

**Regulation und funktionelle Analyse der menschlichen
Mismatchreparaturgene /-proteine am speziellen Beispiel
von hMSH2**

**Dissertation
zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG**

vorgelegt von

Dr. med. Stefan Scherer

aus

Ludwigshafen/Rhein

Würzburg, 2003

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. M. Scharl

Gutachter: Prof. Dr. H.K. Müller-Hermelink

Tag des Promotionskolloquiums: 24.02.2004

Urkunde ausgehändigt am:

Für Sandra -
die dies alles ermöglichte,
und mitgetragen hat -

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

1. Tumorbegriff und Tumorentstehung	1
2. Tumorsuppressorgene/Onkogene	1
3. HNPCC-Tumore	2
4. DNA-Reparatur-Systeme	5
4.1 Basen-Exzisions-Reparatur-System	5
4.2 Methyl-gesteuertes Mismatch-Reparatur-System (MGMR)	6
4.3 Nukleotid-Exzisions-Reparatur-System (NER)	10
5. Das Tumorsuppressorgen p53	10
6. c-Jun als UV-induzierter Transkriptionsfaktor	14

II. Material und Methoden

1. Zellkulturmethoden	16
1.1 Kultivierung und Subpassagierung	17
1.2 Kryokonservierung von Zellen	18
1.3 Auftauen der Zellen	18
1.4 Bestrahlung der Zellen	19
2. Proteinmethoden	
2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung	
2.1.1 Herstellung eines Albumin-Standards	19
2.1.2 Herstellung von Probenverdünnungen	20
2.1.3 Proteinmessung nach dem BCA Protein Assay	20
2.2 Proteinquantifizierung (Proteinbestimmung nach Bradford, 1976)	21
3. Western Blot	21
3.1 Proteinaufarbeitung	22
3.2 Gellauf	23
3.3 Blotting	24
3.4 Blocken	25
3.5 Immunfärbung, Chemilumineszenz-Nachweis	26

4. DNA		
4.1	Allgemeine DNA-Methoden	
4.1.1	Reinigung von DNA	
4.1.1.1	Fällung von DNA-Fragmenten	28
4.1.1.2	Phenol-Chloroform-Iso- amylalkohol-(PCI)-Extraktion	29
4.1.2	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen (RE)	29
4.1.3	Analyse durch Agarosegel-Elektrophorese	31
4.1.4	DNA-Elution aus Agarosegelen	32
4.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
4.3	Klonierung von DNA-Fragmenten und Aufarbeitung von Plasmid-DNA	35
4.3.1	Amplifikation des hMSH2-Reporter- genkonstruktes	35
4.3.2	Mutagenese	35
4.3.3	Dephosphorylierung von DNA-Enden	36
4.3.4	Ligation von DNA	36
4.3.5	Herstellung kompetenter Bakterien	37
4.3.6	Transformation	38
4.3.7	Plasmid-DNA-Präparation	39
4.3.7.1	Plasmid-DNA-Minipräparation mit alkalischer Lyse	39
4.3.7.2	Plasmid-DNA-Midipräparation	40
4.4	DNA-Sequenzierung	
4.4.1	Probenbereitung	41
4.4.2	Präparation eines Sequenzierungsgels	43
4.4.3	Bearbeiten der Sequenzen am Computer	44
4.5	Transfektion	
4.5.1	DNA-Transfer in eukaryotische Zellen mittels Kalziumphosphat-Methode	44
4.5.2	DNA-Transfer in eukaryotische Zellen mittels Liposomentechnik	45
4.6	Aufschluss eukaryotischer Zellen, Proteinextraktion und -quantifizierung	
4.6.1	Aufschluss eukaryotischer Zellen und Proteinpräparation nach liposomaler Transfektion	46
4.6.2	Aufschluss eukaryotischer Zellen und Proteinpräparation nach Transfektion mittels Kalziumphosphat	47
4.7	Messung der Reporter-Genaktivitäten	47
4.7.1	Luziferase-Aktivitäts-Bestimmung	47
4.7.2	β -Galaktosidase-Bestimmung	48

4.7.3	Auswertung der Messergebnisse	49
5.	Immunfluoreszenz	49
6.	FACS-Analyse zur Apoptosemessung /-detektion	50
7.	TUNEL-Assay	53
8.	Repair-Assay	
8.1	Phagenisolierung / DNA-Präparation	54
8.2	dsDNA Präparation	57
8.3	Präparation der Heteroduplex DNA	58
8.4	Herstellung kompetenter Bakterien	59
8.5	Zellyse und Proteingewinnung	60
8.6	Heteroduplexreparatur in menschlichen Zellen	61
8.7	Bestimmung der Reparaturkapazität	62
8.8	Auswertung des Assays	63
9.	RNA	
9.1	RNA-Isolierung	64
9.2	RT-PCR	65
9.3	cDNA Amplifikation	67
III.	Ergebnisse	
1.	Strukturelle und funktionelle Analyse der Promotorregion des menschlichen Mismatch-Reparatur-Gens hMSH2	69
2.	Herstellung von hMSH2-Promotorkonstrukten	71
2.1	Promotorsequenz von hMSH2 und Primerdesign	71
2.2	PCR Amplifikation und Ligation sowie DNA Gewinnung	72
3.	Analyse des hMSH2 Promotors durch Reporter-genexperimente	73
4.	Analyse der Regulation der hMSH2 Transkriptmenge	85
5.	Analyse der Regulation des hMSH2 Proteins	88
6.	Untersuchung der Apoptoserate in Abhängigkeit von der	

Strahlendosis	90
7. Test auf Reparatureffizienz	93
8. Zelluläre Lokalisation von hMSH2 in Abhängigkeit der Strahlendosis	96
IV. Diskussion	
1. Die Promotorsequenz von hMSH2	100
2. Regulation des hMSH2 Promotors als Reaktion auf UV-Schäden	100
3. DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle	102
4. Kooperation von p53 und c-Jun in der Aktivierung von hMSH2	102
5. Modell der Interaktion von p53 und c-Jun in der Aktivierung von hMSH2	104
6. Mismatchreparaturproteine als Proteine in der Apoptosesignalgebung	105
7. Zelluläre Lokalisation von hMSH2	109
V. Zusammenfassung	111
VI. Summary	113
VII. Abkürzungen	115
VIII. Literatur	118
IX. Publikationen	132
X. Danksagung	136
XI. Lebenslauf	137
XII. Eidesstattliche Erklärung	139

I. Einleitung

1. Tumorbegriff und Tumorentstehung

Die Begriffe „Neoplasie“ (Neubildung) und „Tumor“ werden im allgemeinen synonym verwendet. Unter diesen Oberbegriffen versteht man eine abnorme Vergrößerung eines Gewebes, welche durch autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen entsteht. Der Begriff „Krebs“ charakterisiert ein malignes Geschehen, welches sich durch infiltratives und destruierendes Wachstum, sowie der Fähigkeit zur Metastasenbildung von benignen Tumoren unterscheidet.

Nicht organisiert proliferierendes Gewebe dehnt sich unbegrenzt aus und bedroht meist das Leben des gesamten Organismus. Jeder Zelltyp, jedes Gewebe kann zum Ausgangspunkt eines charakteristischen Tumors mit eigener Wachstumsgeschwindigkeit, Prognose und Therapiemöglichkeit werden. Die Entstehung von Tumoren aus Normalzellen wird als Transformation bezeichnet, die von bösartigen Tumoren als maligne Transformation. Durch ein initiales Ereignis in einer einzelnen Zelle erhält diese gegenüber Nachbarzellen einen Wachstumsvorteil. Hieran können Gene durch Mutation oder Fehlregulation aktiv beteiligt sein; solche Gene nennt man Onkogene. Dieser Begriff impliziert eine dominante Wirkung auf die maligne Transformation. Andere Gene tragen durch Verlust beider Allele zur malignen Transformation bei; diese nennt man Tumorsuppressorgene.

Als Karzinome bezeichnet man Tumore, die von Epithelien ausgehen, Sarkome sind mesenchymalen Ursprungs. Beide Entitäten bilden Gewebeverbände und somit solide Tumore.

Die Tumorgenese ist in den meisten Fällen kein Einschnittprozess, bei dem eine einzige Mutation für die maligne Transformation ausreicht. Die Tatsache, dass zwei oder mehr Mutationen für die Ausprägung des vollen malignen Phänotyps verantwortlich sind wird als „Mehrschritt-Kanzerogenese“ bezeichnet.

2. Tumorsuppressorgene und Onkogene

Proto-Onkogene fördern das Zellwachstum, Tumorsuppressorgene bremsen es. Zusammen sind diese beiden Klassen für einen Großteil unkontrollierter Zellvermehrungsprozesse in menschlichen Tumoren verantwortlich.

Wenn ein Proto-Onkogen in der Regulator- oder in der Strukturregion mutiert wird, kann als Folge zu viel von seinem wachstumsfördernden Protein

hergestellt werden oder dieses übermäßig aktiv sein. Aus dem Proto-Onkogen ist ein Onkogen geworden, das die Zelle zu übermäßiger Vermehrung anregt. Viele Proto-Onkogene kodieren für Proteine, welche für die Signaltransduktion wachstumsfördernder Signale verantwortlich sind. Wenn eine Mutation in einem Proto-Onkogen ein wichtiges Signalübertragungssystem permanent aktiviert, so dass dieses auch dann ein wachstumsstimulierendes Signal übermittelt, wenn an der Zelloberfläche kein Wachstumsreiz ankam, beginnt sich die entsprechende Zelle der Wachstumskontrolle zu entziehen.

Demgegenüber tragen Tumorsuppressorgene zur Krebsentstehung bei, wenn sie durch Mutationen inaktiviert werden. Als Folge verliert die Zelle funktionsfähige Suppressorproteine und damit entscheidende Wachstumsbremsen, die sie normalerweise an einer unangemessenen Vermehrung hindern.

3. HNPCC - Tumore

Hereditäre **N**ichtpolypöse **C**olorectale **C**arcinome (**HNPCC**) sind unter den vererbaren kolorektalen Karzinomen eine häufige Form (Lynch et al. 1993), welche durch eine hohe Penetranz von mehr als 90% und einen autosomal dominanten Vererbungsmodus charakterisiert ist (Lynch et al. 1991). Der synonym verwendete Name **HMMRDS** (**H**ereditary **M**ismatch **R**epair **D**eficiency **S**yndrom) ist gleichzeitig ein Hinweis auf die zugrunde liegende genetische Störung. Unter den erblich bedingten Kolonkarzinomen sind die HNPCC-Tumore mit einem Anteil von ca. 2-5-8% der Gesamtkolonkarzinomen am häufigsten (Aaltonen et al. 1994 u. 1998, Mecklin et al. 1994, Ponz de Leon 1994).

In den westlichen Industrienationen gehört der Dickdarmkrebs zu den häufigsten Tumorentitäten. Karzinome des Kolons und des Rektums sind nach den bösartigen Lungen-Tumoren bei der männlichen Bevölkerung und nach dem Mammakarzinom beim weiblichen Bevölkerungsteil die zweithäufigsten Krebserkrankungen (Statistisches Bundesamt 2000). In Japan, Asien, Afrika und Teilen von Lateinamerika ist die Inzidenz dieser Tumoren niedriger.

Kolorektale Karzinome entwickeln sich in der Regel aus benignen Adenomen. Zwischen den ersten Schleimhautveränderungen aufgrund schädigender Einflüsse und dem Auftreten der ersten Krebszelle liegt im allgemeinen ein Zeitraum von 10 – 20 Jahren.

Für Tumore des Gastrointestinaltraktes und des Dickdarms im Besonderen ist heute das Konzept der Dysplasie-Karzinom-Sequenz gesichert (Fearon und Vogelstein 1990), das auch als Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben wurde (Abb.1). Die Veränderungen sind charakterisiert durch eine gestörte Regulation

von Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose auf dem Boden einer Akkumulation genetischer Veränderungen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen (Fearon und Vogelstein 1990).

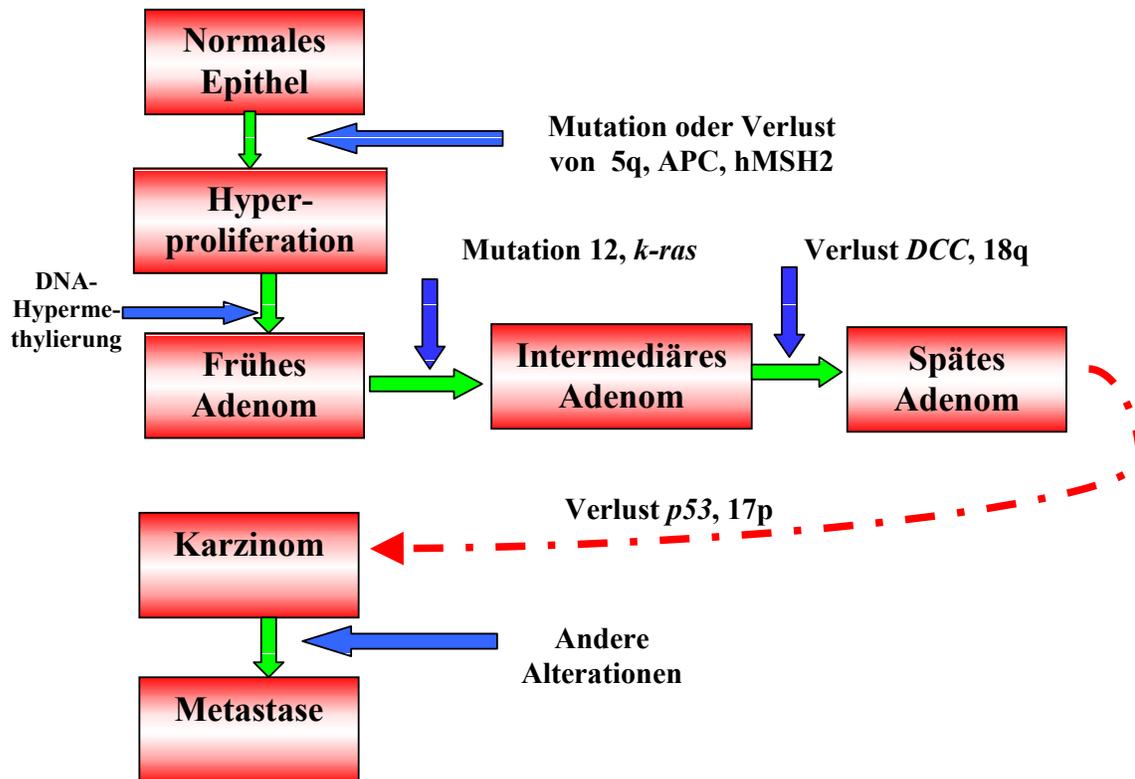


Abb. 1: Genetisches Modell der kolorektalen Tumorgenese (modifiziert nach Fearon et al. 1990): Bei Patienten mit FAP liegt der Erkrankung eine vererbte Mutation auf Chromosom 5q zu Grunde. Diese Alteration ist verantwortlich für die epitheliale Hyperproliferation. Bei Patienten ohne FAP ist die gleiche Region mutiert oder zeigt einen Allelverlust im frühen Tumorstadium. Hypermethylierungen treten in sehr kleinen Adenomen auf und finden sich sowohl bei Patienten, welche an FAP leiden als auch bei solchen, die diese Erkrankung nicht geerbt haben. Aus den Hypermethylierungen können Aneuploidien entstehen und diese prädestinieren für Allelverluste z.B. von Tumorsuppressorgenen. Ras-Gen-Mutationen entstehen in einer Zelle eines Adenoms und durch klonale Expansion entsteht ein größerer und mehr dysplastischer Tumor. Allelverluste auf Chromosom 17p und 18q entstehen erst zu einem späteren Zeitpunkt der Tumorgenese. Die Akkumulation von Tumorsuppressorgenverlusten ist verantwortlich für die Fähigkeit des Tumors zur Metastasierung.

Für 10 – 15% aller kolorektalen Karzinome wird ein fest definierter Vererbungsmodus angenommen (Diermann et al. 1994; Lynch et al. 1993; Ponz de Leon 1994; Rüschoff et al. 1995). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die bisher identifizierten Gene und das verursachte Tumorsyndrom.

Tabelle 1: Autosomal dominant vererbte Kolonkarzinom-Syndrome (modifiziert nach Al-Taie 2001, Groden et al. 1991, Hemminki et al. 1998, Howe et al. 1998, Jenne et al. 1998, Kinzler et al. 1991, Leach et al. 1993, Marsh et al. 1998, Miyaki et al. 1997, Nicolaides et al. 1994, Nishisho et al. 1991, Olschwang et al. 1998, Papadopoulos et al. 1994)

Erkrankung	Gen	Chromosomale Lokalisation
FAP	<i>APC</i>	5q21
HNPCC	MMR-Gene	2, 3, 7
Peutz-Jeghers-Syndrom	<i>STK11/LKB1</i>	19p13.3
Juvenile Polyposis	<i>SMAD4/DPC4</i>	18q21.1
Cowden-Syndrom	<i>PTEN/MMAC1</i>	10q22.3-q24.1

Bei den hereditären Karzinomen finden sich bereits genetische Veränderungen in der Keimbahn. Man unterscheidet zwei große Gruppen aufgrund des Vorbestehens von kolorektalen Polypen, die FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) und die hereditären nicht polypösen kolorektalen Karzinome (HNPCC).

Bereits 1913 entdeckte Alfred Warthin bei einer Familie ein gehäuftes Auftreten von kolorektalen Tumoren über mehrere Generationen. Seine Vermutung, dass es sich hierbei um eine vererbte Prädisposition handelte griff Lynch 1966 wieder auf (Lynch et al. 1966; Lynch et al. 1967). Er fasste die Hauptcharakteristika dieser kolorektalen Karzinome zusammen und nannte dieses Syndrom „cancer family syndrome, CFS“. Diese genetische Erkrankung wird klassischerweise in zwei Formen eingeteilt: Lynch I, bei dem nur kolorektale Tumoren zu finden sind und Lynch II, bei der außer den kolorektalen Karzinomen auch andere epitheliale Neubildungen beobachtet werden, wie z.B. Tumoren in Ovar, Magen, Pankreas, Gehirn, etc. (Boland 1984, Lynch 1985). Es gelang jedoch erst 1993 zwei Arbeitsgruppen parallel eines der für diese Erkrankung verantwortlichen Gene, das *hMSH2*-Gen durch Kopplungsanalysen zu identifizieren.

Mittlerweile sind weitere Gene identifiziert worden, die für etwa 90% der HNPCC-Fälle verantwortlich sind (siehe Tab.2). Kopplungsanalysen haben gezeigt, dass die Mehrzahl der HNPCC-Tumore durch die Vererbung zweier Gene verursacht wird, welche auf den Chromosomen 2p und 3p liegen (Lindblom et al. 1993, Peltomaki et al. 1993a). Es handelt sich hierbei neben dem *hMSH2*-Gen auf Chromosom 2p, welches für bis zu 45% der Fälle verantwortlich ist, um das *hMLH1*- Gen auf Chromosom 3p, welches bei durchschnittlich 30% - 60% der Patienten Mutationen zeigt. Weitere mitverantwortliche Gene sind *hPMS1*, das bei 2 - 7% und *hPMS2*, welches bei 4 - 7% der Fälle Mutationen aufweist (Akiyama et al. 1997, Miyaki et al. 1997, Nicolaides et al. 1994, Peltomaki et al. 1997, Plaschke et al. 2000). Die Tatsache, dass die Häufigkeiten in einem breiten Bereich streuen, ist auf die Untersuchung verschiedener Populationen zurückzuführen (Peltomaki 1997).

Mutationen des *hMSH6*-Gens finden sich nur vereinzelt (Peltomaki 1997). Das Vorliegen einer *hMSH2* Keimbahnmutation ist im Vergleich zum Vorliegen einer *hMLH1*-Keimbahnmutation mit einem größeren Risiko für extrakolische Karzinome (33% vs. 12%) sowie einer häufigeren Inzidenz von Rektumkarzinomen (28% vs. 8%) verbunden (Vasen et al. 1996, Lin et al. 1998).

Tabelle 2: Hauptverantwortliche HNPCC-Gene, nach Peltomaki 1997

Gen	Genort	Häufigkeit
<i>hMSH2</i> :	Chromosom 2p21-22	3 - 45%
<i>hMLH1</i> :	Chromosom 3p21.3	14 - 83%
<i>hPMS1</i> :	Chromosom 2q31-33	2 - 7%
<i>hPMS2</i> :	Chromosom 7p22	4 - 7%
<i>hMSH6</i> :	Chromosom 2p16	vereinzelt

Dieses molekularbiologische Wissen macht man sich auch diagnostisch zu Nutze, indem man die Expression der Proteine *hMSH2*, *hMLH1* und *hMSH6* in den Tumoren mit immunhistochemischen Methoden untersucht (Cawkwell et al. 1999, Chaves et al. 2000, Plaschke et al. 2000, Vossen et al. 1998).

Bei allen isolierten HNPCC Genen handelt es sich um DNA-Reparatur-Gene. Sie erkennen fehlerhafte Basenpaarungen („Mismatches“) nach der DNA-Replikation und bessern sie aus. Der funktionelle Verlust der Mismatch-Reparaturaktivität und die daraus resultierende genetische Destabilisierung führt vermutlich zu Mutationen, die das regulatorische System der Zellproliferation stören (Modrich et al. 1994).

4. DNA-Reparatur-Systeme

Multiple Ursachen sowohl endogener als auch exogener Herkunft sind für eine Karzinogenese denkbar. Trotz all dieser Einflüsse denen die DNA unterliegt, bleibt die Basenpaarung in vivo relativ konstant. Diese Konstanz wird durch DNA-Reparatursysteme gewährleistet (für eine Übersicht siehe Wood et al. 2001).

4.1 Basen-Exzisions-Reparatur-System

Ein solches Reparatursystem basiert auf DNA-Glycasen, welche fehlerhafte Basen erkennen und entfernen. Modifizierte Basen, wie z.B. Uracil, Hypoxanthin, Formamidopyrimidin sowie 3-Methyladenin und 7-Methylguanin

werden erkannt. Das am besten charakterisierte Enzym dieses Reparatursystems ist die Uracil-DNA-Glycosylase.

4.2 Methyl-gesteuertes Mismatch-Reparatur-System (MGMR)

Das „Methyl-gesteuerte Mismatch-Reparatur-System“ (MGMR) stellt ein weiteres DNA-Reparatursystem dar. Dieses System arbeitet sehr viel komplexer und hat seine Hauptaufgabe in der Korrektur fehlgepaarter Basen und kleiner Insertionen. Es verhindert auch ein „crossing over“ nicht homologer DNA-Stränge (Cleaver et al. 1995; Lindahl et al. 1997; Modrich 1997; Peltomaki et al. 1997).

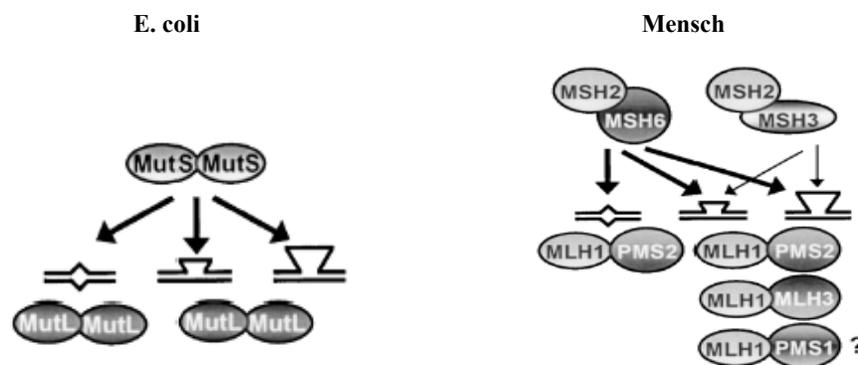


Abb. 2: Darstellung der MMR-Systeme in verschiedenen Spezies (nach Marti et al. 2002). Sowohl in *E. coli* als auch im humanen System sind die Interaktionen der einzelnen Partner, MutS und MutL und deren Homologe, hoch konserviert.

Erster Schritt bei der Reparatur einer fehlgepaarten Base oder einer kleinen Insertion ist in *E. coli* die Bindung des MutS-Proteins, beim Menschen die von hMSH2 (für „human MutS-homologue“) an den Ort der Mutation. MutS, ein 97 kDa Protein, bindet an alle von den Watson-Crick-Regeln abweichenden Basenpaarungen. Es besitzt eine für die DNA-Reparatur essentielle ATPase-Aktivität. Das MutH-Protein, ein 25 kDa Protein, bindet an den methylierten Adenin-Rest im d(GATC)-Motiv. MutH assoziiert mit MutS und dirigiert MutL, ein 70 kDa Protein (hMLH1 im Säugetierorganismus) und weitere Proteine in den „Reparatur-Komplex“. Hierdurch wird die latente Endonuklease-Aktivität des MutH-Proteins aktiviert und der nicht-methylierte DNA-Strang 5' des G-Restes in der d(GATC)-Sequenz geschnitten. Der komplementäre Strang wird durch Einzelstrang-Binde-Proteine (SSB-Protein) vor dem Abbau geschützt. Die entstandene Lücke wird anschließend durch DNA-Polymerase III aufgefüllt und der neu synthetisierte Strang mit dem verbliebenen Strang durch eine DNA-Ligase verbunden (Modrich 1991; Wagener 1999).

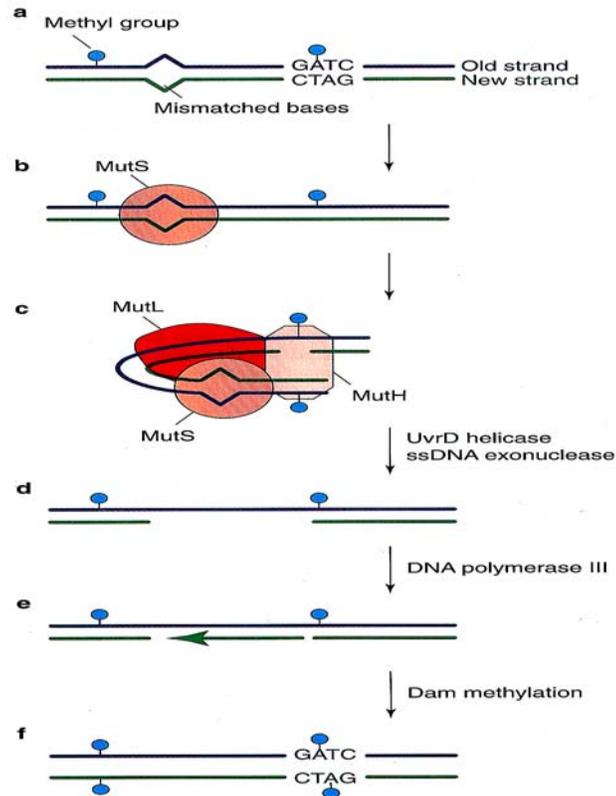


Abb. 3: Schematische Darstellung zur Funktion der MutS, MutL und MutH-Proteine des MGMR-Systems in *E. coli* (modifiziert nach Modrich et al. 1991 und Lothe et al. 1997): (a) Während der Replikation ist es zu einer Fehlpaarung gekommen, der alte Strang ist der methylierte, der neu-synthetisierte ist noch unmethyliert. (b) MutS erkennt und bindet an die fehlgepaarte Base(n). (c) MutL bindet an den Mismatch Komplex und aktiviert zusammen mit MutS die Endonukleaseaktivität von MutH. (d) Anschließend wird ein Teil des neu synthetisierten Stranges durch Helicasen und Endonukleasen herausgeschnitten. (e) Die so entstandene Lücke wird mittels der DNA-Polymerase wieder aufgefüllt. (f) Im letzten Schritt wird der Strang methyliert.

In Säugerzellen läuft die Reparatur prinzipiell ähnlich ab, jedoch existieren wichtige Unterschiede. Im Menschen sind folgende Proteine an der Mismatch-Reparatur beteiligt (Prolla et al. 1996, Kolodner et al. 1999):

- DNA-Polymerase δ
- RPA (replication protein A)
- PCNA (proliferating cell nuclear antigen)
- RFC (replication factor C)
- Exonuklease 1
- RAD 27
- DNA-Polymerasen δ und ϵ -assoziierte Exonukleasen (Longley et al. 1997, Lin et al. 1998, Johnson et al. 1996, Umar et al. 1996, Xie et al. 1999, Tran et al. 1999)

Grundsätzlich gibt es drei Proteine, die an der Erkennung von Basenfehlpaarungen und kleinen ungepaarten DNA-Loops von bis zu vier Basen beteiligt sind: MSH2, MSH3 und MSH6 (Marsischky et al. 1996). MSH6 ist auch als GTBP (G/T Binding Protein) bekannt. Die drei Proteine lagern sich zu zwei verschiedenen Heterodimeren zusammen. Den Komplex aus MSH2 und MSH6 bezeichnet man als MutS α , den Komplex aus MSH2 und MSH3 als MutS β . Beide Komplexe unterscheiden sich in ihrer Erkennungsspezifität.

