dass in der S- und G2-Phase homologe Matrizen für die HR vorliegen, da diese im Test über die beiden mutierten *EGFP*-Gene des Rekombinationskonstrukts in jeder Zellzyklusphase zur Verfügung stehen. Die Steigerung der Expression HR-spezifischer Proteine wie Rad51 trägt jedoch in diesen Phasen zum Sequenz-unabhängigen Rekombinationsanstieg bei (Chen *et al.*, 1997; Flygare *et al.*, 1996).

Im Gegensatz zu den Daten mit extrachromosomalen Substrat in dieser Arbeit zeigten die Vorexperimente von G. Boehden im SV40-basierten Rekombinations-Testsystem einen *MLLbcr*-spezifischen Rekombinations-anstieg für Camptothecin, Etoposid und Paclitaxel. Vermutlich begründet sich diese Spezifität darauf, dass SV40 nach Infektion der Wirtszelle über molekulare Interaktionen viraler Proteine mit Wirtsproteinen diese Zelle zum Eintritt in die S-Phase zwingt (Challberg and Kelly, 1989; Hatanaka and Dulbecco, 1966). Somit befinden sich behandelte und unbehandelte Zellen im SV40-basierten Rekombinations-Testsystem in der gleichen Zellzyklusphase und unterliegen, im Gegensatz zu den Experimenten mit dem Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem, den gleichen Zellzyklus-abhängigen Rekombinationsbedingungen.

Untersuchungen im chromosomalen Kontext mit dem Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem zeigten jedoch einen wesentlich geringfügigeren Einfluss der Zellzykluseffekte auf die Rekombination an den DNA-*cis*-Elementen im Vergleich zum extrachromosomalen Kontext (Tab. 12). So wurden in den stabilen WTK1-Klonen nach Chemotherapeutika-Behandlung zwar die gleichen Zellzyklusarreste detektiert, doch beeinflussten diese die Reparatur an den chromosomal integrierten Konstrukten deutlich geringer und zeitlich verzögert. Dies steht möglicherweise im Zusammenhang mit der im chromosomalen Kontext fehlenden Notwendigkeit die Rekombinationsplasmide über Elektroporation in die Zellsysteme einzubringen. So führt die Elektroporation im transienten Kontext wahrscheinlich zu einer basalen Sensitivierung der Zellen gegenüber Brüchen und Zellzyklus-abhängigen Reparaturreffekten, die nach Chemotherapeutika-Behandlung auftreten. Des Weiteren schützt möglicherweise die chromosomale Verpackung der Rekombinationssubstrate vor Sequenz-unabhängigen Reparaturreffekten. Eine weitere Option wäre, dass Rad51, welches Zellzyklus-abhängig exprimiert wird, bei nur einer chromosomal integrierten Kopie des Rekombinationssubstrats pro Zelle vs. 1000en extrachromosomalen Kopien pro transfizierter Zelle nicht limitierend ist.

Neben dem Zellzyklus-abhängigen Einfluss auf die Rekombination können, wie bereits erwähnt, auch genotoxische Effekte der Chemotherapeutika eine Rolle bei der Stimulierung der Rekombination spielen (Tab. 12). So wirken, mit Ausnahme von Paclitaxel, dass über die Stabilisierung der Mikrotubuli die Zellteilung blockiert (De Brabander *et al.*, 1981), alle getesteten Chemotherapeutika genotoxisch, wobei Aphidicolin in Bezug auf die Genotoxizität eine später näher erläuterte Sonderstellung einnimmt (Backer *et al.*, 1990; Cahill *et al.*, 2004; Kleinsasser *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2008; Zounkova *et al.*, 2007). Diese Genotoxizität könnte sowohl in den Kontrollsequenzen als auch im *MLLbcr*-Fragment zur

Akkumulation von Brüchen führen und folglich zum Anstieg der DNA-Reparatur beitragen. So konnten z.B. in Bezug auf Etoposid und Camptothecin für das *SV40*-Kontrollfragment eine Topo I-Konsensussequenz und für die *Hygromycin*-Resistenz-Kassette acht Topo I- und eine Topo II-Konsensussequenz nachgewiesen werden (Aplan *et al.*, 1996; Jaxel *et al.*, 1988; Tsui *et al.*, 1989). Für das *MLLbcr*-Fragment wies Mirault *et al.* 2006 *in vivo* drei Etoposid-induzierte Topo II-Schnittstellen und sechs Camptothecin-induzierte Topo I-Schnittstellen nach. Aufgrund des bereits erwähnten Auftretens von Therapie-abhängigen Sekundärleukämien nach Behandlung der primären Malignität mit Etoposid (Cimino *et al.*, 1997; Felix, 1998; Felix, 2001; Haupt *et al.*, 1994) und der damit verbundenen Detektion von Etoposid-induzierter DNA-Spaltung im *MLL*-Gen (Aplan *et al.*, 1996; Ishii *et al.*, 2002; Lovett *et al.*, 2001; Moneypenny *et al.*, 2006; Strissel *et al.*, 1998a) wurde von anderen Arbeitsgruppen bereits eine direkte Vermittlung von *MLL*-Rearrangements über Topo II-vermittelte Spaltung angenommen. Sim und Liu *et al.* 2001 konnten jedoch sowohl für Etoposid als auch für Camptothecin, 5-Fluorouracil und dem nicht-genotoxischen Mikrotubuli-Inhibitor Vinblastin eine spezifische Spaltung in der endogenen *MLLbcr* nachweisen und für Etoposid zeigen, dass die Spaltung über die Blockierung von Caspasen inhibierbar ist. Diese Daten wiesen auf eine Beteiligung apoptotischer Prozesse bei der Entstehung von *MLL*-Rearrangements hin.

In der chromosomalen Rekombinationsanalyse dieser Arbeit konnte ein Rekombinationsanstieg spezifisch am *MLLbcr*-Fragment nach Etoposid- und Camptothecin-Behandlung festgestellt werden. Dieser Anstieg wurde vom jeweiligen chromosomalen Locus am integrierten *MLLbcr*-Fragment beeinflusst, da nicht jeder WTK1-Klon mit integriertem *MLLbcr*-Rekombinationskonstrukt auf die Behandlung mit Etoposid mit einem Rekombinationsanstieg reagierte. Für beide Chemotherapeutika konnte auch die Induktion von Apoptose unter den Testbedingungen nachgewiesen werden und über eine semiquantitative PCR-Analyse gezeigt werden, dass Etoposid nach acht Stunden Inkubationsdauer spezifisch Brüche im chromosomal integrierten *MLLbcr*-Fragment, jedoch nicht im *SV40*-Kontroll-Fragment induzierte. Der für *MLLbcr*-spezifische Rekombinationsanstieg und die Induktion von Brüchen sind jedoch trotz der Apoptose-Induktion sowohl mit Initiation durch apoptotische Nukleasen als auch mit Initiation durch den direkt auf die *MLLbcr* wirkenden genotoxischen Effekt von Etoposid und Camptothecin vereinbar (Tab. 12). So könnte die Aktivität von Topo I und Topo II, aufgrund der chromosomalen Umgebung und möglicherweise sogar aufgrund einer Verbindung des *MLLbcr*-Fragments über die *s/mar* mit dem nukleären Matrix-Proteingerüst, am chromosomal

integrierten *MLLbcr*-Fragment gegenüber dem *SV40*-Kontrollfragment wesentlich stärker sein. Die Blockierung der Enzyme über Etoposid und Camptothecin würde folglich zur *MLLbcr*-spezifischen Induktion von Brüchen und zur Stimulierung der Rekombination führen. Zusammengefasst weisen die Daten darauf hin, dass für Agenzien wie Camptothecin und Etoposid, sowohl genotoxische als auch apoptotische Effekte zur Induktion von *MLL*-Rearrangements führen können (Tab. 12).

Eine Separation der potenziell rekombinationsstimulierenden Einflüsse von Apoptose und Genotoxizität war für das replikationsinhibierende Chemotherapeutikum Aphidicolin möglich. Dieses Chemotherapeutikum entfaltet seine zytotoxische Wirkung über die Inhibition der DNA-Polymerase  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  durch die Blockierung der Bindestelle von dNTPs (Glover *et al.*, 2005; Wright and Brown, 1990). Obwohl Aphidicolin eher als Verstärker genotoxischer Effekte anderer Agenzien eingesetzt wird (Speit *et al.*, 2004), konnte auch für Aphidicolin allein die Induktion von DNA-Schäden nachgewiesen werden (Tiwari *et al.*, 2008), die in Bezug zur Inhibition der Replikation steht. Im Zusammenhang mit der Applikation des Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystems im extrachromosomalen Kontext ergibt sich jedoch ein sehr interessanter Aspekt. So tragen die episomalen Rekombinationsvektoren keine eukaryotischen Replikationsstartpunkte, womit keine DNA-Replikation durch die betroffenen DNA-Polymerasen stattfinden kann. Eine Blockierung der Replikationsgabel durch Inhibition der DNA-Polymerasen über Aphidicolin und daraus resultierende DSBe (Kurose *et al.*, 2006) ist an den transienten Rekombinationskonstrukten demzufolge nicht möglich. Das bedeutet, dass Aphidicolin im Gegensatz zu Etoposid, Camptothecin, 5-Fluorouracil und MNNG auf das Rekombinationssubstrat nicht genotoxisch wirken kann, und somit im extrachromosomalen Kontext keine Genotoxizität-vermittelte Bruchinduktion am *MLLbcr*-Fragment und an Kontrollsequenzen möglich ist, die einen Rekombinationsanstieg verursachen könnte. Des Weiteren wurde für Aphidicolin, im Gegensatz zu den anderen getesteten Chemotherapeutika eine Zellzyklusverschiebung in G1/S detektiert, aufgrund derer Sequenz-unabhängige Effekte auf die HR unwahrscheinlich sind (Tab. 12). Auf der Basis fehlender Zellzyklus-vermittelter und genotoxischer Rekombinationseffekte konnte im extrachromosomalen Kontext für Aphidicolin eine Stimulierung der Rekombination spezifisch am *MLLbcr*-Fragment nachgewiesen werden, die im chromosomalen Kontext nicht mehr zu detektieren war. Dieser Anstieg war unabhängig vom p53-Status, da er sowohl für WTK1 (p53-mutiert) als auch TK6 (p53-wt) ermittelt wurde. Parallel dazu konnte für Aphidicolin, ebenso wie für alle anderen getesteten Chemotherapeutika, die Induktion des Zelltods detektiert werden. Da für die Aphidicolin-

abhängige Steigerung der Rekombination wie bereits erwähnt sowohl Zellzyklus-vermittelte als auch genotoxische Effekte ausschließbar waren, läßt sich als mögliche Ursache des *MLLbcr*-spezifischen Rekombinationsanstiegs und der damit verbundenen Instabilität des *MLLbcr*-Fragments die Induktion der Apoptose annehmen.

Die Möglichkeit einer Apoptose-verursachten Instabilität der *MLLbcr* wird gestützt durch die bereits erwähnten Erkenntnisse von Sim und Liu *et al.* 2001. Des Weiteren konnte Stanulla *et al.* 1997 zeigen, dass eine Positions-spezifische Spaltung innerhalb der *MLLbcr* sowohl über Topo II-Inhibitoren als auch über andere genotoxische und nicht-genotoxische Stimuli des apoptotischen Zelltods mit der DNA-Fragmentierung höherer Ordnung, während der initialen Stufe der Apoptose, einhergeht. Stanulla assoziierte diese Spaltung mit einer hochaffinen s/mar, die innerhalb der *MLLbcr* lokalisiert wurde (Broeker *et al.*, 1996) und allgemein als Orte der apoptotischen Spaltung höherer Ordnung gelten (Gromova *et al.*, 1995; Khodarev *et al.*, 2000; Oberhammer *et al.*, 1993). Zusätzlich zeigte er, dass die Spaltung nicht abhängig vom chromosomalen Kontext war, sondern auch im extrachromosomalen Kontext nachgewiesen werden konnte (Stanulla *et al.*, 2001).

**Tab. 12 Zusammenfassung der theoretisch möglichen Effekte, die zur Rekombinationssteigerung an den DNA-*cis*-Elementen führen können.**

Agens	Kontext	Mögliche Rekombinations-steigernde Effekte		
		Zellzyklusarrest	Genotoxizität	Apoptose
<b>Etoposid</b> <b>Camptothecin</b>	<b>transient</b>	Ja	Ja	Ja
	<b>chromosomal</b>	Ja	Ja	Ja
<b>Aphidicolin</b>	<b>transient</b>	Nein	Nein	Ja
	<b>chromosomal</b>	Nein	Ja	Ja
<b>Paclitaxel</b>	<b>transient</b>	Ja	Nein	Ja
<b>MNNG</b> <b>5-Fluorouracil</b>	<b>transient</b>	Ja	Ja	Ja

Neben den Effekten chemotherapeutischer Agenzien wiesen Betti *et al.* (2001) nach, dass ein Anti-CD95 Antikörper als Induktor der CD95-Rezeptor-vermittelten Apoptose, Translokationen an einer Spaltungsstelle im Exon 12 des *MLL*-Gens initiieren kann. Diese Spaltungsstelle ist in dem in dieser Arbeit analysierten *MLLbcr*-Fragment enthalten. Des Weiteren detektierten Mirault *et al.* (2006) innerhalb des *MLLbcr*-Fragments mehrere Hotspots für apoptotische Spaltungen über Behandlung mit Anti-CD95 (Abb. 1).

Untersuchungen der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment nach Behandlung mit Anti-CD95

Antikörper führten in dieser Arbeit jedoch trotz nachgewiesener Apoptose-Induktion zu keiner Stimulierung der Reparatur, die auf eine erhöhte Fragilität der *MLLbcr* durch Apoptose hindeuten würde. Vielmehr wurde sogar eine tendenzielle Abnahme der Rekombination nach Anti-CD95-Behandlung detektiert. Diese Reduktion kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass eine schnelle Kinetik der CD95-Signalkaskade eine exzessive Aktivierung der Effektor-Caspase 3 bedingt, was zu einem frühzeitigen Abbau von Reparaturproteinen, wie Rad51, führt. Dadurch würde unmittelbar nach Einführung der Brüche Reparatur unmöglich gemacht werden. Das Gleichgewicht zwischen apoptotischem Abbau von Reparaturproteinen und unter initialer Apoptose weiterhin bestehenden Reparaturprozessen würde frühzeitig in Richtung Zelltod und Proteinabbau verlagert werden. Diese Verlagerung für den CD95-Signalweg ist im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem über eine Reduktion der Rekombination detektierbar. Da Chemotherapeutika über den mitochondrialen Weg Apoptose induzieren, ist die Aktivierung apoptotischer Prozesse wie die der Caspasen-vermittelten Spaltung verlangsamer als der Todesrezeptor-vermittelte Apoptoseweg über den Anti-CD95-Antikörper (Abb. 37). So führt die Behandlung mit Anti-CD95, in Abhängigkeit von einer vorhandenen CD95-Rezeptordisposition, frühzeitig zur apoptotischen DNA-Fragmentierung (Los *et al.*, 2002). Chemotherapeutika können hingegen, sowohl in ihrer zeitlichen als auch sequentiellen Abfolge der aktivierten zellulären Prozesse, wie Zellzyklusarrest und Apoptose stark variieren (Del Bino and Darzynkiewicz, 1991; Sleiman *et al.*, 1998; Sleiman and Stewart, 2000). In Abb. 37 wurde schematisch verdeutlicht wie es zu dem unterschiedlichen Rekombinationsverhalten nach Behandlung mit Anti-CD95 oder Chemotherapeutika im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem kommen könnte. Dabei kann sowohl Behandlung mit Anti-CD95 als auch mit verschiedenen Chemotherapeutika über Apoptose zu Brüchen führen. Die Reparatur dieser Brüche ist jedoch im Zeitrahmen des verwendeten Testsystems im Fall von Anti-CD95 möglicherweise nicht detektierbar.

Zusammengefasst schließen sowohl die transienten als auch die chromosomalen Rekombinationsanalysen die Möglichkeit ein, dass, zusätzlich zur basalen Instabilität des *MLLbcr*-Fragments, genetische Rearrangements über Behandlung mit Chemotherapeutika verschiedener Wirkstoffklassen vermittelt werden können. Des Weiteren weisen die Daten zu den *MLLbcr*-spezifischen Spaltungs- bzw. Rekombinationseffekten im chromosomalen Kontext nach Etoposid- oder Camptothecin-Behandlung sowie im extrachromosomalen Kontext nach Aphidicolin-Behandlung auf eine mögliche Beteiligung apoptotischer Prozesse beim Rekombinationsanstieg nach Chemotherapeutika-Behandlung hin.

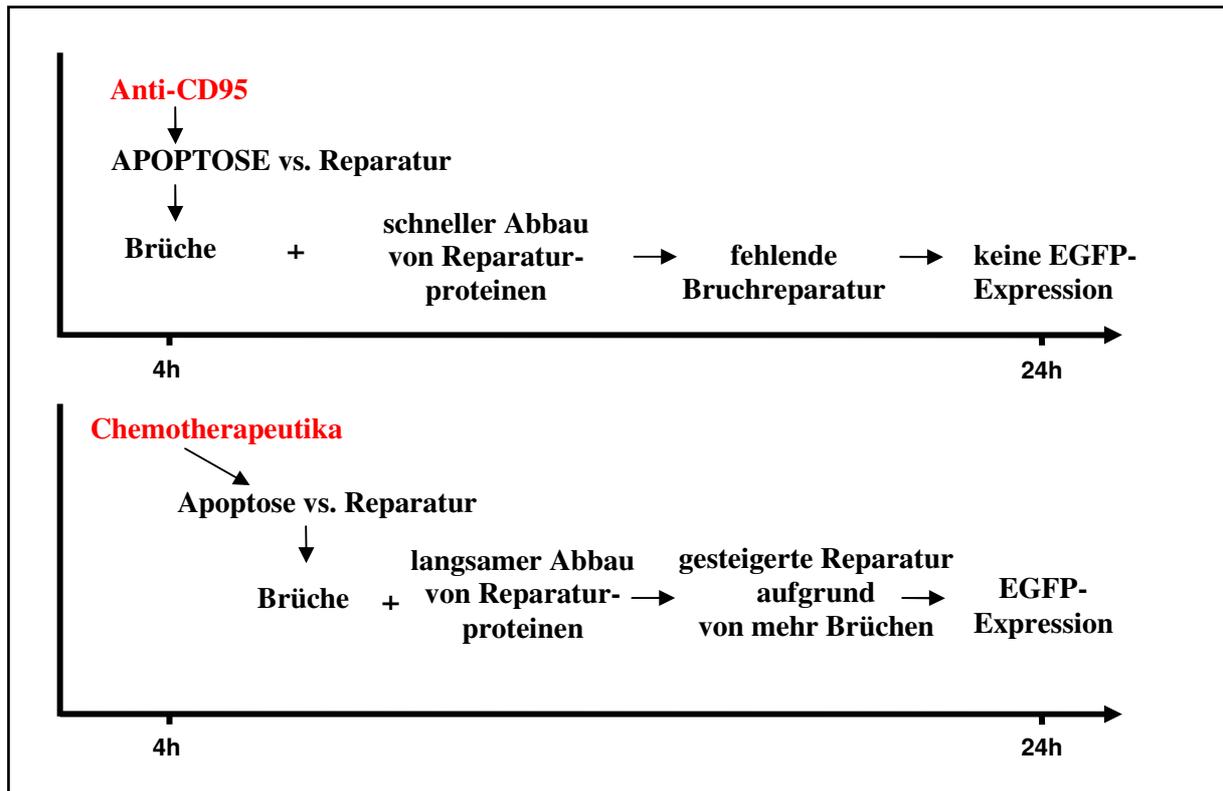


Abb. 37 Mögliche Erklärung für einen fehlenden Anstieg der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment nach Anti-CD95 Antikörper-Behandlung im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem

### 4.3 Einfluss apoptotischer Faktoren auf die Stimulierung der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment nach Behandlung mit zytotoxischen Agenzien

Analysen zum Einfluss verschiedener apoptotischer Faktoren auf den *MLLbcr*-spezifischen und Sequenz-unabhängigen Rekombinationsanstieg führten zu interessanten, jedoch zum Teil auch kontroversen Ergebnissen. So zeigte sich sowohl für Etoposid als auch für Camptothecin, jedoch nicht für Aphidicolin, eine Sequenz-unabhängige Reduktion der Rekombinationsstimulierung nach Blockierung von Caspasen über den Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk im extrachromosomalen Kontext.

Diese Sequenz-Unabhängigkeit steht möglicherweise in Verbindung mit einer Interaktion zwischen der Caspase-abhängigen Nuklease CAD und Topoisomerasen. So konnte gezeigt werden, dass CAD an das Isomer Topo II $\alpha$  bindet und die Inhibition von beiden die apoptotische Chromatinkondensation komplett verhindert (Durrieu *et al.*, 2000).

Im Falle einer Etoposid-Behandlung der Zellen führt die apoptotische Aktivierung von CAD über Caspase 3 also möglicherweise zur Bindung von CAD an die durch Etoposid DNA-fixierte Topo II.