MutS α bindet bevorzugt an Basenfehlpaarungen und Loops von 1-2 bp, MutS β an größere Insertionen/Deletionen (Fishel 1999). Insertionen/Deletionen von geringer Größe können von beiden Heterodimeren erkannt werden (Marsischky et al. 1996, Greene et al. 1997, Kolodner et al. 1996, Sia et al. 1997, Genschel et al. 1998). Nach der primären Erkennung der DNA-Heteroduplex durch die MutS α - und MutS β -Komplexe lagert sich ein sekundärer Komplex an. Dieser kann aus MLH1 und PMS2, das man auch als MutL α bezeichnet oder aus MLH1 und PMS1, MutL β genannt, bestehen.

Für MutS α konnte gezeigt werden, dass dieser Komplex eine ATPase Funktion hat (Alani 1996, Macpherson et al. 1998, Haber et al. 1988, Gradia et al. 1997). Mutationen in dieser Region in *MSH2* und auch in *MSH6* Untereinheiten haben eine reduzierte ATPase Aktivität und eine reduzierte MMR-Kapazität (Iaccarino et al. 1998) zur Folge. Für diese Interaktion wurde ein Modell entwickelt, in dem MutS α in einer ADP-gebundenen Form inaktiv vorliegt, in der ATP-Form kann es aktiv den Mismatch erkennen und reparieren und aus der Hydrolyse zu ADP die Energie für das Entlanggleiten an der DNA entnehmen (Gradia et al. 1997, Fishel 1998). Abb. 4 zeigt schematisch den Ablauf einer Mismatchreparatur.

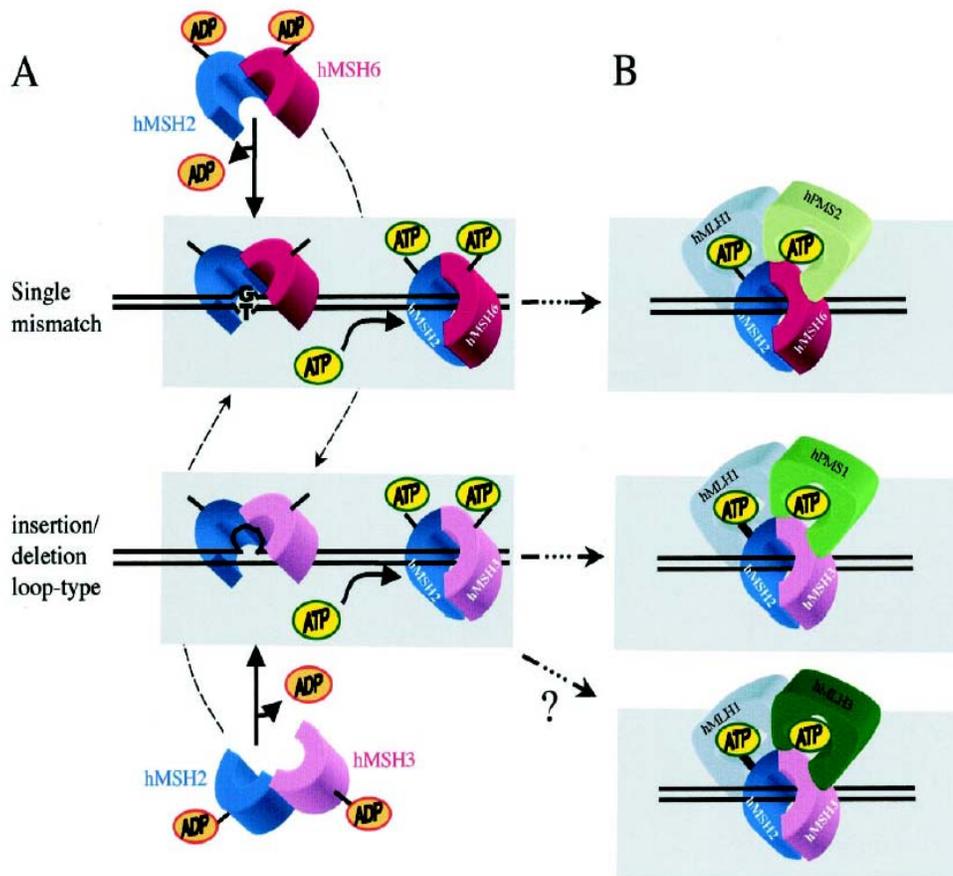


Abb. 4: Modell der sogenannten „hydrolysis sliding clamp“ nach Fishel 1998. Sowohl MSH2 als auch MSH6 liegen in der ADP-gebundenen Form vor. Bindet ein MutS α Komplex an einen DNA-Mismatch, so erfolgt ein Austausch von ADP mit ATP. Die ATP-Form ermöglicht dann das Andocken des zweiten Komplexes MutL α . Nach der Reparatur erfolgt die Hydrolyse von ATP in ADP und der gesamte Komplex entfernt sich von der DNA.

Die beschriebenen Proteine allein sind jedoch nicht ausreichend um die komplexe Aufgabe der Mismatchreparatur zu bewerkstelligen. Es gibt, wie schon erwähnt, noch eine ganze Reihe wichtiger Interaktionen mit anderen Proteinen. Eine davon ist die Interaktion mit der Exonuklease I (Szankasi et al. 1995). Für dieses Enzym wurde auch eine Interaktion mit MSH2 beschrieben (Tishkoff et al. 1997). Exo-I ist eine 5'-3' Exonuklease (Fiorentini et al. 1997), von der beim Menschen 2 Splicevarianten existieren (Fiorentini et al. 1997, Tishkoff et al. 1998, Wilson et al. 1998).

Bei den beiden wichtigsten MMR-Genen, *MSH2* und *MLH1* finden sich bei HNPCC Patienten vor allem Mutationen in der DNA-Bindungsregion, den Heterodimerisierungsregionen und an den Bindungsstellen für andere Proteine.

Dies erklärt weshalb es zur HNPCC-Erkrankung kommt, selbst wenn nur eines der vielen Proteine, die in den fein abgestuften Prozess der DNA-Reparatur involviert sind, betroffen ist.

Bereits vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass MSH6 eine Komponente des Mismatch-Reparatur-Komplexes ist (Drummond et al. 1995) und einige Tumorzelllinien Mutationen von *MSH6* tragen (Papadopoulos et al. 1995; Risinger et al. 1996). Zellen von *MSH6* knockout Mäusen zeigen einen Defekt in der Reparatur von Einzelnukleotidmismatches, die Reparaturfähigkeit von Insertions-/Deletions-Mismatches bleibt jedoch voll funktionsfähig (Edelmann et al. 1997). Diese Beobachtungen gehen konform mit der Tatsache, dass man lange Zeit bei HNPCC-Patienten keine *MSH6* Mutationen gefunden hat. Da die Reparatur von Insertions-/Deletions-Mismatches unbeeinflusst ist, findet man keine für HNPCC typische Mikrosatelliteninstabilität. Der Partialdefekt in der Mismatchreparatur beeinflusst die Tumorbilogie dahingehend, dass die Zeit bis zur Entstehung eines Tumors länger wird. Basierend auf diesen Erkenntnissen untersuchte man Familien mit einem späten Tumoraufreten und fand *MSH6* Keimbahnmutationen (Edelmann et al. 1997; Miyaki et al. 1997; Akiyama et al. 1997; Kolodner et al. 1999; Wu et al. 1999; Wijnen et al. 1999; Verma et al. 1999).

4.3 Nukleotid-Exzisions-Reparatur-System (NER)

Das Nukleotid-Exzisions-Reparatur-System ist ein Enzym-System, welches große DNA-Addukte, aber auch kleinere Schäden sowie fehlgepaarte Basen beseitigt. Das System wirkt auf Mutationen, die zu einer Veränderung der helikalen Struktur der DNA führen. Insgesamt besteht das System aus 17 Polypeptiden. XPA, RPA (Replication Protein A) und XPC sind die eigentlichen Erkennungsproteine für DNA-Addukte.

Eine Erkrankung, die auf Defekten des NER-Systems beruht, ist Xeroderma Pigmentosa, eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung mit einer Inzidenz von etwa 1:250.000. Patienten entwickeln früh Tumore an UV-Licht exponierten Hautarealen.

5. Das Tumorsuppressorgen *p53*

Das *p53*-Protein wurde als ein mit dem T-Antigen von SV40-Viren assoziiertes zelluläres Protein entdeckt (Lane et al. 1979; Linzer et al. 1979). Seit seiner Erstbeschreibung wurden mittlerweile mehr als 25.000 Publikationen über *p53* veröffentlicht, allein 2002 mehr als 5200.

Das Gen wurde auf dem Chromosom 17p13 lokalisiert und besteht aus 11 Exons mit insgesamt 20 kb Größe. Es gehört zu einer hochkonservierten Familie, die mindestens noch 2 weitere Mitglieder *p63* und *p73* hat (Levrero et al. 2000, Marin et al. 2000). Die Unterschiede zu *p63* und *p73* liegen darin, dass *p53* offensichtlich nur eine Funktion als Tumorsuppressor besitzt, denn *p53*^{-/-} Mäuse entwickeln sich normal, haben aber eine erhöhte Inzidenz an frühen Tumoren (Donehower et al. 1992). Das ist nicht der Fall für *p63* und *p73*^{-/-} Mäuse, welche ein komplexes Muster an Fehlbildungen in der Entwicklung zeigen, aber keine erhöhte Inzidenz an Tumoren (Mills et al. 1999, Yang et al. 2000).

In 40-50 % aller menschlicher Tumore wurden Mutationen oder ein Verlust der Heterozygotie im *p53*-Gen nachgewiesen (Soussi et al. 1994). Eine ständig aktualisierte Datenbank von *p53*-Mutationen der International Agency for Research on Cancer, www.iarc.fr/p53/ verzeichnet derzeit über 15.000 Einträge und somit die größte Anzahl von Informationen über Tumore überhaupt (Hernandez-Boussard et al. 1999).

Bei einer großen Mehrzahl der Tumore überwiegt der Verlust von nur einem Allel. Das Genprodukt ist, anders als für ein klassisches Tumorsuppressorgen zu erwarten, häufig in erhöhter Konzentration im Tumor zu finden. Dieser Befund ist darauf zurückzuführen, dass das verbleibende *p53*-Allel mutiert ist und so dem Genprodukt unter anderem eine verlängerte Halbwertszeit verleiht. Bei den Mutationen handelt es sich fast ausschließlich um Punktmutationen, die in einem weiten Bereich des Gens vorkommen und im allgemeinen phylogenetisch gut konservierte, d.h. funktionell bedeutsame Regionen des Genproduktes betreffen (Prives 1994). Mutationen in *p53* sind über alle codierenden Exons verteilt, mit einem starken Focus auf die Exons 4-9, in denen etwa 90% der Mutationen zu liegen kommen. Ungefähr 80% der Mutationen bewirken den Austausch einer Aminosäure (Missense-Mutationen). Dadurch unterscheidet sich *p53* von anderen Tumorsuppressoren, z.B. *APC*, *RB* oder *BRCA1*, die meist durch Deletionen oder Frameshift-Mutationen aktiviert sind. (Hainaut et al. 2000).

Mittlerweile ist die Struktur vollständig aufgeklärt und man weiß, dass *p53* den klassischen Aufbau eines sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktors hat mit saurer N-terminaler Transaktivierungsdomäne, hydrophober zentraler Region, welche an spezifische DNA-Sequenzen bindet und basischem C-Terminus zur Oligomerisierung und als Regulator-domäne der DNA-Bindung (May et al. 2000). Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus enthalten Stellen für die posttranslationale Modifizierung wie z.B. Phosphorylierung von Serinen an Position 6, 9, 15, 20, 376, 378, 392, Acetylierung von Lysin an 371, 373, 382 und Sumolierung von Lysinen an Position 386 (Meek et al. 1999, Prives et al. 1999, Giaccia et al. 1998). Jedoch findet sich keine dieser Stellen in Tumoren

als mutiert wieder (Pluquet et al. 2001). Die meisten Mutationen finden sich in der DNA-Bindungsdomäne (Cho et al. 1994, Meplan et al. 2000).

In den Promotoreregionen einiger Gene wurden p53-Bindungsstellen identifiziert, wie z.B. im Promotor des *p21/WAF 1*-Gens. Das Keratinkinase-Gen trägt wie das GADD45-Gen (Kastan et al. 1992) und das *MDM2*-Gen (Barak et al. 1993; Wu et al. 1993; siehe auch Hloch 1996) p53 bindende Promotorsequenzen (Weintraub et al. 1991; Zambetti et al. 1992). Eine Interaktion mit dem Proto-Onkogen *c-met* konnte ebenfalls bereits gezeigt werden (Seol et al. 1999).

P53 ist in fast allen Geweben exprimiert, jedoch ist die Menge des Proteins sehr gering. Diese Reprimierung wird durch verschiedene Signale aufgehoben und es kommt als Folge zur Akkumulation durch posttranslationale Modifikationen. Diese Signale kann man in 3 Gruppen einteilen (Pluquet et al. 2001):

1. DNA-Schäden: Genotoxischer Stress, UV, ionisierende Strahlen, Karzinogene, zytotoxische Substanzen, etc. (Meek et al. 1999).
2. Aktivierung über Onkogene durch konstitutive Aktivierung von Signalkaskaden (Meek et al. 1999).
3. Nicht-genotoxischer Stress: Hypoxie, Ribonukleotiddepletion, über ATR und Caseinkinase II verursacht (Meek et al. 1999).

Alle drei Wege inhibieren die Degradation des p53-Protein und führen somit zu einer Stabilisierung auf hohem Niveau.

P53 liegt an einem biochemischen Schnittpunkt von verschiedenen, sehr distinkten Stress-Pathways, welche sowohl antiproliferative Effekte, wie Zellzykluseffekte, DNA-Reparatur, Apoptose oder Differenzierung als auch die Angiogenese beeinflussen (Vogelstein et al. 2000).

Die Regulation von *p53* ist ein Schlüsselprozess für die Zelle, der über das Weiterleben der Zelle als Normalzelle, den Tod durch Apoptose oder die Entartung zur Tumorzelle entscheidet. Dieser Prozess muss folglich fein reguliert werden. Ein Hauptregulator von *p53* ist *MDM2*. Das *MDM2* Gen wird aber selbst wieder von *p53* reguliert. Das daraufhin gebildete *MDM2* bindet an den N-Terminus von *p53*, bedingt den Export von *p53* vom Kern ins Zytoplasma und veranlasst die Proteolyse und damit den Abbau von *p53*. Dieser Prozess funktioniert im Sinne eines „feedback-loop“ (Bar-or et al. 2000). Dadurch wird sowohl das Level von *MDM2* als auch von *p53* in der Zelle niedrig gehalten. Die Degradation erfolgt schließlich über den Ubiquitinweg. *MDM2* ist für die konstitutiv niedrige Expression von *p53* in ungestressten Zellen verantwortlich und die Zerstörung des *p53*-*MDM2*-Loops ist ein

Schlüsselereignis für die Stabilisierung von p53 und dessen Aktivierung (Freedman et al. 1999, Piette et al. 1997). Mechanismen, welche die Instabilität in diesem Gleichgewicht herbeiführen können, sind die oben beschriebenen Wege. Durch DNA-Schäden kommt es zur z.B. Aktivierung von Kaskaden wie z.B. ATM, ChK2, ChK1, die p53 aminoterminal nahe der MDM2 Bindungsstelle phosphorylieren und dadurch die Interaktion von MDM2 und p53 blockieren. Dies hat die Stabilisierung von p53 zur Folge (Chehab et al. 1999; Kapoor et al. 1999, Carr et al. 2000). Eine zweite Möglichkeit ist die der Stimulation von Onkogenen, welche die Transkription von *p14^{arf}* stimulieren. Dieses bindet an MDM2 und neutralisiert es dadurch (Tao et al. 1999, Zhang et al. 1998, Lowe et al. 1999, Sherr et al. 2000, Lowe et al. 2000). Eine dritte Möglichkeit ist der nicht genotoxische Stress, z.B. kann eine Hypoxie p53 stimulieren (Pluquet et al. 2001). Dafür ist die Jun-N-terminale Kinase (JNK-2) verantwortlich. Diese Kinase bindet in einer inaktiven Form an p53, ähnlich MDM2, und führt über den Ubiquitinweg zur Degradierung von p53. Wird JNK-2 aktiviert kommt es zu einer Phosphorylierung von p53 in der Transaktivierungsdomäne und damit zur Proteinstabilisierung. JNK-2 wird von DNA-schädigenden Substanzen wie UV, aber auch von nicht schädigenden Einflüssen wie Hypoxie aktiviert (Pluquet et al. 2001).

P53 aktiviert die Transkription des *p21*-CIP-Gens. P21^{CIP} ist ein universeller Inhibitor von Cyclin-CDK-Komplexen, sowie von *GADD45* (Growth Arrest and Damage Dependent). CDK's sind Schlüsselregulatoren des Zellzyklus, wobei p21 den G1 → S und den G2 → M-Phasenübergang inhibiert. P21 und GADD45 sind in der Lage mit PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) zu assoziieren und hemmen so die Replikation der DNA. Mittlerweile kennt man noch andere Gene, wie z.B. *Reprimo*, die ebenfalls einen G2-Arrest bewirken (Ohki et al. 2000). Des weiteren stimuliert p53 die Expression von *14-3-3σ*, welches für das Aufrechterhalten des G2-Blockes durch Hemmung der CyclinB-CDK1 Komplexe von Bedeutung ist (Chan et al. 1999, Laronga et al. 2000). Dadurch kommt es zu einem Anhalten des Zellzyklus, um der Zelle Zeit zu geben, die Reparatur einzuleiten oder sie zu bewerkstelligen.

Das Retinoblastom-Protein (RB) und P53 integrieren afferente und efferente Signalwege, die den Zellzyklus kontrollieren und unter bestimmten Bedingungen Apoptose auslösen. P53 unterdrückt die Synthese eines Apoptose-inhibierenden Proteins (Bcl-2) und fördert die Transkription eines Apoptose-fördernden Proteins (Bax) (Reed et al. 1999). Indem es so das Gleichgewicht zugunsten des Apoptoseinduktors verschiebt, treibt es die Zelle in den Selbstmord. Ein anderes Modell beschreibt die Interaktion von RB mit P53. In ruhenden Zellen liegt RB im dephosphorylierten (aktiven) Zustand vor und hemmt den Transkriptionsfaktor E2F-1. P53 wird durch die MDM2-vermittelte Proteolyse auf niedrigem Niveau gehalten. Genomische Läsionen bewirken eine Stabilisierung von P53, die eine MDM2 vermittelte Proteolyse bewirkt. Durch

Inaktivierung des RB-Proteins, z.B. durch das E1A-Onkoprotein, wird E2F transkriptionell aktiv. Eines der E2F1-abhängigen Gene ist *ARF*. Das Genprodukt, p19^{ARF}, hemmt die MDM2-vermittelte Proteolyse von P53. Hierdurch wird P53 stabilisiert und unter bestimmten Bedingungen Apoptose induziert. Auch die bekannte Apoptose-fördernde Wirkung von MYC scheint über eine verstärkte Transkription des *ARF*-Gens reguliert zu werden. Eine Schädigung der DNA durch genotoxische Substanzen oder UV-Strahlen führt zu einem Anstieg der zellulären p53-Konzentration. Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass p53 in der Lage ist Apoptose einzuleiten (Lowe et al. 1993; Shaw et al. 1992; Yonish-Rouach et al. 1991). P53 kann auch den programmierten Zelltod über einen Einfluss auf DNA-Reparaturprozesse kontrollieren (Caelles et al. 1994). Ein möglicher Mechanismus hierfür wäre die gefundene Interaktion von p53 mit dem Replikationsprotein A (RPA) (Li et al. 1993; He et al. 1993; Dutta et al. 1993), das sowohl an der DNA-Reparatur als auch an der DNA-Replikation beteiligt ist.

Zusammenfassend lässt sich die Wirkung von p53 als die eines „Wächter des Genoms“ beschreiben. Zunächst wird den geschädigten Zellen Zeit eingeräumt DNA-Schäden zu reparieren bevor sich Mutationen manifestieren können. Erweist sich dies aufgrund der Stärke der Schädigung als unwirksam, kann p53 den programmierten Zelltod auslösen. Somit erfüllt p53 seine Aufgabe über Inhibierung der Zellteilung oder über Induktion der Apoptose und sorgt für die Integrität des Genoms.

6. C-jun als UV-induzierter Transkriptionsfaktor

Der Transkriptionsfaktor AP-1 erkennt die kurze Sequenz TGACTCA, die als ursprünglich im Enhancer von SV-40, inzwischen jedoch auch in den Promotoren und Enhancern zellulärer Gene entdeckt wurde. Der AP-1 Faktor besteht aus einem Dimer zweier Untereinheiten, die von den Genen *c-jun* und *c-fos* codiert werden; er aktiviert Gene, deren Promotoren oder Enhancer eine AP-1 Bindungsstelle haben. Jun und Fos gehören zur Klasse der „Leucinreißverschluss“- (leucine-zipper) Transkriptionsfaktoren.

Karzinogene wie z.B. UV-Licht können in die Genexpression über den Transkriptionsfaktor c-Jun/AP-1 eingreifen (für eine Übersicht siehe Minden et al. 1997). Untersuchungen an *c-fos*- und *c-jun*-defizienten Mausfibroblasten konnten die wichtige Rolle dieser Proteine in der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress beschreiben (Schreiber et al. 1995, Kolbus et al. 1999). Außerdem konnte auch eine direkte Interaktion von c-Jun in der transkriptionellen Aktivierung von p53 gezeigt werden (Schreiber et al. 1999). Die Beschreibung, dass die p53-regulierte GADD45-Expression die p38/c-Jun NH₂-terminale Kinase aktiviert deutet ebenfalls auf eine Interaktion von p53 und

c-Jun Pathways hin. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Unterschiede im Transaktivierungspotential bei verschiedenen Jun und Fos Proteinen bestehen (für eine Übersicht siehe Angel und Karin 1991; Karin 1997). Die Transaktivierungsaktivität von c-Jun durch Mitglieder der MAP-Kinase-Familie (JNK/SAPKs) hängt hauptsächlich von der Hyperphosphorylierung von 2 Serinresten ab (Aminosäure 63 und 73), z.B. als Reaktion auf genotoxischen Stress (für eine Übersicht siehe Karin 1997). Zusätzlich zu Ser 63/73 wurden andere Regionen, die wichtig für die c-Jun abhängige Zelltransformation sind (Oliviero et al. 1992) in der Transaktivierungsdomäne von c-jun identifiziert.

II. Material und Methoden

1. Zellkulturmethoden

Verwendete Zelllinien:

SAOS-2: Humane Osteosarkomzelllinie, adhärenent als Monolayer wachsend, etabliert 1973 aus einem primären Osteosarkom eines 11-jährigen Mädchen (ATCC HTB 85).

Medium: McCoy's 5A (Gibco)
10% FCS (Gibco)
1% Penicillin/Streptomycin (Gibco)

Einfriermedium für SAOS-2: McCoy's 5A (Ca^{2+} 2mM)
20% FCS
5% DMSO
1% Penicillin/Streptomycin

HaCaT: Humane immortalisierte Keratinozytenzelllinie (Boukamp et al. 1988); adhärenent als Monolayer wachsend, die Zellen entstammen ursprünglich einer histologisch normalen Gewebeprobe eines Melanompatienten und wurden freundlicherweise von Dr. Jörg Reichrath, Universität Homburg, Dermatologie zur Verfügung gestellt.

Medium: DMEM (Gibco)
10% FCS
1% Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium für HaCaT-Zellen: 70% DMEM
10% DMSO
20% FCS

LoVo: Humane Colon Adenocarcinom Zelllinie, etabliert 1972 von einem 56-jährigen Patienten mit Adenokarzinom. Bei LoVo handelt es sich um eine definiert MSH2-defiziente Zelllinie (DSMZ, NR. ACC 350); diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Oliver Al-Taie, Medizinische Poliklinik der Universität Würzburg überlassen.

Medium: RPMI (Gibco)
10% FCS
1% Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium: 70% RPMI
10% DMSO
20% FCS

- HCT116: Humane kolorektale, adhären wachsende Karzinomzelllinie von einem männlichen Patienten gewonnen und mit einer definierten MLH1-Defizienz (ATCC: CCL-247). Diese Zelllinie wurde von Dr. Al-Taie zur Verfügung gestellt.
Medium und Einfriermedium: vgl. HaCaT
- HCT15: Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie epithelialen Ursprungs, adhären wachsend und GBTP/MSH6-defizient (ATCC: CCL-225). Diese Zelllinie wurde von Dr. Al-Taie zur Verfügung gestellt.
Medium und Einfriermedium: vgl. LoVo
- HT29: Normalzelllinie, etabliert aus Kolonepithel. Diese Zelllinie wurde von Dr. Al-Taie zur Verfügung gestellt.
Medium und Einfriermedium: vgl. LoVo

1.1 Kultivierung und Subpassagierung

Material:

Zusätze zu den Medien: 10.000U/ml Penicillin
 10.000U/ml Streptomycin
 10% Fötale Kälberserum (FCS)

PBS

Trypsin/EDTA-Lösung

Methode:

- Zelllinien bei 37°C / 5% CO₂ kultivieren.
- Dem Medium wird vor Gebrauch 10% FCS und 1% einer Penicillin/Streptomycin Stammlösung zugesetzt. Die hier verwendeten adhären wachsenden Zellen werden vor Erreichen der Konfluenz subkultiviert.
- Dazu werden sie zunächst zweimal mit PBS gewaschen und mit 5ml 1x Trypsin/EDTA abgelöst.
- Mit dem gleichen Volumen Medium wird das Trypsin/EDTA-Gemisch inaktiviert und alles in ein 15ml Falconröhrchen überführt.
- Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 1100rpm (Heraeus, Megafuge 1.0; Schwenkbecherrotor #2704), für 5min.
- Überstand steril absaugen, das Pellet in Kulturmedium resuspendieren und auf frische Zellkulturplatten verteilen.

1.2 Kryokonservierung von Zellen

Material:

PBS, Trypsin/EDTA-Lösung
Kulturmedium der entsprechenden Zelllinie
15 ml Falcon-Röhrchen
Vorgekühlte Einfrierröhrchen
Einfrierbox Bicell

Methode:

- Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase können in Gegenwart von 5-10% DMSO und 20% FCS durch langsames, kontinuierliches Abkühlen auf -80°C eingefroren und längerfristig in flüssigem Stickstoff gelagert werden.
- Zur Kryokonservierung werden subkonfluente Zellen nach zweimaligem Spülen mit jeweils 5 ml PBS mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Auf diese Weise sowie durch leichtes Beklopfen des Flaschenrandes werden die Zellen vom Schalenboden abgelöst.
- Die Zellsuspension wird mit 5 ml Kulturmedium der jeweiligen Zelllinie in sterile 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min bei 1100rpm (Heraeus Megafuge) zentrifugiert.
- Das Zellpelett wird anschließend in 2 ml Einfriermedium vollständig resuspendiert und in vorgekühlte Einfrierröhrchen überführt.
- Die Röhrchen werden in einer Bicell-Einfrierbox zunächst innerhalb von 24 h kontinuierlich auf -80°C abgekühlt. Nach 24 h werden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

1.3 Auftauen der Zellen

Material:

Eingefrorene Zellen
 37°C Wasserbad
15 ml Falconröhrchen, steril
Kulturmedium der entsprechenden Zellen

Methode:

- Zum Auftauen der Zellen die Einfrierröhrchen im 37°C -Wasserbad schnell erwärmen.
- Kurz vor dem vollständigen Auftauen die Zellsuspensionen in 15 ml Falcon-Röhrchen überführen.

- Tropfenweise ca. 5 ml des jeweiligen Kulturmediums zugegeben. Nach Zentrifugation bei 1100rpm (Heraeus Megafuge) für 5 Minuten das Zellpellet in einem geeigneten Volumen Kulturmedium aufnehmen und in Zellkulturschalen verteilen.

1.4 Bestrahlung der Zellen

Material:

6-well-Platten (Greiner)
Cross Linker (Stratagene)
PBS

Methode:

- Die Zellen werden am Vortag auf 6-well-Platten ausgesät.
- Bei hinreichender Konfluenz wird das Medium abgenommen und jeweils durch 1ml PBS/well ersetzt.
- Dann werden die 6-well-Platten in die Strahlenquelle (Cross Linker) gestellt und die jeweilige Dosis (0, 10, 25, 50, 75 und 100 J/m²) eingestellt und appliziert.
- Nach Verabreichung der Strahlendosis wird PBS abgenommen und durch das jeweilige Standardmedium ersetzt und für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37°C weiter kultiviert.

2. Proteinmethoden

2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

2.1.1 Herstellung eines Albumin-Standards

Material:

BSA (bovine serum albumin, Merck)
Lysispuffer (Zusammensetzung wie unter 3.1. beschrieben)
Falcon-Röhrchen 50 ml
Eppendorfgefäße

Methode:

Durch das Zusammenpipettieren von definierten Mengen einer Albumin-Ausgangslösung bekannter Konzentration mit bestimmten Mengen an Lysispuffer wird eine lineare Verdünnungsreihe (Albumin-Standards) zu Vergleichs- und Berechnungszwecken hergestellt.

2.1.2 Herstellung von Probenverdünnungen

Material:

Probe aus Proteinaufarbeitung

H₂O dest.

Methode:

Aus Proben und H₂O dest. werden jeweils unterschiedliche Verdünnungen (1:2, 1:5, 1:10) hergestellt (jeweils 50 µl Gesamtvolumen), ähnlich der Herstellung der Albumin-Standards.

2.1.3 Proteinmessung nach dem BCA Protein Assay

Material:

BCA Protein Assay Kit der Firma PIERCE

Wasserbad auf 37°C vorgeheizt

Photometer Ultrospec III, LKB, Pharmacia

Methode:

Es handelt sich hierbei um eine kolorimetrische Bestimmung und Quantifizierung der Gesamtproteinmenge durch Komplexbildung von Proteinen mit Cu²⁺ (im Reagenz B enthalten) in alkalischer Lösung. Unter Einwirkung des alkalischen Milieus (v.a. durch Reagenz A hergestellt; Biuret Reaktion) wird Cu²⁺ zu Cu¹⁺ reduziert; anschließend bilden die Kupfer-Kationen mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex. Dieser wasserlösliche Komplex zeigt eine starke Absorption bei 562 nm, welche sich in Bereichen von 20 µg/ml bis 2200 µg/ml Proteinkonzentration linear verhält.

- Herstellung einer ausreichenden Menge des „BCA Working Reagent“ gemäß Beschreibung im Kit (1 Teil Reagenz B und 50 Teile Reagenz A mischen, bis eine klare Flüssigkeit entsteht).
- Jeweils 50 µl Probe und 1 ml des „Working Reagent“ in ein 10 ml Falcon Gefäß zusammen pipettieren.
- Gründlich durchmischen.
- 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren lassen.
- Alle Lösungen auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
- Überführen von jeweils 1 ml Lösung in eine passende Messküvette des Photometers.
- Bestimmung der Absorption jeder Probe bei 562nm gegen einen Referenzwert. Da diese Reaktion nicht wirklich zu einem Endpunkt gelangt, schreitet die Farbentwicklung auch nach Abkühlung auf Raumtemperatur weiter fort. Da diese weitere Farbentwicklung bei

Raumtemperatur jedoch relativ langsam fortschreitet, ist bei Messungen, die innerhalb von 10 min durchgeführt werden kein signifikanter Fehler in den Ergebnissen zu erwarten. Des Weiteren wird eine gewisse Zeitverzögerung beim Hinzupipettieren der Lösungen auch auf die Messung der Proben übertragen.

- Anschließend Anfertigen einer Standardkurve, bei der die korrigierten Messwerte (Absorption der Probe bei 562 nm Absorption des Leerwertes bei 562 nm) gegen die bekannten Albuminkonzentrationen der Standards in $\mu\text{g/ml}$ aufgetragen werden.

Mittels der Standardkurve lassen sich die Proteinkonzentrationen der Proben durch Ablesen bestimmen. Hieraus lassen sich die Proteinkonzentrationen der ursprünglichen, unverdünnten Proteinlösungen errechnen. Da für jede Proteinlösung drei verschiedene Ansätze (1:2, 1:5, 1:10) gemessen werden, lässt sich als Mittelwert der drei Proben die Konzentration der Proteine in der Ursprungslösung errechnen.

2.2 Proteinquantifizierung (Proteinbestimmung nach Bradford, 1976)

Material:

Bradford-Lösung (Biorad)

Rinderserumalbumin

RLB-Lösung (vgl. 4.6.1)

Photometer Ultrospec III, LKB, Pharmacia

Methode:

Diese Methode basiert auf der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250. Diese Bindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm, welche photometrisch detektiert werden kann. Für die Messung werden jeweils 1ml Bradford-Lösung mit einem entsprechenden Aliquot (5-10 μl) der zu messenden Proteinlösung vermischt, 5 min. bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595nm im Spektralphotometer ermittelt. Als Referenz dient eine Eichkurve aus verschiedenen Konzentrationen von Rinderserumalbumin.

3. Western Blot

Ein Blot ist ein Verfahren um Makromoleküle, die man zuvor in einem Gel elektrophoretisch getrennt hat, dauerhaft auf einer Membran zu fixieren. Handelt es sich hierbei um DNA, so wird der Vorgang nach seinem Entdecker, Ed M. Southern (1975) benannt. In Anlehnung an diese Bezeichnung wird der Transfer von RNA auf eine Membran Northern Blot und der Transfer von Proteinen z.B.

eines SDS-Geles auf eine Membran Western Blot genannt. Diese Methode erlaubt eine Vielzahl verschiedener sich anschließender Manipulationen, da Proteine auf einer Membran angefärbt, sequenziert, mit Antikörpern inkubiert oder mit Enzymen umgesetzt werden können. Im Vergleich zum Gel ist die Membran leicht zu handhaben und Reaktionen und Waschvorgänge laufen unbehindert durch Diffusionsvorgänge schneller ab. Die Antikörperexposition der Banden oder Spots im Gel beispielsweise wird kaum angewendet, da die Antikörper schlecht in das Polyacrylamidgel diffundieren und relativ große Mengen Antikörper nötig wären. Das Membranmaterial kann aus verschiedenen Materialien bestehen; in dieser Arbeit wurden Nitrocellulose-Membranen verwendet, welche mechanisch und chemisch sehr stabil sind. Die Übertragung der Proteinspots erfolgt mittels elektrophoretischer Elution. Im Prinzip wird hierbei die Membran in Kontakt mit dem Gel gebracht. Durch Anlegen eines elektrischen Felds gelangen die Proteine zur Membran (Elektroblotting) und binden dort nicht-kovalent. Zur Sichtbarmachung der Proteinspots sind Direktfärbungen mit verschiedenen Farbstoffen, wie z.B. Amidoschwarz, Coomassie-Blau, Ponceau-Rot oder aber eine Silberfärbung möglich. Zur Identifizierung des vermuteten Antigens im Blot wird die Membran mit Rinderserumalbumin geblockt, um die unspezifische Adhäsion der Antikörper zu verhindern. Anschließend wird der Antikörper auf die Membran gegeben. Der primäre Antikörper ist entweder direkt markiert, oder es wird ein markierter/markierender Sekundärantikörper verwendet.

3.1 Proteinaufarbeitung

Material:

Lysispuffer: 50mM TRIS-HCl (pH 7.5)
 150mM NaCl
 0,5% NP-40
 200mM Na₃Vo₄ (Natriumvanadat)
 10µg/ml Leupeptin
 10µg/ml Aprotinin
 1mM PMSF (Phenylmethylsulfonsäurefluorid, bei RT ist die HWZ
 30 min.; hydrolysiert schnell im Puffer, daher zuletzt zugeben)

Eis

1x Trypsin/EDTA

Methode:

- Die jeweiligen Zellen werden zuerst mit PBS gewaschen und dann von der Zellkulturschale mit 1x Trypsin/EDTA abgelöst und abzentrifugiert.
- Das Pellet wird trocken gesaugt.
- 100µl Lysispuffer zugeben.
- 10 min. auf Eis inkubieren.

- 10 min. bei V_{\max} , 4°C zentrifugieren.
- Danach erfolgt die Proteinbestimmung mittels der unter 2.2 beschriebenen Methode.
- Für den Blot werden routinemäßig 25 – 100 μg Protein eingesetzt, 50 μg im Durchschnitt.

3.2 Gellauf

Material:

5xLämmli-Puffer: 50% Glycerin
 7,5% SDS
 25mM EDTA
 0,075mM Bromphenolblau
 7,5% β -Mercaptoethanol

Laufpuffer: 25mM TRIS
 200mM Glycin
 0,1% SDS

Trenngelpuffer: 1,5mM TRIS, pH 8,8
 20% SDS

Sammelgelpuffer: 1M TRIS, pH 6,8
 20% SDS

APS

TEMED

H₂O

wassergesättigtes Butanol

Acrylamid

Proteinmarker (New England Biolabs, Prestained Protein Marker Broad Range)

Gelkammer (Biometra)

Methode:

- Beide Glasplatten reinigen, ein Gummizug als Spacer und Abdichtung dazwischen legen und mit zwei Klammern zu beiden Seiten fixieren.
- Das Trenngel nach der folgenden Vorschrift, je nach gewünschter Konzentration und Anzahl der Gele herstellen und in die Glasplatten gießen.

- Trenngelvorschrift:

Konzentration der Gele (%)		7,5%			10%	
Anzahl der Gele	1	2	3	1	2	3
H ₂ O (ml)	3,85	7,17	11,04	3,43	6,36	9,8
Puffer (ml)	1,75	3,25	5	1,75	3,25	5
40% Acrylamid (ml)	1,32	2,44	3,75	1,75	3,25	5
TEMED (µl)	5	8	12	3	5	8
10%APS (70µl)	70	130	200	70	130	200
Gesamtvolumen (ml)	7	13	20	7	13	20

- Das Trenngel mit wassergesättigtem Butanol überschichten und polymerisieren lassen.
- Nach entsprechender Zeit das Butanol mit Whatmanpaper abnehmen und das Sammelgel auf das Trenngel gießen.
- Sammelgelvorschrift:

Anzahl der Gele	1	2	3
H ₂ O (ml)	2,05	3,42	4,77
Puffer (ml)	0,61	1,02	1,43
40% Acrylamid (ml)	0,308	0,51	0,72
TEMED (µl)	3	5	7
10% APS (µl)	30	50	70
Gesamtvolumen (ml)	3	5	7

- In das Gel direkt nach dem Gießen einen Kamm einsetzen und das Sammelgel auspolymerisieren lassen.
- Danach Kamm und Gummispacer vorsichtig entnehmen; Gel in die Gelkammer einspannen und mit Laufpuffer überschichten.
- 50µg Protein werden mit Laemmli-Puffer vermengt (Endkonzentration Laemmli-Puffer 1x).
- Proben und Marker für 10min. bei 95°C inkubieren.
- Sodann abzentrifugieren und in die Taschen des Gels einfüllen.
- Gel bei 200 V, 50mA für 1,5h laufen lassen.
- Nachdem der Gellauf beendet ist, Gele aus der Kammer nehmen, vorsichtig die Glasplatten abtrennen, Sammelgel mit einem Skalpell entfernen und wie unter 3.3 beschrieben weiter verfahren.

3.3 Blotting

Material:

Whatmanpaper

Blotpuffer: 25mM TRIS

192mM Glycin

20% Methanol
 Blotkammer (Biometra)
 Nitrocellulose Transfer Membran, PROTRAN (Schleicher & Schüll)
 Rührfisch
 Eisblock

Methode:

- Membran und Whatmanpaper auf die Größe des Gels zuschneiden.
- Gel, Membran und Whatmanpaper in Blotpuffer für 10min. equilibrieren.
- Apparatur aufbauen, Kissen auf beide Seiten des Blothalters legen, 3x Whatmanpaper auflegen, danach das Gel aufbringen, die Membran luftblasenfrei auf das Gel legen und erneut mit 3x Whatmanpaper abdecken.
- Blothalter schließen.
- In den Blot-Apparat einspannen und diesen in die Kammer stellen.
- Kammer mit Rührfisch und Eisblock versehen, mit Blotpuffer auffüllen und auf einen Magnetrührer stellen.
- Blot bei 4°C, 0,37mA, 100V für 1,5h blotten lassen.
- Nach Ablauf der Zeit wie unter 3.4 beschrieben weiterverfahren.

3.4 Blocken

Vor der Reaktion zwischen Proteinen eines Blots mit Antikörpern müssen unspezifische Proteinbindungsstellen der Blotmembran mit BSA abgesättigt werden. Dieser Vorgang, auch Blocken genannt sorgt dafür, dass die hohe Affinität der Membran zu Proteinen herabgesetzt wird und der im nächsten Schritt zugegebene Antikörper spezifischer bindet. Tween-20 als Blocking-Reagenz allein zeigt eine hohe Hintergrundfärbung und unspezifische Banden bei der Immunfärbung. Es ergänzt jedoch gut andere Blocker wie z.B. BSA. (BATTEIGER et al., 1982; HAURI et al., 1986).

Material:

Blocking-Lösung: 1,5% BSA in 1x Waschpuffer
 Waschpuffer, 10x: 100mM TRIS
 1,5M NaCl
 1,25% TWEEN

Methode:

- Blockpuffer immer frisch ansetzen.
- Nach dem Gellauf Membran aus der Vorrichtung nehmen und mit der Gelseite nach oben für 15min. in Blockpuffer legen.

- Blockpuffer abgießen und die Membran in 1x Waschpuffer bei 4°C aufheben oder die Immunfärbung (siehe 3.5) beginnen.

3.5 Immunfärbung, Chemilumineszenz-Nachweis

Gebloottete Antigene lassen sich mit entsprechenden Antikörpern nachweisen. Hierfür wird der Blot nach dem Blocken mit dem 1. Antikörper inkubiert (Anti-Antigen-Antikörper). Es handelt sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern um monoklonale Maus-(IgG)-Antikörper, bzw. polyklonale Kaninchen-(IgG)-Antikörper, welche gegen das jeweilige Protein gerichtet sind. Durch Waschschrte werden ungebundene Antikörper entfernt und anschließend ein zweiter markierter Antikörper zugegeben. Hierbei handelt es sich um Anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-Antikörper, die mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt sind. Nach weiteren Waschschrten wird der Blot mit Hilfe der Markierung des 2. Antikörpers entwickelt und damit die Position des Antigens sichtbar. Diese Lumineszenz-Reaktion entsteht im wesentlichen durch folgende Schritte:

Da der erste AK an das nachzuweisende Protein auf der Membran bindet und der 2. AK an den Ersten bindet, befindet sich auch das Enzym Peroxidase, das an den 2. AK gekoppelt ist, an der Stelle des Proteins auf der Membran. Peroxidase ist ein Enzym, welches aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) Radikale abspaltet, die eine Oxidation von vorhandenem reduziertem Luminol bewirken. Bei dieser Reaktion wird Energie in Form von Licht (425 nm) freigesetzt, welches einen Film schwärzen kann. Die Spezifität der Immunfärbung hängt von der Spezifität des 1. und 2. Antikörpers und von deren Verdünnung ab.

Material:

SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, PIERCE

- | | | |
|----------------|-------|--|
| 1. Antikörper: | MSH2: | Clone FE11 ist ein monoklonaler Mausantikörper, hergestellt durch die Immunisierung von BALB/C Mäusen mit einem carboxyterminalen Fragment von menschlichem MSH2 Protein; Isotyp $IgG_{1\kappa}$ (Oncogene Research Products, MSH2-AB-2) |
| | p53: | Clone DO-1 ist ein monoklonaler Mausantikörper, hergestellt durch die Immunisierung von BALB/C Mäusen mit rekombinantem menschlichen Wildtyp p53 Protein; Isotyp $IgG_{2a\kappa}$ (Oncogene Research Products, p53-AB-2) |

Bad: Polyklonaler Antikörper, hergestellt durch die Immunisierung von Hasen gegen den murinen Carboxyterminus von Bad der Maus (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Bad (C-20))

Bcl-2: Polyklonaler Antikörper hergestellt durch die Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Bcl-2 Protein (Santa Cruz Biotechnology Inc. Bcl-2 (Δ C 21))

MSH6/GTBP: Monoklonaler Mausantikörper, Isotyp IgG1, generiert mit humanem MSH6 Protein (BD Transduction Laboratories)

2. Antikörper: Goat anti-Mouse-HRP Conjugate, PIERCE; mit Meerrettichperoxidase gekoppelt

Goat anti-Rabbit IgG (H+L), BIORAD; mit Meerrettichperoxidase gekoppelt

1.AK-Lösung:

MSH2: 0,2 μ g/ml entsprechend einer 1:500 Verdünnung in Blockpuffer, 8 μ l Antikörper in 4ml Blockpuffer verdünnen

MSH6: 0,5 μ g/ml entsprechend einer 1:500 Verdünnung in Blockpuffer, 8 μ l Antikörper in 4 ml Blockpuffer

p53: 0,1 μ g/ml entsprechend einer 1:1000 Verdünnung in Blockpuffer, 4 μ l Antikörper in 4ml Blockpuffer

bcl-2: 0,2 μ g/ml entsprechend einer 1:1000 Verdünnung in Blockpuffer, 4 μ l Antikörper in 4ml Blockpuffer

bad: 0,1 μ g/ml entsprechend einer 1:1000 Verdünnung in Blockpuffer, 4 μ l Antikörper in 4ml Blockpuffer

2.AK-Lösung:

Anti-Maus-Antikörper, 1: 3.000 verdünnt

PBS steril

1,5% BSA in 1x Waschpuffer

Anti-Rabbit-Antikörper, 1:10.000 verdünnt

PBS steril

1,5% BSA in 1x Waschpuffer

Waschpuffer

Röntgenfilm, X-ray Retina (Noras)

Methode:

- Nach dem Blocken wird die Blocklösung entfernt und die Membranen werden über Nacht bei 4°C oder bei RT für 1h in der 1.AK-Lösung leicht geschüttelt.
- Anschließend wird überschüssiger und unspezifisch gebundener Antikörper mit Waschsritten (1x Waschpuffer), die jeweils 15 min. dauern, von der Membran abgelöst (ständiges Schütteln).
- Nun inkubiert man mit dem 2.AK, der gegen IgG der Maus, bzw. Hase gerichtet ist, um die Bindung an den 1.Antikörper zu erreichen. Dies geschieht durch Inkubation der Membran für 1 Stunde in 2.AK-Lösung bei RT.
- 3 - 5 mal mit Waschpuffer für jeweils 5 min. waschen (auf Schüttler).
- Anschließend Inkubation des Blots mit Super Signal West Pico Working solution für 2 - 5 min.
- Abkippen der Inkubationslösung.
- Danach wird der Blot mittels eines Folienschweißgerätes blasenfrei eingeschweißt.
- Bei Rotlicht wird der Blot in eine Film-Kassette eingelegt und ein auf die Größe der Membran zurechtgeschnittener Röntgenfilm (Noras x-ray Retina) aufgelegt. Es werden nacheinander mehrere Filme exponiert, da die günstigste Dauer der Exposition von Experiment zu Experiment schwankt. Gängige Expositionsdauern sind: 10sec, 30sec, 1 min, 5 min, 10 min. und 1 h.
- Nach der Exposition werden die Filme mit entsprechenden Entwicklungs- und Fixierungslösungen behandelt und anschließend getrocknet.

4. DNA

4.1 Allgemeine DNA-Methoden

4.1.1 Reinigung von DNA

4.1.1.1 Fällung von DNA-Fragmenten

Material:

NaAC 3M, pH 5.2

EtOH_{abs.}

EtOH 70% bei -20°C

TE-Puffer 10x: Tris-HCL: 100mM, pH 7.4

EDTA: 10mM, pH 7.6 – 8.0

Methode:

- Zur wässrigen DNA-Lösung wird 1/10 Volumeneinheit (VE) 3M NaAc, pH 5.2 zugegeben und kurz vermischt.
- Danach wird mit 2.5 VE EtOH_{abs.} die DNA bei -20°C für mindestens eine Stunde gefällt.
- Der Ansatz wird 15 – 30 min. in der Eppendorffzentrifuge bei V_{max} zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 500 μl 70% EtOH (-20°C) gewaschen.
- Erneute Zentrifugation in der Eppendorff-Zentrifuge für 5 min. bei V_{max} und anschließend den Überstand verwerfen.
- Das Pellet wird in der Speed-Vac-Apparatur bei RT für ca. 5 min. getrocknet.
- Die Resuspension erfolgt in TE-Puffer oder H₂O.

4.1.1.2 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-(PCI)-Extraktion

Material:

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, PCI (25:24:1)

Chloroform

Methode:

- Zur wässrigen DNA-Lösung wird 1 VE PCI pipettiert.
- Beide Phasen werden intensiv vermischt.
- Um die Phasen zu trennen, erfolgt eine Zentrifugation für 3min. bei V_{max} in einer Eppendorffzentrifuge.
- Die obere, wässrige Phase wird abpipettiert und mit einer VE Chloroform versetzt. Die untere Phase wird entsorgt.
- Die Extraktion wird zweimal wiederholt.

Die DNA der oberen Phase wird wie unter 4.1.1.1 beschrieben gefällt.

4.1.2 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen (RE)

Die erste Beobachtung, die später zur Entdeckung von RE führte, stammte aus den frühen fünfziger Jahren. Man konnte schon damals zeigen, dass manche Bakterienstämme gegen die Infektion mit einem Bakteriophagen immun waren, ein Phänomen, das man als wirtskontrollierte Restriktion bezeichnete. Der Mechanismus der Restriktion ist nicht sehr kompliziert, dennoch dauerte es über 20 Jahre, bis man ihn völlig verstand. In den Bakterien, aus denen sie isoliert werden, zerstören die RE als Teil eines Schutzmechanismus, des sogenannten

Restriktions-Modifikations-Systeme, jede DNA, die von außen in die Zelle eindringt. Um zu verhindern, dass diese Enzyme auch die Erbinformation der eigenen Wirtszellen zerstören, besitzen diese Zellen ein Modifikationssystem, eine Methylase, welche die eigene DNA an bestimmten Basen der Erkennungssequenz methyliert und so verhindert, dass ein RE die eigene DNA schneidet (Nicholl, 1995). Die DNA abbauenden Enzyme, die von vielen Bakterien produziert werden, bezeichnet man als RE. Mehr als 1200 solcher Enzyme konnten bislang charakterisiert werden. Man unterscheidet drei Klassen von RE, die sich in ihrer Wirkungsweise unterscheiden. Die Typen I und III sind für die Gentechnik nur für spezielle Anwendungen von Interesse. Der Typ II stellt die Schneideenzyme dar, welche große Bedeutung erlangt haben (Brown, 1996). Man zählt sie zu den Endonukleasen, da sie die DNA nicht vom Ende her abbauen, sondern innerhalb eines Stranges schneiden.

Das wichtigste Merkmal der RE besteht darin, dass es für jedes Enzym eine bestimmte Erkennungssequenz gibt, an welcher es die DNA hydrolysiert. Diese Schnittsequenz besitzt meistens palindromischen Charakter. Jedes RE schneidet DNA nur an den für dieses Enzym spezifischen Stellen. Dabei wird das Zucker-Phosphat-Gerüst der DNA hydrolysiert. Jede vollständige Restriktion eines bestimmten DNA-Moleküls durch eine bestimmte RE führt immer zur gleichen Gruppe von Fragmenten. Diese Fragmente werden üblicherweise durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit einem in die DNA interkalierenden Farbstoff unter UV-Licht sichtbar gemacht. Durch Verwendung eines Molekulargewichtstandards, welcher genau definierte Fragmente bestimmter Molekülmasse enthält, kann die Größe der untersuchten DNA-Moleküle bestimmt werden.

Material:

Inkubationspuffer 10x für RE

Restriktionsendonukleasen

EDTA 0,5M, pH 8,0

10x Auftragspuffer in 1x Acetat-Puffer:

EDTA: 40mM

Glycerin: 70%

Bromphenolblau: 0.05%

Xylencyanol: 0.05%

Methode:

- Pipettierschema für 10µl Ansatz:

DNA: 0.1 – 1µg

10x RE-Puffer: 1µl

RE/µg DNA: 10 U

ad 10µl H₂O_{dest.}

- Inkubation für 1h am Temperaturoptimum des verwendeten Enzyms (i.d.R. 37°C).
- Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 2,5µl 10x Auftragspuffer (1:10 im Reaktionsvolumen) oder 0,5µl 0.5M EDTA. Bei einer geplanten enzymatischen Weiterbehandlung der Probe wird die Reaktion durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C abgestoppt, wodurch das RE inaktiviert wird. Die Dauer des Erhitzens richtet sich nach der Inaktivierungszeit des jeweiligen Enzymes bei 65°C.

4.1.3 Analyse durch Agarosegel-Elektrophorese

Material

10x Acetat- Puffer:

Tris: 400mM

NaAc: 50mM

EDTA: 10mM

pH 8.0 mit Eisessig eingestellt

Agarose (SeaKem)

10x Auftragspuffer (vgl. 4.1.2.)

Ethidiumbromid (EtBr)-Färbelösung: 1µg/ml in H₂O_{dest.}

DNA-Molekulargewichtsmarker

Elektrophoresekammer

UV-Transluminator: 254nm (Bachofer)

366nm (Bachofer)

Herstellen eines 1%igen Agarosegels (100 ml):

1g Agarose wird in 100ml 1x Acetat-Puffer gelöst und im Mikrowellenherd aufgeköcht. Anschließend wird die Flüssigkeit bis auf 60°C abgekühlt um das Gel dann zu gießen.

Methode:

- Die Agarosekonzentration des Gels richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Fragmente bis 300 bp lassen sich besser mit höheren Agarosekonzentrationen auftrennen, so dass hierfür 2 – 2,5% -ige Gele benutzt werden, während größere Fragmente von über 5000 bp, am besten mit 0,5%igen Gelen aufzutrennen sind. Ein Standard-Agarosegel hat eine Agarosekonzentration von 0,8 – 1%.
- Eine in der Größe passende Gelkammer wird mit Klebeband umklebt. Anschließend wird der Kamm mit der Halterung eingesetzt und die 60°C warme Agarose in die Vorrichtung gegossen. Luftblasen werden mit einer Eppendorf- oder einer Pasteurpipette entfernt. Das Gel bleibt so lange bei RT stehen bis es ausgehärtet ist.

- In die Laufkammer wird 1x Acetat-Puffer gegeben. Der Kamm wird vorsichtig, ohne Schiebe- und Biegebewegungen herausgezogen und das Klebeband entfernt. Danach wird das Gel in die Kammer eingesetzt und mit Puffer überschichtet.
- Zugabe von 1/5 VE Auftragspuffer zu den Proben und Einbringen der Proben in die Taschen des Gels.
- Starten der Elektrophorese mit 80 – 100V.
- Sobald die gewünschte Auftrennung erreicht ist, wird die Elektrophorese gestoppt. Die Bromphenolblau- und die Xylencyanolbande sind optische Marker für die gewanderte Strecke der DNA-Fragmente.
- Die Gelkammer mit dem Agarosegel wird aus der Elektrophoresekammer genommen, das Gel vorsichtig von der Platte in eine Färbewanne überführt und lichtgeschützt für 15 min. in EtBr-Lösung gefärbt.
- Anschließend wird das Gel zu Dokumentationszwecken mit UV-Licht der Wellenlänge 254nm fotografiert. Soll das Gel später geblottet werden, wird zum fotografieren neben das Gel ein Lineal gelegt um die Signale auf dem Filter später mit denen des Gels vergleichen zu können. Ist das Gel für präparative Zwecke vorgesehen, so wird bei einer Wellenlänge von 302nm fotografiert, um die DNA nicht durch zu starke Energieeinwirkung zu schädigen.

4.1.4 DNA-Elution aus Agarosegelen

Material:

Äquibrierungspuffer:

NaAc: 300mM, pH 7.0

EDTA: 1mM

„Freeze-Squeeze“-Reaktionsgefäße mit Glaswolleinsatz (Costar)

1x TE-Puffer

Sea-Kem-Agarose (FMC)

Methode:

- Elektrophorese der DNA-Probe im Sea-Kem-Agarosegel entsprechender Konzentration in frischem 1x Acetatpuffer wie in 4.1.3. beschrieben.
- Färben und fotografieren des Gels wie unter 4.1.3 beschrieben.
- Die Bande des gesuchten DNA-Fragmentes wird mittels eines Molekulargewichtsstandards identifiziert und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.
- Das so erhaltene Gelstück wird in ein Eppendorfgefäß überführt und durch Zugabe von 1 ml Äquibrierungspuffer ungefähr 20 min. äquilibriert.

- Danach wird das Gelstück mit einer sterilen Pinzette in ein „Freeze-Squeeze“-Reaktionsgefäß überführt und bei -70°C für mindestens 1h, besser über Nacht eingefroren.
- Das Gefäß wird in gefrorenem Zustand in einer Eppendorfszentrifuge für 20 min. zentrifugiert, wobei die Geschwindigkeit langsam auf V_{max} erhöht wird, um das Zerreißen der gefrorenen Gefäße zu vermeiden.
- Die im Sieb verbliebene Agarose wird verworfen und das DNA-Fragment im durch das Sieb gedrückten Puffer wie oben beschrieben gefällt, gewaschen, getrocknet und resuspendiert.
- Kontrolle der Elution durch Elektrophorese eines Aliquots im Agarosegel.