Die Stabilisierung von Topo II an der DNA nach Etoposid-Behandlung ist neben dem

*MLLbcr*-Fragment auch für die Kontrollsequenz *SV40* möglich, da *in vivo* Topo II-Erkennungsstellen im *SV40*-Fragment vorliegen könnten (Yang *et al.*, 1985). Die fixierte Bindung von Topo II an die DNA (Topo II-DNA-Spaltungskomplexe) durch Etoposid und eine parallele Rekrutierung von CAD zur Topo II könnten zum einen zur Inhibition der Chromatinkondensation aufgrund fehlender Dekatenation führen. Zum anderen könnte die Bildung eines Topo II/CAD-Komplexes, neben einer Topo II-aktivierten genotoxischen DNA-Spaltung nach Etoposid-Behandlung, zeitlich versetzt auch zur apoptotischen Spaltung über den Topo II/CAD-Komplex beitragen. So detektierte Mirault *et al.* (2006) nach 30 min Etoposid-Behandlung von Lymphozyten eine Topo II-vermittelte Spaltung und nach längerer Behandlung (6 h) mit Etoposid apoptotische DNA-Spaltungssignale.

Da die alleinige apoptotische Spaltung über CAD mit *s/mar*-Sequenzen assoziiert wird, könnte Topo II in Kombination mit CAD die Spaltung in DNA-Sequenzen ohne *s/mar*-Eigenschaften unterstützen und forcieren. Für CAD konnte bereits nachgewiesen werden, dass es sowohl bei der Fragmentierung höherer Ordnung an *s/mar*-Elementen wie auch bei der inter-nukleosomalen Fragmentierung eine Rolle spielt (Lagarkova *et al.*, 1995; Oberhammer *et al.*, 1993; Widlak, 2000).

Ähnliche Mechanismen könnte es für die Camptothecin-induzierte Bildung von Topo I-DNA-Spaltungskomplexen bei paralleler Aktivierung von Apoptose geben. So wurden Topo I-Spaltungsstellen häufig in der Nähe von apoptotischen Spaltungsstellen des *MLLbcr*-Fragments gefunden (Mirault *et al.* 2006). Des Weiteren weist auch die *SV40*-Kontrollsequenz eine Topo I-Konsensussequenz auf.

Da Aphidicolin ebenfalls zur Aktivierung von Apoptose und damit von CAD, jedoch nicht zur Fixierung von Topoisomerasen an DNA-Substraten führt, und damit auch nicht zur Rekrutierung von CAD über Topo II an Sequenzen ohne *s/mar*-Eigenschaften, hat der kombinierte Topo II/CAD-Mechanismus möglicherweise keinen Einfluss auf die apoptotische Spaltung von DNA nach Aphidicolin-Behandlung. Doch könnte die alleinige Aktivität der CAD-Nuklease in der Fragmentierung höherer Ordnung zu einer spezifischen Spaltung in *s/mar*-Elementen wie *MLLbcr* führen, die unabhängig von Topoisomerasen ist.

Im chromosomalen Kontext konnte die *zVAD-fmk*-abhängige Reduktion des Rekombinationsanstiegs nach Etoposid- bzw. Camptothecin-Behandlung jedoch nicht detektiert werden. Meine Beobachtung, dass im chromosomalen Kontext die Caspase-vermittelte Apoptose keinen Einfluss hat, steht scheinbar im Gegensatz zu den Daten von Betti *et al.* (2003) und Mirault *et al.* (2006). Diese konnten zeigen, dass die apoptotische Spaltung innerhalb von der chromosomalen *MLLbcr* durch *zVAD-fmk*-Behandlung

aufgehoben werden konnte. Die Caspase-Unabhängigkeit des Rekombinationsanstiegs in meiner Arbeit könnte andererseits die These der Initiation von Rearrangements über die rein enzymatische Spaltung durch Topo II und möglicherweise auch Topo I, also Spaltung unabhängig von Apoptose, unterstützen (Aplan *et al.*, 1996; Ishii *et al.*, 2002; Lovett *et al.*, 2001; Moneypenny *et al.*, 2006; Strissel *et al.*, 1998a). Dies würde jedoch den Einfluss von zVAD-fmk auf die Daten mit extrachromosomalen Substrat für Etoposid und Camptothecin nicht erklären.

Mögliche Gründe für meine Beobachtungen könnten wie folgt sein:

Die Aktivierung von Caspase 3 führt, über die proteolytische Degradation von Reparaturproteinen, zur Inhibition der Reparatur und gleichzeitig über die Caspase 3-abhängige Aktivierung von Nukleasen wie CAD zur Induktion von DNA-Brüchen, die, trotz beginnenden Abbaus von HDR-Proteinen, repariert werden (Flygare *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1997; Mitamura *et al.*, 1998; Sordet *et al.*, 2004b; Sordet *et al.*, 2004a).

Kommt es zur Hemmung der Caspase 3-Aktivität über zVAD-fmk, führt dies einerseits zur Aufhebung des Abbaus der HDR-Proteine wie Rad51 und könnte demzufolge im beobachteten Anstieg der Rekombination im chromosomalen Kontext resultieren. Andererseits wird über die Behandlung mit zVAD-fmk möglicherweise die Nuklease-vermittelte Bruchinduktion und vielleicht sogar die Topo-Spaltungskomplex-vermittelte Bruchinduktion inhibiert und folglich die Reparatur gesenkt.

So konnte in Bezug auf die Ausbildung von Topo-Spaltungskomplexen gezeigt werden, dass sie zur vollständigen Apoptose-Antwort beitragen können. Es wurde beschrieben, dass die Inhibition der Topo I-Expression zur Senkung der apoptotischen Fragmentierung nach Staurosporin-Behandlung, einem Inhibitor von Adenosintriphosphat (ATP) abhängigen Proteinkinasen und nicht-genotoxischen Induktor der Apoptose, führte (Sordet *et al.*, 2004a). Ähnliches wurde für die Behandlung mit As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nachgewiesen, einem Apoptose-Induktor, der die intrazelluläre Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induziert und darüber auch zur Ausbildung von Topo I-Spaltungskomplexen beiträgt. Die Behandlung mit einem Caspase-Inhibitor verhinderte partiell die Bildung von Topo I-Spaltungskomplexen und Apoptose (Sordet *et al.*, 2004b). Möglicherweise führt die Behandlung mit Etoposid und Camptothecin also zum einen direkt zur Ausbildung von Topo-Spaltungskomplexen und indirekt zu einer weiteren Stabilisierung und Induktion dieser Komplexe über Caspasen, die durch Apoptose-Induktion der beiden Chemotherapeutika aktiviert wurde.

Abhängig von Stärke und Typ (glatte Brüche durch apoptotische Nukleasen, komplexe Brüche durch Etoposid/Camptothecin) des Bruch-induzierenden Signals und vom

experimentellen System könnten die beiden Effekte des Abbaus von Reparaturproteinen vs. der apoptotischen Bruchinduktion unterschiedlich gewichtet sein.

So könnte sich im extrachromosomalen Kontext der CAD-vermittelte Bruch-induzierende Effekt und die damit assoziierte Reparatursteigerung stärker auswirken als im chromosomalen Kontext, da aufgrund der hohen Kopienanzahl der Rekombinationsvektoren pro Zelle zahlenmäßig mehr apoptotische Brüche entstehen können als im chromosomalen Kontext mit einem Rekombinationskonstrukt pro Zelle. Dies spiegelt sich in den absoluten Werten der Rekombinationsmessungen wieder, die für den extrachromosomalen Kontext ca. 10-fach so hoch sind wie für den chromosomalen Kontext. So ist extrachromosomal die Bruch-induzierte Rekombinationssteigerung, und damit auch die zVAD-abhängige Hemmung dieses Anstiegs wahrscheinlich stärker als die gegenläufige Aufrechterhaltung der Reparaturaktivität nach Caspase 3-Inhibition. Hinzu kommt, dass im chromosomalen Kontext fehlerfreies NHEJ zum schnellen Wiederversiegeln von DNA-Brüchen beitragen könnte, wohingegen extrachromosomal vermutlich nicht alle Brüche über fehlerfreies NHEJ rasch versiegelt werden können. Dieses fehlerfreie NHEJ würde mit Hilfe des Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystems nicht detektiert werden. Tatsächlich stellt fehlerfreies NHEJ die Reparaturform dar, die DSBs innerhalb der ersten 2 h beseitigt wohingegen HDR und fehlerhaftes NHEJ zu späteren Zeiten aktiv werden (Riballo *et al.*, 2004). Da im Chromosom nur eine Kopie des Rekombinationssubstrats vorliegt, kann NHEJ Brüche rasch reparieren, es sei denn die Brüche sind dem fehlerfreien NHEJ aufgrund von Modifikationen oder Addukten, wie z.B. kovalent gebundenen Topo I- oder Topo II-Molekülen, nicht zugänglich. Das würde bedeuten, dass chromosomal vielmehr die Reparatur der genotoxischen Brüche als der apoptotischen Brüche nach Etoposid- oder Camptothecin-Behandlung detektiert wurden. Das extrachromosomal verstärkte Signal würde auch die Detektion der Caspase-abhängigen apoptotischen Bruchinduktion ermöglichen.

Interessanterweise zeigte die Behandlung mit zVAD-fmk keine Auswirkungen auf die *MLLbcr*-spezifische Stimulierung der Rekombination für Aphidicolin. Dies impliziert, dass entweder Caspase-unabhängige Apoptose (Kim *et al.*, 2005) oder der beschriebene gegenläufige Anstieg der Reparatur durch zVAD-fmk, der möglicherweise aufgrund des zwar signifikanten aber nur leichten rekombinationsstimulierenden Signals am *MLLbcr*-Fragment nach Aphidicolin-Behandlung hier auch im extrachromosomalen Kontext zur Aufrechterhaltung der Rekombinationsstimulierung beiträgt.

Gegen Ersteres sprechen die Ergebnisse nach der kombinierten Inhibition von CAD und Caspase, denn so konnte für die Aphidicolin-abhängige Stimulierung der Rekombination ein

synergistischer Effekt, in Form von einer spezifischen Reduktion der Rekombination für das *MLLbcr*-Fragment detektiert werden.

Die alleinige Caspase-Blockierung führte also zu keiner Reduktion der Stimulierung, möglicherweise aufgrund des fehlenden Abbaus von Reparaturproteinen. Die alleinige CAD-Blockierung führte zwar zu einer starken Reduktion der Stimulierung, doch konnte diese nicht spezifisch auf die Wirkung von Aphidicolin zurückgeführt werden, da auch unbehandelte Proben nach CAD-Inhibition reduzierte Rekombination aufwiesen. Ähnliche Ergebnisse konnten im chromosomalen Kontext nach Inhibition von CAD und Etoposid-Behandlung detektiert werden. Diese Sequenz-unspezifische Senkung ist möglicherweise mit der Elektroporation assoziiert, die sich auf die Fragilität der untersuchten DNA-*cis*-Elemente auswirken könnte, indem sie diese künstlich verstärkt, wobei das *MLLbcr*-Fragment grundsätzlich fragiler ist als Kontrollsequenzen (Abschnitt 4.1). Die Aktivierung von CAD durch Elektroporation wirkte sich demzufolge sowohl im extrachromosomalen als auch im chromosomalen Kontext auf alle untersuchten DNA-*cis*-Elemente aus. Des Weiteren führte Elektroporation mit einer hohen Gesamtmenge an CAD-inhibierenden Vektoren zur Verstärkung von Reparatur-steigernden Effekten wie Zellzyklusarrest nach Etoposid-Behandlung. Diese Sequenz-unabhängige Verstärkung von reparatursteigernden Effekte war ohne Elektroporation nicht zu detektieren, ist jedoch bereits zuvor von Nickoloff und Kollegen beobachtet worden (Nickoloff *et al.*, 1998). Die Nebeneffekte der Elektroporation verdeutlichen, dass zur Detektion von CAD-spezifischen Einflüssen auf die Rekombinationsstimulierung am *MLLbcr*-Fragment weniger toxische Transfektionsmethoden für die zu untersuchenden Zelllinien gefunden werden müssen. Dies war für die Brustkrebszelllinie T47D, in welcher eine Stimulierung der Rekombination spezifisch am *MLLbcr*-Fragment gezeigt werden konnte, über Lipofektion mittels *FuGENE<sup>®</sup>HD Transfection Reagent* (Roche, Mannheim) bereits möglich. Damit kann zukünftig die Problematik der Transfektions-Toxizität gemindert werden.

Trotz der Elektroporations-abhängigen Effekte konnte, wie bereits erwähnt, für Aphidicolin eine spezifische Reduktion des Rekombinationsanstiegs am *MLLbcr*-Fragment nach kombinierter Inhibition von Caspase 3 und CAD gezeigt werden. In Bezug auf diese Reduktion verdeutlicht das in Abb. 38 dargestellte Schema ein mögliches Szenario zum Ablauf der zellulären Prozesse.



Reduktion der Rekombinationssteigerung detektiert zu werden. Die Hypothese einer CAD-abhängigen Induktion von *MLL*-Rearrangements konnte für Etoposid bereits untermauert werden. So stimulierte Etoposid die Bildung von *MLL*-Fusionsprodukten in CAD cDNA-komplementierten MEF (murine embryonale Fibroblasten)-Zellen, aber nicht in CAD-*knockout*-MEFs (Hars *et al.*, 2006).

Das Konzept einer CAD-abhängigen spezifischen Stimulierung der Rekombination für Aphidicolin bietet möglicherweise auch eine Erklärung für den fehlenden Aphidicolineffekt im chromosomalen Kontext. So ist beschrieben, dass die Nuklease CAD eine strikte Spezifität für doppelsträngige DNA aufweist (Widlak, 2000; Widlak and Garrard, 2005) und Aphidicolin nach Blockierung DNA Polymerase  $\delta$  zur Dissoziation dieser von der Replikationsgabel führt. Es konnte gezeigt werden, dass Initiationsfaktoren der Replikation wie *Mcm3* (*minichromosome maintenance deficient 3*) nach Aphidicolin-Behandlung jedoch nicht von der Replikationsgabel dissoziierten und es zu einer Akkumulation von RPA34 (*replication protein A 34*) kam. Dies implizierte, dass die DNA-Synthese zwar blockiert wurde, aber die Progression der Replikationsgabel selbst fortschritt und zu langen Abschnitten RPA-bedeckter einzelsträngiger DNA führte (Gorisch *et al.*, 2008). Im chromosomalen Kontext des Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem könnte Aphidicolin auf der Basis benachbarter eukaryotischer Replikationsstartpunkte direkt über die Inhibition der Replikation am *MLLbcr*-Fragment angreifen. Diese Inhibition würde zur Entwindung des *MLLbcr*-Fragments führen und damit zu dessen Einzelsträngigkeit. Die parallele Apoptose-Induktion durch Aphidicolin und damit die mögliche CAD-Aktivierung würde demzufolge nicht zur spezifischen Spaltung des chromosomalen *MLLbcr*-Fragments führen, da CAD ausschließlich doppelsträngige DNA erkennt. Extrachromosomal bleibt das *MLLbcr*-Fragment jedoch doppelsträngig da wie bereits erwähnt keine eukaryotischen Replikationsstartpunkte in den Vektoren vorliegen und somit keine Replikations-abhängige DNA-Entwindung stattfinden kann. Der Einfluss von CAD-abhängiger Bruchinduktion, die zur spezifischen Stimulierung der Rekombination am *MLLbcr*-Fragment führt, bleibt detektierbar.

Trotz dieser möglichen Szenarios zeigt die Komplexität der Effekte sowie der Einfluss Methodik-bezogener toxischer Nebeneffekte, dass weitere Analysen in einem weniger toxischen System nötig sind. Ein *screening* mit singulärer und kombinierter Inhibition verschiedener Apoptose-relevanter Nukleasen und anderer, DNA-Reparatur und Apoptose-verknüpfender Faktoren könnte das Bild der Apoptose-vermittelten Instabilität der *MLLbcr* vervollständigen.

#### **4.4 Einfluss von NFκB auf die Sequenz-unabhängige Stimulierung der Rekombination an DNA-*cis*-Elementen nach Behandlung mit Etoposid und Camptothecin**

Für die Frage nach dem Einfluss zytotoxischer Agenzien auf die Stabilität des *MLL*bcr-Fragments ist von Bedeutung, ob es neben den direkten Effekt der Genotoxizität und den indirekten Effekten durch Zellzyklusverschiebungen weitere Mechanismen gibt, die durch chemotherapeutische Behandlung aktiviert werden und zu einer Sequenz-unabhängigen Steigerung der Reparatur beitragen. Die Detektion solcher Mechanismen könnte weiter aufklären helfen wie es zur fehlerhaften Reparatur am *MLL*bcr-Fragment nach Chemotherapie-Behandlung kommt, und damit zur Entwicklung leukämogener Rearrangements, anstatt zur Vernichtung der chemotherapeutisch behandelten Zelle. In Bezug darauf ist der Transkriptionsfaktor NFκB (*nuclear factor-κB*) ein interessantes Protein, für den sowohl eine Aktivierung über Etoposid als auch über Camptothecin nachgewiesen werden konnte (Huang *et al.*, 2000; Wuerzberger-Davis *et al.*, 2007). Für NFκB wurden sowohl pro-apoptische als auch anti-apoptische Effekte gezeigt. In Bezug auf Letzteres konnte z.B. nachgewiesen werden, dass Fibroblasten aus NFκB-*knockout* Mäusen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber den zytotoxischen Effekten von TNF-α (Tumornekrosefaktor-α) haben (Bellas *et al.*, 1997). Zusätzlich zeigten Ergebnisse von M. Volčič, einer Doktorandin unserer Arbeitsgruppe, dass die Aktivierung von NFκB nach TNF-α-Behandlung in Abhängigkeit von dem Reparaturfaktor BRCA1 zur Steigerung der homologen Rekombination in erythroblastoiden Zellen führte.

Im Zusammenhang mit diesen Daten konnte über den Nachweis der Degradation des Inhibitors von NFκB (IκB) in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl Etoposid als auch Camptothecin zur Aktivierung des NFκB-Signalwegs in der lymphoblastoiden Zelllinie WTK1 führen. Parallel dazu wurde für beide Chemotherapeutika nach 24 h eine Reduktion des Sequenz-unabhängigen Rekombinationsanstiegs im extrachromosomalen Kontext detektiert, wenn NFκB durch die dominant negative Variante von IκBα inhibiert wurde. Diese Reduktion war auch nach 48 h noch sichtbar, wurde dann aber teilweise von anderen rekombinationssteigernden Effekten, wie z.B. der Manifestation des Zellzyklusarrests, überlagert.

Die Reduktion der Rekombinationsstimulierung nach Etoposid- und Camptothecin-Behandlung und Blockierung der NFκB-Aktivität verhielt sich ähnlich wie nach Caspase-Inhibition über zVAD-fmk. So wurde für Etoposid eine vollständige Aufhebung des

stimulierenden Reparatureffekts und für Camptothecin eine partielle Reduktion detektiert. Beide Effekte waren sowohl für Etoposid als auch für Camptothecin Sequenz-unabhängig. Der mögliche Zusammenhang zwischen der Reparatur-stimulierenden Aktivierung von NFκB über Etoposid bzw. Camptothecin nach Wuerzberger-Davis *et al.* (2007) und der Etoposid bzw. Camptothecin-vermittelten Bruchinduktion an den DNA-*cis*-Elementen wird in Abb. 39 schematisch verdeutlicht. Abb. 39 stellt dar, dass die Aktivierung von NFκB über die Degradation von IκB (*inhibitor of NFκB*) nach Phosphorylierung durch IKK (*IκappaB kinase*) erfolgt, wobei IKK über die Kombination aus ATM (*ataxia telangiectasia mutated*)-Kinase-Aktivierung und SUMOylierung (*small ubiquitin-like modifier*) von NEMO (*NFκB essential modulator*) aktiviert wird (Wuerzberger-Davis *et al.*, 2007).

Des Weiteren zeigt Abb. 39, dass die Detektion der Reparatur-Stimulation nach Etoposid bzw. Camptothecin-Behandlung möglicherweise über die Kombination zweier Effekte abläuft: (i) Die Bruch-Induktion über Caspase 3-vermittelte Apoptose und (ii) Die Stimulation der Rekombination dieser Brüche nach Aktivierung von NFκB und unter möglicher Beteiligung des Reparaturfaktors BRCA1.

Für Aphidicolin, welches in diesem Zusammenhang in dieser Arbeit nicht getestet wurde, könnte ein ähnlicher Mechanismus existieren. So konnte gezeigt werden, dass auch Aphidicolin über einen ATM-abhängigen Signalweg zur Aktivierung von NFκB führt (Wu and Miyamoto, 2008). Die *MLLbcr*-spezifischen Brüche im extrachromosomalen Kontext könnten demzufolge ebenfalls über den Reparatur-steigernden Effekt von NFκB nach Aphidicolin-Behandlung wiederversiegelt werden (Abb. 39).

Zusammengefasst implizieren die Daten, dass das *MLLbcr*-Fragment, als eine hochfragile Sequenz, die nach chemotherapeutischer Behandlung zusätzlicher Instabilität unterliegt, über einen NFκB-abhängigen Mechanismus repariert werden kann und über diesen Prozess möglicherweise zur Entwicklung genetischer *MLL*-Rearrangements beiträgt.