Die Elution von DNA aus Agarosegelen kann auch alternativ mit Hilfe des QIAEX Kits (QIAGEN) bzw. des CONCERT™ Rapid Gel Extraktion Systems (GIBCO) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt werden.

4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Prinzip:

Die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) ist eine in vitro Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Die PCR macht sich die Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einzelsträngige DNA zu replizieren zu nutze. Voraussetzung für diesen Prozess ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende, das entsprechend verlängert werden kann. Die doppelsträngige DNA dient als Matrize. Durch Erhitzen trennen sich die beiden DNA-Stränge voneinander, die DNA wird denaturiert. An die so entstandenen Einzelstränge können sich kurze, aus ca. 20 Nukleotiden bestehende Primer anlagern. Dieser auch als Annealing bezeichnete Prozess ist sequenzspezifisch. Die kurzen Abschnitte werden nun von der Polymerase verlängert. Denaturiert man anschließend die neu synthetisierte doppelsträngige DNA durch eine Temperaturerhöhung in ihre Einzelstränge, so können neue Primermoleküle binden und der Prozess wiederholt sich. Gibt man in jeden PCR-Ansatz zwei solcher Primer, einen der am Sense-Strang und einen der am Antisense-Strang, dem Gegenstrang bindet, so erhält man mit jedem Zyklus von Neusynthese und Denaturierung eine Verdopplung des zwischen den Primern liegenden DNA-Abschnittes. Die PCR führt also zu einer exponentiellen Amplifikation, da auch die jeweils neu gebildeten Stränge als Matrize zur Verfügung stehen.

Ein typischer PCR-Verlauf besteht in der Regel aus drei unterschiedlichen Temperaturstufen. Die Trennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge erfolgt durch Erhitzen auf $92 - 98^{\circ}\text{C}$. Zweiter Schritt der Reaktion ist die Anlagerung, das Annealing der Primer. Dazu kühlt man den Reaktionsansatz je nach verwendetem Primerpaar sequenzspezifisch auf ca. $55 - 65^{\circ}\text{C}$ ab. Dadurch

wird die Hybridisierung der Primer mit der komplementären DNA gewährleistet. Nach dem Annealing erhöht man die Temperatur auf 72°C. Diese Temperatur entspricht dem Aktivitätsoptimum des verwendeten Enzyms, der Taq-Polymerase, und gewährleistet die schnelle Verlängerung der Primer. Die Taq-Polymerase entstammt der Bakterienart *Thermus aquaticus*, welche in heißen Quellen vorkommt und deren sämtliche Enzyme hitzestabil sind. In der Regel werden ca. 20 – 35 PCR-Zyklen durchgeführt. Für die beiden Schritte Annealing und Verlängerung reichen in der Regel Zeiten von jeweils weniger als einer Minute aus. Nur bei sehr großen PCR-Produkten (> 1kb) verlängert man die Extensionszeit entsprechend um sicherzustellen, dass der komplette Strang synthetisiert werden kann und die Polymerase genügend Zeit zur Verfügung hat. Nachfolgend wird die Reaktion wieder auf 92 – 98°C gebracht, um die DNA in ihre Einzelstränge zu zerlegen.

Material:

Biometra T4-Thermocycler

PCR-Gefäße

Taq-Polymerase (Pharmacia, Roche)

Taq-Polymerase-Puffer

Primer

Template-DNA

dNTP-Mix, 4mM

Methode:

- Pipettierschema:

Template-DNA:	0.1 – 1 µg
Primer:	je 10 - 50 pmol
10x Puffer:	10 µl
dNTP ₄ -Mix, jeweils 1mM:	5 µl
Taq-Polymerase:	1.5 U
ad 100 µl H ₂ O _{dest.}	
Taq-Polymerase als letztes zupipettieren.	

- Die Ansätze werden in PCR-Gefäße überführt und in die auf 94°C vorgeheizte PCR- Apparatur gestellt.
- Die Amplifikation erfolgt nach einem speziellen und optimierten Programm.
- Nach dem Ende der PCR-Reaktion wird ein Aliquot des Reaktionsgemisches mit einem Agarosegel ausgewertet.

4.3 Klonierung von DNA-Fragmenten und Aufarbeitung von Plasmid-DNA

4.3.1 Amplifikation des hMSH2-Reportergenkonstruktes

Material:

Primer (MWG Biotech)
pGL3-Basisvektor

Methode:

- Zur Amplifikation der jeweiligen Konstrukte wurden Primer aus der 5' und 3'-Region des hMSH2 Promotors ausgewählt und menschliche DNA als Template verwendet.
- An den Forwardprimer wurde eine *KpnI*-Schnittstelle angehängt und an den Reverseprimer eine *HindIII*-Schnittstelle, welche auch in der MCS des pGL3-Basisvektors repräsentiert ist.

Für die Amplifikation des **hMSH2-Promotors** waren die Primer folgende:

Forward: 5'-gggtacctcgtgctcccaaagtactgg-3'
KpnI Primersequenz

Reverse: 5'-cccaagcttcccacaccactaagctgtt-3'
HindIII Primersequenz

Die den Amplifikationen zugrunde liegenden PCR-Bedingungen waren:

- | | | |
|------------------------|---|-----------|
| - 94°C für 2 min | } | 34 Zyklen |
| - 94°C für 30 Sekunden | | |
| - 64°C für 1 min | | |
| - 72°C für 1 min | | |
| - 4°C hold | | |

- Um Polymerasefehler so klein wie möglich zu halten, wurden alle Amplifikationen mit PFU-Taq (Invitrogen) durchgeführt. Anschließend wurden alle Amplifikate zur Kontrolle sequenziert.
- Von den als positiv identifizierten Klonen wurden anschließend jeweils 100 ml Kulturen angelegt und aus diesen wie unter 4.3.7. beschrieben die DNA isoliert und anschließend aufgereinigt.

4.3.2 Mutagenese

Material:

Primer (MWG Biotech)
ExSite™ PCR-Based Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

Methode:

- Für die Mutagenese des **AP-1 mutanten** hMSH2-Promotors werden folgende Primer verwendet:
Forward: 5'-gttttcgaatgaggggaagcatcaacgagtgatgaagcg-3'
Reverse: 5'-cgcttcactcgttgatgcttcctcattcgaaac-3'
- Für die Mutagenese zum **p53-mutanten** hMSH2-Promotor kommen folgende Primer zur Anwendung:
Forward: 5'-gggaggaggaggaaggagcggtttttttgtttcaagttcc-3'
Reverse: 5'-ggaaacttgaaaacaaaaaaaaaacgctcctcctcctccc-3'
- Die Mutagenese wird mit dem beschriebenen Kit nach Anleitung durchgeführt.

4.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Material:

10x NEB Puffer 2 (New England Biolabs)
 CIP, calf intestine phosphatase (Sigma)

Methode:

- Zur Vermeidung der Selbstligierung isolierter DNA-Fragmente mit identischen Enden werden die 5'-terminalen Phosphatgruppen durch Behandlung mit hitzeinaktivierter, alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm („calf intestine phosphatase“, CIP) abgespalten.
- Die gefällte DNA wird hierfür in 20 µl NEB Puffer 2 + H₂O aufgenommen und mit 0,2U CIP pro pmol 5'-Enden (1 µg 1kb-DNA entspricht 3,08pmol) 1 h bei 37°C inkubiert.
- Zur Abtrennung des Enzyms wird die DNA nach Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1, v:v) mit EtOH gefällt.

4.3.4 Ligation von DNA

Material:

- Vektoren:
 - p Bluescript KS+/KS-, Länge; 2,964 kb, Stratagene, La Jolla, CA
 - pUC18, Länge 2,69 kb, Promega, Mannheim (YANISCH-PERRON et al., 1985)
 - pGL3-Controll Vector, Länge 5,256 kb, Promega, Mannheim
 - pGL3-Basic Vector, Länge 4,818 kb, Promega, Mannheim)
- T4 DNA-Ligase (Invitrogen)

Methode:

- Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen, überhängenden oder glatten Enden wird das Enzym T4 DNA-Ligase (Invitrogen) verwendet. Die Konzentration der DNA-Fragmente im Ansatz wird so gewählt, dass das molare Verhältnis der kohäsiven Enden von Vektor zu Insert 1:1 bis 1:3 beträgt. Insgesamt werden 100-200ng DNA in einem Gesamtvolumen von 20µl eingesetzt.
- Die Ligation erfolgt mit 2U T4-Ligase im vom Hersteller empfohlenen Puffer über Nacht bei 16°C im Wasserbad. Die Hälfte des Ligationsansatzes wird anschließend zur Transformation eingesetzt.

4.3.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Material:

Glycerinkultur folgender E.coli-Genotypen:

- XL1 Blue, endA1, hsdR17 (rk-, mk+), supE44, thi-, λ-, recA1, gyrA96, relA1, Δ(lac), [F', proAB, lacIqZΔM15, Tn10(tetR)], (BULLOCK, 1987)
- DH5α, F-, endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, thi-1, λ-, recA1, gyrA96, relA1, Δ[argF-lacZYA]_{U196}, [φ80dlacZM15], (HANAHAN, 1983)

DnD (DMSO und DTT):
 1M DTT
 90% DMSO
 10mM KOAc pH 7,5

TFB:
 100mM KCl
 45mM MnCl₂•4H₂O
 10mM CaCl₂•2H₂O
 3mM Hexamin Co(III)Chlorid
 10mM K-MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure); pH 6,3 mit KOH

SOB:
 20g/l Bacto-Tryptone
 5g/l Hefeextrakt
 2,5mM KCl
 10mM NaCl
 pH 7,6 mit KOH
 Zugabe von 2% 1M MgSO₄ (steril) vor dem Gebrauch

Methode:

- 50ml SOB-Medium werden in einen 250ml Erlenmeyerkolben gegeben, mit 1-2ml Übernachtskultur des Wirtsstammes angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,4 und 0,7 bei 37°C im Schüttler inkubiert.
- Die Zellen werden dann bei 3500rpm (Heraeus Biofuge 15R; HFA 22.2 Rotor) für 5 min. zentrifugiert, das Pellet mit 5ml kaltem TFB resuspendiert und erneut zentrifugiert (3500rpm, 5 min.).
- Anschließend vorsichtig in 2ml TFB aufnehmen.
- Diese Suspension wird für 20 min. auf Eis inkubiert, anschließend werden 35µl DnD/ml TFB zugegeben, geschüttelt und erneut für 10-20 min. auf Eis inkubiert.
- Nochmals werden 35µl DnD/ml TFB zugegeben, wieder geschüttelt und für 10-20 min. auf Eis inkubiert.

4.3.6 Transformation

Material:

Kompetente Bakterien (*E.coli*, DH5α bzw. XL1 Blue)

Vektor mit Teilen des hMSH2-Promotors

Kontrollvektor: pUC 18

β-Mercaptoethanol

Agarplatten mit 150 µg/ml Ampicillin

LB-Medium

Methode:

Die konstruierten Vektoren werden in Bakterien des Stammes *E.coli* DH5α bzw. XL1 Blue transformiert, wobei frisch kultivierte, hochkompetente Zellen eingesetzt werden (Präparation nach Hanahan, 1985).

- Bakterienzellen auf Eis auftauen und vorsichtig schwenken.
- Für die Transformation werden 100µl kompetenter Bakterienzellen in vorgekühlte 1,5 ml Röhrchen aliquotiert.
- Hinzugabe von 0,8 µl β-Mercaptoethanol.
- Vorsichtiges schwenken.
- Für 10 min auf Eis stellen, hierbei alle 2 min. vorsichtig schwenken.
- 50 ng Vektor + 1 µl zu transformierende DNA (durchschnittlich 50ng) hinzu pipettieren und das Ganze vorsichtig mischen.
- Mindestens 30 min. auf Eis inkubieren.
- Dem Ansatz für 45- 90 Sekunden einen Hitzeschock zufügen, indem man die Röhrchen für die angegebene Zeit in ein 42°C warmes Wasserbad hält. Hier sollten die Zeiten genau eingehalten werden.
- Den Ansatz für 2 min. auf Eis abkühlen lassen.

- Den Ansatz in 3 ml LB-Medium überführen und für 30-90 min. bei 37°C vorsichtig auf einem Rotationsschüttler (220 rpm) schütteln lassen.
- Anschließend wird dieser Ansatz für 5 min. bei 3500 rpm (Heraeus Biofuge) zentrifugiert, das Bakterienpellet in 200 µl LB-Medium resuspendiert und vorsichtig auf vorbereitete Agarplatten ausplattiert.
- Über/Nacht-Inkubation bei 37°C im Brutschrank.
- Bei erfolgreicher Transformation können nach Ü/N-Inkubation Einzelkolonien isoliert werden.

4.3.7 Plasmid-DNA-Präparation

4.3.7.1 Plasmid-DNA-Minipräparation mit alkalischer Lyse

Material:

Puffer 1:	6,06g/l	Tris-Base
	3,72g/l	Na ₂ EDTA 2H ₂ O
	100mg/l	RNase
		pH: 8,0

Puffer 2:	8,0g/l	NaOH
	50ml/l	20%SDS

Beide Pufferlösungen werden in Aqua bidest. angesetzt.

Methode:

Geringe Mengen reiner Plasmid-DNA werden nach folgender Schnellmethode präpariert:

- 1ml Bakterien-Suspension einer 3 ml LB-Übernachtskultur werden durch Zentrifugation (5 min., 5000 rpm, Heraeus Biofuge) pelletiert und das Pellet in 100 µl Puffer 1 resuspendiert.
- Nach Zugabe von 200 µl Lysispuffer (P2) wird bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert.
- Zur Neutralisation 150 µl 3M KOAc zugeben, den Ansatz für 5 min. auf Eis abkühlen und anschließend die Zelltrümmer durch 10-minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm abtrennen.
- Zum Überstand werden 400 µl Phenol/Chloroform (1:1) gegeben, um die Proteine zu denaturieren.
- Der Ansatz wird erneut 10 min. bei 15.000rpm zentrifugiert.
- Nach Überführen von 350 µl der Wasserphase in ein neues Eppendorfgefäß wird die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1ml 100% Ethanol gefällt.

- Nach Waschen mit 70% Ethanol, Zentrifugation und Trocknung wird das Pellet in 30 µl TE-Puffer resuspendiert.
- Für einen analytischen Restriktionsverdau werden in der Regel 6 µl eingesetzt.

4.3.7.2 Plasmid-DNA-Midipräparation

Die Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA erfolgt mittels des EndoFree™ Plasmid Maxi Kit der Firma QIAGEN nach Protokoll.

Material:

Bakterienstamm

LB-Medium

25 g/L LB-Medium (Bio 101, Vista, USA)

100 µg/ml Ampicillin

EndoFree™ Plasmid Maxi Kit der Firma QIAGEN (vor Beginn der Präparation alle mitgelieferten Puffer vervollständigen, mischen und bei Bedarf vorkühlen)

Methode:

- 4 ml LB-Ampicillin-Medium werden mit einer Kolonie des gewünschten Bakterienstamms beimpft und über Nacht (mindestens 8 Stunden) bei 37°C auf dem Rotationsschüttler (300rpm) inkubiert.
- Hieraus wird ein Aliquot von 100-200 µl in 100 ml ampicillinhaltigem Medium 1:500 bis 1:1000 verdünnt.
- Dieser Ansatz wird für 12-16 Stunden bei 37°C und 300 rpm auf einem Rotationsschüttler inkubiert.
- Anschließend sollte mit einem Photometer eine Dichtebestimmung der Bakterien bei OD₆₀₀ erfolgen. Benötigt wird eine Dichte von 3-4 x 10⁹ Bakterien. Die OD (optische Dichte) bei 600 nm ist ein gängiges Prinzip der indirekten Bestimmung der Bakterienzahl einer Bakteriensuspension.
- Die Bakterien werden durch 15 Minuten Zentrifugation bei ca. 6000 g (Sorvall; GSA-Rotor) und 4°C pelletiert und anschließend in 10 ml Puffer P1 vollständig resuspendiert. Dies kann mittels Pipettieren und Vortexen erreicht werden.
- Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 und gründlichem Durchmischen werden die Zellen für 5 min. bei Raumtemperatur lysiert. Die Durchmischung sollte vorsichtig erfolgen, um ein Scheren der Bakterien-DNA zu vermeiden, deshalb sollte auf Vortexen verzichtet werden.
- Durch Zugabe von 10 ml gekühltem Puffer P3 werden Membranreste, Proteine und chromosomale DNA ausgefällt. Der Ansatz wird nach vorsichtiger Durchmischung sofort auf die Filter gegeben und dort bei Raumtemperatur für 10 min. inkubiert.

- Die Zellysate werden mittels Stempeltechnik in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, wobei keine Kraft aufgewendet werden sollte.
- Hinzufügen von 2,5 ml Puffer ER, mischen und für 30 min. auf Eis inkubieren.
- Während dieser Zeit wird die QIAGEN-tip 500 Säule mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert.
- Das Lysat wird nun auf die Säule gegeben. Die Plasmid-DNA wird unter den vorliegenden Salzkonzentrationen selektiv an das Säulenmaterial gebunden. Verunreinigungen, wie z.B. Reste von RNA, werden nicht in der Säule zurückgehalten und im nächsten Schritt ausgewaschen.
- Die Säule wird 2 mal mit jeweils 30 ml Puffer QC gespült. Für alle folgenden Schritte wird nur endotoxinfreie Plastikware benutzt.
- Die gereinigte DNA wird nun mit 15 ml Puffer QN von der Säule in ein 50 ml Reaktionsgefäß eluiert und durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol gefällt.
- Das Ganze wird sofort bei 4°C und 15.000 g (Sorval, SS34-Rotor) für 30 min. zentrifugiert.
- Anschließend den Überstand vorsichtig dekantieren.
- DNA-Pellet mit 5 ml endotoxinfreiem 70% Ethanol waschen und das Pellet dreimal mit 1,5 ml Ethanol zum Waschen zentrifugieren.
- Zuletzt noch einmal für 10 min. bei 15.000 g (Sorvall, SS34) zentrifugieren.
- Überstand vorsichtig abnehmen, ohne das Pellet zu berühren.
- Pellet für 5-10 min. lufttrocknen lassen.
- DNA in einem geeigneten Volumen Puffer TE lösen und anschließend photometrisch die DNA-Konzentration und –menge bestimmen.

Die so gereinigte Plasmid-DNA ist von einer Qualität, die es erlaubt, sie in sämtlichen weiterführenden Experimenten, einschließlich automatischer Sequenzierung, einzusetzen.

4.4 DNA-Sequenzierung

4.4.1 Probenaufbereitung

Die Sequenzierung der isolierten DNA-Fragmente wird mit einem automatischen DNA-Sequenzier-Gerät der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Das Funktionsprinzip der Sequenzierung basiert auf einem Fluoreszenzverfahren mit verschiedenen Farbstoffen, die an ddNTP's gekoppelt sind und bei der Sequenzreaktion in die Proben-DNA eingebaut werden. Diese Farbstoffmoleküle werden vom Laser des Gerätes angeregt und emittieren dann Fluoreszenzstrahlung unterschiedlicher Wellenlänge. Für jede der vier Basen

wird ein bestimmter Farbstoff verwendet. Deshalb ist es möglich den Reaktionsansatz der Sequenzierung eines DNA-Moleküls in einer Bahn des Sequenzgels aufzutragen, da die basenspezifischen Abbruchprodukte durch ihre verschiedenfarbige Fluoreszenz unterschieden werden können. Diese automatische Detektion ist sehr empfindlich und es genügen sehr geringe Mengen an DNA, die allerdings hohe Reinheit besitzen muss.

Material:

Taq Dye DeoxyTM Sequencing Kit (ABI)

Hochreine DNA

1 pmol/µl Primer

Auftragspuffer 100 µl deionisiertes Formamid
 20 µl EDTA (50 mM, pH 8,0)

PCR-Gefäße

Biometra T4 Thermocycler

Methode:

- Die Reaktionsansätze werden nach den Angaben des Herstellers pipettiert.

Zunächst wird ein Reaktions Premix hergestellt:

5 x TACS Puffer	40 µl
dNTP ₄ Mix	10 µl
DyeDeoxy TM A Terminator	10 µl
DyeDeoxy TM C Terminator	10 µl
DyeDeoxy TM T Terminator	10 µl
DyeDeoxy TM G Terminator	10 µl
AmpliTaq DNA-Polymerase	5 µl

- Reaktionsansatz in PCR Gefäßen:

▪ Premix	9,5 µl
▪ DNA	50-100 ng
▪ Primer	3,2 pmol
▪ H ₂ O _{dest.}	ad 20µl

- Durchführung einer PCR-Reaktion von 25 Zyklen im PCR-Gerät unter folgenden Bedingungen:

96°C	15 sec.
50°C	1 min.
60°C	4 min.

- Die Reaktionsprodukte werden gefällt, gewaschen und getrocknet.
- Die Proben werden unmittelbar vor der Auftragung auf das Gel in 4 µl Auftragspuffer resuspendiert.
- Denaturierung der Proben bei 95°C für 3 min.
- Direkte Überführung auf Eis.

- Die Proben können auf das Sequenzgel aufgetragen werden.

4.4.2 Präparation eines Sequenzierungsgels

Material:

Roth Rotiphorese Sequenziergel-Konzentrat (NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40% 19:1)

Temed (N,N,N',N'-(Tetramethylethylendiamin) Kodak IB70120)

APS 10% (Kodak IB70080)

H₂O dest.

TBE 10x

Glasplatten 20x40 cm

Spacer 1,5 x 40 cm, 0,4 mm dick

Applied Biosystems Model 373A DNA Sequencing System

Alconox^R Glasreiniger (Alconox Inc.)

Methode:

- Die Glasplatten werden mit Alconox intensiv gereinigt und anschließend mit H₂O dest. und 90% Isopropanol und fusselfreien Tüchern abgerieben.
- Die Reinigung wird am Sequenzierer durch einen Scanvorgang kontrolliert.
- Auf die Ohrenplatte werden die Spacer und darauf die andere Glasplatte gelegt. Beide Platten werden mit Gelklammern fixiert.
- Pipettierschema für ein 6%iges DNA-Sequenzierungsgel (250 ml):

Harnstoff	125 g
40%ige Acrylamidlösung	37,5 ml
TBE-Puffer 10x:	25,0 ml
ad 100 ml H ₂ O dest.	

Den Harnstoff durch Rühren und Erwärmen (nicht über 50°C) lösen.

Danach 50 ml durch einen 0,2 µm Filter filtrieren und 10 min. entgasen.

- Zugabe von 144 µl 10%igem APS und 19,2 µl TEMED.
- Die Gellösung wird zügig und luftblasenfrei zwischen die horizontal gelagerten Glasplatten gegossen.
- Abschlußspacer einsetzen und 2 Stunden in horizontaler Lage polymerisieren lassen.
- Nach der Polymerisation wird der Abschlußspacer gezogen und die Geloberfläche mit H₂O dest. und 90%igem Isopropanol gespült. Die Reinigungsphase wird mit dem Scanner des Sequenzierers überprüft.
- Das Gel wird in die Apparatur des Sequenzierers eingespannt und der Kamm so eingesetzt, dass die Zähne ca. 1 mm tief in die Gelmatrix eintauchen.

- Die Pufferkammern werden mit 1x TBE gefüllt und das Gel 1 Stunde vorelektrophoretisiert.
- Die denaturierten Proben können nun aufgetragen werden. Nach 14 Stunden ist der Gellauf beendet.

4.4.3 Bearbeiten der Sequenzen am Computer

Die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgt an einem MacIntosh Computer (G4) mit Hilfe der Programme *SeqEdit* (ABI, England), *MacVector* (Kodak, USA) und *Sequencher* (GeneCodes Corp., USA).

4.5 Transfektion

4.5.1 DNA-Transfer in eukaryotische Zellen mittels Kalziumphosphat-Methode

Material:

PBS

2,5M CaCl₂

DNA

2x BBS: 50mM BES (N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2 Aminoethansulfonsäure)
280mM NaCl
1,5mM Na₂HPO₄

Methode:

Die Transfektion von Zellen basiert hier auf einer Kalziumphosphat-Präzipitation.

- Für diesen Versuch werden die Zellen mit einer Dichte von ungefähr $1,2 \times 10^6$ Zellen mit 7ml Medium in 10cm² Zellkulturplatten ausgesät.
- Nach ungefähr 24 Stunden werden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend der Transfektionsmix aus 8 µg DNA und 50 µl 2,5M CaCl₂ in einem Gesamtvolumen von 500 µl (mit Aqua bidest aufgefüllt) zugegebenen.
- Nach 45 min. Inkubation bei Raumtemperatur werden zu diesem Ansatz 500 µl 2x BBS pipettiert.
- Dieser Ansatz wird über Nacht bei 37°C inkubiert, anschließend wird frisches Medium zugesetzt.

4.5.2 DNA-Transfer in eukaryotische Zellen mittels Liposomentechnik

Material:

DOSPERS-liposomales Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim; sollte stets mit einer sterilen Kanüle entnommen werden, um Luftkontakt zu vermeiden)

DNA: Plasmid mit hMSH2-Promotor und Luciferase als Reportergen (2 μg)

Plasmid mit β -Galaktosidase als Reportergen (1 μg)

Zellkulturmedium ohne FCS und Penicillin/Streptomycin- Zusatz

PBS

Methode:

Diese Transfektionsmethode benutzt als Basis positiv geladene Liposomen, welche spontan mit DNA unter Ausbildung von Liposomen/Polynukleotid-Komplexen reagieren. Das verwendete liposomale Transfektionsreagenz „DOSPERS“ ist eine Liposomenpräparation des polykationischen Lipids 1,3-Di-Oleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid. Aufgrund der positiv geladenen Spermin-Kopfgruppen bindet DOSPERS negativ geladene DNA-Moleküle. Diese Bindung resultiert in der Bildung von polykationischen Komplexen, welche unspezifisch an die mit negativen Ladungen überzogene Oberfläche der zu transfizierenden Zellen adsorbiert werden. Anschließend wird die DNA von der Zelle aufgenommen.

- Vor der Transfektion werden die zu transfizierenden Zellen mit einer Dichte von etwa 3×10^5 pro Vertiefung einer 6-Loch-Kulturplatte in 2 ml Kulturmedium ausgesät und bei 37°C in einem Zellinkubator so lange inkubiert, bis sie 60-80% konfluent sind.
- Am Transfektionstag wird das Medium kurz vor der Zugabe der DOSPERS/DNA-Mischung durch 1ml frisches Kulturmedium (ohne FCS und Penicillin/Streptomycin-Zusatz) ersetzt.
- Um optimale Transfektionsbedingungen zu ermitteln werden zuerst verschiedene Verhältnisse von DOSPERS-Nukleinsäure-Mischungen getestet. In unserem System zeigte sich ein Verhältnis von $3 \mu\text{g}$ DOSPERS zu $3 \mu\text{g}$ DNA als optimal.
- So werden $3 \mu\text{g}$ DNA mit PBS zu einem Endvolumen von $50 \mu\text{l}$ verdünnt. Außerdem werden pro Ansatz $3 \mu\text{g}$ DOSPERS in $50 \mu\text{l}$ PBS verdünnt.
- Diese beiden Lösungen werden nun vorsichtig zusammengemischt (nicht vortexen) und 15 min. bei $15-25^\circ\text{C}$ inkubiert, um die Ausbildung von DOPSERS-DNA-Komplexen zu ermöglichen.
- Danach werden die $100 \mu\text{l}$ des Gemisches tropfenweise in das kurz zuvor zugegebene Kulturmedium pipettiert.
- Durch vorsichtiges Schwenken der Kulturplatte wird der Ansatz gemischt und dieser anschließend für 6h bei 37°C in einem Zellinkubator inkubiert.

- Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Transfektionsmischung abgenommen und durch 2-3ml frisches Kulturmedium ersetzt.

Für diesen und alle weiteren Versuche wird das zuvor beschriebene Plasmid mit dem MSH2-Promotor verwendet. Um eine Aussage über die Transfektionseffizienz treffen zu können, wird neben dem hMSH2-Plasmid auch immer zusätzlich ein β -Galactosidase exprimierendes Plasmid als interner Standard kotransfiziert. So ergibt sich im Transfektionsgemisch ein Verhältnis von 2 μ g hMSH2-Vektor zu 1 μ g β -Galactosidase-Vektor in 50 μ l PBS. Die Aktivität des Reportergens wird jeweils nach 6, 12, 24 und 48 Stunden bestimmt.

4.6 Aufschluss eukaryotischer Zellen, Proteinextraktion und -quantifizierung

4.6.1 Aufschluss eukaryotischer Zellen und Proteinpräparation nach liposomaler Transfektion

Material:

5x RLB-Puffer (Reporter Lysis Buffer, RLB), Promega

1x Lysispuffer: 4 Volumina H₂O steril
1 Volumen RLB-Puffer

PBS-Lösung: 137mM NaCl
2.7mM KCl
4.3mM Na₂HPO₄
1.4mM KH₂PO₄

Cellscrapper (Costar)

Methode:

- Die Zellen (10⁶-10⁷ pro Ansatz) werden auf der Kulturschale zweimal mit jeweils 2 ml PBS-Lösung gewaschen.
- Nach sauberem Abnehmen von PBS werden in jede Schale 400 μ l RLB-Lysispuffer auf die Zellen pipettiert und die Schale vorsichtig geschwenkt.
- Die Zellen werden in Lysispuffer mit Hilfe eines Cellscrapers vom Schalenboden abgelöst.
- Die gesamte Zell/Lysispufferlösung wird vorsichtig resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt.
- 10 min. Inkubation auf Eis zum Aufschluss der Zellen.
- 10-15 Sekunden vortexen.
- Zellen zweimal hintereinander in flüssigen Stickstoff tauchen.
- 2 min. bei 15.000rpm (Heraeus Biofuge) und 4°C zentrifugieren um unlösliche Zellbestandteile zu sedimentieren.

- Überstand wird in ein frisches Eppendorfgefäß überführt.
- 20 µl Aliquot für Luciferase-Aktivitätsbestimmung separieren.
- Lagerung bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff.

4.6.2 Aufschluss eukaryotischer Zellen und Proteinpräparation nach Transfektion mittels Kalziumphosphat

Material:

Vgl. 4.5.1

Methode:

- Die Zellen (10^6 - 10^7 pro Ansatz) werden auf der Kulturschale einmal mit 2 ml PBS gewaschen.
- In 1ml PBS mit Hilfe eines Gummischabers ernten und in einem Reaktionsgefäß durch Zentrifugation (5 min., 5000rpm, Heraeus Biofuge) pelletieren.
- Das Pellet wird je nach Größe in 60µl-100µl 1xRLB-Puffer resuspendiert und nach 15-30 min. Inkubation bei RT auf einem Schüttler erneut zentrifugiert (15 min., 15000rpm).
- Anschließend wird der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

4.7 Messung der Reportergenaktivitäten

Ein bis zwei Tage vor der geplanten Transfektion werden die verwendeten Zellen der verschiedenen Zelllinien so auf 6-well-Platten ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion hinreichende Konfluenz erreichen (ca. 60%). Diese wird unmittelbar vor Beginn der Transfektionen überprüft und bei erreichter gewünschter Dichte werden die Transfektionen in der liposomalen und Kalziumphosphat-Technik durchgeführt. Anschließend werden die Zellen mit verschiedenen Intensitäten von UV-Licht bestrahlt und nach verschiedenen Zeitpunkten lysiert und eine Luziferase-Aktivitäts-Messung sowie eine β -Galaktosidase-Messung als interner Standard durchgeführt.

4.7.1 Luciferase-Aktivitäts-Bestimmung

Material:

Luciferase-Assay (Promega, Mannheim), Verwendung bei Raumtemperatur

10 ml Luciferase Assay Puffer mit lyophilisierter Luciferase mischen = Luciferase Assay Reagenz und dieses in 100 µl Aliquots bei -70°C wegfrieren.

Luminometerröhrchen (Greiner)

Luminometer (Lumat, Berthold)

RLB-Puffer: 4 VE Wasser zu 1 VE 5 x LP; pro Ansatz sind ca. 400 µl LP nötig

PBS-Puffer (Mg^{2+} und Ca^{2+} frei)

6-Loch Platten (Greiner) bzw. 10cm Zellkulturschalen (Greiner)

Methode:

Kalziumphosphattechnik:

Die Luciferase-Aktivität wird mittels eines Luminometers festgestellt. Hierfür werden 5µg Protein in ein Luminometerröhrchen (Greiner) pipettiert. Hierzu werden 100µl Luciferase Assay Reagenz (Promega) gegeben, vermischt und anschließend (nach 1-2 sek. Wartezeit) für 10 Sekunden im Luminometer vermessen.

DOSPERS-liposomale Transfektion:

20µl des zuvor gewonnenen Zelllysates werden auf Raumtemperatur erwärmt. Diese werden mit 100µl Luciferase Assay Reagenz (RT) gemischt und binnen 10 Sekunden in einem Luminometer vermessen.

4.7.2 β -Galaktosidase-Bestimmung

Material:

Galacto-Light Plus™ Systems (Applied Biosystems)

Wasserbad, 48°C

Luminometerröhrchen (Greiner)

Luminometer (Lumat, Berthold)

Methode:

Das bakterielle β -Galaktosidasegen ist ein häufig verwendetes Reporterenzym zur Untersuchung von Genregulationen. 1,2-Dioxetan-Substrat für die β -Galaktosidase ermöglicht eine hochsensitive Enzymbestimmung und wird häufig in Reporterassays benutzt. Da viele Zellen eine endogene β -Galaktosidaseaktivität besitzen, muss diese durch Hitzeinaktivierung vor der Messung beseitigt werden.

- 50 µl des Zelllysates werden 50-60 min. bei 48°C im Wasserbad zur Inaktivierung der endogenen β -Galaktosidase der Zellen inkubiert.
- Galacton-Plus wird mit dem Reaction Buffer Diluent im Verhältnis 1:100 verdünnt = Reaction Buffer. Für jede Reaktion werden davon 200µl gebraucht. Diese sollten Raumtemperatur haben.

- Es werden 20µl Zelllysat zu jeweils 200µl Reaction Buffer in ein Luminometerröhrchen pipettiert.
- Dieser Ansatz wird für 60 min. bei RT inkubiert und vorsichtig gemischt.
- Danach werden 300µl Accelerator zu jedem Probenansatz zupipettiert. Nach 1-2 sek. wird die Lumineszenz für 10 sek. im Luminometer vermessen.

4.7.3 Auswertung der Messergebnisse

Jede Messung wird mindestens dreimal durchgeführt. Aus diesen Einzelwerten wird dann der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Um die Unterschiede in den einzelnen Transfektionen bezüglich Transfektionseffizienz und Zellkulturvariabilitäten auszugleichen, muss jede der Messungen standardisiert werden. Bei der Kalziumphosphattechnik erfolgt die Standardisierung über die Proteinbestimmung. Im Fall der Lipofektaminteknik erfolgt die Standardisierung über das zusätzlich transfizierte Plasmid β -Galactosidase, indem die relativen Lichteinheiten der Luciferasemessung durch die der β -Galactosidasemessung dividiert werden.

5. Immunfluoreszenz

Material:

PBS

Methanol (Roth)

Aceton (Roth)

BSA, Bovines Serum Albumin (Roth)

1.AK vgl. 3.5

2.AK: CyTM3-konjugiertes Ziege Anti-Maus-IgG (H+L); Jackson Immuno Research Laboratories

DAPCO: 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octane

Dakopen (Dako)

Mikroskop Zeiss Axiophot

Methode:

- Die Zellen werden auf in 70% Methanol eingelegten Deckgläschen in 6-Loch-Platten ausplattiert und die Zellen in üblichem Medium kultiviert.
- Nach der jeweils gewünschten Zeit wird das Medium abgenommen und die Zellen 2-3 mal mit sterilem PBS gewaschen.
- Die Deckgläschen werden in eine neue 6-Lochplatte überführt und mit eiskaltem Methanol (-20°C) für mindestens 10 min. überschichtet.
- Danach 2 min. in -20°C Aceton inkubieren.

- Die Deckgläschen werden anschließend mit dem Dakopen umrandet, um einen hydrophoben Rand zu schaffen.
- 1 mal mit PBS waschen.
- 20 min. mit 1%BSA/PBS blocken und anschließend absaugen.
- Erstantikörper in 1%BSA/PBS 1:100 verdünnen und die Zellen 60 min. bei RT damit inkubieren.
- Absaugen und dreimal mit PBS waschen.
- Zweitantikörper in 1%BSA/PBS 1:100 verdünnen und 60 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
- Absaugen und dreimal mit PBS waschen.
- Mit H₂O waschen.
- Einen Tropfen DAPCO auf einen Objektträger geben um die Proben auf dem Deckglas einzudecken.
- Mikroskopie.

6. FACS-Analyse zur Apoptosemessung /-detektion

Die Durchflußzytometrie (FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (Zellen, Kunststoffkügelchen usw.) in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben (Antikörper, Rezeptoren, Streptavidin, usw.) bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren.

Das Prinzip:

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/ Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist

möglich, weil sich selbst Farbstoffe die bei einer gemeinsamen Wellenlänge angeregt werden, durch unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren separat analysieren lassen (Beispiele siehe Tab. 3).

Tabelle 3: Auswahl von Absorptions- und Emissionsmaxima von häufig verwendeten Fluoreszenzmarkern

Fluorochrom	Absorptionsmaxima	Emissionsmaxima	Abkürzung
	[nm]	[nm]	
APC-Cy7	743	767	PharRed
Fluoreszeinisothiozyanat	495	519	FITC
PE-Cy5	480; 565; 649	670	CyChrome, Red670
PerCP	490	675	Peridin Chlorophyll
Phycoerythrin	480; 565	578	PE
Propidiumjodid	550	650	PI
Red613	480;565	613	PE-TexasRed

Man unterscheidet zwei Formen von Zelltod: Nekrose und Apoptose. Unter Apoptose versteht man grundsätzlich den geregelten physiologischen Zelluntergang. Dieser Prozess spielt sowohl während Morphogenese und Differenzierung als auch zur Abwehr schädigender Einflüsse auf den Organismus eine entscheidende Rolle. Apoptose ist durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen gekennzeichnet, wie z.B:

- blasige Veränderung der Plasma- und Kernmembran (Engl.: „blebbing“)
- Schrumpfung der Zelle
- Fragmentierung und Kondensierung des Chromatins.

Dieser Vorgang mündet in sogenannte Apoptosekörperchen, die von Makrophagen und benachbarten Zellen phagozytiert werden, wobei die Zelle schrumpft, Zellorganellen nicht geschädigt werden und kein Zellinhalt in die Umgebung austritt. Biochemisch lässt sich eine Aktivierung von Proteinasen und endogenen Nukleasen nachweisen.

Der geregelte Prozess der Apoptose unterscheidet sich grundlegend von dem Vorgang der Nekrose. Die Nekrose geht mit einer Schwellung der Zellen und einer Schädigung der Organellen einher, der Zellinhalt tritt in die Umgebung aus, was zu einer Entzündungsreaktion führt.

Es gibt mittlerweile mehrere Detektionssysteme für den nekrotischen Zelltod wie z.B.:

- Ausschlußfärbungen
- Chrom-Release-Assay
- LDH-Release-Assay

[3H]-Thymidin-Release-Assay
Nachweis metabolischer Aktivität

Für den apoptotischen Zelltod gibt es auch eine Reihe von Nachweismöglichkeiten:

- Färbungen des Zellkerns
- Spaltung von PARP
- DNA-Ladder
- Nucleosomen Quantifizierungs-ELISA
- TUNEL-Technik
- Annexin V

Annexin V als Apoptosemarker

Zu Beginn des apoptotischen Zelltodes wird die asymmetrische Verteilung bestimmter Phospholipide in der Membran der betroffenen Zelle aufgehoben. Phosphatidylserin, das unter normalen Bedingungen auf der cytoplasmatischen Innenseite der asymmetrisch aufgebauten Membran positioniert ist tritt dabei vermehrt in der nach außen gerichteten Membranseite auf. Das Protein Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin. Die Membranveränderungen lassen sich durch die Bindung von Fluorescein-konjugiertem Annexin V nachweisen.

Nekrotische Zellen werden infolge der Schädigungen der Cytoplasmamembran ebenfalls durch das Fluorescein-konjugierte Annexin V markiert. Allerdings kann hier Propidiumjodid zusätzlich in die Zellen eindringen und die DNA des Zellkerns anfärben. Mit dieser Methode ist somit eine eindeutige Unterscheidung von Apoptose und Nekrose möglich.

Material:

- Annexin V-FITC Kit (BIOZOL)
- FACS-Röhrchen (Greiner)
- FACS-Gerät: Beckman Coulter EPICS XL
- 1. Antikörper (vgl. Western-Blot, 2.5)
- 2. Antikörper Cy-3 markiertes Ziege-Anti-Maus-IgG, Jackson Immuno Research

Methode:

- Medium von den Zellen nehmen, mehrmals in PBS waschen.
- Zellen von den Kulturflaschen ablösen, abzentrifugieren und in der Neubauer-Zählkammer zählen.
- Bindungspuffer (aus Kit) mit H₂O 1:4 verdünnen.
- Zellen in Bindungspuffer resuspendieren und auf eine Dichte von $2 - 5 \times 10^5$ /ml einstellen.
- Zu 195 µl dieser Zellsuspension 5 µl Annexin V-FITC zugeben.
- Mischen und 10 min. bei RT inkubieren.

- Danach die Zellen 1x in PBS waschen und in 190µl Bindungspuffer resuspendieren.
- 10µl der 20µg/ml Propidium Jodid Lösung zugeben und erneut 10 min. bei RT inkubieren.
- In PBS waschen.
- FACS Analyse.

7. TUNEL-Assay

Die TUNEL-Technik ist eine Möglichkeit der Einzelzellanalyse und beruht auf der in-situ-Markierung der DNA durch Endmarkierung. Die Abkürzung TUNEL steht für „Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling“. Bei dieser Technik werden Einzelstrangbrüche in der genomischen DNA nachgewiesen, die durch die Aktivität der Nukleasen entstehen.

Die Markierung der Bruchstellen erfolgt durch den Einbau von modifizierten Nukleotiden mit Terminaler Desoxyribosyl-Transferase. Die Zellen werden dafür zunächst mit Paraformaldehyd fixiert, die Zytoplasmamembran wird permeabilisiert. Auf die fixierten Zellen gibt man nun eine Lösung aus Terminaler Desoxyribosyl-Transferase und Fluorescein-markierten Nukleotiden. Das Enzym koppelt die markierten Nukleotidderivate an die freien 3'OH – Strangbrüchen. Der Nachweis der eingebauten modifizierten Nukleotide kann im FACS oder unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgen.

Die Sensitivität dieser Methode ist extrem hoch. Im Prinzip kann man damit jede einzelne apoptotische Zelle identifiziert werden und das bereits in einer sehr frühen Phase der Apoptose.

Material:

DeadEnd Colorimetric Apoptosis Detection System (Promega, Mannheim)

4% PFA in PBS, pH 7,4 (Paraformaldehyd)

PBS

Polylysin beschichtete Objektträger (Sigma)

0,2% Triton-X 100 in PBS

20x SSC

H₂O₂

Glycerol

Mikroskop, Zeiss Axiophot

Equilibrierungspuffer (Promega)

TdT Reaktionsmix (Promega)

Streptavidin (Promega)

DAB-Mix (Promega)

Methode:

- Zellen mit PBS waschen und von der Kulturflasche ablösen.
- Danach die Zellen abzentrifugieren und in PBS waschen.
- Die Zellen auf die Objektträger auftragen und 15 min. bei RT lufttrocknen lassen.
- Zellen fixieren durch Inkubation mit 4% PFA, 20 min. bei RT.
- Danach 2 x waschen für 5 min. in PBS.
- Zugabe von 0,2% Triton-X 100 bei RT für 5 min.
- Danach erneut 2 x in PBS waschen für jeweils 5 min.
- 100µl Equilibrierungspuffer zugeben und für 5 – 10 min. bei RT equilibrieren.
- In der Zwischenzeit TdT Reaktionsmix auf Eis nach Vorschrift vorbereiten.
- 100µl TdT auf die Objektträger geben und mit den mitgelieferten Plastikdeckglas die Objektträger abdecken.
- Für 60 min. bei 37°C inkubieren, danach Plastikdeckgläser vorsichtig entfernen.
- 20 x SSC mit H₂O zu einer Endkonzentration von 2 x SSC verdünnen und auf die Objektträger geben für 15 min. bei RT.
- 3 x waschen mit PBS für jeweils 5 min.
- Zugabe von H₂O₂ für 3 – 5 min bei RT, danach wieder 3 x in PBS waschen.
- Streptavidin 1:500 in PBS verdünnen.
- Jeweils 100µl davon auftragen und 30 min. bei RT inkubieren, 3 x PBS waschen.
- Jeweils 100µl DAB-MIX auftragen und 10 min. inkubieren bis leichter brauner Hintergrund erscheint.
- Spülen mit H₂O.
- Einbetten in 100% Glycerol.
- Detektion unterm Mikroskop.

8. Repair-Assay**Bestimmung der Reparaturkapazität**

Die DNA-Mismatch Reparatur Aktivität kann aus Zellextrakten mittels eines zirkulären M13mp2 heteroduplex DNA Substrates gemessen werden (Hampson et al. 1997). In dieses Substrat sind Fehlpaarungen aller möglichen Art innerhalb des LacZ α integriert. Gleichzeitig enthält das Substrat entweder einen kovalent geschlossenen (+) DNA Strang, der für einen blauen Plaque Phänotyp und einen (-) DNA Strang der für einen farblosen Phänotyp kodiert. Der (-) DNA Strang ist durch einen 3' oder 5' Einzelstrangbruch gekennzeichnet, der zur DNA

Strangspezifizierung benutzt wird. Wird in einen E. coli Stamm, der für die methylierungsabhängige Heteroduplex Reparatur defizient ist, unreparierte Heteroduplexe transfiziert, kommt es zum Auftreten von gemischt-farbigen Plaques. Werden hingegen Extrakte benutzt, die Strang spezifische Reparaturaktivität beinhalten, wird der Anteil am gemischten Plaques reduziert. Die Plaques, die den Phänotyp des (-) Stranges besitzen, werden zunehmen, da durch den Einzelstrangbruch die Reparatur im (-) Strang bevorzugt wird.

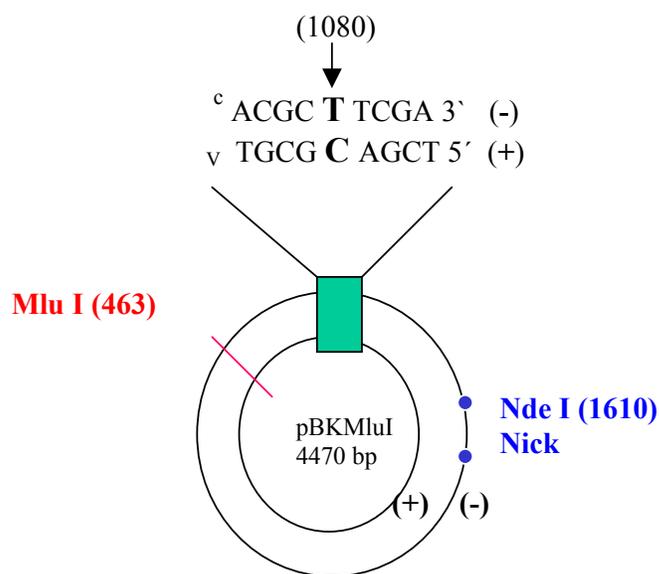


Abb. 5: Schema der Reparaturkassette

Material:

Hypotoner Puffer: 20mM HEPES, pH 7,9

5mM KCl

1,5mM MgCl₂

1mM DTT (Dithiothreit)

0,1mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride)

Isotoner Puffer: Hypotoner Puffer

250mM Sucrose

20x SSC: 3M NaCl

300mM Na-citrat, pH 7,0

Stop-Mix: 2 mg Proteinase K

2% SDS

50mM EDTA

dieser Stopmix ist sehr instabil und wird immer erst kurz vor der Anwendung hergestellt

Proteinase K:	50mg Proteinase K in 5 ml H ₂ O, vorsichtig mischen und in 100µl Aliquots aufbewahren
Präzipitationsmix:	0,71mg E.coli tRNA/ml 1,7M Ammoniumacetat
TE-Puffer:	10mM TRIS-HCL, pH 8,0 0,1mM EDTA
Phenolpuffer :	100mM TRIS-HCL 1mM EDTA 300mM NaCl
TAE-Puffer:	242g TRIS 57,1ml Eisessig 100ml EDTA (500mM, pH 8,0)
X-Gal:	50mg 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactose/ml in N`N`-dimethylformamide Lagerung lichtgeschützt bei -20°C
IPTG:	24mg Isopropyl-thiogalactose/ml H ₂ O
Softagar:	0,8% Agar 0,9% NaCl
YT-Medium:	8g Bactotryptone 5g Bactoyeast extract 5g NaCl in 1l H ₂ O; pH 7,4 mit HCL
50x VB-Salz:	10g MgSO ₄ •7H ₂ O 100g Zitronensäure (Anhydrat) 500g K ₂ HPO ₄ 175g NaHN ₃ PO ₄ •H ₂ O lösen in 670ml H ₂ O, pH 7,0 – 7,2 in 1l H ₂ O
Minimalplatten:	16g Agar/l H ₂ O; autoklavieren und bei 60°C Zusatz von: 0,3ml 100mM IPTG 20ml 50x VB-Salz 20ml 20% Glucose 5ml von 1mg Thiamin-HCl/ml Lösung Jede Lösung wird entweder autoklaviert oder steril filtriert
SOC-Medium:	20g Bactotryptone 5g Bactoyeast extract 10ml von 1M NaCl 2,5ml von 1M KCl autoklavieren und abkühlen lassen auf RT, dann Zusatz von 10ml einer 2M Mg ²⁺ -Lösung und 10ml einer 2M Glucoselösung, pH 7,0 +/- 0,1
Natriumborat:	25g Na ₂ B ₄ O ₇ in 1l H ₂ O
2x YT-Medium:	16g Bactotryptone 10g Bactoyeast

10g NaCl
 pH 7,4 mit HCL
 15% PEG/2,5M NaCl: 75g PEG 8000
 73,05g NaCl
 500ml H₂O
 10x CTAB: (Cetyltrimethylammoniumbromide)
 5g CTAB
 10ml 5M NaCl
 100ml H₂O
 verwendete Bakterienstämme: NR 9099: [Δ (pro-lac)], thi,
 ara, recA56/F'(proAB, lac^qZ Δ M15)
 NR 9162: mutS, hsd, hsdM⁺, araD, Δ (ara, leu),
 Δ (lacIPOZY), galU, galK, strA
 CSH50: [Δ (pro-lac)], thi, ara,
 strA/F'(proAB, lac^qZ Δ M15, traD36)

Tabelle 4: Verwendeten Phagen und zugehörige Mismatches

Positon der Heteroduplex	Heteroduplex mit flankierender Region	Farbe des Strangs
87	CTG A CTC 5'-GAC C GAG-3'	weiss blau
87	'CTG G CTC 5'-GAC T GAG-3'	blau weiss
87	CTG C CTC 5'-GAC T GAG-3'	blau weiss

8.1 Phagenisolierung / DNA-Präparation

Material:

Vgl. auch 8.

Bakterienstamm E.coli NR 9099

Bakteriophage M13mp2

Methode:

- Übernachtkultur von NR 9099 anlegen.
- Am Folgetag in 200 ml Kultur überführen und weiter anwachsen lassen.
- Softagar auf 50 – 60°C anwärmen.
- 1 –10 μ l des Bacteriophagen M13mp2 zugeben / 400 μ l NR 9099.
- Kurz vortex en und auf Minimalagarplatten ausplattieren.
- Mit jeweils 2,5 ml Softagar überschichten.

- 8 – 12h wachsen lassen bei 37°C.
- Danach wird ein einzelner Plaque gepickt und in 1l 2x YT-Medium überführt mit 10ml der NR 9099 E.coli Bakterien.
- Die so infizierten Zellen wachsen über Nacht bei 37°C und leichtem Schütteln.
- Am Folgetag werden die Bakterien bei 5000g abzentrifugiert für 30 min.
- Aus dem Zellpellet wird die Doppelstrang-DNA mit der Qiagen-Präparation (4.3.7) gewonnen.
- Um die einzelsträngige Phagen-DNA zu erhalten wird der klare Überstand mit 3% Polyethylen-Glycol 8000 und 0,5M NaCl versetzt.
- Anschließend bei 5000g, 30 min. bei 0°C zentrifugiert.
- Das Pellet wird in Phenolpuffer resuspendiert.
- Die Einzelstrang-DNA wird dann durch zweimalige Phenolextraktion, gefolgt von einer 2maligen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)-Extraktion gewonnen.
- Danach erfolgt die Präzipitation mit Ethanol und die Resuspension in TE-Puffer.
- Die Konzentration wird bei λ_{260} nm gemessen.

8.2 Doppelstrang-DNA (dsDNA) Präparation

Material:

Vgl. auch 8.

CsCl (Cäsiumchlorid)

Etbr (Ethidiumbromid)

Methode:

- Die dsDNA wird nach der Qiagen-Präparation (4.3.7) weiter verarbeitet.
- Das Pellet wird in 25ml TE resuspendiert.
- 1,2g CsCl / ml DNA werden zugegeben.
- 1,2 ml Etbr / 10ml CsCl-Lösung und gut mischen.
- Damit wird ein Beckman Quick Seal Zentrifugenröhrchen beladen.
- Danach werden die Proben gewogen um Gewichtsunterschiede < 0,1g zu halten.
- Zentrifugation bei 45.000 rpm für > 18h und anschliessendes Stoppen der Zentrifuge ohne die Bremse zu betätigen.
- Die Banden werden unter UV-Licht beurteilt.
- Die entsprechenden Bande wird mit einer Spritze und Nadel extrahiert und 4 x mit Isopropanol gewaschen um das Ethidiumbromid zu entfernen
- 0,1V NaOAc / 2,5V EtOH zugegeben und bei 10500rpm für 12min. zentrifugieren.

- Anschließend mit 70% EtOH waschen.
- In 500µl TE lösen.
- Die DNA Konzentration wird bei $\lambda_{260\text{nm}}$ gemessen.

8.3 Präparation der Heteroduplex DNA

Material:

Vgl. auch 8.

Agarose (Roth)

H₂O

Restriktionsenzyme AvaII und Bsu361 (Invitrogen)

Ladepuffer

DNA-Ligase (Invitrogen)

Methode:

- 10µg DNA der Wildtypform des M13mp2-Phagen wird mit den selten, bzw. einzelstrangschneidenden Enzymen AvaII oder Bsu361 verdaut.
- Danach bei 37°C für 1 h inkubiert.
- 6x in 500µl H₂O waschen und bei 12.000g für 12 min. zentrifugieren.
- Das Pellet in 20 µl H₂O resuspendieren.
- DNA wird getrocknet bei RT für 3-5 min.
- Zur Hybridisierung wird die DNA zuerst verdünnt; 5 µg der linearen DNA werden mit H₂O zu einer Endkonzentration von 100ng/µl verdünnt.
- Zur Denaturierung für 15min. auf 75°C erhitzen.
- Die Einzelstrang-DNA wird etwa 1 min. bevor die denaturierte M13mp2-DNA aus dem 75°C Inkubator genommen wird zugegeben und zwar in einer etwa doppelt so hohen Konzentration, um effiziente Heterduplices zu produzieren.
- 15 µg ssDNA werden wie folgt pipettiert:
 - M13Δ2ssDNA (1,4µg/µl) zu 11µl der wt-Form mit AvaII geschnitten
 - TGA₈₉ssDNA (1,8µg/µl) zu 9µl von TCA₈₉ mit AvaII geschnitten
- Für 5 min. auf Eis inkubieren.
- 20x SSC zugeben zu einer Endkonzentration von 2x SSC und für 20 – 25 min. auf Eis inkubieren.
- Für 5 min. auf 65°C erhitzen, danach 1 µl Ladepuffer zugeben und auf Eis stellen.
- Auf ein 0,8%iges Agarosegel auftragen und bei 80V laufen lassen.
- Der Nick-enhaltende Heteroduplex wird gereinigt und mit Ethanol präzipitiert.

- Danach erfolgt die Resuspension der DNA in TE-Puffer zu einer Konzentration von 5 µg /ml.
- Die Präparation von kovalent geschlossenen Heteroduplices erfolgt durch Behandlung von 100 ng gereinigten Nick-Heteroduplices mit 0,2 Einheiten DNA-Ligase für 3h bei 37°C.
- Auftragen auf ein Gel und aus dem Gel reinigen wie unter 4.1.4 beschrieben. Typischerweise werden mehr als 80% in zirkuläre DNA konvertiert.

8.4 Herstellung kompetenter Bakterien

Material:

Vgl. 8.