Trotz dieser möglichen Zusammenhänge aufgrund der Ergebnisse im extrachromosomalen Kontext konnte im chromosomalen Kontext nach NFκB-Inhibition keine Reduktion der Etoposid- bzw. Camptothecin-induzierten *MLLbcr*-spezifischen Rekombinationsstimulation detektiert werden. Möglicherweise steht der fehlende Einfluss von NFκB im Zusammenhang mit der geringeren Zahl an reparierbaren Brüchen der pro Zelle einmalig chromosomal integrierten Rekombinationskonstrukte. Hier sind detaillierte Untersuchungen nötig um die Reparatur-stimulierenden Prozesse aufzuklären.

Zusätzlich wird im weiteren Verlauf der Studien von Interesse sein, ob NFκB zur verstärkten Induktion von bestimmten fehlerhaften Reparaturformen wie dem Mikrohomologie-gerichteten

NHEJ oder SSA führt. Der in dieser Arbeit verwendete Rekombinationsvektortyp detektiert sowohl HR als auch SSA und ist zu einer Unterscheidung dieser Reparaturwege nicht geeignet. Die chromosomalen Daten, bei denen im Gegensatz zu den extrachromosomalen Daten kein Einfluss des aktivierten NFκB auf die Stimulierung der Reparatur an den DNA-*cis*-Elementen detektiert werden konnte, lassen offen, ob im chromosomalen Kontext möglicherweise NFκB zur Aktivierung der Reparatur über NHEJ führt. Dies ist interessant, da charakteristische DNA-Modifikationen, wie kurze Deletionen, oftmals an *MLL*-Translokationspunkten detektiert wurden (Reichel *et al.*, 2001b; Reichel *et al.*, 1998)

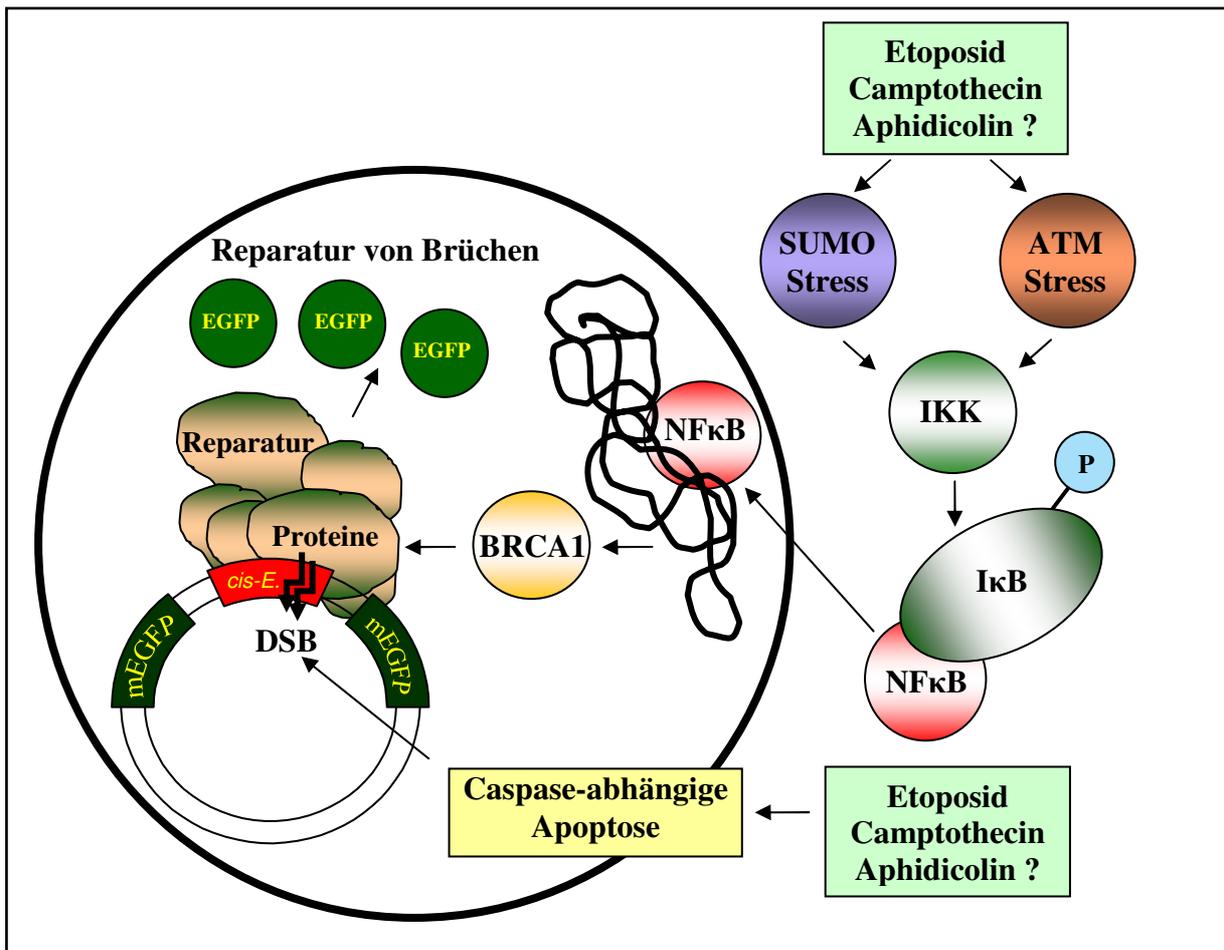


Abb. 39 Schema zur NFκB-Aktivierung über Etoposid und Camptothecin nach Wuerzberger-Davis *et al.* (2007) im Zusammenhang mit der Stimulierung von HDR an den DNA-*cis*-Elementen (*cis*-E.) nach Etoposid- bzw. Camptothecin- vermittelter DSB-Induktion (Doppelpfeile).

## 4.5 PARP-1 antagonisiert die Topo I-abhängige Stimulierung der Rekombination über p53

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde das Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem genutzt, um das Zusammenspiel zwischen den Reparatur-relevanten Faktoren p53, Topoisomerase I (Topo I) und Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 (PARP-1) auf die Rekombination an DNA-Sequenzen mit Topo I-Erkennungssequenzen zu analysieren.

In diesem Zusammenhang wurde hier für PARP-1 eine negativ regulatorische Rolle in der Rekombination gezeigt. Es blieb jedoch unklar, ob PARP-1 an der HDR und/oder an alternativen Signalwegen der Rekombination beteiligt ist (Schultz *et al.*, 2003; Susse *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PARP-1, in einer von der DNA-Replikation und spezifischen DNA-Sequenzen unabhängigen Weise, die HDR an einem künstlich erzeugten DBS im Chromosom ebenso reduziert wie die Rekombination an verschiedenen extrachromosomalen Vektorsubstraten. Die PARP-DBD (PARP-DNA-Bindedomäne), die keine Poly(ADP-Ribosyl)ierende Aktivität besitzt, war ähnlich effektiv wie das Gesamtprotein PARP-1. Dies indiziert, dass der zugrundeliegende Mechanismus auf der direkten Bindung des Proteins an das DNA-Substrat, über die Enden oder sekundäre Strukturen, beruht (Potaman *et al.*, 2005). Dieses Konzept wird durch die Entdeckung, dass die PARP-DBD die Wiederversieglung von DSBen inhibiert, unterstützt (Rudat *et al.*, 2001). Sowohl p53 als auch Topo I repräsentieren Bindungspartner von PARP-1 und sind Substrate der Poly(ADP)Ribosylierung. Des Weiteren spielen beide eine Rolle in der Rekombination (Bauer *et al.*, 2001; Boehden *et al.*, 2004; Ferro and Olivera, 1982; Gatz and Wiesmuller, 2006; Kumari *et al.*, 1998; Vaziri *et al.*, 1997; Wesierska-Gadek *et al.*, 1996; Yung *et al.*, 2004). Darum wurden in dieser Arbeit mögliche Verbindungen zwischen PARP-1, p53 und Topo I in der spontanen und DSB-induzierten Rekombination näher untersucht. In vorangegangenen Studien, mit Hamsterzellen mit mutierten p53, embryonalen Stamzellen, in denen p53 inaktiviert vorlag oder in embryonalen Fibroblasten mit p53-Genmutationen, könnten funktionelle Interaktionen zwischen PARP-1 und Wildtyp p53 durchaus übersehen worden sein (Schultz *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse meiner RNA Interferenz-Experimente demonstrieren zum ersten mal, dass p53 in einer ausschließlich von Topo-I abhängigen Weise die Rekombination stimulieren kann. Dies ist konsistent mit einem vorangegangenen Befund unserer Arbeitsgruppe, der eine ähnliche Steigerung der Rekombination über p53-Expression oder Behandlung mit Camptothecin zeigte (Boehden *et al.*, 2004). Dieser stimulierende Effekt war nur detektierbar,

wenn das DNA-Rekombinationssubstrat in Nachbarschaft von Topo I-Erkennungsstellen innerhalb viraler oder zellulärer Chromosomen lokalisiert war (Baumann *et al.*, 2006). Das könnte bedeuten, dass die Kooperation zwischen p53 und Topo I vom Chromatinkontext abhängt. In Bezug darauf ist interessant, dass für p53 eine Rolle bei der Regulation der Chromatin-Remodellierung gezeigt wurde. Durch p53 werden möglicherweise die Stellen der Topo I-Aktivität zugänglich gemacht (Rubbi and Milner, 2003). Topo I interagiert präferentiell mit *supercoiled* DNA. Dies könnte alternativ die Basis für die Rekrutierung von Topo I an die DNA im Chromatinkontext sein (Madden *et al.*, 1995).

Die Steigerung der Rekombination konnte nicht mehr beobachtet werden sobald künstliche DSBe in das DNA-Substrat eingeführt wurden. Stattdessen wurde eine Reduktion der Rekombination nach wt-p53-Expression beobachtet. In ähnlicher Weise dominierte an nackter Vektor-DNA die inhibierende Rolle von wt-p53 als Kontrollfaktor für Rekombinationsgenauigkeit über die stimulierende Topo I-abhängige Steigerung der Rekombination (Dudenhoffer *et al.*, 1998; Gatz and Wiesmuller, 2006). Diese Beobachtungen legen nahe, dass p53 und Topo I in einem Signalweg kooperieren, der die Rekombinogenität von DNA-Substraten erhöht, was jedoch bei der Verfügbarkeit von hochrekombinogener DNA wie der *MLLbc*r irrelevant wird. Die stimulatorische Rolle von p53 könnte einfach durch die Stimulation der Relaxationsaktivität zur Auflösung torsionaler Spannungen von Topo I erreicht werden (Albor *et al.*, 1998; Gobert *et al.*, 1999). Eine andere mögliche Erklärung leitet sich von biochemischen Untersuchungen von Topo I-DNA-Komplexen ab. Hierbei wurde demonstriert, dass Topo I-DNA-Komplexe von einer zusätzlichen Topo I erkannt werden können um einen sogenannten DNA-Doppel-Spaltungskomplex zu bilden. Die Freisetzung von einem Spaltungskomplex zusammen mit dem Oligonukleotid, welches die DNA-Läsion einschließt, führt zu einer einzelsträngigen DNA-Lücke. Diese Lücke stellt eine mögliche Invasionsstelle für einen fremden komplementären DNA-Strang dar. p53 wiederum hat einen signifikanten stimulatorischen Effekt auf diese Doppel-Spaltungsreaktion und auf die resultierenden Rekombinations-vermittelten Reparaturereignisse (Soe and Grosse, 2003; Soe *et al.*, 2002; Stephan *et al.*, 2002).

Als die p53-vermittelte Stimulierung der Rekombination an den SV40 (alle SV40-Experimente wurden von G. Boehden durchgeführt) und zellulären Chromosomen detektiert wurde, antagonisierte die Koexpression von PARP-1 diesen Topo I-abhängigen Effekt (Baumann *et al.*, 2006). Es ist bekannt, dass Einzelstrangbrüche (SSBs), inklusive derer die durch Stabilisation des Topo I-DNA-Spaltungskomplexes verursacht werden, an der Replikationsgabel in DSBe konvertiert werden (Strumberg *et al.*, 2000). Die anti-

rekombinogenen Effekte von PARP-1 könnten daher theoretisch über dessen Aktivitäten in der Reparatur von SSBs verursacht werden (Dantzer *et al.*, 2000). Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass SSB-Reparaturaktivitäten eine Rolle bei der p53- und TopoI-abhängigen Stimulierung der Rekombination spielen, da sehr gut dokumentiert ist, dass p53, als Antwort auf die DSB-Bildung, die Rekombination viel eher inhibiert als stimuliert (Saintigny *et al.*, 2002; Wieler *et al.*, 2003).

Die Expression von PARP-1 hatte keinen bedeutenden Einfluß auf das Muster der DNA-Replikation oder auf die S-Phase Progression unter den Bedingungen der SV40-basierten (Baumann *et al.*, 2006) und Fluoreszenz-basierten Rekombinationsmessungen. Dies deutet darauf hin, dass Replikationsstress beim hier beschriebenen antagonistischen Effekt von PARP-1 keine Rolle spielt.

Es wurde gezeigt, dass PARP-1, insbesondere durch die trans-Poly(ADP-Ribosyl)ierung von Histonen und HMG (*high mobility group*)-Proteinen an der Chromatinkondensation und Dekondensation beteiligt ist (Faraone-Mennella, 2005; Huber *et al.*, 2004). Des Weiteren steigern Histone die Bindung von PARP-1 an DNA (Sastry and Kun, 1988). Darum könnte PARP-1 möglicherweise in den Topo I-Signalweg über Aktivitäten in der Chromatin-Remodellierung eingreifen. Unter den Bedingungen der p53-vermittelten Stimulierung der Rekombination, aber ohne exogen exprimiertes p53, zeigte PARP-1 jedoch keine signifikanten regulatorischen Aktivitäten auf die Rekombination (Baumann *et al.*, 2006). Dies impliziert, dass PARP-1 im Allgemeinen keinen direkten regulatorischen Einfluss auf Topo I-abhängige Rekombinationsereignisse hat. Es erscheint vielmehr so, dass PARP-1 den Effekt von p53 auf Topo I spezifisch revertiert. Diese Ergebnisse sind überraschend, da PARP-1 die DSB-Reparatur unabhängig von p53 senkt (Süsse *et al.* 2004 und diese Arbeit). Schlußfolgernd muss eine biochemische Aktivität von PARP-1, die sich von ihrer katalytischen Aktivität unterscheidet, für die Modulation von p53/Topo I-Aktivitäten, die zur Steigerung der Rekombination führen, verantwortlich sein.

Wichtige Anhaltspunkte zum Mechanismus, der der antagonistischen Wirkung von PARP-1 in der p53/Topo I-geförderten Rekombination zugrunde liegt, könnten von den Ergebnissen mit der PARP-DBD abgeleitet werden. Die PARP-DBD repräsentiert in Bezug auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung eine dominant negative PARP-1 Mutante (Kupper *et al.*, 1990; Kupper *et al.*, 1995). Es wurde gezeigt, dass kovalente Poly(ADP-Ribosyl)ierung Topo I inhibiert (Ferro and Olivera, 1984). Auf der anderen Seite wurde demonstriert, dass Poly(ADP-Ribose)-Bildung das Wiederversiegeln von Brüchen über Topo I steigert (Malanga and Althaus, 2004). Konsistent damit wurde demonstriert, dass die Rekrutierung von XRCC1

und DNA-Ligase III über PARP-1 ebenso wie die Wiederversiegelung von DSBen über den neuen PARP-1/XRCC1/DNA-Ligase III-Pfad auf der Poly(ADP-Ribose)-synthese beruht (Audebert *et al.*, 2004; Leppard *et al.*, 2003; Masson *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 2002). Da die Poly(ADP-Ribosyl)ierung in der PARP-DBD nicht aber der PARP-1 unterdrückt ist, kann dieser Mechanismus den anti-rekombinogenen Effekt in dieser Studie nicht erklären, da mit PARP-DBD und PARP-1 bei der Fluoreszenz-basierten Messung der spontanen Rekombination an zellulären Chromosomen keine signifikanten Unterschiede detektiert wurden. Ein Schlüssel zur Klärung dieses Rätsels könnte von Kartierungsstudien kommen, die Interaktion der PARP-1-Domäne mit Topo I zeigten und dass PARP-DBD ausreichend ist für eine Bindung mit Topo I (Bauer *et al.*, 2001). Interessanterweise kann p53 Topo I in dessen zentraler Region (As 140-484) binden, in einer Region, die mit den PARP-1 Interaktionsbereichen von As 209-400 und 626-765 überlappt (Bauer *et al.*, 2001; El-Hizawi *et al.*, 2002; Park and Cheng, 2005). Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass PARP-1 mit p53 um die Bindung mit Topo I konkurriert oder PARP-1 die p53/Topo I-DNA-Komplexe sogar destabilisiert.

Die kovalenten Topo I-DNA Komplexe können über das chemotherapeutische Agens Camptothecin (Svejstrup *et al.*, 1991) und über verschiedenen DNA-Läsionen (Pourquier *et al.*, 1999) stabilisiert werden. p53 steigert die Dissoziation von Topo I-Molekülen, die kovalent an DNA gebunden sind. Dies repräsentiert, insbesondere wenn Topo I an der geschädigten DNA festsetzt, den limitierenden Schritt während der Topo I-vermittelten Reparatur (Soe and Grosse, 2003). Entsprechend weiterer Daten könnte p53 die proteasomale Degradation von Topo I auslösen und somit die komplette Entfernung beschleunigen (Tomicic *et al.*, 2005).

Im Gegensatz dazu scheint PARP-1, über die PARP-DBD, die Bindungsaffinität von Topo I für Substrat-DNA zu steigern und die Ausbildung von kovalenten Topo I-DNA-Komplexen zu stimulieren (Bauer *et al.*, 2001; Park and Cheng, 2005). Obwohl beide Faktoren einen Netto-Anstieg der Topo I-Aktivität verursachen (Bauer *et al.*, 2001; Soe *et al.*, 2002; Yung *et al.*, 2004) könnten die gegensätzlichen Effekte von p53 und PARP-1 für die Dynamik von Topo I-DNA-Komplexen die molekulare Basis für die direkt antagonisierende Aktivität in der Rekombination sein.

Es wurde demonstriert, dass wt-p53 als Antwort auf DNA-Schädigung Topo I an genomische DNA rekrutiert (Gobert *et al.*, 1999; Mao *et al.*, 2002; Radford, 2002). Yung *et al.* (2004) zeigten, dass PARP-1 und Topo I während des gesamten Zellzyklus kolokalisieren, aber in Erwiderung auf DNA-Schädigung diese PARP-1-Topo I Interaktionen, aufgrund der PARP-1 Automodifikation, unterbrochen werden. Dies impliziert, dass Topo I über spezifische

Komplexpartner, die mit Topo I in einer sich gegenseitig ausschließenden Weise interagieren, mit verschiedenen zellulären Prozessen assoziiert ist. Dementsprechend repräsentiert p53 möglicherweise die molekulare Verbindung zur rekombinativen Reparatur von spezifischen DNA-Läsionen, wie komplexen DSBen, die über ionisierende Strahlung generiert und nur langsam repariert werden. PARP-1 könnte diese Aktivität in ungeschädigten, proliferierenden Zellen blockieren und Topo I eher mit Transkription und DNA-Replikation verknüpfen. Jegliche Verlagerung dieser empfindlichen Balance zwischen den verschiedenen Topo I-Funktionen würde dramatische Auswirkungen auf die zelluläre genomische Stabilität haben, da festsitzende Topo I-DNA Komplexe illegitime Rekombinationsereignisse mit Topo I Molekülen, die andernorts im Genom gebunden sind, initiieren (Gobert *et al.*, 1999; Radford, 2002; Zhu and Schiestl, 1996).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

*MLL* (*mixed lineage leukemia*)-Translokationen gehören zu den häufigsten Translokationen in hämatologischen Malignitäten, so weisen 3-10 % der Patienten mit Akut myeloischer Leukämie und 8-10 % der Patienten mit B-Linien-Akut lymphatischer Leukämie *MLL*-Translokationen auf. Die meisten Translokationsbruchpunkte konnten in einer 8,3 kbp großen Bruchpunkt-(Cluster)-Region (*bcr*) lokalisiert werden. Im telomeren Abschnitt dieser Region befinden sich vorwiegend *MLL*-Bruchpunkte von Fällen der Kleinkind-Leukämie und der Therapie-induzierten Akut myeloischen Leukämie. Letztere wurden mit der Behandlung über chemotherapeutische Agenzien, insbesondere mit dem Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid, assoziiert und führten zu zwei Theorien.

Erstere impliziert, dass Etoposid über seinen genotoxischen Mechanismus zur Blockierung der Topoisomerase II-abhängigen Wiederversiegelung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBen) in der *MLLbcr* führt, die durch die Topoisomerase II-Aktivität vorher induziert wurden. Die zweite Theorie besagt, dass nicht die genotoxischen Effekte direkt, sondern die Chemotherapie-induzierte Apoptose in ihrer frühen Phase über die Aktivierung von Nukleasen zur Bruchentstehung in der *MLLbcr* führt.

Um sowohl die Bruch-induzierenden- als auch die Reparatur-Mechanismen an der *MLLbcr* im Vergleich zu Kontrollsequenzen ohne und nach Chemotherapeutika-Behandlung näher zu untersuchen, wurde ein Fluoreszenz-basiertes Rekombinations-Testsystem gentechnisch modifiziert. Dieses Testsystem basiert auf transfizierbaren und chromosomal integrierbaren Vektoren, die zwei hintereinander geschaltete mutierte *EGFP* (*enhanced green fluorescent protein*)-Gene (5'-3' → Akzeptor-EGFP -*spacer*- Donor-EGFP) tragen. Zwischen diese beiden Gene wurde ein 0,4 kbp großes Fragment des telomeren Abschnitts der *MLLbcr* oder ähnlich große Kontrollsequenzen integriert. Führten spontane oder chemotherapeutisch induzierte Brüche innerhalb dieser Regionen zur Reparatur über konservative homologe Rekombination oder *single strand annealing* konnte dies zur Rekonstitution des Wildtyp-Akzeptor-EGFPs führen. Die Expression von Wildtyp-EGFP innerhalb der humanen Zelllinien, welche entweder mit Rekombinationsvektor transfiziert waren (extrachromosomaler Kontext) oder die Rekombinationskonstrukte chromosomal integriert trugen (chromosomaler Kontext) konnte über eine durchflusszytometrische Analyse quantifiziert werden.

Auf der Basis der detektierten Rekombinationsereignisse in Verbindung mit zusätzlichen Ergebnissen durch Methoden der Bruch-, Zellzyklus- und Apoptose-Analyse konnte auf die

den *MLL*-Rearrangements zugrunde liegenden Mechanismen geschlossen werden.

Es zeigte sich, dass das *MLLbcr*-Fragment im Vergleich zu Kontrollsequenzen bereits ohne chemotherapeutische Behandlung unabhängig vom chromosomalen Kontext instabil war. Die chemotherapeutische Behandlung mit verschiedenen zytotoxischen Agenzien, wie Etoposid, Camptothecin, 5-Fluorouracil, MNNG und Paclitaxel zeigte, daß sowohl Zellzyklus-abhängige, genotoxische und apoptotische Effekte auf die *MLLbcr*-spezifische als auch Sequenz-unabhängige Rekombination Einfluss haben. Für die Behandlung mit dem Replikations-inhibierenden Agens Aphidicolin wurde im extrachromosomalen Kontext ein *MLLbcr*-spezifischer Anstieg der Rekombination detektiert. Dieser Anstieg war über den Ausschluss von Genotoxizität und Zellzyklus-abhängigen Effekten sowie über den Nachweis einer Reduktion der Rekombinationsstimulierung nach kombinierter Inhibition der Apoptose-relevanten Faktoren Caspase 3 und CAD (*caspase-activated DNase*) auf Apoptose-induzierte Mechanismen zurückzuführen.

Des Weiteren konnte für Etoposid und Camptothecin im extrachromosomalen Kontext ein über die Aktivierung von NFκB vermittelter Reparatur-stimulierender Mechanismus detektiert werden, der zwar Sequenz-unabhängig war, jedoch aufgrund der erhöhten Instabilität von *MLLbcr* insbesondere zur Entwicklung von *MLL*-Rearrangements beitragen könnte.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde das Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem genutzt, um das Zusammenspiel zwischen den Reparatur-relevanten Faktoren p53, Topoisomerase I und Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 (PARP-1) auf die Rekombination an DNA-Sequenzen mit Topoisomerase I-Erkennungssequenzen zu analysieren. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatten in einem Rekombinations-Testsystem basierend auf dem Austausch zwischen SV40-Minichromosomen gezeigt, dass die Reparatur an einem Topoisomerase I-Erkennungssequenzen tragenden DNA-Fragment durch die Aktivität von p53 stimuliert wurde und PARP-1 dieser Stimulierung entgegenwirkte.

Parallel dazu konnte in dieser Arbeit über das Fluoreszenz-basierte Rekombinations-Testsystem im Kontext zellulärer Chromosomen ein ähnlicher Effekt detektiert werden. Des Weiteren führte eine siRNA-vermittelte Inhibition der Expression von Topoisomerase I zur Detektion einer essentiellen Rolle dieses Enzyms innerhalb des p53-vermittelten Rekombinations-stimulierenden Mechanismus. Darüber hinaus indizierten weitere Daten, dass PARP-1, vielmehr über eine direkte Interaktion mit Topoisomerase I als über dessen Poly(ADP-Ribosyl)ierende Eigenschaft, p53 von der Stimulierung der spontanen Rekombination über Topoisomerase I am Chromosom abhält.

## 6 SUMMARY

*MLL* (*mixed lineage leukemia*) translocations belong to the most common translocations underlying hematologic malignancies. Approximately 3-10 % of the patients with acute myeloid leukemia and 8-10 % of the patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia have *MLL* translocations. Most *MLL* translocation breakpoints can be mapped to an 8.3 kb breakpoint cluster region (bcr). *MLL* breakpoints in patients with infant-leukemia or therapy-related leukemia are predominantly localized within the telomeric part of the *MLL*bcr. The development of therapy-related leukemia was linked to chemotherapeutic treatment, especially with topoisomerase II inhibitor etoposide. This correlation resulted in two theories. The first theory implies that etoposide causes blockage of topoisomerase II-activities at the stage of DNA double-strand break (DSB) resealing after generation of the same, thereby causing a genotoxic effect.

The second theory postulates that not genotoxic effects but chemotherapy-induced apoptotic nucleases leads to the formation of breaks within the *MLL*bcr at an early stage of apoptosis.

To investigate the consequences of both, breakage and repair processes at the *MLL*bcr in comparison to control sequences with and without chemotherapeutic treatment, I correspondingly adapted a fluorescence based recombination test system by genetic engineering. This test system is based on transiently transfected or chromosomally integrated vector constructs that carry two mutated *EGFP* (*enhanced green fluorescent protein*)-genes in series (5'-3' → acceptor-*EGFP* -*spacer*- donor-*EGFP*). A 0.4 kb fragment of the *MLL*bcr telomeric region and control fragments of similar size, respectively, were integrated as spacer sequences between both genes. Whenever spontaneous or chemotherapeutically induced breaks within these integrated fragments were repaired by conservative homologous recombination or single strand annealing, these processes possibly resulted in the reconstitution of the wildtype-acceptor *EGFP*. Expression of wildtype-EGFP in the human cell lines that had been transfected with a recombination vector (extrachromosomal context) or carried a stably integrated recombination-construct (chromosomal context) was quantified by flow cytometric analysis.

On the basis of the recombination events detected in this way together with results from breakage, cell cycle and apoptosis analyses it was possible to draw conclusions on the mechanisms underlying *MLL*-rearrangements.

It turned out, that the *MLL*bcr-fragment was highly fragile in comparison to control sequences even without chemotherapeutic treatment and independently of the chromosomal context.

Chemotherapeutic treatment with different cytotoxic agents, like etoposide, camptothecin, 5-fluorouracil, MNNG, or paclitaxel, revealed that cell cycle-dependent, genotoxic and apoptotic effects had an impact on both *MLL*bcr-specific and sequence-independent recombination.

Treatment with aphidicolin, a replication-blocking agent, resulted in an *MLL*bcr-specific increase of recombination in the extrachromosomal context. This increase was traced back to apoptotic mechanisms, because genotoxic and cell cycle-dependent effects could be excluded and, more importantly, because recombination stimulation was reduced after combined inhibition of the apoptotic factors, caspase 3 and CAD (caspase-activated DNase).

Furthermore in the extrachromosomal context etoposide and camptothecin were shown to activate an NFκB-mediated repair-stimulating mechanism that was sequence-independent, but was particularly effective at the *MLL*bcr due to high intrinsic fragility thereby contributing to the mechanisms causing *MLL*-rearrangements.

In second part of my project the fluorescence-based recombination test system was used to analyse the interplay between the repair factors p53, topoisomerase I and poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in recombination at DNA sequences with topoisomerase I-recognition sites.

Preceding data had revealed p53-dependent enhancement of homologous recombination at a DNA-fragment comprising topoisomerase I-recognition sites by application of a recombination test system that was based on genetic exchange between SV40-minichromosomes. This p53-dependent effect was counteracted by PARP-1.

In this work, I made corresponding observations by use of the fluorescence-based recombination test system and newly demonstrated the critical role of the chromatin context. In addition, siRNA-mediated knockdown of topoisomerase I expression revealed the essential contribution of this enzyme in this regulatory mechanism. Further data indicated that PARP-1, probably through physical topoisomerase I interactions rather than through poly(ADP-ribosyl)ation, prevents p53 from stimulating spontaneous homologous recombination on chromosomes via topoisomerase I activity.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Adams DJ, Wahl ML, Flowers JL, Sen B, Colvin M, Dewhirst MW *et al* (2006). Camptothecin analogs with enhanced activity against human breast cancer cells. II. Impact of the tumor pH gradient. *Cancer Chemother Pharmacol* **57**: 145-54.

Agarwal S, Tafel AA, Kanaar R (2006). DNA double-strand break repair and chromosome translocations. *DNA Repair (Amst)* **5**: 1075-81.

Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**: 301-13.

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

Akyüz N, Boehden GS, Susse S, Rimek A, Preuss U, Scheidtmann KH *et al* (2002). DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **22**: 6306-17.

Albor A, Kaku S, Kulesz-Martin M (1998). Wild-type and mutant forms of p53 activate human topoisomerase I: a possible mechanism for gain of function in mutants. *Cancer Res* **58**: 2091-4.

Alcalay M, Zangrilli D, Pandolfi PP, Longo L, Mencarelli A, Giacomucci A *et al* (1991). Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor alpha locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1977-81.

Alexander FE, Patheal SL, Biondi A, Brandalise S, Cabrera ME, Chan LC *et al* (2001). Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer Res* **61**: 2542-6.

Altmann KH, Gertsch J (2007). Anticancer drugs from nature--natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. *Nat Prod Rep* **24**: 327-57.

Andersen MK, Christiansen DH, Jensen BA, Ernst P, Hauge G, Pedersen-Bjergaard J (2001). Therapy-related acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangements following DNA topoisomerase II inhibitors, an increasing problem: report on two new cases and review of the literature since 1992. *Br J Haematol* **114**: 539-43.

Aplan PD (2006). Causes of oncogenic chromosomal translocation. *Trends Genet* **22**: 46-55.

Aplan PD, Chervinsky DS, Stanulla M, Burhans WC (1996). Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors. *Blood* **87**: 2649-58.

Aplan PD, Lombardi DP, Ginsberg AM, Cossman J, Bertness VL, Kirsch IR (1990). Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity. *Science* **250**: 1426-9.

- Ariumi Y, Masutani M, Copeland TD, Mimori T, Sugimura T, Shimotohno K *et al* (1999). Suppression of the poly(ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase in vitro. *Oncogene* **18**: 4616-25.
- Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD *et al* (2002). MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* **30**: 41-7.
- Audebert M, Salles B, Calsou P (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* **279**: 55117-26.
- Ayton PM, Cleary ML (2001). Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* **20**: 5695-707.
- Backer LC, Allen JW, Harrington-Brock K, Campbell JA, DeMarini DM, Doerr CL *et al* (1990). Genotoxicity of inhibitors of DNA topoisomerases I (camptothecin) and II (m-AMSA) in vivo and in vitro. *Mutagenesis* **5**: 541-7.
- Baldwin EL, Osheroff N (2005). Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **5**: 363-72.
- Basecke J, Karim K, Podleschny M, Becker A, Glass B, Trumper L *et al* (2006). MLL rearrangements emerge during spontaneous apoptosis of clinical blood samples. *Leukemia* **20**: 1193-4.
- Bauer PI, Chen HJ, Kenesi E, Kenessey I, Buki KG, Kirsten E *et al* (2001). Molecular interactions between poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I) and topoisomerase I (Topo I): identification of topology of binding. *FEBS Lett* **506**: 239-42.
- Baum C, Forster P, Hegewisch-Becker S, Harbers K (1994). An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques* **17**: 1058-62.
- Baumann C, Boehden GS, Burkle A, Wiesmuller L (2006). Poly(ADP-RIBOSE) polymerase-1 (Parp-1) antagonizes topoisomerase I-dependent recombination stimulation by P53. *Nucleic Acids Res* **34**: 1036-49.
- Bellas RE, FitzGerald MJ, Fausto N, Sonenshein GE (1997). Inhibition of NF-kappa B activity induces apoptosis in murine hepatocytes. *Am J Pathol* **151**: 891-6.
- Benson FE, Stasiak A, West SC (1994). Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. *EMBO J* **13**: 5764-71.
- Beran M, Luthra R, Kantarjian H, Estey E (2004). FLT3 mutation and response to intensive chemotherapy in young adult and elderly patients with normal karyotype. *Leuk Res* **28**: 547-50.
- Bertrand P, Saintigny Y, Lopez BS (2004). p53's double life: transactivation-independent repression of homologous recombination. *Trends Genet* **20**: 235-43.
- Betti CJ, Villalobos MJ, Diaz MO, Vaughan AT (2001). Apoptotic triggers initiate

translocations within the MLL gene involving the nonhomologous end joining repair system. *Cancer Res* **61**: 4550-5.

Betti CJ, Villalobos MJ, Diaz MO, Vaughan AT (2003). Apoptotic stimuli initiate MLL-AF9 translocations that are transcribed in cells capable of division. *Cancer Res* **63**: 1377-81.

Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH (2000). Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* **96**: 24-33.

Blake MS, Johnston KH, Russell-Jones GJ, Gotschlich EC (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* **136**: 175-9.

Blanco JG, Dervieux T, Edick MJ, Mehta PK, Rubnitz JE, Shurtleff S *et al* (2001). Molecular emergence of acute myeloid leukemia during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10338-43.

Blanco JG, Edick MJ, Relling MV (2004). Etoposide induces chimeric Mll gene fusions. *FASEB J* **18**: 173-5.

Blank M, Shiloh Y (2007). Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* **6**: 686-95.

Block WD, Yu Y, Merkle D, Gifford JL, Ding Q, Meek K *et al* (2004). Autophosphorylation-dependent remodeling of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit regulates ligation of DNA ends. *Nucleic Acids Res* **32**: 4351-7.

Bloomfield CD, Mrozek K, Caligiuri MA (2006). Cancer and leukemia group B leukemia correlative science committee: major accomplishments and future directions. *Clin Cancer Res* **12**: 3564s-71s.

Bode J, Schlake T, Rios-Ramirez M, Mielke C, Stengert M, Kay V *et al* (1995). Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally active loci. *Int Rev Cytol* **162A**: 389-454.

Boehden GS, Restle A, Marschalek R, Stocking C, Wiesmuller L (2004). Recombination at chromosomal sequences involved in leukaemogenic rearrangements is differentially regulated by p53. *Carcinogenesis* **25**: 1305-13.

Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* **5**: 21-6.

Boulikas T (1995). Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int Rev Cytol* **162A**: 279-388.

Bowater R, Aboul-ela F, Lilley DM (1991). Large-scale stable opening of supercoiled DNA in response to temperature and supercoiling in (A + T)-rich regions that promote low-salt cruciform extrusion. *Biochemistry* **30**: 11495-506.

Broeker PL, Super HG, Thirman MJ, Pomykala H, Yonebayashi Y, Tanabe S *et al* (1996). Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute

leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* **87**: 1912-22.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**: 550-3.

Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondaneche MC, Sanal O *et al* (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* **124**: 287-99.

Bugreev DV, Brosh RM, Jr., Mazin AV (2008). RECQ1 possesses DNA branch migration activity. *J Biol Chem* **283**: 20231-42.

Bugreev DV, Mazina OM, Mazin AV (2006). Rad54 protein promotes branch migration of Holliday junctions. *Nature* **442**: 590-3.

Burkle A (2005). Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD<sup>+</sup>. *FEBS J* **272**: 4576-89.

Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**: 42462-7.

Burma S, Chen DJ (2004). Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **3**: 909-18.

Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC *et al* (2002). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* **100**: 4325-36.

Cahill PA, Knight AW, Billinton N, Barker MG, Walsh L, Keenan PO *et al* (2004). The GreenScreen genotoxicity assay: a screening validation programme. *Mutagenesis* **19**: 105-19.

Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eby Y *et al* (1994). Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* **265**: 415-7.

Caligiuri MA, Schichman SA, Strout MP, Mrozek K, Baer MR, Frankel SR *et al* (1994). Molecular rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations. *Cancer Res* **54**: 370-3.

Calsou P, Frit P, Humbert O, Muller C, Chen DJ, Salles B (1999). The DNA-dependent protein kinase catalytic activity regulates DNA end processing by means of Ku entry into DNA. *J Biol Chem* **274**: 7848-56.

Capranico G, Jaxel C, Roberge M, Kohn KW, Pommier Y (1990). Nucleosome positioning as a critical determinant for the DNA cleavage sites of mammalian DNA topoisomerase II in reconstituted simian virus 40 chromatin. *Nucleic Acids Res* **18**: 4553-9.

Challberg MD, Kelly TJ (1989). Animal virus DNA replication. *Annu Rev Biochem* **58**: 671-717.

- Chan DW, Chen BP, Prithivirajasingh S, Kurimasa A, Story MD, Qin J *et al* (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev* **16**: 2333-8.
- Chan DW, Ye R, Veillette CJ, Lees-Miller SP (1999). DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer. *Biochemistry* **38**: 1819-28.
- Chen CS, Sorensen PH, Domer PH, Reaman GH, Korsmeyer SJ, Heerema NA *et al* (1993). Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* **81**: 2386-93.
- Chen F, Nastasi A, Shen Z, Brenneman M, Crissman H, Chen DJ (1997). Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutat Res* **384**: 205-11.
- Chen ZJ (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* **7**: 758-65.
- Chessells JM, Harrison CJ, Watson SL, Vora AJ, Richards SM (2002). Treatment of infants with lymphoblastic leukaemia: results of the UK Infant Protocols 1987-1999. *Br J Haematol* **117**: 306-14.
- Cimino G, Rapanotti MC, Biondi A, Elia L, Lo Coco F, Price C *et al* (1997). Infant acute leukemias show the same biased distribution of ALL1 gene breaks as topoisomerase II related secondary acute leukemias. *Cancer Res* **57**: 2879-83.
- Cockerill PN, Yuen MH, Garrard WT (1987). The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements. *J Biol Chem* **262**: 5394-7.
- Collis SJ, DeWeese TL, Jeggo PA, Parker AR (2005). The life and death of DNA-PK. *Oncogene* **24**: 949-61.
- Cui X, Yu Y, Gupta S, Cho YM, Lees-Miller SP, Meek K (2005). Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell Biol* **25**: 10842-52.
- Cuzick J, Erskine S, Edelman D, Galton DA (1987). A comparison of the incidence of the myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia following melphalan and cyclophosphamide treatment for myelomatosis. A report to the Medical Research Council's working party on leukaemia in adults. *Br J Cancer* **55**: 523-9.
- Dahm-Daphi J, Hubbe P, Horvath F, El-Awady RA, Bouffard KE, Powell SN *et al* (2005). Nonhomologous end-joining of site-specific but not of radiation-induced DNA double-strand breaks is reduced in the presence of wild-type p53. *Oncogene* **24**: 1663-72.
- Danial NN, Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell* **116**: 205-19.
- Dantzer F, de La Rubia G, Menissier-De Murcia J, Hostomsky Z, de Murcia G, Schreiber V (2000). Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* **39**: 7559-69.

- Daser A, Rabbitts TH (2005). The versatile mixed lineage leukaemia gene MLL and its many associations in leukaemogenesis. *Semin Cancer Biol* **15**: 175-88.
- Dash AB, Williams IR, Kutok JL, Tomasson MH, Anastasiadou E, Lindahl K *et al* (2002). A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7622-7.
- Datta R, Oki E, Endo K, Biedermann V, Ren J, Kufe D (2000). XIAP regulates DNA damage-induced apoptosis downstream of caspase-9 cleavage. *J Biol Chem* **275**: 31733-8.
- Dayn A, Malkhosyan S, Duzhy D, Lyamichev V, Panchenko Y, Mirkin S (1991). Formation of (dA-dT)<sub>n</sub> cruciforms in Escherichia coli cells under different environmental conditions. *J Bacteriol* **173**: 2658-64.
- De Angelis PM, Svendsrud DH, Kravik KL, Stokke T (2006). Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. *Mol Cancer* **5**: 20.
- De Brabander M, Geuens G, Nuydens R, Willebrords R, De Mey J (1981). Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 5608-612.
- de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M *et al* (1997). Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7303-7.
- de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A (1990). The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* **347**: 558-61.
- Del Bino G, Darzynkiewicz Z (1991). Camptothecin, teniposide, or 4'-(9-acridinylamino)-3-methanesulfon-m-anisidide, but not mitoxantrone or doxorubicin, induces degradation of nuclear DNA in the S phase of HL-60 cells. *Cancer Res* **51**: 1165-9.
- Deriano L, Stracker TH, Baker A, Petrini JH, Roth DB (2009). Roles for NBS1 in alternative nonhomologous end-joining of V(D)J recombination intermediates. *Mol Cell* **34**: 13-25.
- Deveraux QL, Reed JC (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**: 239-52.
- Ding Q, Reddy YV, Wang W, Woods T, Douglas P, Ramsden DA *et al* (2003). Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **23**: 5836-48.
- Dohner K, Tobis K, Ulrich R, Frohling S, Benner A, Schlenk RF *et al* (2002). Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* **20**: 3254-61.