H₂O

Glycerol

Methode:

- Der Bakterienstamm NR 9162 wird in 5 ml 2x YT-Medium über Nacht wachsen lassen.
- Am Folgetag 1:100 in 1 – 2l 2x YT-Medium verdünnen und bei 37°C für weitere 6-8h inkubieren.
- 30 min. auf Eis inkubieren.
- Bei 3000 rpm, 4°C für 10 min. abzentrifugieren.
- Das Pellet wird in 1l eiskaltem Wasser resuspendiert.
- Erneut bei 3000 rpm für 10min. bei 4°C abzentrifugieren.
- Das Wasser wird abgeschüttet und das Pellet erneut in eiskaltem Wasser resuspendiert.
- Nochmals bei 3000 rpm für 10 min. bei 4°C zentrifugieren.
- 20 ml kaltes 10% Glycerol zugeben und das Pellet vollständig lösen.
- Zentrifugation bei 5000rpm, 10 min. bei 4°C.
- Resuspendieren in 2 – 4 ml kaltem Glycerol auf Eis.
- Jeweils 0,4 ml werden aliquotiert und bei –80°C aufbewahrt.

8.5 Zelllyse und Proteingewinnung

Material:

Vgl. auch 8.

PBS

Methode:

- Die Zellen werden in PBS geerntet und bei 1500 rpm für 4 min. zentrifugiert.
- Das Medium muss vollständig entfernt sein und danach werden die Zellen in 50ml eiskaltem isotonischen Puffer gelöst und vorsichtig gevortext.
- Erneute Zentrifugation und Entfernen des Überstandes.
- Das Pellet wird sodann in 50ml eiskaltem hypotonischen Puffer gelöst.
- Direkt danach Zentrifugation der Zellen, da bei diesem Schritt die Zellmembranen fragil werden.
- Der Überstand wird abgesaugt und das Pelletvolumen ermittelt.
- Die Zellen werden dann in hypotonischen Puffer resuspendiert, so dass eine Dichte von 7×10^7 Zellen /ml erreicht ist.
- Die Zellen werden unter dem Mikroskop angeschaut, um zu beurteilen ob ein Schwellen der Zellen bereits eingetreten ist. Falls ja, lässt man die Zellen für weitere 15 – 30 min. auf Eis stehen.
- Zentrifugieren bei 3000rpm für 10 min., um die Zellkerne zu entfernen bei 0°C.
- Der Überstand wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und bei 10.000 rpm für 10 min. zentrifugiert um alle partikulären Zellbestandteile zu entfernen.
- Der Überstand wird tropfenweise in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.
- Vor der Benutzung zur Analyse wird etwa 1ml des gefrorenen Lysates auf Eis aufgetaut und für 5 min. bei 4°C zentrifugiert um eine Kontamination auszuschließen.
- Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt.
- Die Proteinkonzentration wird mittels der unter 2.2 beschriebenen Bradford Proteinkonzentrationsbestimmungsmethode gemessen und sollte mindestens 500 µg – 1 mg / ml liegen.

8.6 Heteroduplexreparatur in menschlichen Zellen

Material:

Vgl. auch 8.

Frisch anzusetzen sind: 300mM ATP
 2M Kreatinphosphat (CK)
 5mg/ml Kreatinphosphatkinase (CP)

250mM NaPO₄, pH 7.5

2mM dNTP's

SVRB-Puffer (16x): 500mM HEPES, pH 7.8
 117mM MgCL₂
 67mM ATP

	3,34mM CTP
	3,34mM GTP
	3,34mM TTP
SVRM-Puffer:	1,5µl SVRB (16,7)
	0,5µl CK (2M)
	0,5µl CP (5mg/ml)
	1,5µl NaPO ₄ , pH7,5 (250mM)
	1,25µl dNTP's (2mM)
Stopmix:	2mg Proteinase K/ml
	2% SDS
	50mM EDTA
Präzipitationsmix:	0,71mg E.coli tRNA/ml
	1,7M Ammoniumacetat
Phenol	
Chloroform	
50µg Proteinextrakt (vgl. 8.5)	
Isopropanol (Roth)	

Methode:

- 50 µg des isolierten Proteins werden mit 5 ng (1 fmol) der Heteroduplex-DNA und 5,25 µl SVRM-Puffer gemischt und mit H₂O zu einem Volumen von 25 µl ergänzt.
- Der beschriebene Ansatz wird für 15 min. bei 37°C inkubiert.
- Die Reaktion wird terminiert durch Zugabe von gleichen Volumina Stopmix bei weiterer Inkubation für 30 min. bei 37°C.
- Hinzufügen von 0,6 Volumen Präzipitationsmix.
- 1 Volumen Isopropanol zugeben.
- Für 15 min. bei > 10.000 rpm, RT zentrifugieren.
- Resuspendieren in 50 µl TE-Puffer.
- Gefolgt von einer 2maligen Phenol-Chloroform-Extraktion und letztendlich resuspendiert in 20 µl H₂O.
- Dieser Ansatz ist nun fertig für den Einsatz im Schritt 8.7 zur Bestimmung der Reparaturkapazität.

8.7 Bestimmung der Reparaturkapazität

Material:

Vgl. auch 8

Elektroporator, EasyjecT; Eurogentec, Belgien

Eis

Küvetten

IPTG: 25mg/ml in H₂O

X-Gal: 50mg/ml in DMF

SOC-Medium:

Methode:

- Am Vortag wird eine O/N Kultur von CSH50 Bakterien in 2 x YT-Medium hergestellt.
- Am Folgetag 1:100 in 2x YT verdünnen und nochmals für 3-5 Stunden bis zu einer OD = 0,4-0,6 wachsen lassen.
- Küvette für Elektroporation auf Eis stellen.
- Kompetente Bakterien auf Eis auftauen (NR9162, mutS-defizient).
- Pro Versuchsansatz 50µl Bakterienkultur (NR9162) nehmen und dazu 2-5µl DNA des Heteroduplex-Assays (8.6) pipettieren, gut mischen, keine Blasen zulassen und auf Boden der Küvette pipettieren.
- Transfektion durch Elektroporation bei 2010V, 400Ω und 25µF für ca. 9,3ms.
- Direkt danach erfolgt die Zugabe von 1 ml SOC-Medium.
- Diese Reaktion sollte nicht länger als 1h bei RT stehen.
- Softagar auf einer Heizplatte auf ca. 50°C aufwärmen.
- Einen Prämix herstellen aus 0,4 ml CSH50-Bakterien und 20 µl IPTG (25mg/ml) pro Ansatz.
- 10-50-100-200 µl der elektroporierten Zellen werden zu 0,4 ml des Prämixes gegeben.
- Dieser Ansatz wird in ein 10 ml Gefäß pipettiert.
- Softagar und 100 µl X-Gal in die Reaktionsgefäße zugegeben und vortexen.
- Der Gesamtansatz wird dann auf die Minimalagarplatten ausplattiert.
- Der Versuch wird im Doppelansatz durchgeführt einmal indem die Zellen mit dem extrahierten Protein inkubiert werden und einmal als Leerwert ohne Inkubation.
- Die Platten werden dann bei 37°C für 14 – 18h inkubiert und danach ausgewertet wie unter 8.8 beschrieben.

8.8 Auswertung des Assays

Die Effizienz wird in Prozent der gemischten Plaques bei den behandelten Zellen im Vergleich zu denen von unbehandelten Zellen ausgedrückt.

$$1 - \frac{\% \text{ der gemischten Plaques von behandelten Zellen}}{\% \text{ der gemischten Plaques von unbehandelten Zellen}} \times 100$$

9. RNA

9.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung sollte die Zelldicht bei $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ liegen. Um RNasen zu inaktivieren gibt es mehrere Methoden, z.B. die Verwendung von DEPC (Diethylpyrocarbonat), welches man in einem Volumen von 1/200 zumischt. DEPC bindet an primäre und sekundäre Amine, z.B. Histidin, und führt zu kovalenten Bindungen, wodurch die Aktivität aller Enzyme, einschließlich der RNasen zerstört wird (Mühlhardt, 2000)

Beim Arbeiten mit RNA ist es grundsätzlich wichtig alle Schritte mit Handschuhen zu tun und für die Experimente eigene Pipetten, Pipettenspitzen, Chemikalien und Reaktionsgefäße zu verwenden um jedwede Kontamination auszuschließen.

Glaswaren und andere Utensilien, die hohe Temperaturen vertragen, werden für 4 Stunden bei $180 - 200^\circ\text{C}$ gebacken. Gerätschaften, die keine Hitze vertragen werden mit Wasserstoffperoxidlösung (1%) behandelt und danach mit DEPC-H₂O aus- und abgespült.

Material:

Chloroform

Isopropylalkohol

75% Ethanol in DEPC-Wasser (H₂O + 0,01% DEPC, autoklavieren)

DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat-H₂O)

DNase, RNase frei (Roche, Mannheim)

4 M LiCl

10x DNase Puffer: 500mM TRIS, pH 7,5

100mM MgCl₂

Phenol (Roche)

Chloroform (Roche)

100% Ethanol (Roche)

70% Ethanol / DEPC-H₂O

H₂O₂

Methode:

- Die Zellyse wird direkt in der Kulturschale durchgeführt indem 1 ml der TRIZOL Reagenz / 3,5cm (Durchmesser) Kulturschale zugegeben wird.
- Das Zellysats wird mehrmals mittels einer Pipette auf und ab pipettiert.
- Dann inkubiert für 5 min. bei $15 - 30^\circ\text{C}$.
- 0,2 ml Chloroform / 1ml TRIZOL werden zugegeben.
- Die Reagenzröhrchen werden mit der Hand für 15 sec. geschüttelt.

- Inkubiert für 3 min. bei 15 – 30°C.
- Zentrifugieren bei 10.000g für 15 min., 2 - 8°C.
- Die farblose obere, wässrige Phase enthält die RNA (ca. 60% des TRIZOL-Volumens).
- Die obere Phase wird in neues Reaktionsgefäß transferiert.
- 0.5 ml Isopropanol / 1ml TRIZOL werden zugegeben.
- Inkubation der Proben bei 15 – 30°C für 10 min.
- Zentrifugieren < 12.000g, 10 min., 2 – 8°C.
- Den Überstand verwerfen.
- Das Pellet wird mit 75% Ethanol (1ml Ethanol/1ml TRIZOL) gewaschen und gevortext.
- Erneut zentrifugieren bei < 7.500g für 5 min., 2 – 8°C.
- Das RNA-Pellet wird für 5 – 10 min. bei RT getrocknet.
- Die so erhaltene RNA wird in RNase freiem Wasser (DEPC-H₂O) oder 0.5% SDS resuspendiert, bei schlechter Löslichkeit erfolgt eine Inkubation für 10 min. bei 55 – 60°C.
- Anschließend erfolgt der DNase-Verdau indem man 175µl RNA mit 20µl 10x DNase Puffer mischt und 3 – 4 µl DNase zugibt.
- 30 min. bei 37°C inkubieren.
- 200µl Phenol zugeben, kurz mischen und für 5 min. bei 13.000rpm zentrifugieren.
- Die obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß pipettieren.
- 200µl Chloroform zugeben, erneut kurz mischen und bei 13.000 rpm für 5 min. zentrifugieren.
- Den Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen.
- Mit 22µl LiCl, 500µl 100% Ethanol bei –80°C für mindestens 30 min., besser über Nacht fällen.
- Für 30 min. bei 13.000 rpm, 4°C abzentrifugieren.
- Das Pellet waschen mit 500 µl 70% Ethanol.
- Für 10 min. bei 13.000 rpm, 4°C erneut zentrifugieren.
- Das Pellet trocknen bei RT für 4-5 min.
- Rücklösen des Pellets in ca. 50µl DEPC-H₂O.
- Die so erhaltene RNA wird bei –80°C gelagert.

9.2 RT-PCR

Die Möglichkeiten der PCR beschränken sich nicht auf die Vermehrung von DNA-Matrizen. Man kann auch RNA-Moleküle vervielfältigen, wenn man sie mit dem Enzym "Reverse Transkriptase" in eine einzelsträngige cDNA umschreibt. Im Allgemeinen werden zwei verschiedene Enzyme verwendet. Dies ist zum Einen die Reverse Transkriptase aus dem *avian myoblastosis virus*

(AMV-RT), welche eine DNA-Polymerase ist, die RNA- oder DNA-abhängig DNA synthetisiert. Ihr Arbeitsoptimum liegt bei 42°C. Die Reverse Transkriptase aus dem *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit einem Arbeitsoptimum bei 37°C. Der Vorteil der AMV-RT liegt in der Tatsache, dass sie durch ihre höheren Arbeitstemperaturen Sekundärstrukturen der RNA besser überwunden werden. Die MMLV-RT liefert dagegen längere cDNA Transkripte. Im Anschluss setzt man Primer und Taq zu, und das Experiment läuft nach dem üblichen Schema ab.

Ein nützliches Anwendungsgebiet dieser sogenannten RT-PCR ist die Messung von Mengenverhältnissen einer mRNA in verschiedenen Geweben oder in einem Gewebe, Zelllinie, zu verschiedenen Zeitpunkten. Allgemein wird davon ausgegangen, dass die mRNA-Menge in einer Zelle die Aktivität des zugehörigen Gens widerspiegelt. Somit kann man dadurch einen Querschnitt in der Expression eines Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt erlangen.

Material:

1ng – 5µg RNA
 Random Primer (Invitrogen)
 dNTP Mix (jeweils 10mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
 H₂O
 0,1M DTT (Roth)
 5x First Strand Buffer (Invitrogen)
 Reverse Transkriptase: Superscript II (Invitrogen)

Methode:

- Die RNA wird so mit DEPC-H₂O verdünnt, dass alle Versuchsansätze gleiche Konzentration haben und die RNA in einem Endvolumen von 12 µl vorliegt.
- Dazu gibt man 1 µl Random Primer und 1 µl 10 mM dNTP-Mix.
- Dieses Gemisch erhitzt man auf 65°C für 5 min.
- Danach transferiert man es sofort auf Eis.
- Im nächsten Schritt gibt man 4 µl 5x First Strand Buffer zu und 2 µl 0,1 M DTT.
- Diesen Ansatz mischt man vorsichtig und inkubiert ihn für 2 min. bei 42°C.
- Nach dieser kurzen Inkubation fügt man jeweils 1 µl Superscript II zu.
- mischt den Ansatz durch auf- und abpipettieren.
- Inkubation bei 42°C für 50 min.
- Die ganze Reaktion wird inaktiviert durch Erhitzen auf 70°C für 15 min.
- Danach hat man cDNA erhalten und kann mit dieser weiter verfahren und sie z.B. für PCR-Reaktionen einsetzen.

9.3 cDNA-Amplifikation

Material:

Primer (MWG Biotech)

Siehe auch 4.2

Methode:

- Zum Nachweis der hMSH2-Expression wurden folgende Primer gewählt (Qian et al. 1998):

Forward: 5'-ccagtgcacagtt-3'

Reverse: 5'-ctgattggccaaggcagt-3'

Das folgende Alignment wurde unter www.ebi.ac.uk durchgeführt und zeigt die Lage der Primer und damit die Länge des zu erwartenden Fragmentes von 836bp. Die Sequenz der hMSH2 cDNA wurde unter der Accessionnummer U03911 aus der Genbank www.ncbi.nlm.nih.gov entnommen.

```

MSH2      GAATTAAGAGAAATAATGAATGACTTGGAAAAGAAGATGCAGTCAACATTAATAAGTGCA 1500
For -----
MSH2      GCCAGAGATCTTGGCTTGGACCCTGGCAAACAGATTAAACTGGATTCCAGTGCACAGTTT 1560
For ----- CCAGTGCACAGT-
                *****
MSH2      GGATATTACTTTCGTGTAACCTGTAAGGAAGAAAAAGTCCTTCGTAACAATAAAAACTTT 1620
For -----
.
.
.
MSH2      TTTGGGTTAGCATGGGCTATATCAGAATACATTGCAACAAAGATTGGTGCTTTTTGCATG 2340
Rev -----
MSH2      TTTGCAACCCATTTTCATGAACTTACTGCCTTGGCCAATCAGATACCAACTGTTAATAAT 2400
Rev ----- ACTGCCTTGGCCAATCAG
                *****
MSH2      CTACATGTCACAGCACTCACCCTGAAGAGACCTTAACATATGCTTTATCAGGTGAAGAAA 2460

```

Die den Amplifikationen zugrunde liegenden PCR-Bedingungen waren:

- | | | |
|--|---|-----------|
| <ul style="list-style-type: none"> - 94°C für 2 min - 94°C für 30 Sek - 60°C für 1 min - 72°C für 1 min - 72°C für 10 min - 4°C hold | } | 34 Zyklen |
|--|---|-----------|

- Das Gleiche wurde auch durchgeführt um die cDNA von p53 zu amplifizieren. Hier waren die gewählten Primer die folgenden (Ju et al. 1999). Das zu erwartende Fragment hat eine Größe von 503p:

Forward: 5'-atgtttgccaactggc-3'

Reverse: 5'-aggctcccctttcttgcg-3'

- Als Kontrolle für die erfolgreiche Transkription und um gleichzeitig zu zeigen, dass für jeden Versuchsansatz gleiche Mengen RNA zum Einsatz kamen wählten wir ein ubiquitäres Genprodukt die GAPD-DH, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. Diese diente bei allen RT-PCR Versuchen als positiv Kontrolle und internem Standard. Die nachfolgenden Primer ergeben ein PCR Produkt von 306bp (Wong et al. 1994),

Forward: 5'-cggagtcaacggatttggtcgat-3'

Reverse: 5'-agccttctccatggtggtgaagac-3'

unter folgenden PCR Bedingungen:

- 94°C für 2 min
 - 94°C für 30 Sek
 - 60°C für 30 sec
 - 72°C für 30 sec
 - 72°C für 10 min
 - 4°C hold
- } 25 Zyklen

III. Ergebnisse

1. Strukturelle und funktionelle Analyse der Promotorregion des menschlichen Mismatch-Reparatur-Gens hMSH2

Kolodner et al. (1994) konnten die Struktur des hMSH2-Gens aufklären und beschrieben Exon-Intron-Übergänge, jedoch ohne die regulatorische Region, den hMSH2-Promotor. Um weiteren Aufschluss über die transkriptionelle Aktivität des Gens zu erhalten, war die Kenntnis des Promotors unabdingbar, außerdem war die Kenntnis seiner Strukturen Voraussetzung für Untersuchungen zu zellulären und nukleären Bindungspartnern.

Mittels einer Primerwalking-Strategie konnten 1100 bp des hMSH2-Promotors identifiziert und charakterisiert werden. Die so erhaltene Sequenz wurde auf Proteinbindungsmotive untersucht und als erstes konnte eine potentielle p53-Bindungsregion identifiziert werden (Scherer et al. 1996a). Diese wird von zwei AP-1 Erkennungssequenzen flankiert. Ebenso finden sich weiter in 5'-Richtung zwei GC-reiche Regionen. Diese GC-Boxen sind typische Strukturen eukaryotischer Promotoren und oft sind in einem Promotor mehrere Kopien hiervon enthalten. Abbildung 6 gibt einen schematischen Überblick über die Struktur des hMSH2 Promotors.

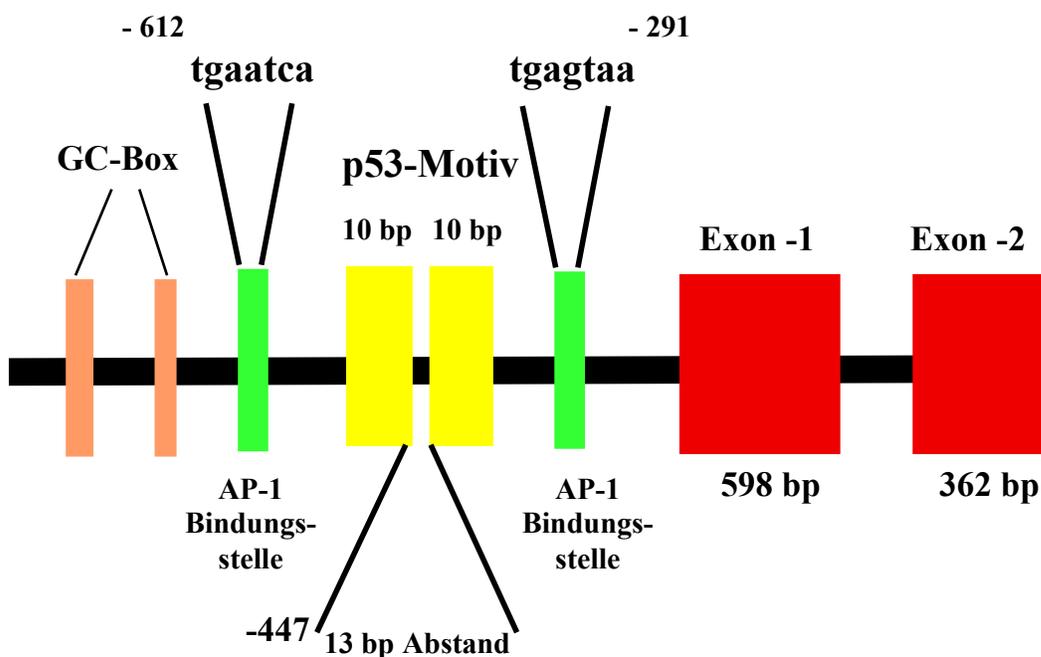


Abb. 6: Struktur des hMSH2 Promotors

Beim direkten Vergleich der p53-Bindungsstelle im hMSH2-Promotor mit der p53 Konsensussequenz findet man eine 90% Ähnlichkeit. Im zweiten Teil des Palindroms finden sich zwei Basenaustausche (Abb. 7).

hMSH2-p53-Motiv:

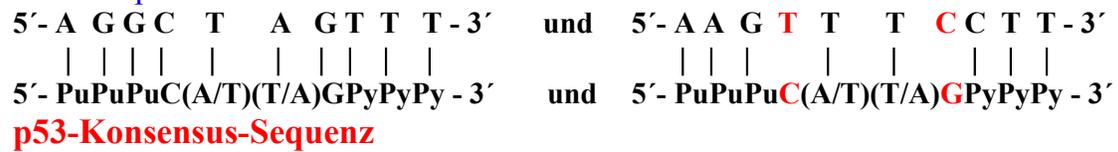


Abb. 7: Vergleich der p53-Konsensussequenz mit dem hMSH2-Motiv

Durch Gel-Mobility-Shift-Versuche ergab sich, dass p53 mit einer sehr hohen Affinität an das gefundene Motiv im hMSH2-Promotor bindet (Scherer et al. 1996b). Dies ist ein Hinweis dafür, dass die gefundene p53-Bindungsstelle im hMSH2-Promotor funktionell ist. Diese Daten identifizieren hMSH2 als neues p53-Ziel-Gen und legen einen Einfluss von p53 auf die Mechanismen der DNA-Reparatur nahe. Somit war es erstmals möglich eine direkte Interaktion zwischen p53 und einem Mismatch-Reparaturgen nachzuweisen.

Ausgehend von diesen Vorbefunden war es wichtig zu klären, ob sich dieser mögliche Mechanismus auch in vivo in kultivierten Zellen verifizieren lässt. Hierzu stellen Reporterexperimente eine gute Untersuchungstechnik dar. Diese Technik erlaubt es die spezifische Aktivität eines Promotors in Zellen, die das zugehörige Gen normalerweise exprimieren, zu untersuchen. Hierzu setzt man ein heterologes Gen in einem geeigneten Vektor unter die Kontrolle des betreffenden Promotors. Auf diese Weise lässt sich die Expression des endogenen Gens von der des fremden Gens unterscheiden. Der Vorteil eines Reporters ist, dass er ein Genprodukt liefert, das gut quantifiziert werden kann, stabil und leicht messbar ist. Mittlerweile häufig verwendet und auch in den dargestellten Experimenten benutzt, ist das Enzym Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (siehe auch 4.7).

Um die transkriptionelle Aktivierung von hMSH2 durch p53 zu bestätigen wurden Transfektionsexperimente durchgeführt. Dazu wurde sowohl der Wildtyp-Promotor von hMSH2 als auch eine Version des Promotors, bei der die beiden p53-Bindungsstellen mutiert sind, vor ein Luciferase-Reporter gen kloniert.

2. Herstellung von hMSH2-Promotorkonstrukten

2.1 Promotorsequenz von hMSH2 und Primerdesign

Zur Klonierung des Wildtypkonstruktes von hMSH2 wurden Primer sowohl von der 5'-Region als auch von der 3'-Region gewählt und mit menschlicher DNA als Template eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die folgende Abbildung zeigt die Lage der Primer in der Sequenz des hMSH2-Promotors.

-1176	aagtggcgtg	aacatagctg	acggcagaag	acctcctggg	ctcaaacgat
-1126	cctcctggct	 cggtctccca	aagtactggg	attatggcgt	gtgacaccac
		Forward Primer			
-1076	gcctggcgtc	aaacgttt gt	ctttttattt	atttttttt	gtattttttg
-1026	agacaggggt	ttcaatctgt	cgcccacgct	ggagtgcagt	ggcacaattt
-976	acggctgcac	cgcagcctcg	acctcccggg	ctcaggtgat	cctttcgcct
-926	cagccctgct	aatatctggg	atcacagacg	tgggttttac	catgttgccc
-876	aggatgggtg	caatctcctg	ggctcaagtg	atccgcccac	ctcggcctcc
-826	caaattgctg	ggattacagg	cgtgagctac	cgcgcctgc	cacaaacgca
-776	tatcttctaa	cgtaccattt	catttacttg	ctatattcat	tatctgaatt
-726	ttctcatatt	agaatgtaag	cagaataaag	gcagtgattt	ttctttttac
-676	tggcgatecct	cagagccaag	aagagtctgg	gacatagcag	gccatataaa
-626	tgttttcgaa	tgagtgaatc	atcaacgagt	ggatgaagcg	ataatgtggc
-576	taacaggcag	cagtaaggag	gctgtgtaga	ataaacccgt	aatccccgatg
-526	ttggcagttt	gcttagaaaag	aaaaagggag	gcagtcggag	aggggacacac
-476	gttttaacaa	aatactggga	ggaggaggaa	ggctagtttt	ttttttgttt
-426	tcaagtttcc	ttctgatggt	actcccatgc	ttccgggcac	attacgagct
-376	cagtgccctgc	cggaaatctc	ccacctggtg	gcaacctacc	cttgcataca
-326	ccccaccag	gggcttcaag	ccttgacgct	gagtaaacac	agaaaggagc
-276	tctactaagg	atgcgcgtct	gcgggtttcc	gcgcgaccta	ggcgcaggca
-226	tgcgtagtag	ctaaagtcac	cagcgtgcgc	gggaagctgg	gccgcgtctg
-176	cttatgattg	gttgccgcgg	cagactccca	cccaccgaaa	cgcagccctg

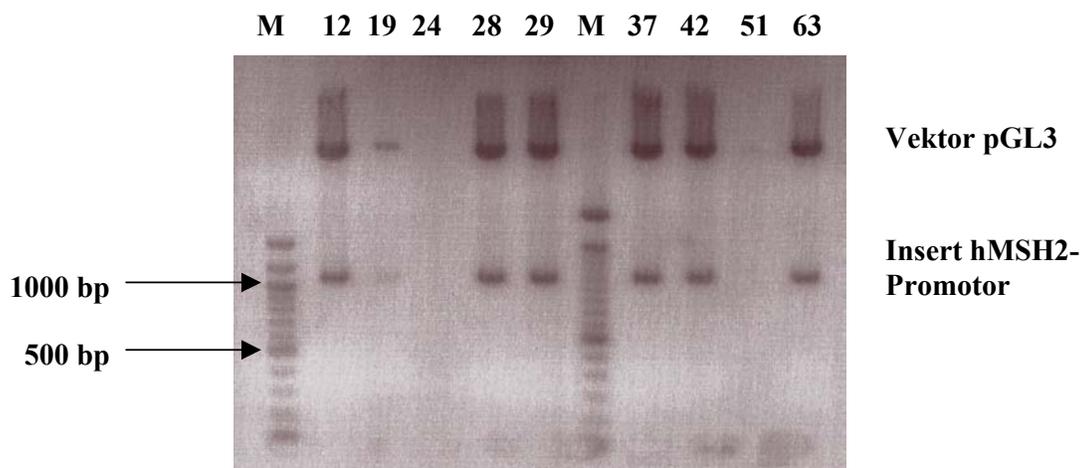


Abb. 10: Kontrollgel nach Plasmidisolierung und Verdau mit *KpnI* und *HindIII*, die Klone 12, 19, 28, 29, 37, 42 und 63 tragen ein Insert der erwarteten Größe

3. Analyse des hMSH2 Promotors durch Reportergenexperimente

Um zu überprüfen, ob die Expression von hMSH2 durch UVB-Licht induzierbar ist, wurden HaCaT-Zellen, humane Keratinozyten, die endogenes p53 exprimieren benutzt. Es wurden sowohl verschiedene UV-Dosen, als auch verschiedene Zeitpunkte gewählt, an denen die Induktion überprüft wurde. Als UV-Energiedosis wurden 0, 25, 50, 75 und 100 J/m² eingesetzt. Als Kontrolle dienten die gleichen Zellen, die bis auf die Bestrahlung identisch behandelt wurden. In unbehandelten Zellen konnte kein Anstieg der MSH2-Promotoraktivität festgestellt werden, nach UVB-Bestrahlung zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg der MSH2-Promotoraktivität (Abb. 11a-d). Dieser Anstieg ist in dem HaCaT-Zellsystem sowohl zeit- als auch dosisabhängig. Bei 100 J/m² und 6h nach Bestrahlung zeigt sich die stärkste Induktion von MSH2 (ca. 4 fach, vgl. Abb. 11d). Bei anderen UV-Dosen war eine schwächere Induktion zu beobachten, z. B. konnte bei einer Dosis von 25 J/m² ein etwa 1,5 facher Anstieg nach 6 und 12h erzielt werden (Abb. 11a), bei 50 J/m² zeigte sich ein etwa doppelter Anstieg der Expression von MSH2 in den bestrahlten Zellen (Abb. 11b). Bestrahlt man die Zellen mit der Dosis von 75 J/m² so erzielt man eine recht starke Expression von MSH2 die dem 3-4 fachen des Ausgangswertes entspricht (Abb. 11c).