- Dordelmann M, Reiter A, Borkhardt A, Ludwig WD, Gotz N, Viehmann S *et al* (1999). Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **94**: 1209-17.
- Dudenhoffer C, Rohaly G, Will K, Deppert W, Wiesmuller L (1998). Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol Cell Biol* **18**: 5332-42.
- Durrieu F, Samejima K, Fortune JM, Kandels-Lewis S, Osheroff N, Earnshaw WC (2000). DNA topoisomerase IIalpha interacts with CAD nuclease and is involved in chromatin condensation during apoptotic execution. *Curr Biol* **10**: 923-6.
- El-Hizawi S, Lagowski JP, Kulesz-Martin M, Albor A (2002). Induction of gene amplification as a gain-of-function phenotype of mutant p53 proteins. *Cancer Res* **62**: 3264-70.
- Elliott B, Richardson C, Jasin M (2005). Chromosomal translocation mechanisms at intronic alu elements in mammalian cells. *Mol Cell* **17**: 885-94.
- Emerenciano M, Koifman S, Pombo-de-Oliveira MS (2007). Acute leukemia in early childhood. *Braz J Med Biol Res* **40**: 749-60.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**: 43-50.
- Erlandsson N, Baumann B, Rossler OG, Kaufmann K, Giehl KM, Wirth T *et al* (2002). Lack of correlation between NF-kappaB activation and induction of programmed cell death in PC12 pheochromocytoma cells treated with 6-hydroxydopamine or the cannabinoid receptor 1-agonist CP55,940. *Biochem Pharmacol* **64**: 487-95.
- Estey E, Dohner H (2006). Acute myeloid leukaemia. *Lancet* **368**: 1894-907.
- Faraone-Mennella MR (2005). Chromatin architecture and functions: the role(s) of poly(ADP-RIBOSE) polymerase and poly(ADPribosyl)ation of nuclear proteins. *Biochem Cell Biol* **83**: 396-404.
- Felix CA (1998). Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* **1400**: 233-55.
- Felix CA (2001). Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors. *Med Pediatr Oncol* **36**: 525-35.
- Felix CA, Lange BJ, Chessells JM (2000). Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Challenges and Controversies in 2000. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 285-302.
- Fenaux P, Chomienne C, Degos L (2001). All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol* **38**: 13-25.
- Fernandez LA, Winkler M, Grosschedl R (2001). Matrix attachment region-dependent

- function of the immunoglobulin mu enhancer involves histone acetylation at a distance without changes in enhancer occupancy. *Mol Cell Biol* **21**: 196-208.
- Ferro AM, Olivera BM (1982). Poly(ADP-ribosylation) in vitro. Reaction parameters and enzyme mechanism. *J Biol Chem* **257**: 7808-13.
- Ferro AM, Olivera BM (1984). Poly(ADP-ribosylation) of DNA topoisomerase I from calf thymus. *J Biol Chem* **259**: 547-54.
- Fiers W, Contreras R, Haegemann G, Rogiers R, Van de Voorde A, Van Heuverswyn H *et al* (1978). Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* **273**: 113-20.
- Fleenor DE, Kaufman RE (1993). Characterization of the DNase I hypersensitive site 3' of the human beta globin gene domain. *Blood* **81**: 2781-90.
- Flygare J, Armstrong RC, Wennborg A, Orsan S, Hellgren D (1998). Proteolytic cleavage of HsRad51 during apoptosis. *FEBS Lett* **427**: 247-51.
- Flygare J, Benson F, Hellgren D (1996). Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* **1312**: 231-6.
- Fortune JM, Osheroff N (2000). Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **64**: 221-53.
- Frantz CE, Chen H, Eastmond DA (1996). Inhibition of human topoisomerase II in vitro by bioactive benzene metabolites. *Environ Health Perspect* **104 Suppl 6**: 1319-23.
- Galande S, Kohwi-Shigematsu T (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase and Ku autoantigen form a complex and synergistically bind to matrix attachment sequences. *J Biol Chem* **274**: 20521-8.
- Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB *et al* (1997). Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13950-4.
- Gatz SA, Keimling M, Baumann C, Dork T, Debatin KM, Fulda S *et al* (2008). Resveratrol modulates DNA double-strand break repair pathways in an ATM/ATR-p53- and -Nbs1-dependent manner. *Carcinogenesis* **29**: 519-27.
- Gatz SA, Wiesmuller L (2006). p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ* **13**: 1003-16.
- Gichner T, Veleminsky J (1982). Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homologs. *Mutat Res* **99**: 129-242.
- Gillert E, Leis T, Repp R, Reichel M, Hosch A, Breitenlohner I *et al* (1999). A DNA damage repair mechanism is involved in the origin of chromosomal translocations t(4;11) in primary leukemic cells. *Oncogene* **18**: 4663-71.
- Gilliland DG, Griffin JD (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*

**100:** 1532-42.

Gilliland DG, Tallman MS (2002). Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* **1**: 417-20.

Glover TW (1998). Instability at chromosomal fragile sites. *Recent Results Cancer Res* **154**: 185-99.

Glover TW, Arlt MF, Casper AM, Durkin SG (2005). Mechanisms of common fragile site instability. *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**: R197-205.

Glover TW, Berger C, Coyle J, Echo B (1984). DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet* **67**: 136-42.

Glynn JM, Cotter TG, Green DR (1992). Apoptosis induced by Actinomycin D, Camptothecin or Aphidicolin can occur in all phases of the cell cycle. *Biochem Soc Trans* **20**: 84S.

Gobert C, Skladanowski A, Larsen AK (1999). The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10355-60.

Gorisch SM, Sporbert A, Stear JH, Grunewald I, Nowak D, Warbrick E *et al* (2008). Uncoupling the replication machinery: replication fork progression in the absence of processive DNA synthesis. *Cell Cycle* **7**: 1983-90.

Greaves MF (1996). Infant leukaemia biology, aetiology and treatment. *Leukemia* **10**: 372-7.

Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM (2003). Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* **102**: 2321-33.

Green D, Kroemer G (1998). The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* **8**: 267-71.

Greenberg RA, Sobhian B, Pathania S, Cantor SB, Nakatani Y, Livingston DM (2006). Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev* **20**: 34-46.

Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR (2005). The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol* **205**: 154-71.

Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ *et al* (2001). The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* **98**: 1312-20.

Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G *et al* (1998). The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* **92**: 2322-33.

Gromova, II, Nielsen OF, Razin SV (1995). Long-range fragmentation of the eukaryotic genome by exogenous and endogenous nucleases proceeds in a specific fashion via preferential DNA cleavage at matrix attachment sites. *J Biol Chem* **270**: 18685-90.

Gu Y, Alder H, Nakamura T, Schichman SA, Prasad R, Canaani O *et al* (1994). Sequence analysis of the breakpoint cluster region in the ALL-1 gene involved in acute leukemia. *Cancer Res* **54**: 2327-30.

Gu Y, Cimino G, Alder H, Nakamura T, Prasad R, Canaani O *et al* (1992a). The (4;11)(q21;q23) chromosome translocations in acute leukemias involve the VDJ recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10464-8.

Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G *et al* (1992b). The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene. *Cell* **71**: 701-8.

Haber JE, Leung WY (1996). Lack of chromosome territoriality in yeast: promiscuous rejoining of broken chromosome ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13949-54.

Hake CR, Graubert TA, Fenske TS (2007). Does autologous transplantation directly increase the risk of secondary leukemia in lymphoma patients? *Bone Marrow Transplant* **39**: 59-70.

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

Hande KR (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* **34**: 1514-21.

Harper DP, Aplan PD (2008). Chromosomal rearrangements leading to MLL gene fusions: clinical and biological aspects. *Cancer Res* **68**: 10024-7.

Hars ES, Lyu YL, Lin CP, Liu LF (2006). Role of apoptotic nuclease caspase-activated DNase in etoposide-induced treatment-related acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* **66**: 8975-9.

Hatanaka M, Dulbecco R (1966). Induction of DNA synthesis by SV40. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**: 736-40.

Haupt R, Fears TR, Rosso P, Colella R, Loiacono G, de Terlizzi M *et al* (1994). Increased risk of secondary leukemia after single-agent treatment with etoposide for Langerhans' cell histiocytosis. *Pediatr Hematol Oncol* **11**: 499-507.

Hayden MS, Ghosh S (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**: 2195-224.

Hedges DJ, Deininger PL (2007). Inviting instability: Transposable elements, double-strand breaks, and the maintenance of genome integrity. *Mutat Res* **616**: 46-59.

Hensel JP, Gillert E, Fey GH, Marschalek R (2001). Breakpoints of t(4;11) translocations in the human MLL and AF4 genes in ALL patients are preferentially clustered outside of high-affinity matrix attachment regions. *J Cell Biochem* **82**: 299-309.

Hess JL (2004). MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med* **10**: 500-7.

Hesse JE, Lieber MR, Mizuuchi K, Gellert M (1989). V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. *Genes Dev* **3**: 1053-61.

Hilden JM, Dinndorf PA, Meerbaum SO, Sather H, Villaluna D, Heerema NA *et al* (2006). Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. *Blood* **108**: 441-51.

Huang M, Miao ZH, Zhu H, Cai YJ, Lu W, Ding J (2008). Chk1 and Chk2 are differentially involved in homologous recombination repair and cell cycle arrest in response to DNA double-strand breaks induced by camptothecins. *Mol Cancer Ther* **7**: 1440-9.

Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Seufzer BJ, Shumway SD, Kurama T, Boothman DA *et al* (2000). NF-kappaB activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events. *J Biol Chem* **275**: 9501-9.

Huber A, Bai P, de Murcia JM, de Murcia G (2004). PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1103-8.

Hull RN, Minner JR, Smith JW (1956). New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. I. Origin and properties of cytopathogenic agents S.V.1, S.V.2, S.V.4, S.V.5, S.V.6, S.V.11, S.V.12 and S.V.15. *Am J Hyg* **63**: 204-15.

Huret JL (2006). Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology. <http://atlasgeneticsoncology.org/>.

Huret JL, Dessen P, Bernheim A (2001). An atlas of chromosomes in hematological malignancies. Example: 11q23 and MLL partners. *Leukemia* **15**: 987-9.

Ikegami S, Taguchi T, Ohashi M, Oguro M, Nagano H, Mano Y (1978). Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase-alpha. *Nature* **275**: 458-60.

Ishii E, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Yoshida N, Oda M, Zaitzu M *et al* (2002). In vitro cleavage of the MLL gene by topoisomerase II inhibitor (etoposide) in normal cord and peripheral blood mononuclear cells. *Int J Hematol* **76**: 74-9.

Isoyama K, Eguchi M, Hibi S, Kinukawa N, Ohkawa H, Kawasaki H *et al* (2002). Risk-directed treatment of infant acute lymphoblastic leukaemia based on early assessment of MLL gene status: results of the Japan Infant Leukaemia Study (MLL96). *Br J Haematol* **118**: 999-1010.

Jaxel C, Kohn KW, Pommier Y (1988). Topoisomerase I interaction with SV40 DNA in the presence and absence of camptothecin. *Nucleic Acids Res* **16**: 11157-70.

Jeffs AR, Benjes SM, Smith TL, Sowerby SJ, Morris CM (1998). The BCR gene recombines preferentially with Alu elements in complex BCR-ABL translocations of chronic myeloid leukaemia. *Hum Mol Genet* **7**: 767-76.

- Jenuwein T, Forrester WC, Fernandez-Herrero LA, Laible G, Dull M, Grosschedl R (1997). Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature* **385**: 269-72.
- Johnson RD, Jasin M (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J* **19**: 3398-407.
- Kalos M, Fournier RE (1995). Position-independent transgene expression mediated by boundary elements from the apolipoprotein B chromatin domain. *Mol Cell Biol* **15**: 198-207.
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**: 621-63.
- Karmakar P, Piotrowski J, Brosh RM, Jr., Sommers JA, Miller SP, Cheng WH *et al* (2002). Werner protein is a target of DNA-dependent protein kinase in vivo and in vitro, and its catalytic activities are regulated by phosphorylation. *J Biol Chem* **277**: 18291-302.
- Kas E, Laemmli UK (1992). In vivo topoisomerase II cleavage of the Drosophila histone and satellite III repeats: DNA sequence and structural characteristics. *EMBO J* **11**: 705-16.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-57.
- Khodarev NN, Bennett T, Shearing N, Sokolova I, Koudelik J, Walter S *et al* (2000). LINE L1 retrotransposable element is targeted during the initial stages of apoptotic DNA fragmentation. *J Cell Biochem* **79**: 486-95.
- Kim R, Emi M, Tanabe K (2005). Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage (Review). *Oncol Rep* **14**: 595-9.
- Klehr D, Maass K, Bode J (1991). Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry* **30**: 1264-70.
- Klehr D, Schlake T, Maass K, Bode J (1992). Scaffold-attached regions (SAR elements) mediate transcriptional effects due to butyrate. *Biochemistry* **31**: 3222-9.
- Kleinsasser NH, Gamarra F, Bergner A, Wallner BC, Harreus UA, Juchhoff J *et al* (2001). Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **63**: 141-7.
- Kolomietz E, Meyn MS, Pandita A, Squire JA (2002). The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **35**: 97-112.
- Kumari SR, Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzalez R (1998). Functional interactions of p53 with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) during apoptosis following DNA damage: covalent poly(ADP-ribosyl)ation of p53 by exogenous PARP and noncovalent binding of p53 to the M(r) 85,000 proteolytic fragment. *Cancer Res* **58**: 5075-8.

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

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

Kupper JH, Muller M, Jacobson MK, Tatsumi-Miyajima J, Coyle DL, Jacobson EL *et al* (1995). trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation sensitizes cells against gamma-irradiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine but does not limit DNA replication of a polyomavirus replicon. *Mol Cell Biol* **15**: 3154-63.

Küpper JH, Muller M, Jacobson MK, Tatsumi-Miyajima J, Coyle DL, Jacobson EL *et al* (1995). trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation sensitizes cells against gamma-irradiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine but does not limit DNA replication of a polyomavirus replicon. *Mol Cell Biol* **15**: 3154-63.

Kurose A, Tanaka T, Huang X, Traganos F, Dai W, Darzynkiewicz Z (2006). Effects of hydroxyurea and aphidicolin on phosphorylation of ataxia telangiectasia mutated on Ser 1981 and histone H2AX on Ser 139 in relation to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cytometry A* **69**: 212-21.

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

Lagarkova MA, Iarovaia OV, Razin SV (1995). Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers. *J Biol Chem* **270**: 20239-41.

Laker MK, Duffett RS, Cookson JC (1998). Long-term outcome with clozapine: comparison of patients continuing and discontinuing treatment. *Int Clin Psychopharmacol* **13**: 75-8.

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.

Langer T, Metzler M, Reinhardt D, Viehmann S, Borkhardt A, Reichel M *et al* (2003). Analysis of t(9;11) chromosomal breakpoint sequences in childhood acute leukemia: almost identical MLL breakpoints in therapy-related AML after treatment without etoposides. *Genes Chromosomes Cancer* **36**: 393-401.

Larson RA, Le Beau MM, Ratain MJ, Rowley JD (1992). Balanced translocations involving chromosome bands 11q23 and 21q22 in therapy-related leukemia. *Blood* **79**: 1892-3.

Larson RA, Wang Y, Banerjee M, Wiemels J, Hartford C, Le Beau MM *et al* (1999). Prevalence of the inactivating 609C-->T polymorphism in the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood* **94**: 803-7.

Laumann R, Jucker M, Tesch H (1992). Point mutations in the conserved regions of the p53 tumour suppressor gene do not account for the transforming process in the Jurkat acute

lymphoblastic leukemia T-cells. *Leukemia* **6**: 227-8.

Leppard JB, Dong Z, Mackey ZB, Tomkinson AE (2003). Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* **23**: 5919-27.

Lewis SM, Agard E, Suh S, Czyzyk L (1997). Cryptic signals and the fidelity of V(D)J joining. *Mol Cell Biol* **17**: 3125-36.

Libura J, Slater DJ, Felix CA, Richardson C (2005). Therapy-related acute myeloid leukemia-like MLL rearrangements are induced by etoposide in primary human CD34+ cells and remain stable after clonal expansion. *Blood* **105**: 2124-31.

Libura M, Asnafi V, Tu A, Delabesse E, Tigaud I, Cymbalista F *et al* (2003). FLT3 and MLL intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress. *Blood* **102**: 2198-204.

Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 712-20.

Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JH *et al* (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* **404**: 613-7.

Lin Y, Lukacsovich T, Waldman AS (1999). Multiple pathways for repair of DNA double-strand breaks in mammalian chromosomes. *Mol Cell Biol* **19**: 8353-60.

Lin Y, Waldman BC, Waldman AS (2003). Suppression of high-fidelity double-strand break repair in mammalian chromosomes by pifithrin-alpha, a chemical inhibitor of p53. *DNA Repair (Amst)* **2**: 1-11.

Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT *et al* (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8461-6.

Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**: 175-84.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* **3**: 330-8.

Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A *et al* (2002). Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell* **13**: 978-88.

Lovett BD, Lo Nigro L, Rappaport EF, Blair IA, Osheroff N, Zheng N *et al* (2001). Near-precise interchromosomal recombination and functional DNA topoisomerase II cleavage sites at MLL and AF-4 genomic breakpoints in treatment-related acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9802-7.

Lowenberg B, Downing JR, Burnett A (1999). Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **341**: 1051-62.

- Madden KR, Stewart L, Champoux JJ (1995). Preferential binding of human topoisomerase I to superhelical DNA. *EMBO J* **14**: 5399-409.
- Malanga M, Althaus FR (2004). Poly(ADP-ribose) reactivates stalled DNA topoisomerase I and Induces DNA strand break resealing. *J Biol Chem* **279**: 5244-8.
- Maloisel L, Fabre F, Gangloff S (2008). DNA polymerase delta is preferentially recruited during homologous recombination to promote heteroduplex DNA extension. *Mol Cell Biol* **28**: 1373-82.
- Mao Y, Mehl IR, Muller MT (2002). Subnuclear distribution of topoisomerase I is linked to ongoing transcription and p53 status. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1235-40.
- Marschalek R, Nilson I, Lochner K, Greim R, Siegler G, Greil J *et al* (1997). The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene. *Leuk Lymphoma* **27**: 417-28.
- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* **18**: 3563-71.
- Mazina OM, Rossi MJ, Thoma NH, Mazin AV (2007). Interactions of human rad54 protein with branched DNA molecules. *J Biol Chem* **282**: 21068-80.
- McLaughlin P, Estey E, Glassman A, Romaguera J, Samaniego F, Ayala A *et al* (2005). Myelodysplasia and acute myeloid leukemia following therapy for indolent lymphoma with fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone (FND) plus rituximab and interferon alpha. *Blood* **105**: 4573-5.
- Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzalez R (2001). Regulation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP-ribosylation). *J Biol Chem* **276**: 36425-30.
- Mimitou EP, Symington LS (2009). DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair (Amst)* **8**: 983-95.
- Mirault ME, Boucher P, Tremblay A (2006). Nucleotide-resolution mapping of topoisomerase-mediated and apoptotic DNA strand scissions at or near an MLL translocation hotspot. *Am J Hum Genet* **79**: 779-91.
- Mirkovitch J, Mirault ME, Laemmli UK (1984). Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* **39**: 223-32.
- Mitamura S, Ikawa H, Mizuno N, Kaziro Y, Itoh H (1998). Cytosolic nuclease activated by caspase-3 and inhibited by DFF-45. *Biochem Biophys Res Commun* **243**: 480-4.
- Moneypenny CG, Shao J, Song Y, Gallagher EP (2006). MLL rearrangements are induced by low doses of etoposide in human fetal hematopoietic stem cells. *Carcinogenesis* **27**: 874-81.
- Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, Gadner H, Odenwald E, Harbott J *et al* (2005). Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90, and 95. *Klin Padiatr* **217**: 310-20.

- Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD (2007). Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* **109**: 431-48.
- Mrozek K, Prior TW, Edwards C, Marcucci G, Carroll AJ, Snyder PJ *et al* (2001). Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* **19**: 2482-92.
- Mudie NY, Swerdlow AJ, Higgins CD, Smith P, Qiao Z, Hancock BW *et al* (2006). Risk of second malignancy after non-Hodgkin's lymphoma: a British Cohort Study. *J Clin Oncol* **24**: 1568-74.
- Munoz L, Nomdedeu JF, Villamor N, Guardia R, Colomer D, Ribera JM *et al* (2003). Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. *Leukemia* **17**: 76-82.
- Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N, Fukuyama H (2003). Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* **10**: 108-16.
- Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K *et al* (1996). Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **10**: 1911-8.
- Negrini M, Felix CA, Martin C, Lange BJ, Nakamura T, Canaani E *et al* (1993). Potential topoisomerase II DNA-binding sites at the breakpoints of a t(9;11) chromosome translocation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* **53**: 4489-92.
- Ng A, Taylor GM, Eden OB (2006). Genotoxicity of etoposide: greater susceptibility of MLL than other target genes. *Cancer Genet Cytogenet* **164**: 164-7.
- Nickoloff JA, Spirio LN, Reynolds RJ (1998). A comparison of calcium phosphate coprecipitation and electroporation. Implications for studies on the genetic effects of DNA damage. *Mol Biotechnol* **10**: 93-101.
- O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M *et al* (1997). Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* **57**: 4285-300.
- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE *et al* (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* **12**: 3679-84.
- Olesen LH, Nyvold CG, Aggerholm A, Norgaard JM, Guldborg P, Hokland P (2005). Delineation and molecular characterization of acute myeloid leukemia patients with coduplication of FLT3 and MLL. *Eur J Haematol* **75**: 185-92.
- Opresko PL, Sowd G, Wang H (2009). The Werner syndrome helicase/exonuclease processes mobile D-loops through branch migration and degradation. *PLoS ONE* **4**: e4825.

- Pallisgaard N, Hokland P, Riishoj DC, Pedersen B, Jorgensen P (1998). Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* **92**: 574-88.
- Pan Y, Haines DS (1999). The pathway regulating MDM2 protein degradation can be altered in human leukemic cells. *Cancer Res* **59**: 2064-7.
- Park C, Choi BT, Cheong J, Moon SK, Kim CH, Lee WH *et al* (2004). Induction of apoptosis and G2/M arrest by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in human prostate carcinoma cells. *Mutat Res* **563**: 139-49.
- Park SY, Cheng YC (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 could facilitate the religation of topoisomerase I-linked DNA inhibited by camptothecin. *Cancer Res* **65**: 3894-902.
- Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber CA (1988). The international incidence of childhood cancer. *Int J Cancer* **42**: 511-20.
- Pastorcic M, Bagchi MK, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1989). Multiple protein binding sites within the ovalbumin gene 5'-flanking region: isolation and characterization of sequence-specific binding proteins. *Nucleic Acids Res* **17**: 6693-711.
- Paull TT, Gellert M (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* **1**: 969-79.
- Paull TT, Gellert M (1999). Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* **13**: 1276-88.
- Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH, Nerlov C (2002). Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood* **99**: 1909-12.
- Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Johansson B (1998). Balanced chromosome aberrations in leukemias following chemotherapy with DNA-topoisomerase II inhibitors. *J Clin Oncol* **16**: 1897-8.
- Pedersen-Bjergaard J, Philip P (1991). Balanced translocations involving chromosome bands 11q23 and 21q22 are highly characteristic of myelodysplasia and leukemia following therapy with cytostatic agents targeting at DNA-topoisomerase II. *Blood* **78**: 1147-8.
- Perlmutter RM, Klotz JL, Pravtcheva D, Ruddle F, Hood L (1984). A novel 6:10 chromosomal translocation in the murine plasmacytoma NS-1. *Nature* **307**: 473-6.
- Ploski JE, Aplan PD (2001). Characterization of DNA fragmentation events caused by genotoxic and non-genotoxic agents. *Mutat Res* **473**: 169-80.
- Poljak L, Seum C, Mattioni T, Laemmli UK (1994). SARs stimulate but do not confer position independent gene expression. *Nucleic Acids Res* **22**: 4386-94.
- Pommier Y, Redon C, Rao VA, Seiler JA, Sordet O, Takemura H *et al* (2003). Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat Res* **532**: 173-203.

- Potaman VN, Shlyakhtenko LS, Oussatcheva EA, Lyubchenko YL, Soldatenkov VA (2005). Specific binding of poly(ADP-ribose) polymerase-1 to cruciform hairpins. *J Mol Biol* **348**: 609-15.
- Pourquier P, Ueng LM, Fertala J, Wang D, Park HJ, Essigmann JM *et al* (1999). Induction of reversible complexes between eukaryotic DNA topoisomerase I and DNA-containing oxidative base damages. 7, 8-dihydro-8-oxoguanine and 5-hydroxycytosine. *J Biol Chem* **274**: 8516-23.
- Prasad NK, Papoff G, Zeuner A, Bonnin E, Kazatchkine MD, Ruberti G *et al* (1998). Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway. *J Immunol* **161**: 3781-90.
- Pui CH, Behm FG, Downing JR, Hancock ML, Shurtleff SA, Ribeiro RC *et al* (1994). 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* **12**: 909-15.
- Radford IR (2002). Model for the initiation of ionizing radiation-induced apoptosis in lymphoid cells by complex DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* **78**: 467-74.
- Raffini LJ, Slater DJ, Rappaport EF, Lo Nigro L, Cheung NK, Biegel JA *et al* (2002). Panhandle and reverse-panhandle PCR enable cloning of der(11) and der(other) genomic breakpoint junctions of MLL translocations and identify complex translocation of MLL, AF-4, and CDK6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4568-73.
- Raghavan SC, Kirsch IR, Lieber MR (2001). Analysis of the V(D)J recombination efficiency at lymphoid chromosomal translocation breakpoints. *J Biol Chem* **276**: 29126-33.
- Raynard S, Bussen W, Sung P (2006). A double Holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75. *J Biol Chem* **281**: 13861-4.
- Razin SV, Gromova, II, Iarovaia OV (1995). Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions. *Int Rev Cytol* **162B**: 405-48.
- Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WG (1998). Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* **279**: 1504-13.
- Rege-Cambrin G, Giugliano E, Michaux L, Stul M, Scaravaglio P, Serra A *et al* (2005). Trisomy 11 in myeloid malignancies is associated with internal tandem duplication of both MLL and FLT3 genes. *Haematologica* **90**: 262-4.
- Reichel M, Gillert E, Angermuller S, Hensel JP, Heidel F, Lode M *et al* (2001a). Biased distribution of chromosomal breakpoints involving the MLL gene in infants versus children and adults with t(4;11) ALL. *Oncogene* **20**: 2900-7.
- Reichel M, Gillert E, Breitenlohner I, Angermuller S, Fey GH, Marschalek R *et al* (2001b). Rapid isolation of chromosomal breakpoints from patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia: implications for basic and clinical research. *Leukemia* **15**: 286-8.

- Reichel M, Gillert E, Nilson I, Siegler G, Greil J, Fey GH *et al* (1998). Fine structure of translocation breakpoints in leukemic blasts with chromosomal translocation t(4;11): the DNA damage-repair model of translocation. *Oncogene* **17**: 3035-44.
- Reshkin SJ, Bellizzi A, Cardone RA, Tommasino M, Casavola V, Paradiso A (2003). Paclitaxel induces apoptosis via protein kinase A- and p38 mitogen-activated protein-dependent inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE) NHE isoform 1 in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* **9**: 2366-73.
- Riballo E, Kuhne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ *et al* (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell* **16**: 715-24.
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* **407**: 777-83.
- Richards RI (2001). Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends Genet* **17**: 339-45.
- Roemer K, Mueller-Lantzsch N (1996). p53 transactivation domain mutant Q22, S23 is impaired for repression of promoters and mediation of apoptosis. *Oncogene* **12**: 2069-79.
- Ross JA (1998). Maternal diet and infant leukemia: a role for DNA topoisomerase II inhibitors? *Int J Cancer Suppl* **11**: 26-8.
- Rossi MJ, Mazin AV (2008). Rad51 protein stimulates the branch migration activity of Rad54 protein. *J Biol Chem* **283**: 24698-706.
- Rouet P, Smih F, Jasin M (1994a). Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 6064-8.
- Rouet P, Smih F, Jasin M (1994b). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol* **14**: 8096-106.
- Rowley JD (2000). Molecular genetics in acute leukemia. *Leukemia* **14**: 513-7.
- Rubbi CP, Milner J (2003). p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J* **22**: 975-86.
- Rubnitz JE, Link MP, Shuster JJ, Carroll AJ, Hakami N, Frankel LS *et al* (1994). Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* **84**: 570-3.
- Rudat V, Bachmann N, Kupper JH, Weber KJ (2001). Overexpression of the DNA-binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase inhibits rejoining of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* **77**: 303-7.
- Ruscetti T, Lehnert BE, Halbrook J, Le Trong H, Hoekstra MF, Chen DJ *et al* (1998). Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* **273**: 14461-7.
- Saintigny Y, Makienko K, Swanson C, Emond MJ, Monnat RJ, Jr. (2002). Homologous

recombination resolution defect in werner syndrome. *Mol Cell Biol* **22**: 6971-8.

Saitoh Y, Laemmli UK (1994). Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* **76**: 609-22.

Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**: 96-9.

Sastry SS, Kun E (1988). Molecular interactions between DNA, poly(ADP-ribose) polymerase, and histones. *J Biol Chem* **263**: 1505-12.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ *et al* (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**: 1675-87.

Schichman SA, Caligiuri MA, Strout MP, Carter SL, Gu Y, Canaani E *et al* (1994). ALL-1 tandem duplication in acute myeloid leukemia with a normal karyotype involves homologous recombination between Alu elements. *Cancer Res* **54**: 4277-80.

Schreiber V, Ame JC, Dolle P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V *et al* (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* **277**: 23028-36.

Schultz N, Lopez E, Saleh-Gohari N, Helleday T (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Res* **31**: 4959-64.

See HT, Thomas DA, Bueso-Ramos C, Kavanagh J (2006). Secondary leukemia after treatment with paclitaxel and carboplatin in a patient with recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* **16 Suppl 1**: 236-40.

Sengupta S, Harris CC (2005). p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 44-55.

Shao RG, Cao CX, Zhang H, Kohn KW, Wold MS, Pommier Y (1999). Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes. *EMBO J* **18**: 1397-406.

Shapiro MA, Weigert M (1987). A complex translocation at the murine kappa light-chain locus. *Mol Cell Biol* **7**: 4130-3.

Shiah HS, Kuo YY, Tang JL, Huang SY, Yao M, Tsay W *et al* (2002). Clinical and biological implications of partial tandem duplication of the MLL gene in acute myeloid leukemia without chromosomal abnormalities at 11q23. *Leukemia* **16**: 196-202.

Shivji MK, Davies OR, Savill JM, Bates DL, Pellegrini L, Venkitaraman AR (2006). A region of human BRCA2 containing multiple BRC repeats promotes RAD51-mediated strand exchange. *Nucleic Acids Res* **34**: 4000-11.

Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* **18**: 134-47.

- Siegel D, McGuinness SM, Winski SL, Ross D (1999). Genotype-phenotype relationships in studies of a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Pharmacogenetics* **9**: 113-21.
- Silverman LB (2007). Acute lymphoblastic leukemia in infancy. *Pediatr Blood Cancer* **49**: 1070-3.
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo RB, Samara R, Jung M, Dritschilo A *et al* (2001). Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 in vitro and in vivo modulates binding to its DNA consensus sequence. *Neoplasia* **3**: 179-88.
- Skopek TR, Liber HL, Penman BW, Thilly WG (1978). Isolation of a human lymphoblastoid line heterozygous at the thymidine kinase locus: possibility for a rapid human cell mutation assay. *Biochem Biophys Res Commun* **84**: 411-6.
- Sleiman RJ, Catchpole DR, Stewart BW (1998). Drug-induced death of leukaemic cells after G2/M arrest: higher order DNA fragmentation as an indicator of mechanism. *Br J Cancer* **77**: 40-50.
- Sleiman RJ, Stewart BW (2000). Early caspase activation in leukemic cells subject to etoposide-induced G2-M arrest: evidence of commitment to apoptosis rather than mitotic cell death. *Clin Cancer Res* **6**: 3756-65.
- Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A *et al* (2000). Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* **96**: 4075-83.
- Smith MA, McCaffrey RP, Karp JE (1996). The secondary leukemias: challenges and research directions. *J Natl Cancer Inst* **88**: 407-18.
- Smith MT, Wang Y, Skibola CF, Slater DJ, Lo Nigro L, Nowell PC *et al* (2002). Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with MLL translocations in infants and children. *Blood* **100**: 4590-3.
- Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J *et al* (2003). Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* **102**: 43-52.
- So CW, Ma ZG, Price CM, Dong S, Chen SJ, Gu LJ *et al* (1997). MLL self fusion mediated by Alu repeat homologous recombination and prognosis of AML-M4/M5 subtypes. *Cancer Res* **57**: 117-22.
- Soe K, Grosse F (2003). p53 stimulates human topoisomerase I activity by modulating its DNA binding. *Nucleic Acids Res* **31**: 6585-92.
- Soe K, Hartmann H, Schlott B, Stevnsner T, Grosse F (2002). The tumor suppressor protein p53 stimulates the formation of the human topoisomerase I double cleavage complex in vitro. *Oncogene* **21**: 6614-23.
- Sordet O, Khan QA, Kohn KW, Pommier Y (2003). Apoptosis induced by topoisomerase

inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **3**: 271-90.

Sordet O, Khan QA, Plo I, Pourquier P, Urasaki Y, Yoshida A *et al* (2004b). Apoptotic topoisomerase I-DNA complexes induced by staurosporine-mediated oxygen radicals. *J Biol Chem* **279**: 50499-504.

Sordet O, Liao Z, Liu H, Antony S, Stevens EV, Kohlhagen G *et al* (2004a). Topoisomerase I-DNA complexes contribute to arsenic trioxide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **279**: 33968-75.

Spector LG, Xie Y, Robison LL, Heerema NA, Hilden JM, Lange B *et al* (2005). Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the children's oncology group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**: 651-5.

Speit G, Schutz P, Hoffmann H (2004). Enhancement of genotoxic effects in the comet assay with human blood samples by aphidicolin. *Toxicol Lett* **153**: 303-10.

Sperry AO, Blasquez VC, Garrard WT (1989). Dysfunction of chromosomal loop attachment sites: illegitimate recombination linked to matrix association regions and topoisomerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5497-501.

Spiekermann K, Bagrintseva K, Schwab R, Schmieja K, Hiddemann W (2003). Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells. *Clin Cancer Res* **9**: 2140-50.

Stanulla M, Chhalliyil P, Wang J, Jani-Sait SN, Aplan PD (2001). Mechanisms of MLL gene rearrangement: site-specific DNA cleavage within the breakpoint cluster region is independent of chromosomal context. *Hum Mol Genet* **10**: 2481-91.

Stanulla M, Wang J, Chervinsky DS, Thandla S, Aplan PD (1997). DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region is a specific event which occurs as part of higher-order chromatin fragmentation during the initial stages of apoptosis. *Mol Cell Biol* **17**: 4070-9.

Staudt LM, Lenardo MJ (1991). Immunoglobulin gene transcription. *Annu Rev Immunol* **9**: 373-98.

Stephan H, Grosse F, Soe K (2002). Human topoisomerase I cleavage complexes are repaired by a p53-stimulated recombination-like reaction in vitro. *Nucleic Acids Res* **30**: 5087-93.

Studel C, Wermke M, Schaich M, Schakel U, Illmer T, Ehninger G *et al* (2003). Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **37**: 237-51.

Stief A, Winter DM, Stratling WH, Sippel AE (1989). A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* **341**: 343-5.

Strissel PL, Dann HA, Pomykala HM, Diaz MO, Rowley JD, Olopade OI (1998b). Scaffold-associated regions in the human type I interferon gene cluster on the short arm of chromosome 9. *Genomics* **47**: 217-29.

Strissel PL, Strick R, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ (1998). An in vivo topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in the MLL breakpoint cluster region. *Blood* **92**: 3793-803.

Strissel PL, Strick R, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ (1998a). An in vivo topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in the MLL breakpoint cluster region. *Blood* **92**: 3793-803.

Strout MP, Marcucci G, Bloomfield CD, Caligiuri MA (1998). The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2390-5.

Strumberg D, Pilon AA, Smith M, Hickey R, Malkas L, Pommier Y (2000). Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol Cell Biol* **20**: 3977-87.

Stunkel W, Huang Z, Tan SH, O'Connor MJ, Bernard HU (2000). Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 repress or activate the E6 promoter, depending on the physical state of the viral DNA. *J Virol* **74**: 2489-501.

Super HG, Strissel PL, Sobulo OM, Burian D, Reshmi SC, Roe B *et al* (1997). Identification of complex genomic breakpoint junctions in the t(9;11) MLL-AF9 fusion gene in acute leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **20**: 185-95.

Super HJ, McCabe NR, Thirman MJ, Larson RA, Le Beau MM, Pedersen-Bjergaard J *et al* (1993). Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood* **82**: 3705-11.

Susse S, Scholz CJ, Burkle A, Wiesmuller L (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) and p53 independently function in regulating double-strand break repair in primate cells. *Nucleic Acids Res* **32**: 669-80.

Svejstrup JQ, Christiansen K, Gromova, II, Andersen AH, Westergaard O (1991). New technique for uncoupling the cleavage and religation reactions of eukaryotic topoisomerase I. The mode of action of camptothecin at a specific recognition site. *J Mol Biol* **222**: 669-78.

Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS *et al* (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* **273**: 7787-90.

Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H *et al* (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* **17**: 5497-508.

Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, van Gent DC, Shiraishi T, Verkaik NS *et al* (2002). Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* **420**: 93-8.

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**: 1312-6.

Tiwari R, Lakshmi NK, Surender V, Rajesh AD, Bhargava SC, Ahuja YR (2008).

Combinative exposure effect of radio frequency signals from CDMA mobile phones and aphidicolin on DNA integrity. *Electromagn Biol Med* **27**: 418-25.

Tomicic MT, Christmann M, Kaina B (2005). Topotecan-triggered degradation of topoisomerase I is p53-dependent and impacts cell survival. *Cancer Res* **65**: 8920-6.

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.

Traver RD, Siegel D, Beall HD, Phillips RM, Gibson NW, Franklin WA *et al* (1997). Characterization of a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (DT-diaphorase). *Br J Cancer* **75**: 69-75.

Tsui S, Anderson ME, Tegtmeyer P (1989). Topoisomerase I sites cluster asymmetrically at the ends of the simian virus 40 core origin of replication. *J Virol* **63**: 5175-83.

Tycko B, Sklar J (1990). Chromosomal translocations in lymphoid neoplasia: a reappraisal of the recombinase model. *Cancer Cells* **2**: 1-8.

Udvardy A, Schedl P (1991). Chromatin structure, not DNA sequence specificity, is the primary determinant of topoisomerase II sites of action in vivo. *Mol Cell Biol* **11**: 4973-84.

Valenzuela MT, Guerrero R, Nunez MI, Ruiz De Almodovar JM, Sarker M, de Murcia G *et al* (2002). PARP-1 modifies the effectiveness of p53-mediated DNA damage response. *Oncogene* **21**: 1108-16.

van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* **2**: 196-206.

van Maanen JM, Retel J, de Vries J, Pinedo HM (1988). Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review. *J Natl Cancer Inst* **80**: 1526-33.

Vance JR, Wilson TE (2001). Repair of DNA strand breaks by the overlapping functions of lesion-specific and non-lesion-specific DNA 3' phosphatases. *Mol Cell Biol* **21**: 7191-8.

Vaughan AT, Betti CJ, Villalobos MJ (2002). Surviving apoptosis. *Apoptosis* **7**: 173-7.

Vaziri H, West MD, Allsopp RC, Davison TS, Wu YS, Arrowsmith CH *et al* (1997). ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J* **16**: 6018-33.

von Kobbe C, Harrigan JA, Schreiber V, Stiegler P, Piotrowski J, Dawut L *et al* (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates both the exonuclease and helicase activities of the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res* **32**: 4003-14.

Waldman BC, Waldman AS (1990). Illegitimate and homologous recombination in mammalian cells: differential sensitivity to an inhibitor of poly(ADP-ribosylation). *Nucleic Acids Res* **18**: 5981-8.

- Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblanc J, Whitfield JF, Sikorska M (1991). Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* **51**: 1078-85.
- Wang X, Ohnishi K, Takahashi A, Ohnishi T (1998). Poly(ADP-ribosylation) is required for p53-dependent signal transduction induced by radiation. *Oncogene* **17**: 2819-25.
- Wang ZQ, Stingl L, Morrison C, Jantsch M, Los M, Schulze-Osthoff K *et al* (1997). PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev* **11**: 2347-58.
- Wasko BM, Holland CL, Resnick MA, Lewis LK (2009). Inhibition of DNA double-strand break repair by the Ku heterodimer in mrx mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **8**: 162-9.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ *et al* (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**: 727-30.
- Wesierska-Gadek J, Bugajska-Schretter A, Cerni C (1996). ADP-ribosylation of p53 tumor suppressor protein: mutant but not wild-type p53 is modified. *J Cell Biochem* **62**: 90-101.
- Wesierska-Gadek J, Wang ZQ, Schmid G (1999). Reduced stability of regularly spliced but not alternatively spliced p53 protein in PARP-deficient mouse fibroblasts. *Cancer Res* **59**: 28-34.
- West SC (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 435-45.
- Weterings E, Chen DJ (2008). The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* **18**: 114-24.
- Weterings E, Verkaik NS, Bruggenwirth HT, Hoeijmakers JH, van Gent DC (2003). The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res* **31**: 7238-46.
- Whitman SP, Liu S, Vukosavljevic T, Rush LJ, Yu L, Liu C *et al* (2005). The MLL partial tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular-targeted therapy. *Blood* **106**: 345-52.
- Whitmarsh RJ, Saginario C, Zhuo Y, Hilgenfeld E, Rappaport EF, Megonigal MD *et al* (2003). Reciprocal DNA topoisomerase II cleavage events at 5'-TATTA-3' sequences in MLL and AF-9 create homologous single-stranded overhangs that anneal to form der(11) and der(9) genomic breakpoint junctions in treatment-related AML without further processing. *Oncogene* **22**: 8448-59.
- Widlak P (2000). The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim Pol* **47**: 1037-44.
- Widlak P, Garrard WT (2005). Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* **94**: 1078-87.
- Widlak P, Lanuszewska J, Cary RB, Garrard WT (2003). Subunit structures and stoichiometries of human DNA fragmentation factor proteins before and after induction of

apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 26915-22.