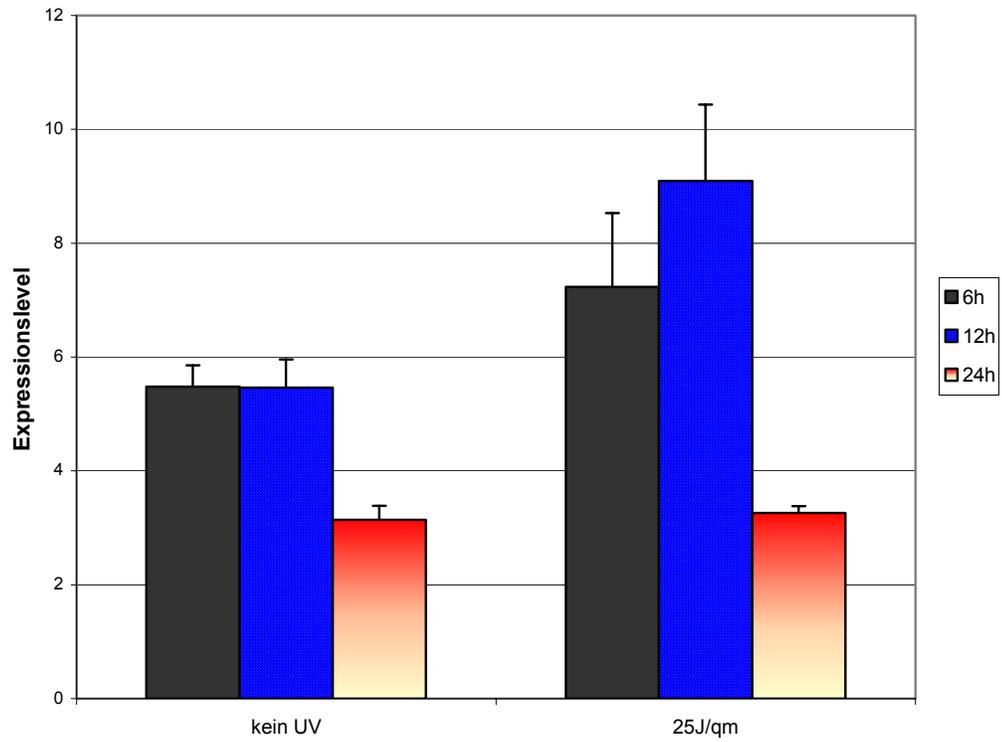


Abb. 11a: Aktivität des hMSH2 Promotors in HaCaT Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten der UV-Bestrahlung mit 25 J/m²

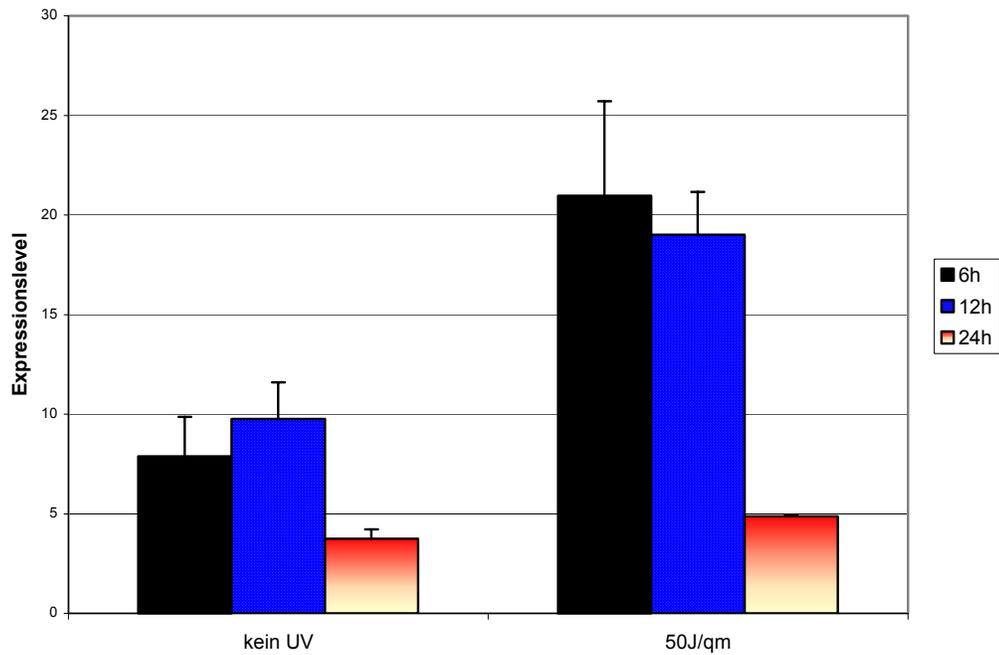


Abb. 11b: Aktivität des hMSH2 Promotors in HaCaT Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten der UV-Bestrahlung mit 50 J/m²

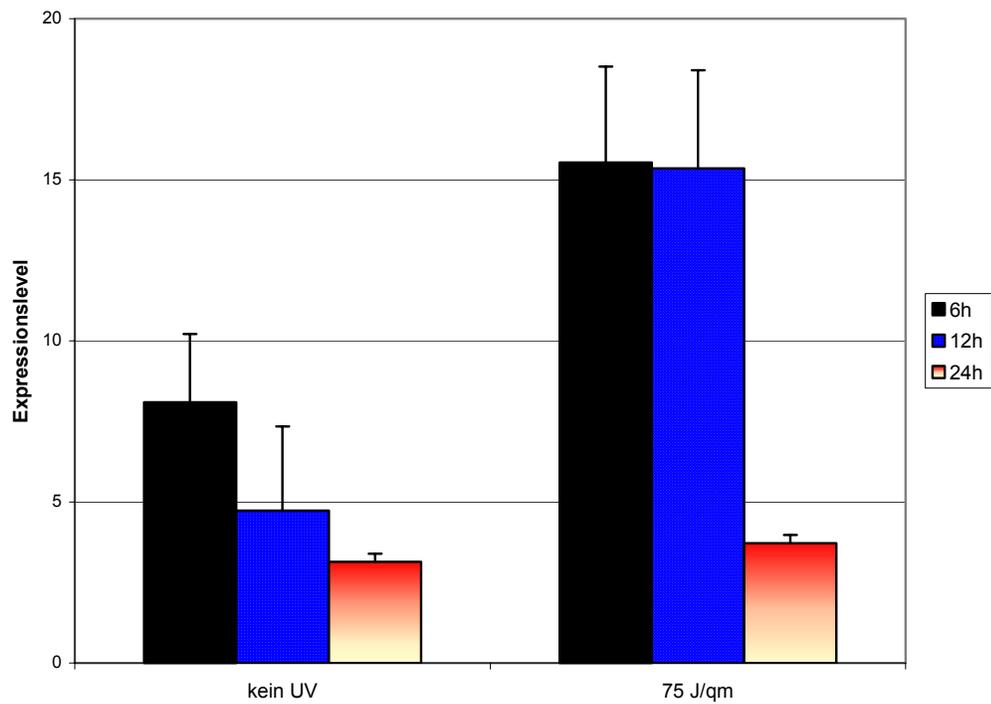


Abb. 11c: Aktivität des hMSH2 Promotors in HaCaT Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten der UV-Bestrahlung mit 75 J/m^2

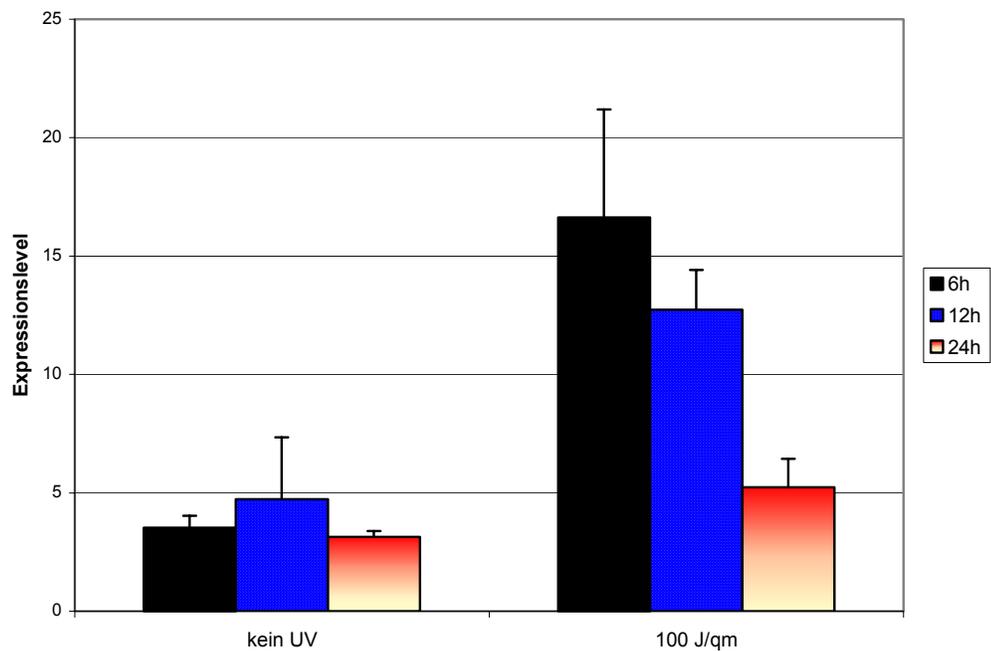


Abb. 11d: Anstieg der hMSH2-Expression in HaCaT-Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten der UV-Behandlung mit 100 J/m^2

Somit konnte gezeigt werden, dass unter UV-Licht ein Expressionsanstieg von MSH2 zu erzielen ist. Dieser Anstieg ist in diesem System jedoch nicht der Wirkung von p53 zu zuschreiben, da wegen der endogenen Expression von p53 in HaCaT Zellen eine Abhängigkeit der Reportergenexpression von p53 nur schwer zu beweisen ist. Um die Hypothese in einem komplexeren, aber besser zu kontrollierenden System zu überprüfen, wurden SAOS-2 Zellen verwendet. Es handelt sich hierbei um eine humane Osteosarkomzelllinie, mit einer homozygoten p53 Deletion (Chen et al. 1990). Die Zellen wurden mit einem p53-Expressionsplasmid und dem hMSH2-Konstrukt kotransfiziert und den gleichen Experimenten ausgesetzt wie die Keratinozyten. Aufgrund einer höheren Strahlenempfindlichkeit der SAOS-2 Zellen zeigte sich in Vorversuchen, dass die Applikation von 100 J/m^2 keine tolerable Dosis darstellt. Je nach Messzeitpunkt waren die geeignetsten Dosen für dieses Zellsystem zur Anschaltung des hMSH2 Promotors 50 J/m^2 und 75 J/m^2 . Im weiteren sind deshalb nur die Ergebnisse mit UV-Dosen von 50 J/m^2 und 75 J/m^2 dargestellt (Abb.12 und Abb.13).

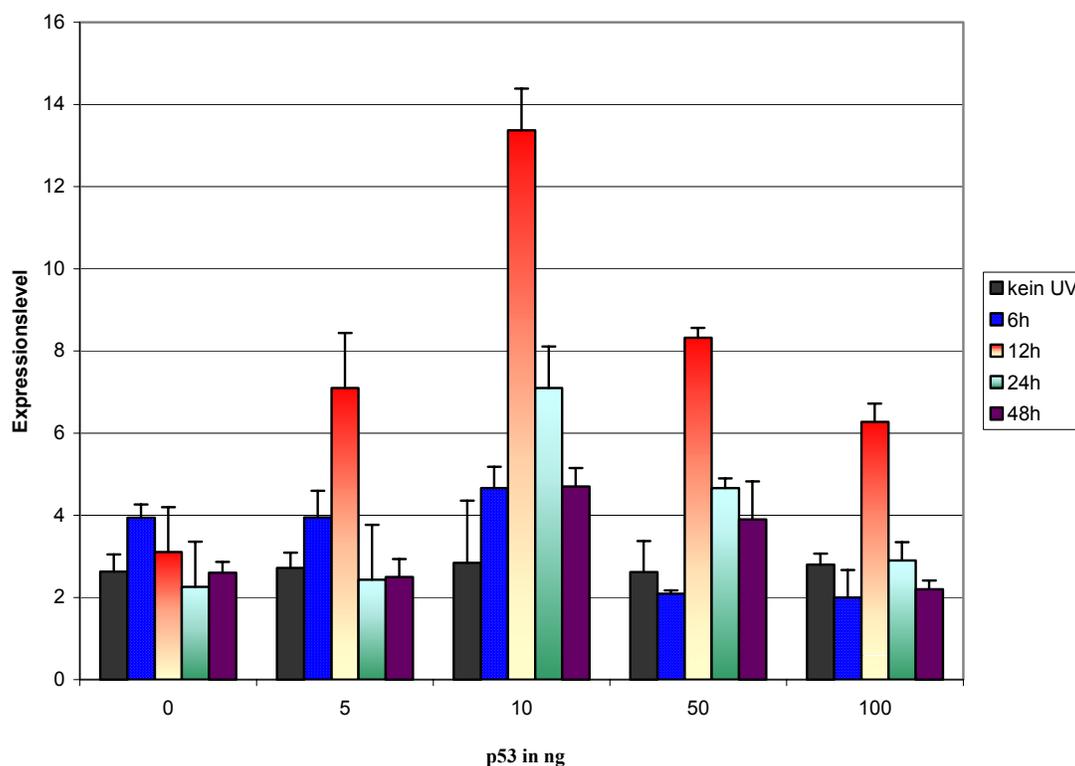


Abb. 12: Anstieg der hMSH2-Expression in SAOS-2 Zellen nach UV-Behandlung mit 50 J/m^2 zu den Zeitpunkten 6, 12, 24 und 48h

Eine Kinetik des hMSH2-Anstieges wurde erstellt, um zu sehen, zu welchem Zeitpunkt die maximale Induktion nach dem Zellschaden einsetzt. Hierzu wurde

der Messzeitpunkt bei 50 J/m^2 variiert, indem nach 12, 24 und nach 48h die Zellen lysiert wurden. Es zeigte sich ein dosis- und zeitabhängiger Verlauf des Expressionsanstieg (Abb. 12), mit einem Maximum bei 50 J/m^2 , 12h nach Bestrahlung, bei Transfektion von 10ng p53-Expressionsplasmid.

Somit konnte gezeigt werden, dass in dem verwendeten Zellsystem 12h nach UV-Bestrahlung der höchste Anstieg der hMSH2-Expression zu verzeichnen war (etwa 4 fach).

Dieser zeit- und dosisabhängige Verlauf der hMSH2-Expression zeigte sich auch bei der Verwendung von 75 J/m^2 . Der höchste Anstieg wurde hier ebenfalls nach Transfektion von 10ng p53 und nach 24h verzeichnet (Abb. 13).

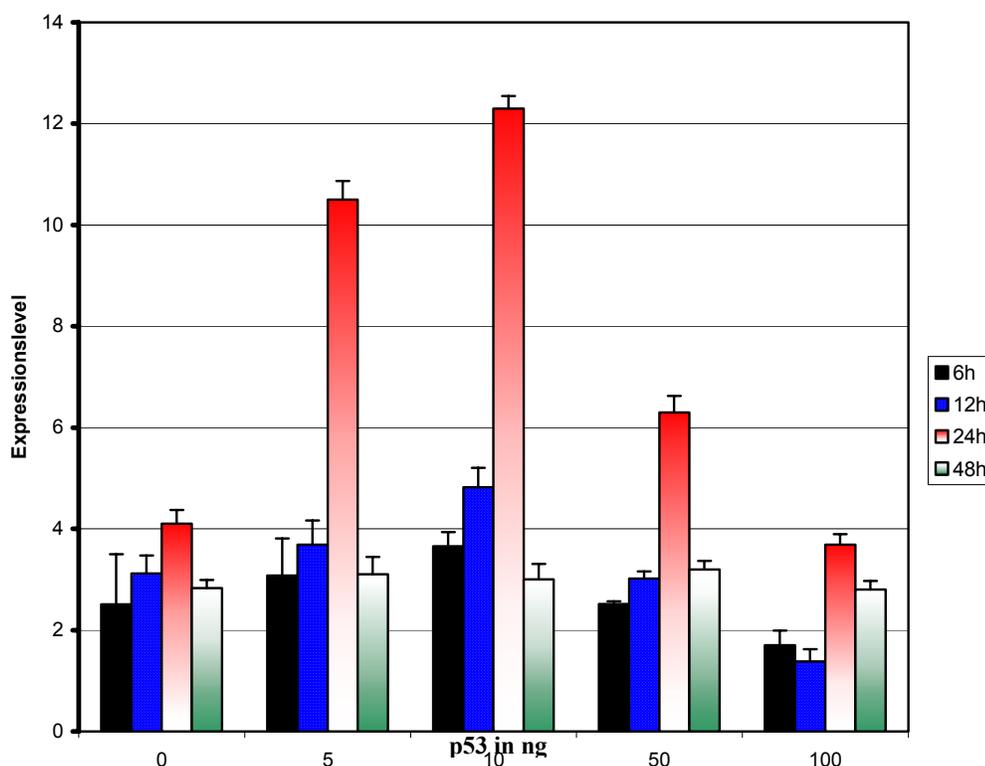


Abb. 13: hMSH2-Expression 6, 12, 24 und 48h nach UV-Bestrahlung mit 75 J/m^2 , p53 in ng

Das p53 Expressionsplasmid wird von einem CMV-Promotor getrieben. Um auszuschließen, dass eine Interaktion des CMV-Promotors mit dem hMSH2-Konstrukt einen Effekt auf die p53-Expression, z.B. durch Konkurrenz von Transkriptionsfaktoren haben könnte, wurden Kontrollexperimente durchgeführt indem ein unabhängiges Plasmid (XMI: Microphthalmagen vom Fisch Xiphophorus) in die Zellen transfiziert und die gleichen Bedingungen zu Grunde

gelegt wurden. Wie Abb. 14 zeigt ist in Anwesenheit des XMI Plasmids keine Induktion von hMSH2 festzustellen.

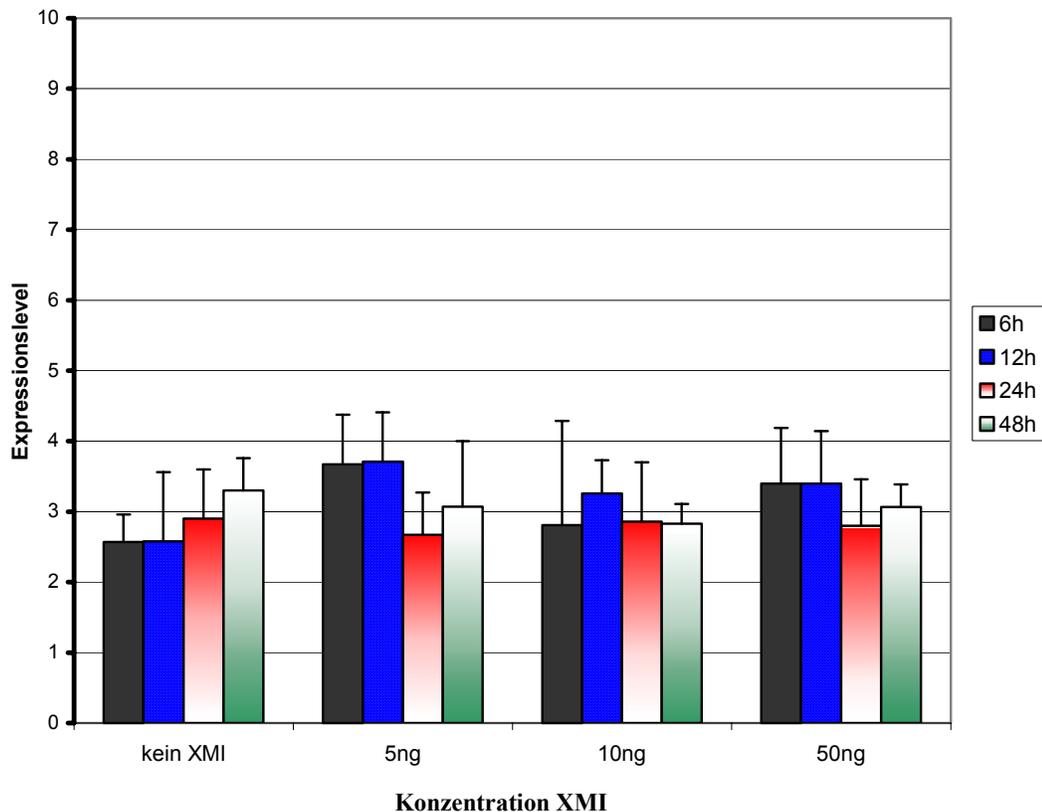


Abb.14: hMSH2-Expression in Anwesenheit des XMI-Expressionsplasmids, 12h nach UV-Bestrahlung mit 50J/m²

Um zu überprüfen, ob die beschriebene Induktion tatsächlich ein p53 abhängiges Ereignis ist, wurde die 5'-liegende p53 Bindungsstelle im hMSH2 Promotor mutiert. Abbildung 15 gibt einen Ausschnitt aus der Promotorsequenz des hMSH2-Promotors mit den beiden p53-Bindungsstellen wieder.

```

-476      gtttaacaa   aatactggga   ggaggaggaa p53 ggctagttt   tttttgttt
           p53
-426      tcaagtttc   ttctgatgtt   actccatgc   ttccggcac   attacgagct
  
```

Abb. 15: Ausschnitt aus der Promotorsequenz von MSH2, mit der Lage der p53-Bindungsstellen

Die erste Bindungsstelle wurde an 3 Basen wie folgt mutiert (Abb. 16).

Originalsequenz: ggaggaggaa **ggctagttt** tttttgttt
 Mutierte Sequenz: ggaggaggaa **ggagcgttt** tttttgttt

Abb. 16: Mutierte Bindungsstelle von hMSH2

Nach Transfektion des hMSH2 Reportergenkonstruktes mit der mutierten p53 Bindungssequenz konnte kein Anstieg der Expression von hMSH2 nach UV Bestrahlung festgestellt werden (Abb. 17).

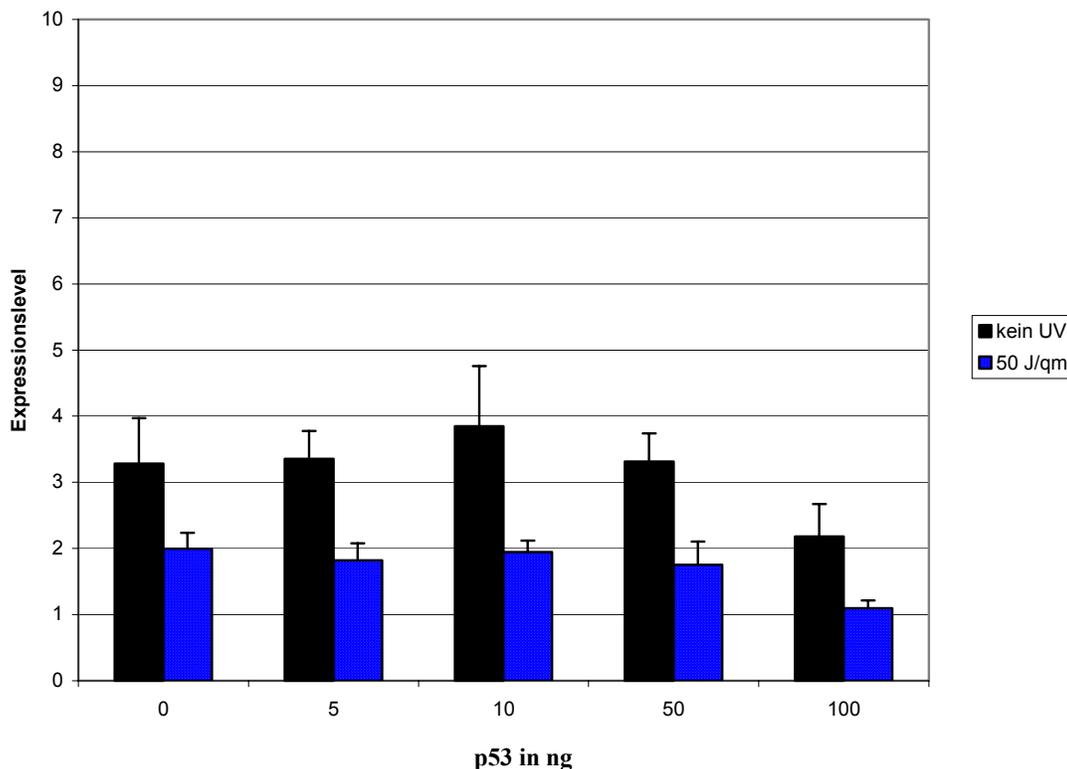


Abb.17: hMSH2-Expression unter Verwendung des p53-mutierten hMSH2-Konstruktes, 12h nach Bestrahlung mit 50 J/m²

Hiermit konnte gezeigt werden, dass die p53-Bindungsstelle im hMSH2-Promotor essentiell für die UV-Induktion des hMSH2 Promotors ist.

Dass die transkriptionelle Aktivierung von hMSH2 durch p53 erst nach einem Zellschaden zu sehen ist, kann dadurch bedingt sein, dass es durch die Bestrahlung zu einer Phosphorylierung des p53-Proteins kommt und es somit in seiner Wirkung nicht inhibiert werden kann, oder dass ein anderer UV-induzierter Kofaktor für die Bindung verantwortlich ist. Selbst bei hohen Konzentrationen an p53 ohne Bestrahlung war keine Induktion von hMSH2 zu verzeichnen. Dies macht die Notwendigkeit eines Kofaktors sehr wahrscheinlich.

Interessanterweise finden sich im Promotor von hMSH2 zwei AP-1 Bindungsstellen, die das p53-Motiv flankieren. Ein Bestandteil von AP-1 ist c-Jun, ein gut charakterisiertes UV-induzierbares Gen. Inwieweit c-Jun in die UV-vermittelte hMSH-2-Expression involviert ist, sollte einerseits mit einer gezielten Mutation der AP-1-Stelle im hMSH2-Promotor und andererseits durch Verwendung einer dominant negativen Mutante von c-Jun untersucht werden. Unter Verwendung der dominant negativen Variante von *c-jun* sollte die Expression des MMR-Gens zu reduzieren oder gar ganz aufzuheben sein. Unter Zugabe des *c-jun* Expressionsplasmides sollte dagegen eine Zunahme der MSH2-Promotoraktivität zu sehen sein.

Zunächst kamen wieder die HaCaT-Zellen, die humanes p53 enthalten zur Anwendung. Diese wurden mit der dominant negativen Mutante von c-Jun, TAM67, transfiziert, die in der Lage ist, an die Transaktivierungsdomäne von c-Jun zu binden und somit die Transkriptionsfaktorfunktion von c-Jun zu hemmen. Die folgende Abbildung zeigt, dass unter Verwendung von TAM67 die UV-abhängige hMSH2-Induktion nicht mehr auftrat, was ein starker Hinweis für deren Abhängigkeit von c-Jun darstellt.