Wieler S, Gagne JP, Vaziri H, Poirier GG, Benchimol S (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a positive regulator of the p53-mediated G1 arrest response following ionizing radiation. *J Biol Chem* **278**: 18914-21.

Wiemels JL, Pagnamenta A, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF (1999). A lack of a functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. *Cancer Res* **59**: 4095-9.

Wiesmüller L, Cammenga J, Deppert WW (1996). In vivo assay of p53 function in homologous recombination between simian virus 40 chromosomes. *J Virol* **70**: 737-44.

Will K, Warnecke G, Albrechtsen N, Boulikas T, Deppert W (1998a). High affinity MAR-DNA binding is a common property of murine and human mutant p53. *J Cell Biochem* **69**: 260-70.

Will K, Warnecke G, Wiesmuller L, Deppert W (1998b). Specific interaction of mutant p53 with regions of matrix attachment region DNA elements (MARs) with a high potential for base-unpairing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13681-6.

Winick NJ, McKenna RW, Shuster JJ, Schneider NR, Borowitz MJ, Bowman WP *et al* (1993). Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia treated with etoposide. *J Clin Oncol* **11**: 209-17.

Wolf BB, Green DR (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* **274**: 20049-52.

Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR (1999). Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem* **274**: 30651-6.

Wright EG (2005). Ionizing radiation and leukaemia: more questions than answers. *Hematol Oncol* **23**: 119-26.

Wright GE, Brown NC (1990). Deoxyribonucleotide analogs as inhibitors and substrates of DNA polymerases. *Pharmacol Ther* **47**: 447-97.

Wu ZH, Miyamoto S (2008). Induction of a pro-apoptotic ATM-NF-kappaB pathway and its repression by ATR in response to replication stress. *EMBO J* **27**: 1963-73.

Wuerzberger-Davis SM, Nakamura Y, Seufzer BJ, Miyamoto S (2007). NF-kappaB activation by combinations of NEMO SUMOylation and ATM activation stresses in the absence of DNA damage. *Oncogene* **26**: 641-51.

Wyman C, Kanaar R (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* **40**: 363-83.

Xia F, Wang X, Wang YH, Tsang NM, Yandell DW, Kelsey KT *et al* (1995). Altered p53 status correlates with differences in sensitivity to radiation-induced mutation and apoptosis in

two closely related human lymphoblast lines. *Cancer Res* **55**: 12-5.

Yakovchuk P, Protozanova E, Frank-Kamenetskii MD (2006). Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res* **34**: 564-74.

Yan B, Wang H, Zhuo D, Li F, Kon T, Dewhirst M *et al* (2006). Apoptotic DNA fragmentation factor maintains chromosome stability in a P53-independent manner. *Oncogene* **25**: 5370-6.

Yang L, Rowe TC, Nelson EM, Liu LF (1985). In vivo mapping of DNA topoisomerase II-specific cleavage sites on SV40 chromatin. *Cell* **41**: 127-32.

Yang YG, Cortes U, Patnaik S, Jasin M, Wang ZQ (2004). Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks. *Oncogene* **23**: 3872-82.

Yannone SM, Roy S, Chan DW, Murphy MB, Huang S, Campisi J *et al* (2001). Werner syndrome protein is regulated and phosphorylated by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **276**: 38242-8.

Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R *et al* (2002). Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* **1**: 133-43.

Yu DS, Sonoda E, Takeda S, Huang CL, Pellegrini L, Blundell TL *et al* (2003). Dynamic control of Rad51 recombinase by self-association and interaction with BRCA2. *Mol Cell* **12**: 1029-41.

Yung TM, Sato S, Satoh MS (2004). Poly(ADP-ribosylation) as a DNA damage-induced post-translational modification regulating poly(ADP-ribose) polymerase-1-topoisomerase I interaction. *J Biol Chem* **279**: 39686-96.

Yunis JJ, Soreng AL (1984). Constitutive fragile sites and cancer. *Science* **226**: 1199-204.

Yunis JJ, Soreng AL, Bowe AE (1987). Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens. *Oncogene* **1**: 59-69.

Zhang Y, Zeleznik-Le N, Emmanuel N, Jayathilaka N, Chen J, Strissel P *et al* (2004). Characterization of genomic breakpoints in MLL and CBP in leukemia patients with t(11;16). *Genes Chromosomes Cancer* **41**: 257-65.

Zhu J, Schiestl RH (1996). Topoisomerase I involvement in illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**: 1805-12.

Zoukova R, Odraska P, Dolezalova L, Hilscherova K, Marsalek B, Blaha L (2007). Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. *Environ Toxicol Chem* **26**: 2208-14.

## 8 ANHANG

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Abt	Abteilung
AG	Aktiengesellschaft
AF4	<i>ALL-1 fused gene on chromosome 4</i>
AF9	<i>ALL-1 fused gene on chromosome 4</i>
ALL	Akut lymphatische Leukämie
AML	Akut myeloische Leukämie
AML1	<i>Acute myeloid leukemia 1</i>
Amp	Ampere oder Ampicillin
APL	Akute promyeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure
AT	<i>Ataxia telangiectasia</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia telangiectasia related kinase</i>
BACH1	<i>BTB and CNC homology 1</i>
BARD1	<i>BRCA1 associated RING domain 1</i>
BCA	<i>bovine carbonic anhydrase</i>
bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
BLM	<i>Bloom's Syndrom Protein</i>
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BRCA1	<i>breast cancer 1</i>
BRCA2	<i>breast cancer 2</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C`	Carboxy-Terminus
ca.	circa
CAD	<i>capsase-activated DNase</i>
Campto	Camptothecin

CD95	<i>cluster of differentiation</i>
Chk2	<i>checkpoint kinase 2</i>
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegali Virus
d.h.	das heißt
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	dsDNA-Proteinkinase
DNA-PKcs	dsDNA-Proteinkinase <i>catalytic subunit</i>
DNase I HS	DNase I hypersensitive Stellen
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
do	<i>downstream</i>
ds	Doppelstrang
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	<i>extension ligation-mediated PCR</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
Fa.	Firma
FACS	<i>fluorescent activated cell sorter</i>
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-1, -2	Fluoreszenzkanal-1, -2
FLT3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
fr.	frühe
FSC	<i>forward scatter</i>
fwd	<i>forward</i>
g	Gramm oder Gravitationskonstante
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GMP	Guanin-Monophosphat
h	human oder Stunde
HA	Hämagglutinin
HDR	<i>homology-directed repair</i>
h.p.i.	<i>hours post infection</i>

---

HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure)
HMG	<i>high mobility group</i>
HMW	<i>high molecular weight</i>
HOX	<i>homeobox</i>
HR	konservative homologe Rekombination
HRP	<i>horse-radish-peroxidase</i>
hsp90	<i>heat shock protein 90</i>
HTS	<i>high throughput sampler</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
ICAD	<i>inhibitor of caspase-activated DNase</i>
IgG	Immunglobulin G
IgHE	<i>immunoglobulin heavy constant epsilon</i>
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of NF<math>\kappa</math>B</i>
Inc	<i>Incorporated</i>
Int	International
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
IR	ionisierende Strahlung
ITD	interne Tandemduplikation
JNK	<i>JUN kinase</i>
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
K <sub>D</sub>	Dissoziations-Konstante
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB-Medium	Luri-Bertani-Medium
LMPCR	<i>ligation-mediated PCR</i>
LMU	Ludwig-Maximilian Universität
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	Meter
m	milli
M	Molar (mol/l)
Mcm3	<i>minichromosome maintenance deficient 3</i>
mi	<i>middle</i>
min	Minute
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i>
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-Nitroso-Guanidin
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MRN	Mre11-Rad50-NBS1-Komplex

mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mut	<i>mutant</i>
MW	Molekulargewicht
N'	Amino-Terminus
n	nano
NaOH	Natriumhydroxid
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrom protein 1</i>
NFκB	<i>nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i>
NLS	<i>nucleus localisation signal</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP40	Nonidet <sup>®</sup> P40
NPQ	NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase 1
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCAF	<i>p300/CBP associated factor</i>
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGS	Protein G-Sepharose
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
Pi	anorganisches Phosphat
PI	Propidiumiodid
PIKK	<i>phosphatidylinositol 3-kinase related kinase</i>
PKC	<i>protein kinase C</i>
PNK	T4-Polynukleotidkinase
PML	Promyelozytäres-Leukämie-Protein
Polα	DNA-Polymerase alpha
Polβ	DNA-Polymerase beta
PTD	Partielle Tandemduplikation
Puro	Puromycin-Resistenzgen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Quadrant
r	resistent

---

RAR $\alpha$	<i>retinoic acid receptor <math>\alpha</math></i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
s	Sekunde
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SCE	<i>sister chromatide exchange</i>
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Ser	Serin
s/mar	<i>scaffold/matrix attachment region</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
sog.	Sogenannt
sp.	späte
ss	Einzelstrang
SSA	<i>single strand annealing</i>
SSB	<i>single strand break</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
SUMO-1	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
SV40	Simian Virus 40
T	Thymidin oder Tween 20
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T-Ag	großes Tumorantigen des SV40 Virus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBP	<i>TATA-Box binding protein</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEL	<i>Translocations-ets-leukemia</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T <sub>m</sub>	Hybridisierungstemperatur
Topo I	Topoisomerase I

Topo II	Topoisomerase II
Topo III	Topoisomerase III
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
ts	Temperatursensitiv
u	<i>unit</i>
u.a.	unter anderem
up	<i>upstream</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumenanteil
VP1	Virus Protein 1
w/v	Gewicht pro Volumen
WRN	<i>Werner's syndrome protein</i>
wt	Wildtyp
XIAP	<i>x-linked inhibitor of apoptosis</i>
XPD/XPB	<i>Xeroderma pigmentosum</i> Faktor D bzw. B
XRCC1	<i>X-ray cross complementing 1</i>
XRCC4	<i>X-ray cross complementing 4</i>
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zellkultur
zVAD-fmk	Carbobenzoxy- L-valyl- L-alanyl- $\beta$ -Methyl- L-aspart-1-yl- Fluoromethane

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Ausschnitt aus der Sequenz der <i>MLLbcr</i> mit Topoisomerase-Schnittstellen, Hotspots der apoptotischen Spaltung und Translokations-Bruchpunkten aus Mirault <i>et al.</i> , 2006 im Kontext des <i>MLL</i> -Gens.....	7
Abb. 2	Schematische Darstellung der DNA-DSB Reparatur-Wege. ....	16
Abb. 3	Prinzip des Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystems .....	18
Abb. 4	Messdokumente zur Bestimmung der Rekombinationsfrequenz mittels Durchflusszytometrie ( <i>Dot-Plots</i> ) .....	58
Abb. 5	Histogramm der Verteilung des DNA-Gehaltes in einer diploiden Zellpopulation mit normalem Zellzyklus. ....	59
Abb. 6	Annexin-V-FLUOS/PI-Färbung zur Bestimmung von Apoptose und Nekrose am FACS. ....	61
Abb. 7	Klonierungsschema für die Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP- <i>MLLbcr.fwd</i> und pHR-EGFP/3'EGFP- <i>MLLbcr.rev</i> mit integriertem <i>MLLbcr</i> -Fragment.....	65
Abb. 8	Grafische Darstellung der Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP- <i>RARabcr.fwd</i> und pHR-EGFP/3'EGFP- <i>RARabcr.rev</i> mit integriertem <i>RARabcr</i> -Fragment. ....	67

Abb. 9 Grafische Darstellung der Rekombinationsvektoren pHR-EGFP/3'EGFP- <i>IgHEmar.fwd</i> und pHR-EGFP/3'EGFP- <i>IgHEmar.rev</i> mit integriertem <i>IgHEmar</i> -Fragment.....	68
Abb. 10 Grafische Darstellung des Rekombinationsvektors pHR-EGFP/3'EGFP- <i>SV40.fwd</i> mit integriertem <i>SV40</i> -Fragment.....	69
Abb. 11 Überprüfung der in die Rekombinationsvektoren integrierten DNA- <i>cis</i> -Elemente per PCR-Analyse....	70
Abb. 12 Detektion der optimalen Puromycin-Konzentration für die Etablierung der stabilen Zelllinien WTK1(HR-EGFP/3'EGFP- <i>MLLbcr.fwd</i> ), WTK1(HR-EGFP/3'EGFP- <i>MLLbcr.rev</i> ) und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP- <i>SV40.fwd</i> ).....	72
Abb. 13 PCR-Analyse zur Überprüfung der chromosomalen Integration der Rekombinationskonstrukte HR-EGFP/3'EGFP- <i>SV40.fwd</i> , HR-EGFP/3'EGFP- <i>MLLbcr.fwd</i> und HR-EGFP/3'EGFP- <i>MLLbcr.rev</i> in einzelnen WTK1-Klonen .....	73
Abb. 14 PCR-Analyse zur Anzahl von den in WTK1-Klonen chromosomal integrierten Rekombinationskonstrukten HR-EGFP/3'EGFP- <i>SV40.fwd</i> , HR-EGFP/3'EGFP- <i>MLLbcr.fwd</i> und HR-EGFP/3'EGFP- <i>MLLbcr.rev</i> .....	75
Abb. 15 Analyse der Rekombination der <i>MLLbcr</i> -Fragment-tragenden Rekombinationsvektoren im Vergleich zu Kontrollsequenzen-tragenden Vektoren in verschiedenen Zelllinien. ....	77
Abb. 16 Analyse der Rekombination für pHR-EGFP/3'EGFP- <i>MLLbcr.fwd</i> im Vergleich zu den <i>IgHEmar</i> -tragenden Rekombinationsvektoren in WTK1 und der Apoptose-resistenten Zelllinie KMV5.....	79
Abb. 17 Einfluss der durch die Meganuklease I- <i>SceI</i> induzierten DSBe auf das Rekombinationsverhalten am <i>MLLbcr</i> -Fragment im transienten Kontext. ....	80
Abb. 18 Analyse der Rekombinationsfrequenz der stabilen Klone WTK1(HR-EGFP/3'EGFP- <i>SV40.fwd</i> ) und WTK1(HR-EGFP/3'EGFP- <i>MLLbcr.fwd</i> ) aus der 1. Selektionsphase .....	81
Abb. 19 Bestimmung der Rekombinationsfrequenz in Abhängigkeit von der Konzentration und der Inkubationszeit für die Behandlung Rekombinationsplasmid-transfizierter WTK1 Zellen mit Aphidicolin.....	85
Abb. 20 Analyse der Rekombination an verschiedenen DNA- <i>cis</i> -Elementen und Bestimmung von Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion für WTK1 Zellen nach Chemotherapeutika-Behandlung. ..	89
Abb. 21 Analyse der Rekombination am <i>MLLbcr</i> -Fragment und Bestimmung von Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion für TK6 Zellen nach Aphidicolin-Behandlung. ....	90
Abb. 22 Analyse der Rekombination am <i>MLLbcr</i> -Fragment und Quantifizierung der Apoptose mittels Annexin-PI-Färbung für WTK1 nach Anti-CD95 Antikörper-Behandlung.....	91
Abb. 23 Analyse der Rekombination am chromosomal integrierten <i>MLLbcr</i> - und <i>SV40</i> -Fragment sowie Bestimmung von Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion nach Etoposid-Behandlung.....	93
Abb. 24 Analyse der Rekombination am chromosomal integrierten <i>MLLbcr</i> - und <i>SV40</i> -Fragment sowie Bestimmung von Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion nach Camptothecin-Behandlung.....	95
Abb. 25 Quantifizierung der Apoptose mittels Annexin-V-FLUOS-Färbung und Westernblot-Analyse zu gespaltener Caspase-3 und PARP-1 für die stabilen WTK1 Klone nach Etoposid- und Camptothecin-Behandlung.....	96
Abb. 26 Analyse der Rekombination am chromosomal integrierten <i>MLLbcr</i> -Fragment sowie Bestimmung von Zellzyklusverteilung und Zelltodinduktion für die WTK1 Zellklone nach Aphidicolin-Behandlung.....	98

Abb. 27	Analyse von DNA-Brüchen innerhalb der artifiziell integrierten DNA- <i>cis</i> -Elemente der WTK1 Zellklone nach Behandlung mit Etoposid per PCR.....	100
Abb. 28	Inhibition von Caspasen bei gleichzeitiger Behandlung mit Etoposid oder Camptothecin. Rekombinationsanalyse im extrachromosomalen Kontext. Zellzyklus- und Zelltod- sowie Westerblot-Analyse von gespaltener Caspase 3.....	103
Abb. 29	Inhibition von Caspasen bei gleichzeitiger Behandlung mit Etoposid oder Camptothecin. Rekombinationsanalyse im chromosomalen Kontext. Zellzyklus- und Zelltod- sowie Westernblot-Analyse von gespaltener Caspase 3.....	106
Abb. 30	Analyse der Rekombination an den bcr-Fragmenten <i>RAR</i> abcr.rev und <i>MLL</i> bcr.rev im extrachromosomalen Kontext nach Inhibition der Caspase- und/oder CAD-Aktivität bei gleichzeitiger Behandlung mit und ohne Aphidicolin. Bestimmung der Expressionsinhibition von CAD für shRNA-exprimierende Vektoren.....	109
Abb. 31	Analyse der Rekombination an den chromosomal integrierten DNA- <i>cis</i> -Elementen nach Inhibition der CAD-Aktivität durch Expression von mCAD bei gleichzeitiger Behandlung mit und ohne Etoposid.....	111
Abb. 32	Inhibition von NFκB bei gleichzeitiger Behandlung mit Etoposid oder Camptothecin. Rekombinationsanalyse im extrachromosomalen Kontext. Zellzyklus- und Zelltod- sowie Westernblot-Analyse von IκBα und mutIκBα.....	115
Abb. 33	Inhibition von NFκB bei gleichzeitiger Behandlung mit Etoposid oder Camptothecin. Rekombinationsanalyse im chromosomalen Kontext. Zellzyklus- und Zelltod- sowie Westernblot-Analyse von IκBα und mutIκBα.....	117
Abb. 34	Einfluss von p53-, PARP-1- und PARP-DBD-Expression auf die Rekombination an den Vektoren pHR-EGFP/3'EGFP- <i>RAR</i> abcr.fwd oder pHR-EGFP/3'EGFP- <i>RAR</i> abcr.rev.....	120
Abb. 35	Rekombination an zellulären Chromosomen nach der Expression von p53, PARP-1 oder PARP-DBD sowie bei gleichzeitigem <i>knockdown</i> der endogenen Topo I.....	122
Abb. 36	Die Meganuklease I- <i>SceI</i> induzierte DSB-Reparatur an zellulären Chromosomen in Abhängigkeit von p53, PARP-1 und Topo I.....	124
Abb. 37	Mögliche Erklärung für einen fehlenden Anstieg der Rekombination am <i>MLL</i> bcr-Fragment nach Anti-CD95 Antikörper-Behandlung im Fluoreszenz-basierten Rekombinations-Testsystem.....	135
Abb. 38	Schema zur möglichen Regulation der Caspase-abhängigen Induktion von Brüchen und deren Reparatur nach Behandlung mit Aphidicolin.....	140
Abb. 39	Schema zur NFκB-Aktivierung über Etoposid und Camptothecin nach Wuerzberger-Davis <i>et al.</i> (2007) im Zusammenhang mit der Stimulierung von HDR an den DNA- <i>cis</i> -Elementen ( <i>cis</i> -E.) nach Etoposid- bzw. Camptothecin- vermittelter DSB-Induktion (Doppelpfeile).....	144

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Primärantikörper.....	31
Tab. 2	Sekundärantikörper.....	33
Tab. 3	Vektoren.....	33
Tab. 4	Oligonukleotide zur Konstruktion von shRNA-exprimierenden Vektoren.....	38
Tab. 5	Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA-Substraten.....	39

Tab. 6	Eukaryotische Zelllinien.....	39
Tab. 7	Bakterienstämme.....	41
Tab. 8	Pipettierschema für jeweils fünf SDS-PAGE-Gele.....	50
Tab. 9	Parameter zur exponentiellen Elektroporation bei einer Kapazität von 1050 $\mu$ F.....	54
Tab. 10	Oligonukleotide zur Analyse der DNA- <i>cis</i> -Elemente innerhalb der Rekombinationsvektoren und die Größen der amplifizierten PCR-Produkte.....	69
Tab. 11	Verwendete zytotoxische Agenzien und ihre Wirkmechanismen zur Analyse des Bruch- und Rekombinationsverhaltens am <i>MLL</i> bcr-Fragment.....	83
Tab. 12	Zusammenfassung der theoretisch möglichen Effekte, die zur Rekombinationssteigerung an den DNA- <i>cis</i> -Elementen führen können.....	133
Tab. 13	Einzelwerte der Rekombinationssteigerungen.....	192

## 8.4 Sequenzierungsanalysen der verwendeten DNA-*cis*-Elemente im Kontext der Rekombinationsvektoren

Blaue Buchstaben kennzeichnen die jeweiligen Sequenzen der DNA-*cis*-Elemente, grüne Buchstaben die Teilsequenzen der mutierten *EGFP*-Gene und Schwarze interstitielle Sequenzen zwischen *EGFP* und DNA-*cis*-Element. Die *cis*-Oligonukleotide sind unterstrichen dargestellt. Reste der Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme nach Verdau und nach Behandlung mit dem Klenow-Fragment bzw. der *T4*-Polymerase sind hellgrün dargestellt. Bestandteile von *Cla*-*linker*-Sequenzen sind durch orange hervorgehoben. In Grau sind „Abstandshalter“-Sequenzen dargestellt. Bei fehlen von Nukleotiden wurde dieser Bereich mit leerem Unterstrich angezeigt. Rote Buchstaben zeigen Austausch zu der publizierten Sequenz an. DNA-Topoisomerase I-Erkennungssequenzen sind durch pinke Buchstaben hervorgehoben und das *DNA unwinding* Motiv hellblau. Dargestellt ist, die Nukleotidfolge, wie sie nach DNA-Sequenzierung vorlag. Die drei Punkte (...) deuten an ab welcher Position die Qualität der Sequenzierung hoch genug zur Auswertung war.

### Lage der *cis*-Oligonukleotide und Sequenzteile am Beispiel von *MLL*bcr (Gesamtgröße: 635 bp; *MLL*-Anteil: 399 bp) (5'→3')

```

ACA TGG TCC TGC TGG AGT TCG TGA CCG CCG CCG GGA TCA CTC TCG GCA TGG ACG AGC
TGT ACA AGT AAA GCG GCC GCG GAT CCC CCG GGC TGC AGG AAT TCG ATA TCA AGC TTA
TCG ATA CCG TCG ACG ATA CTT ACA ACT GTT TCG TAT ATT ACA GAA AAC GTT TAA ACC
CTC CCT ATT TCC CCC ACC CCA CTC CTT TAT ATT CCC ATA GCT CTT TGT TTA TAC CAC
TCT TAG GTC ACT TAG CAT GTT CTG TTA AAT CTT GTA TTA TAT TTA TTT TGT TAC TTT
CTA TTT CCA CTG GTA TTA CCA CTT TAG TAC TCT GAA TCT CCC GCA ATG TCC AAT ACT
GTA CTT TTT TAC ATA GTC ATT GCT TAA TGA ATA TGT ATT GAA TTA AAT ATA TGC CAG

```

TGG ACT ACT AAA ACC CAA AGT ATA TAA GAA GGG TAT GGT TGA TTA TGT TTT TCT ACA  
TAT TAT TTG ACA TAC TTC TAT CTT CCC ATG TTC TTA CTA TAG TTT GTG TAT TGC CAA  
GTC TGT TGT GAG CCC TTC ATC GTC GAC CTC GAG TAG TGA GTG AGC AAG GGC GAG GAG  
CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC  
AAG TTC

**Sequenziertes PCR-Fragment aus pHR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.fwd (forward)**  
**(Gesamtgröße: 633 bp; *MLL*-Anteil: 399 bp) (5'→3')**

...GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TAA AGC GGC CGC GGA TCC  
CCC GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC GAT ACT TAC AAC  
TGT TTC GTA TAT TAC AGA AAA CGT TTA AAC CCT CCC TAT TTC CCC CAC CCC ACT CCT  
TTA TAT TCC CAT AGC TCT TTG TTT ATA CCA CTC TTA GGT CAC TTA GCA TGT TCT GTT  
AAA TCT TGT ATT ATA TTT ATT TTG TTA CTT TCT ATT TCC ACT GGT ATT ACC ACT TTA  
GTA CTC TGA ATC TCC CGC AAT GTC CAA TAC TGT ACT TTT TTA CAT AGT CAT TGC TTA  
ATG AAT ATG TAT TGA ATT AAA TAT ATG CCA GTG GAC TAC TAA AAC CCA AAG TAT ATA  
AGA AGG GTA TGG TTG ATT ATG TTT TTC TAC ATA TTA TTT GAC ATA CTT CTA TCT TCC  
CAT GTT CTT ACT ATA GTT TGT GTA TTG CCA AGT CTG TTG TGA GCC CTT CAT CG\_ \_GA  
CCT CGA GTA GTG AGT GAG CAA GGG CGA GGA GCT GTT CAC CGG GGT GGT GCC CAT CCT  
GGT CGA GCT GGA CGG CGA CGT A...

**Sequenziertes PCR-Fragment aus pHR-EGFP/3'EGFP-*MLL*bcr.rev (reverse)**  
**(Gesamtgröße: 635 bp; *MLL*-Anteil: 399 bp) (3'→5')**

...CTC TCG GCA TGG ACG AGC TGT ACA AGT AAA GCG GCC GCG GAT CCC CCG GGC TGC  
AGG AAT TCG ATA TCA AGC TTA TCG ATA CCG TCG ACG ATG AAG GGC TCA CAA CAG ACT  
TGG CAA TAC ACA AAC TAT AGT AAG AAC ATG GGA AGA TAG AAG TAT GTC AAA TAA TAT  
GTA GAA AAA CAT AAT CAA CCA TAC CCT TCT TAT ATA CTT TGG GTT TTA GTA GTC CAC  
TGG CAT ATA TTT AAT TCA ATA CAT ATT CAT TAA GCA ATG ACT ATG TAA AAA AGT ACA  
GTA TTG GAC ATT GCG GGA GAT TCA GAG TAC TAA AGT GGT AAT ACC AGT GGA AAT AGA  
AAG TAA CAA AAT AAA TAT AAT ACA AGA TTT AAC AGA ACA TGC TAA GTG ACC TAA GAG  
TGG TAT AAA CAA AGA GCT ATG GGA ATA TAA AGG AGT GGG GTG GGG GAA ATA GGG AGG  
GTT TAA ACG TTT TCT GTA ATA TAC GAA ACA GTT GTA AGT ATC GTC GAC CTC GAG TAG  
TGA GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG  
GAC GGC GAC GTA A...

**Sequenziertes PCR-Fragment aus pHR-EGFP/3'EGFP-*RARα*bcr.fwd (Gesamtgröße:**  
**514 bp; *RARα*-Anteil: 281 bp) (5'→3')**

...CGG GAT CAC TCT CGG CAT GGA CGA GCT GTA CAA GTA AAG CGG CCG CGG ATC CCC  
CGG GCT GCA GGA ATT CGA TAT CAA GCT TAT CGA TAC CGT CGA CGA TAG TGG CCG GCT  
TTG AAT ATC CTG TTG ACC CCA GTT TCC TCT GCC CCC AGC TTA TGT CCT CTT CCC TCC  
CTC CTC TTC AAG CGT TAA CTC CTT CCT AAC TCG GGG GGA GAA CGG GGC CAG GCC GCC

CAG GGG CAA GAG CTT TAG AAT CAG GGT GAC CCC CAC CCC TAC TCC CCA AGC ACA GTC  
 ACG GCA CAC ATA CAA ATG TGA TGG TTT ATC ATT GTA TCT TTG TGG TTT TGA AGG TGG  
 GGG TCC TAG GAG TCC AGA GGA GTG ATG GGG TGC TGG AGG CTT ATC GTC GAC CTC GAG  
 TAG TGA GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG  
 CTG GAC GGC GAC GTA A...

**Sequenziertes PCR-Fragment aus pHR-EGFP/3'EGFP-RAR $\alpha$ bcr.rev (Gesamtgröße: 514 bp; RAR $\alpha$ -Anteil: 281 bp) (3'→5')**

...GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TAA AGC GGC CGC GGA  
 TCC CCC GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC GAT AAG CCT  
 CCA GCA CCC CAT CAC TCC TCT GGA CTC CTA GGA CCC CCA CCT TCA AAA CCA CAA AGA  
 TAC AAT GAT AAA CCA TCA CAT TTG TAT GTG TGC CGT GAC TGT GCT TGG GGA GTA GGG  
 GTG GGG GTC ACC CTG ATT CTA AAG CTC TTG CCC CTG GGC GGC CTG GCC CCG TTC TCC  
 CCC CGA GTT AGG AAG GAG TTA ACG CTT GAA GAG GAG GGA GGG AAG AGG ACA TAA GCT  
 GGG GGC AGA GGA AAC TGG GGT CAA CAG GAT ATT CAA AGC CGG CCA CTA TCG TCG ACC  
 TCG AGT AGT GAG TGA GCA AGG GCG AGG AGC TGT TCA CCG GGG TGG TGC CCA TCC TGG  
 TCG AGC TGG ACG GCG ACG TAA...

**Sequenziertes PCR-Fragment aus pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.fwd (Gesamtgröße: 601 bp; IgHE-Anteil: 376 bp) (5'→3')**

...TCA CTC TCG GCA TGG ACG AGC TGT ACA AGT AAA GCG GCC GCG GAT CCC CCG GGC  
 TGC AGG AAT TCG ATA TCA AGC TTA TCG ATA CCG TCG AGG TGT TCT GGT TCT GAT CGG  
 CCA TCT TGA CTC CAA CTC AAC ATT GCT CAA TTC ATT TAA AAA TAT TTT AAA CTT AAT  
 TTA TTA TTG TTA AAA GTC AGT TCT GAA TAG GGT ATG AGA GAG CCT CAC TCC CAT TCC  
 TCG GTT AAA CTT TAA GTA ATG TCA GTT CTA CAC AAA CAA GAC CTC AAA TTG ATT GAC  
 AAA AAT TTT GGA CAT TTA AAA AAA TGA GTA CTT GAA AAC CCT CTC ACA TTT TAA AGT  
 CAC AGT ATT TAA CTA TTT TTC CTA GGA ACC AAC TTA AGA GTA AAA GCA ACA TCT AAT  
 ATT CCA TAC ACA TAC TTC TGT GTT CCT TTG AAA GCT GGA CTT TTG CAG GCT CCA CCA  
 GAC CTC TCT AGT CGA CCT CGA GTA GTG AGT GAG CAA GGG CGA GGA GCT GTT CAC CGG  
 GGT GGT GCC CAT CCT GGT CGA GCT GGA CGG CGA CGT AAA CGG CC...

**Sequenziertes PCR-Fragment aus pHR-EGFP/3'EGFP-IgHEmar.rev (Gesamtgröße: 601 bp; IgHE-Anteil: 376 bp) (3'→5')**

...CGC CGC CGG GAT CAC TCT CGG CAT GGA CGA GCT GTA CAA GTA AAG CGG CCG CGG  
 ATC CCC CGG GCT GCA GGA ATT CGA TAT CAA GCT TAT CGA TAC CGT CGA CTA GAG AGG  
 TCT GGT GGA GCC TGC AAA AGT CCA GCT TTC AAA GGA ACA CAG AAG TAT GTG TAT GGA  
 ATA TTA GAA GAT GTT GCT TTT ACT CTT AAG TTG GTT CCT AGG AAA AAT AGT TAA ATA  
 CTG TGA CTT TAA AAT GTG AGA GGG TTT TCA AGT ACT CAT TTT TTT AAA TGT CCA AAA  
 TTT TTG TCA ATC AAT TTG AGG TCT TGT TTG TGT AGA ACT GAC ATT ACT TAA AGT TTA  
 ACC GAG GAA TGG GAG TGA GGC TCT CTC ATA CCC TAT TCA GAA CTG ACT TTT AAC AAT  
 AAT AAA TTA AGT TTA AAA TAT TTT TAA ATG AAT TGA GCA ATG TTG AGT TGG AGT CA

GAT GGC CGA TCA GAA CCA GAA CAC CT CGA CCT CGA GTA GTG AGT GAG CAA GGG CGA  
GGA GCT GTT CAC CGG GGT GGT GCC CAT CCT GGT CGA GCT GGA CGG CGA CGT AAA CG...

**Sequenziertes PCR-Fragment aus pHR-EGFP/3'EGFP-SV40.fwd (Gesamtgröße: 638 bp; SV40-Anteil: 413 bp) (5'→3')**

...GGA TCA CTC TCG GCA TGG ACG AGC TGT ACA AGT AAA GCG GCC GCG GAT CCC CCG  
GGC TGC AGG AAT TCG ATA TCA AGC TTA TCG ATA CCG TCG AGT GCT GGG TTC CTG ATC  
CAA GTA AAA ATG AAA ACA CTA GAT ATT TTG GAA CCT ACA CAG GTG GGG AAA ATG TGC  
CTC CTG TTT TGC ACA TTA CTA ACA CAG CAA CCA CAG TGC TTC TTG ATG AGC AGG GTG  
TTG GGC CCT TGT GCA AAG CTG ACA GCT TGT ATG TTT CTG CTG TTG ACA TTT GTG GGC  
TGT TTA CCA ACA CTT CTG GAA CAC AGC AGT GGA AGG GAC TTC CCA GAT ATT TTA AAA  
TTA CCC TTA GAA AGC GGT CTG TGA AAA ACC CCT ACC CAA TTT CCT TTT TGT TAA GTG  
ACC TAA TTA ACA GGA GGA CAC AGA GGG TGG ATG GGC AGC CTA TGA TTG GAA TGT CCT  
CTC AAG TAG AGG AGG TTA GGG TTT ATG AGG ACA CAG AGG AGC TTC CTG GGG ATC TC  
GAC CTC GAG TAG TGA GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC  
CTG GTC GAG CTG GAC G...

## 8.5 Rekombinationsdaten

**Tab. 13 Einzelwerte der Rekombinationssteigerungen.**  
P-Werte errechnet über *Wilcoxon matched pairs test*

Abb.	Rekombinationssteigerung	P-Wert
<b>Abb. 15: WTK1</b>		
<i>MLLbcr.fwd</i> vs. <i>SV40.fwd</i>	3,3-fach	<0,0001
<i>MLLbcr.fwd</i> vs. HR3'	5-fach	<0,0001
<i>MLLbcr.fwd</i> vs. <i>RARabc.fwd</i>	2,3-fach	=0,001
<i>MLLbcr.fwd</i> vs. <i>RARabc.rev</i>	2,2-fach	=0,0039
<i>MLLbcr.rev</i> vs. <i>SV40.fwd</i>	2,5-fach	<0,0001
<i>MLLbcr.rev</i> vs. HR3'	3,9-fach	<0,0001
<i>MLLbcr.rev</i> vs. <i>RARabc.fwd</i>	1,8-fach	=0,0039
<i>MLLbcr.rev</i> vs. <i>RARabc.rev</i>	1,7-fach	=0,0039
<b>Abb. 15: TK6</b>		
<i>MLLbcr.fwd</i> vs. <i>SV40.fwd</i>	3,9-fach	<0,0001
<i>MLLbcr.rev</i> vs. <i>SV40.fwd</i>	1,5-fach	<0,0001
<b>Abb. 15: T47D</b>		
<i>MLLbcr.fwd</i> vs. <i>SV40.fwd</i>	1,8-fach	<0,0001
<i>MLLbcr.rev</i> vs. <i>SV40.fwd</i>	1,4-fach	=0,0004

<b>Abb. 20: ohne vs. mit Camptothecin</b>		
<i>SV40.fwd</i>	1,63-fach	=0,0003
HR3'	1,95-fach	=0,0005
<i>MLLbcr.fwd</i>	1,51-fach	=0,0313
<i>MLLbcr.rev</i>	1,81-fach	=0,0009
<b>Abb. 20: ohne vs. mit Etoposid</b>		
<i>SV40.fwd</i>	1,95-fach	=0,0024
HR3'	1,92-fach	=0,0313
<i>MLLbcr.fwd</i>	1,43-fach	=0,0313
<i>MLLbcr.rev</i>	1,72-fach	=0,001
<b>Abb. 20: ohne vs. mit 5-Fluorouracil</b>		
<i>SV40.fwd</i>	1,59-fach	=0,0012
HR3'	1,58-fach	=0,0313
<i>MLLbcr.fwd</i>	1,64-fach	=0,0313
<i>MLLbcr.rev</i>	1,81-fach	=0,0006
<b>Abb. 20: ohne vs. mit MNNG</b>		
<i>SV40.fwd</i>	1,78-fach	=0,0067
HR3'	1,68-fach	=0,0313
<i>MLLbcr.fwd</i>	1,4-fach	=0,0313
<i>MLLbcr.rev</i>	1,52-fach	=0,0009
<b>Abb. 20: ohne vs. mit Paclitaxel</b>		
<i>SV40.fwd</i>	2,93-fach	=0,0005
HR3'	3,1-fach	=0,0005
<i>MLLbcr.fwd</i>	2,33-fach	=0,0313
<i>MLLbcr.rev</i>	2,79-fach	=0,0005

## 8.6 Danksagung

Prof. Dr. Lisa Wiesmüller danke ich sehr für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die interessanten Aufgabenstellungen und die Betreuung dieser Arbeit. Des Weiteren danke ich ihr sehr für die hohe Diskussionsbereitschaft, für ihren Optimismus, ihre stete Förderung und Hilfsbereitschaft.

Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler und Prof. Dr. Wolfgang Weidemann danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit und ihre Bemühungen mir, trotz meiner Selbstüberschätzung in Sachen „Abgabetermin Doktorarbeit“, meinen Weltenbummler-Drang rechtzeitig ermöglichen zu wollen.

Allen MitarbeiterInnen des EOL danke ich für die Unterstützung und sehr gute Zusammenarbeit. Dies gilt insbesondere für Marlen Keimling und Simone Siehler. Wir suchten nach Lösungen wie die „???“, kämpften für Gerechtigkeit wie „Spiderman und seine Freunde“, waren so frech wie Tick, Trick und Track und so unterschiedlich wie „Freund Blase, Gevatter Bastschuh und der Strohalm“.

Bei Angela Dacke möchte ich mich vor allem für die Bereitstellung der Daten zu T47D bedanken.

Prof. Dr. Simone Fulda samt Arbeitsgruppe danke ich für die Einblicke in das Mysterium „Apoptose“ und für den Notfall-Verleihservice jeglicher Arbeitsmittel.

Des Weiteren danke ich Dr. Bernd Baumann und Bin Yan für die zur Verfügung gestellten Vektoren pcDNA3-mutIkB $\alpha$  bzw. pLPCX-mICAD. Dr. Bernd Baumann danke ich zusätzlich für die schnelle Beantwortung von Fragen rund um IkB.

Martin danke ich für viel zu viel, als dass die über 200 Seiten dieser Arbeit reichen würden es aufzulisten.

Meiner Familie samt Freunde danke ich von ganzem Herzen für die moralische Unterstützung. Bald bin ich nun mit der Schule fertig!

## 8.7 Curriculum vitae

Geburtsdatum: 02.04.1979  
 Geburtsort: Meerane  
 Nationalität: deutsch  
 Familienstand: ledig

### Ausbildung und beruflicher Werdegang

---

- 02/2004-01/2009 Doktorandin in der AG Prof. Dr. Lisa Wiesmüller, Endokrinologisch Onkologisches Labor, Sektion Gynäkologische Onkologie Universitätsfrauenklinik Ulm
- Thema der Dissertation: „Analyse der genetischen Rearrangements an einem Segment der *mixed lineage leukemia* Bruchpunktregion (*MLLbcr*) und an DNA-Sequenzen mit Topoisomerase I-Erkennungsstellen“
- 02/2003-01/2004 Diplomandin in der AG Prof. Dr. Dietrich H. Nies, Abt. Molekulare Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Thema der Diplomarbeit: „Charakterisierung neuer Chromatresistenz-Determinanten und Isolierung des Chromat-induzierbaren Sigma-Faktors RpoH aus *Ralstonia metallidurans*“
- 10/1998-01/2003 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Hauptfach: Mikrobiologie  
 Nebenfächer: Genetik  
 Biochemie  
 Immunologie
- 01/1998-09/1998 Hilfsschwester im Pflegeheim *Chaseley Trust Nursing Home* für Menschen mit einer Behinderung und im Altersheim *Glindon Nursing Home*, Eastbourne (GB)

- 09/1997-12/1997      Englisch Sprachkurs am *YES Education Centre* Eastbourne (GB)  
Abgeschlossen mit Zertifikaten in „*communicative skills in English*“
- 07/1997                Abitur am Gymnasium in Penig

### **Publikationen**

---

Baumann C, Boehden GS, Burkle A, Wiesmüller L.

Poly(ADP-RIBOSE) polymerase-1 (Parp-1) antagonizes topoisomerase I-dependent recombination stimulation by P53.

Nucleic Acids Res. 2006 Feb 9;34(3):1036-49.

Boehden GS, Baumann C, Siehler S, Wiesmüller L.

Wild-type p53 stimulates homologous recombination upon sequence-specific binding to the ribosomal gene cluster repeat.

Oncogene. 2005 Jun 16;24(26):4183-92.

Nies DH, Rehbein G, Hoffmann T, Baumann C, Grosse C.

Paralogs of genes encoding metal resistance proteins in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34.J Mol Microbiol Biotechnol. 2006;11(1-2):82-93.

Gatz SA, Keimling M, Baumann C, Dörk T, Debatin KM, Fulda S, Wiesmüller L

Resveratrol modulates DNA double-strand break repair pathways in an ATM/ATR-p53-and – Nbs1-dependent manner.

Carcinogenesis. 2008 Jan 3;29(3):519-527.

Restle A, Färber M, Baumann C, Böhringer M, Scheidtmann KH, Müller-Tidow C, Wiesmüller L

Dissecting the role of p53 phosphorylation in DNA repair provides new clues for gain-of-function mutants.

Nucleic Acids Res. 2008 Sep;36(16):5362-75.

## **Erklärung an Eides Statt**

Ich, Cindy Baumann, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Analyse der genetischen Rearrangements an einem Segment der *mixed lineage leukemia* Bruchpunktregion (*MLLbcr*) und an DNA-Sequenzen mit Topoisomerase I-Erkennungsstellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Cindy Baumann