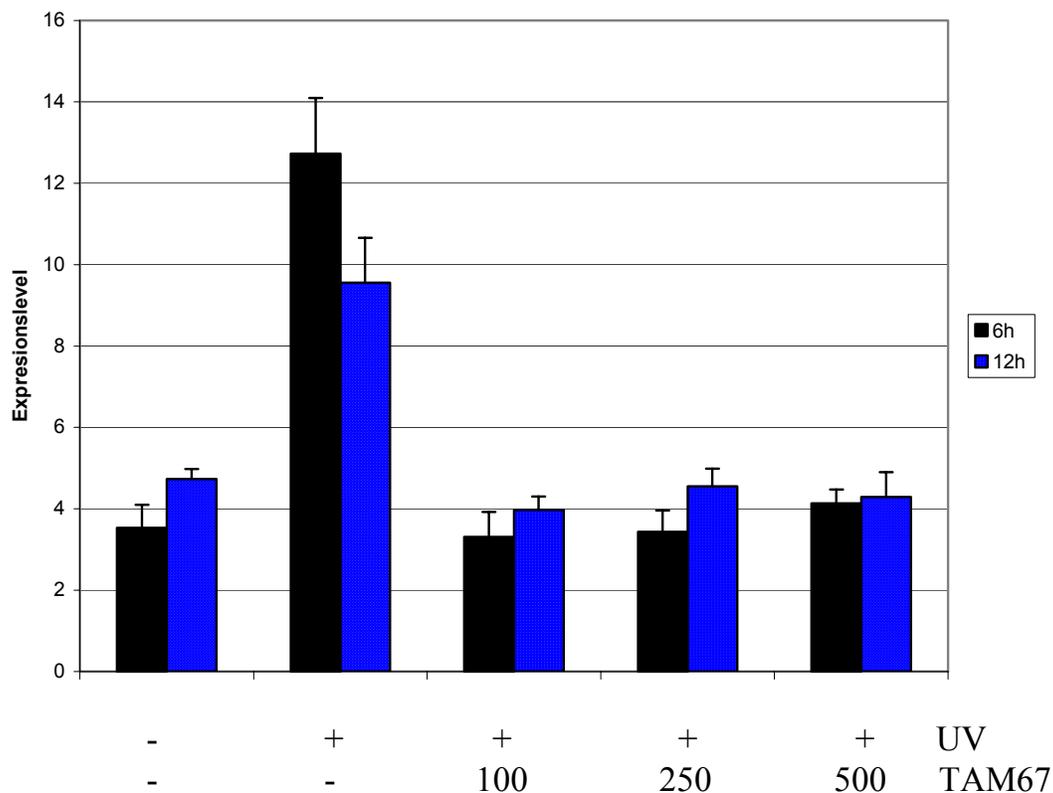


Abb. 18: Abhängigkeit der Expression von hMSH2 von der Interaktion mit c-Jun: Transfektion verschiedener Konzentrationen von TAM67 (in ng) in HaCaT-Zellen; Vergleich der hMSH2 Expression von unbestrahlten und mit UV 100 J/m² bestrahlten Zellen

Um zu zeigen, dass die Interaktion von p53 und c-Jun wirklich der kritische Faktor in der Induktion von hMSH2 bei UV-Schäden ist, wurde die AP-1-Bindungsstelle, analog zur p53-Bindungsstelle, mutiert. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Originalsequenz und Lage der AP-1 Bindungsstelle im hMSH2 Promotor (Abb. 19):

		AP-1				
-626	tgttttcgaa	tgag gaate	a tcaacgagt	ggatgaagcg	ataatgtggc	
-576	taacaggcag	cagtaaggag	gctgtgtaga	ataaacccgt	aatcccgatg	
-526	ttggcagttt	gcttagaaag	aaaaaggag	gcagtcggag	aggggcacac	
-476	gttttaacaa	aatactggga	ggaggaggaa	p53 ggctagttt	tttttgttt	

Abb.19: Originalsequenz des MSH2-Promotors mit Lage der AP-1 Bindungsstelle und der p53 Sequenz

Diese AP-1 Bindungsstelle wurde mutiert, so dass sie folgende Basenabfolge hatte (Abb. 20):

		AP-1				
Originalsequenz:	tgttttcgaa	tgag gaate	a tcaacgagt	ggatgaagcg	ataatgtggc	
Mutierte Sequenz:	tgttttcgaa	tgag ggaagc	a tcaacgagt	ggatgaagcg	ataatgtggc	

Abb. 20: Mutierte AP-1 Sequenz im MSH2 Promotorkonstrukt

Mit dem mutierten Konstrukt transfizierte SAOS-2 Zellen wurden bestrahlt. Dadurch war es möglich, die p53- und c-Jun-Abhängigkeit dieser Reaktion zu überprüfen. Wie Abb. 21 zeigt, konnte unter Verwendung des mutierten AP-1 Konstruktes keine MSH2-Induktion mehr erzielt werden.

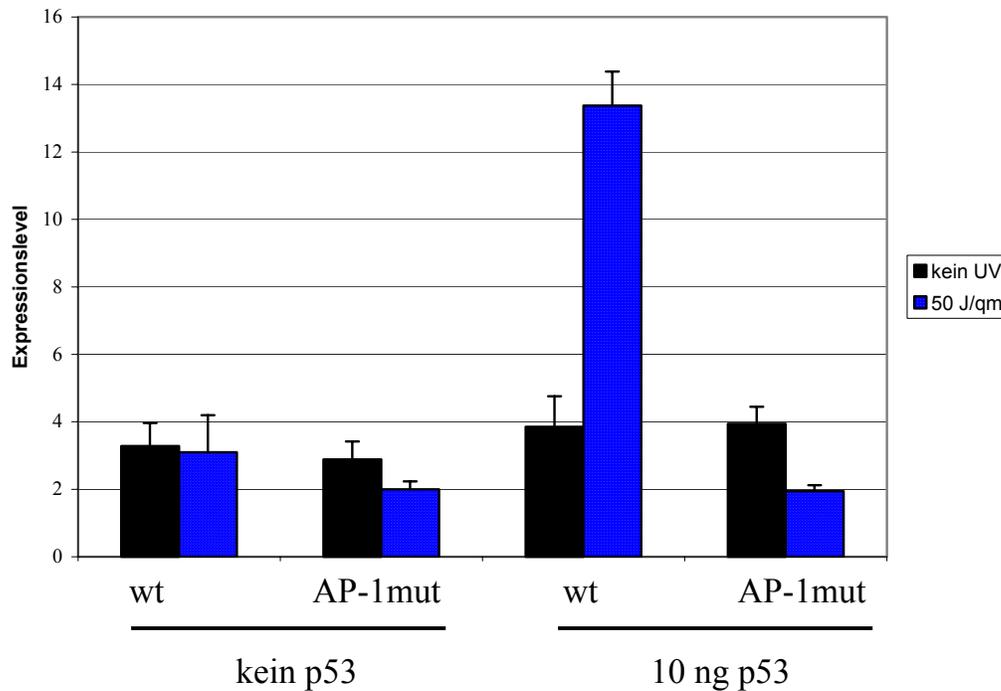


Abb. 21: Expression des Wildtyp hMSH2 Promotors (wt) und des Promotors mit mutierten AP-1 Bindungsstelle (AP-1 mut) nach UV-Bestrahlung von SAOS-2 Zellen in Anwesenheit von p53

Um zu zeigen, dass die Repression durch c-Jun bedingt ist, wurden auch die SAOS-2 Zellen mit TAM67 transfiziert. Das Ergebnis war ebenfalls eine Unterdrückung der UV-induzierten Mehrexpression von MSH2 (Abb. 22).

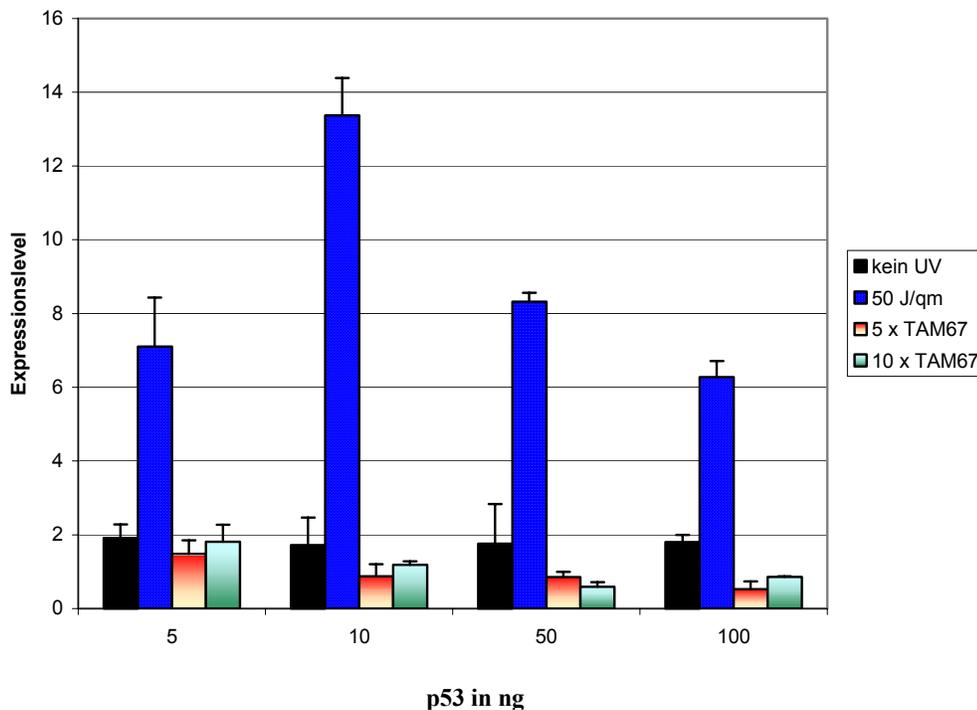


Abb. 22: Transfektion von SAOS-2 Zellen mit p53 und Bestrahlung mit UV in Anwesenheit von TAM67 als 5fachem, bzw. 10fachem Überschuss zum p53-Expressionsplasmid, MSH2-Expression wurde 12h nach Bestrahlung mit 50 J/m² gemessen.

Zur endgültigen Bestätigung der funktionellen Interaktion von c-Jun mit p53 in der Aktivierung von hMSH2 wurden SAOS-2 Zellen mit einem c-Jun Expressionsplasmid transfiziert. Die verwendeten SAOS-2 Zellen wurden nicht mit UV behandelt, um zu zeigen, dass die alleinige Überexpression von c-Jun ein entscheidender Schritt in der Reaktionskaskade von p53 mit c-Jun darstellt. Bei Transfektion mit 50ng c-Jun konnte in Anwesenheit von p53 eine Aktivitätssteigerung von hMSH2 nachgewiesen werden. Da hier biochemisch die Situation in bestrahlten Zellen nachgestellt wurde, in dem p53 in verschiedenen Konzentrationen und c-Jun als Expressionsplasmid in die Zellen transfiziert wurde, konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Interaktion von p53 mit c-Jun den kritischen Faktor in der Aktivierung von hMSH2 als Antwort auf einen UV-Schaden darstellt (Abb. 23).

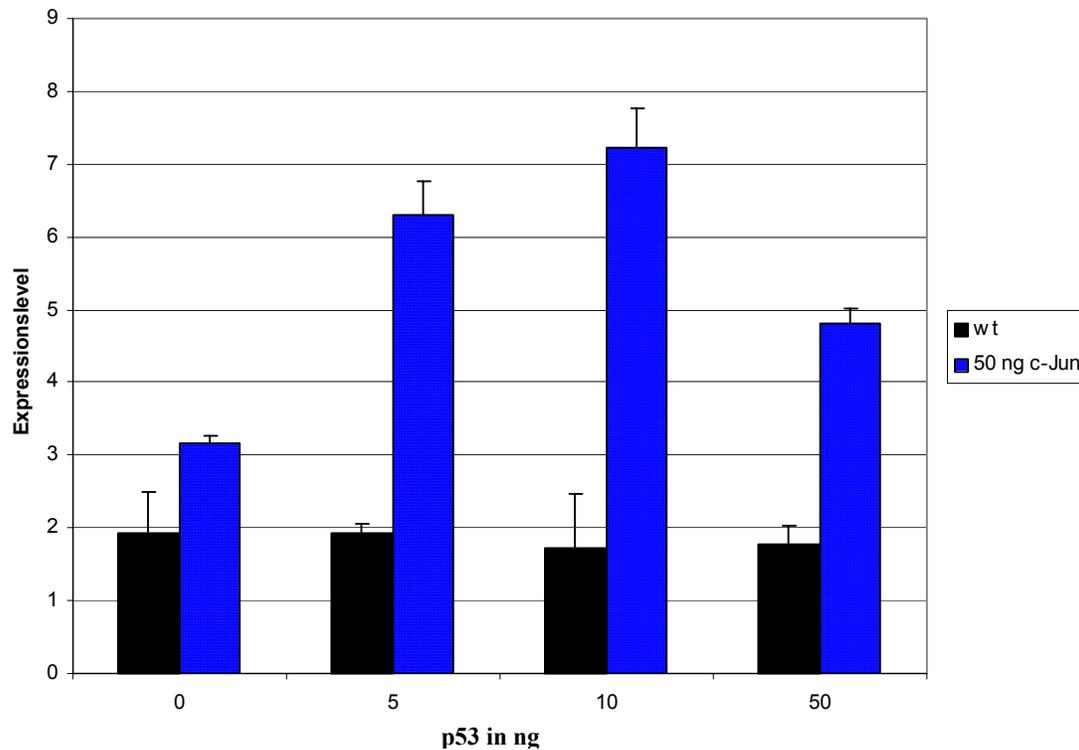


Abb. 23: Anstieg der hMSH2-Expression in Anwesenheit von p53 und einem c-Jun Expressionsplasmid in SAOS-2 Zellen ohne UV-Bestrahlung

Somit konnte erstmals auf molekularer Ebene eine direkte Interaktion des Tumorsuppressorgens p53 mit einem Mismatch-Reparaturgen nachgewiesen werden. Diese Interaktion erfolgt über transkriptionelle Regulation und ist von der Kooperation mit dem Transkriptionsfaktor c-Jun abhängig.

4. Analyse der Regulation der hMSH2 Transkriptmenge

Zur Untersuchung der Induktion des hMSH2 Gens in vivo wurden semiquantitative RT-PCR Reaktionen zur Bestimmung der Transkriptmenge durchgeführt. Als Kontrolle wurde GAPDH verwendet.

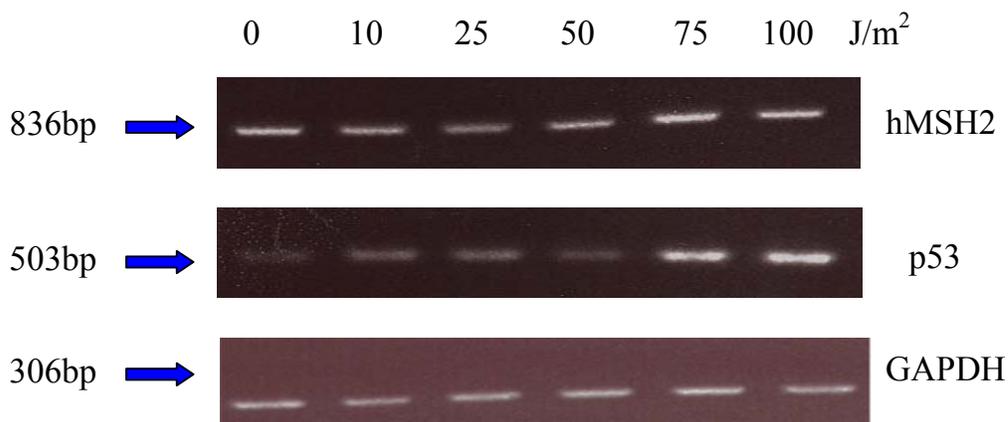


Abb. 24: Expression von hMSH2, p53 und GAPDH 6h nach UV-Bestrahlung von HaCaT-Zellen, Nachweis mittels RT-PCR

Die Expression von hMSH2 6h nach dem DNA Schaden ist am stärksten ausgeprägt bei Bestrahlung mit 75 bzw. bei 100 J/m² (Abb. 24). Dies korreliert gut mit den Ergebnissen der Reporterexperimente. 12 und 24h nach Bestrahlung zeigt sich eine deutliche Korrelation der Expression von hMSH2 zum Ausmaß des DNA Schadens mit einem Maximum bei 50J/m² bis 100J/m² (Abb. 25 und 26). Auch p53 zeigt in Abhängigkeit der Strahlendosis einen Expressionsanstieg.

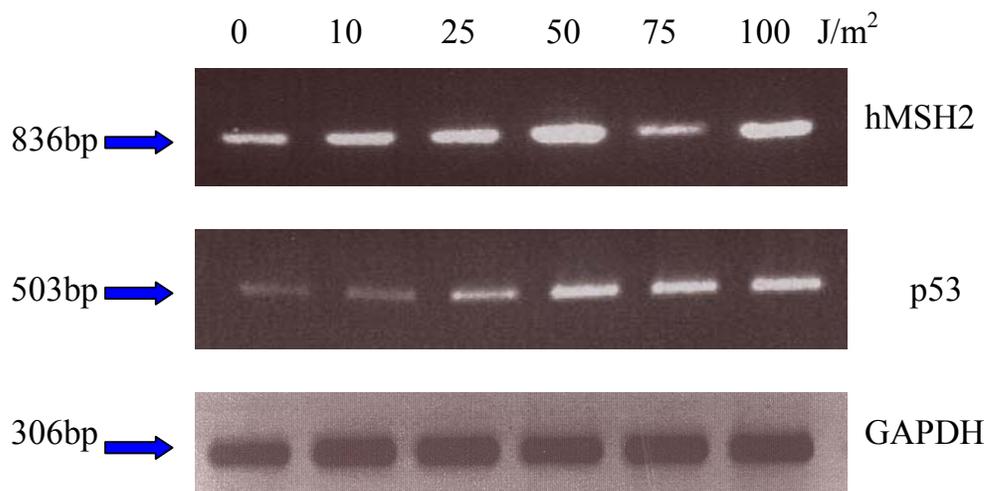


Abb. 25: Expression von hMSH2, p53 und GAPDH 12 h nach UV-Bestrahlung von HaCaT-Zellen, Nachweis mittels RT-PCR

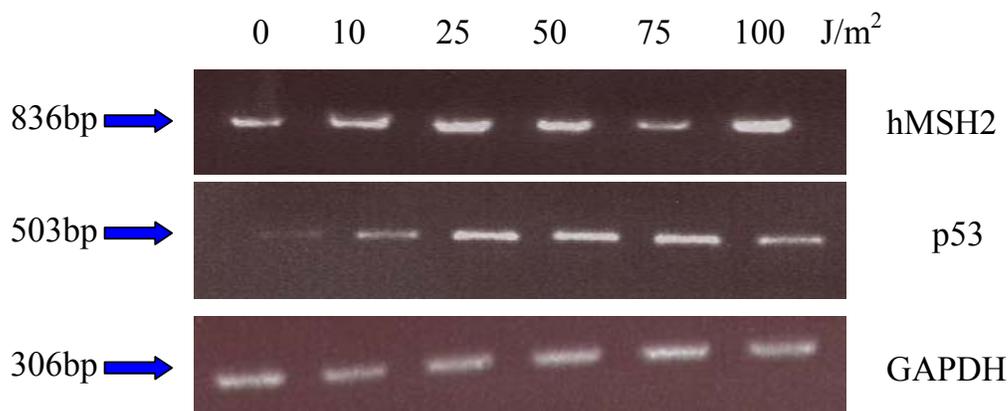


Abb. 26: Expression von hMSH2, p53 und GAPDH 24 h nach UV-Bestrahlung von HaCaT-Zellen, Nachweis mittels RT-PCR

Im weiteren sollte untersucht werden, ob sich die Synergie von p53 und c-Jun bei der UV abhängigen Induktion von hMSH2 auch auf RNA-Ebene nachvollziehen lässt. Hierzu wurden die Zellen mit einer dominant negativen Variante von c-jun, TAM67 transfiziert und nach 12 bzw. nach 24h nach der Bestrahlung RNA isoliert. Abb. 27 zeigt die Expression von hMSH2 12h nach UV-Bestrahlung mit 50 J/m².

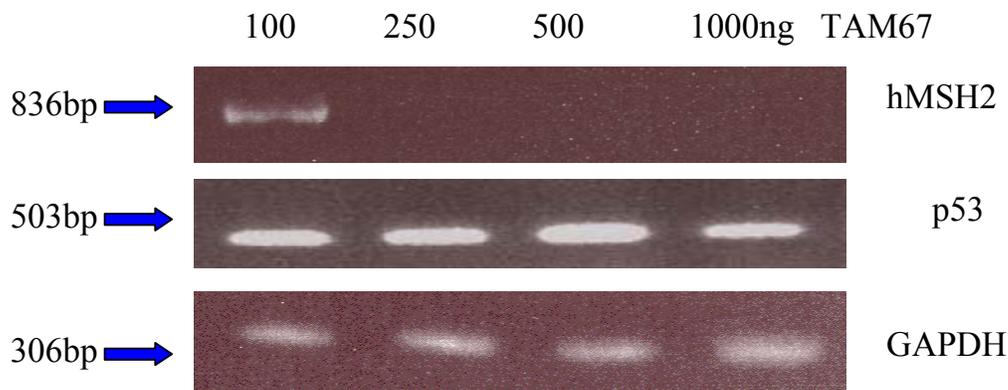


Abb. 27: RT-PCR 12h nach UV-Bestrahlung von HaCaT-Zellen in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von TAM67

Man kann deutlich erkennen, dass sowohl die GAPDH- als auch die p53-Expression durch TAM67 unbeeinflusst bleiben. Für MSH2 spielt die Abwesenheit von c-Jun eine erhebliche Rolle, denn nur bei geringen Transfektionsmengen von TAM67 (100ng) findet sich eine MSH2-Bande. Steigert man die TAM67 Konzentration auf 250-1000ng, ist die Expression des Mismatchreparaturgenes unterdrückt. Auch 24h nach UV-Bestrahlung findet sich das gleiche Bild (Abb. 28).

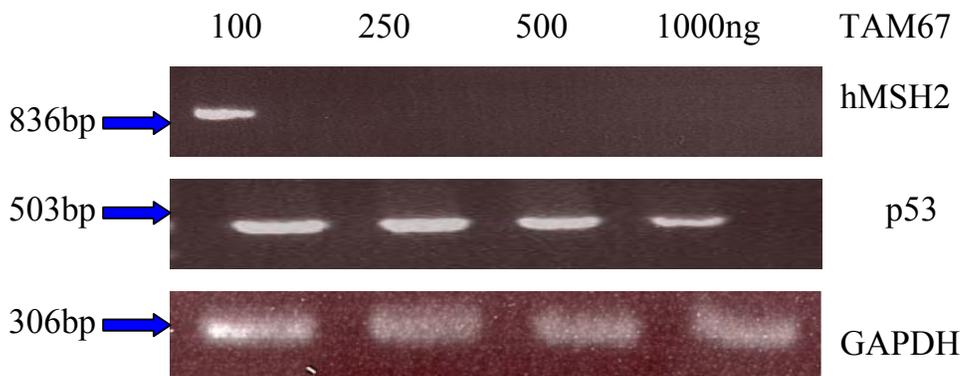


Abb. 28: RT-PCR 24h nach UV-Bestrahlung in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von TAM67

Somit konnte auf Expressionsebene betätigt werden, dass c-Jun ein kritischer Faktor für die UV-vermittelte Expression von hMSH2 darstellt.

Die sich nun anschließende Frage war die einer Interaktion mit p53. Hierzu wurden die Zellen mit einem dominant negativen Konstrukt von p53 (p53-p175) transfiziert. Die 175H-Mutante wirkt, indem sie mit Wildtyp p53 Heterotetramere bildet und das Wildtyp-Protein auf diese Weise inaktiviert. Transfektionen von 175H führen deshalb nicht zu weniger p53, außerdem wird das normalerweise instabile wt-p53 durch die Interaktion mit 175H stabilisiert.

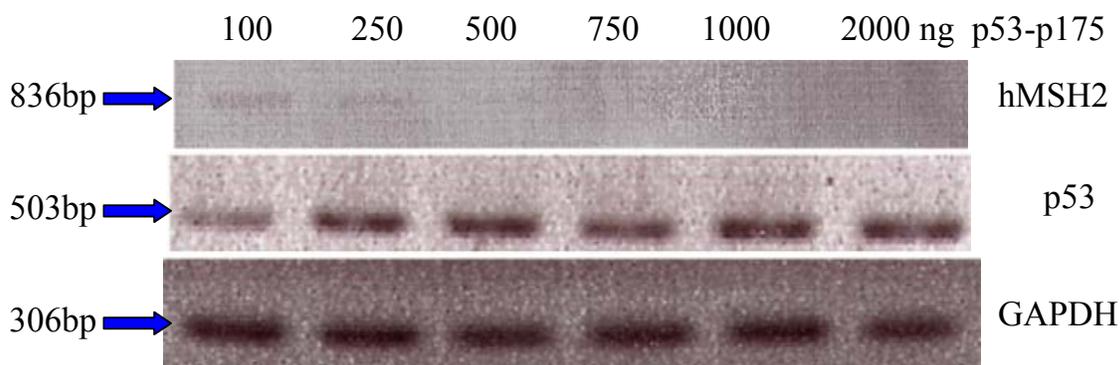


Abb. 29: RT-PCR 24h nach UV-Bestrahlung von HaCaT-Zellen, p53-p175 in verschiedenen Konzentrationen kotransfiziert

Die Transfektion der 175H-Mutante beeinflusst die p53-Expression nicht, sondern stabilisiert das Transkript. GAPDH ist unbeeinflusst. MSH2 wird im Gegensatz dazu bei 250ng p53-p175 nur sehr schwach exprimiert, höhere Konzentrationen hemmen die Transkription von MSH2 komplett. Hiermit konnte die funktionelle Interaktion von c-Jun und p53 in der UV-abhängigen Induktion von hMSH2 gezeigt werden.

5. Analyse der Regulation des hMSH2 Proteins

Um zu klären, ob auf Proteinebene und damit auf der funktionellen Ebene der Reparaturgene ein ähnliches Expressionsmuster zu finden ist, wurden Western Blot Analysen durchgeführt.

Diese zeigen eine deutlich sichtbare Expression von p53, die in den UV bestrahlten Zellen gegenüber nicht UV bestrahlten kaum erhöht war (Abb. 30). Dies erklärt sich durch eine nach UV-Bestrahlung beschriebene Stabilitätszunahme des p53 Proteins.

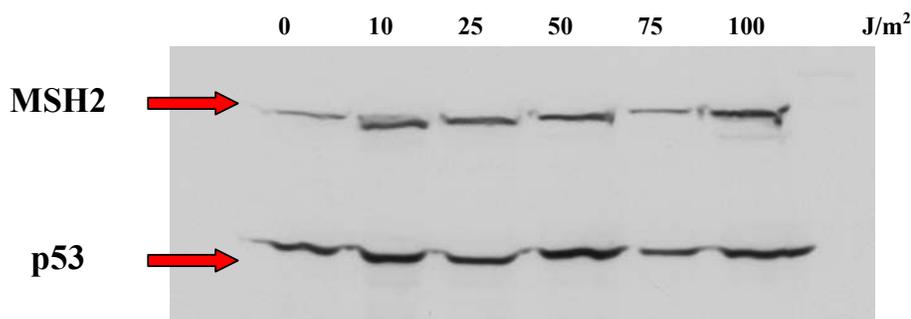


Abb. 30: Western Blot Analyse von HaCaT-Gesamtzellextrakt, detektiert mit Antikörper gegen p53 und MSH2, 24h nach UV-Bestrahlung unterschiedlicher Intensität.

Die gleiche Membran wurde auch mit einem Maus IgG_{1κ}-anti-MSH2 Antikörper inkubiert. Für MSH2 konnte auf Proteinebene eine Zunahme bei den bestrahlten im Gegensatz zu den unbestrahlten Zellen festgestellt werden (Abb. 30).

Im nächsten Schritt wurde die Situation 48h nach UV-Bestrahlung überprüft und vergleichbare Ergebnisse erzielt (Abb. 31). Auch hier reagierten MSH2 und p53 Strahlen-dosisabhängig.

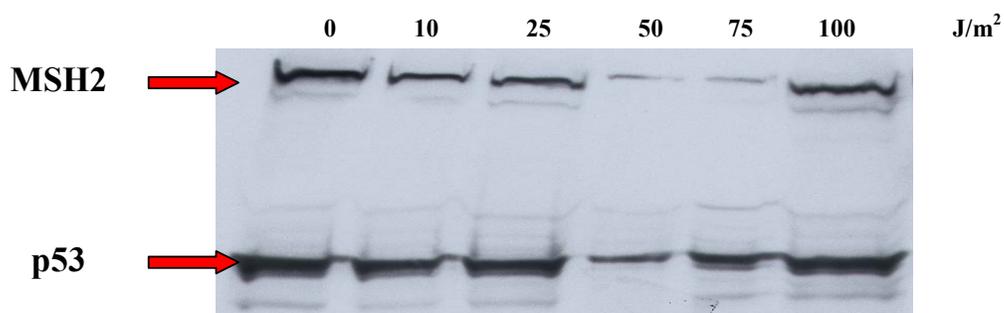


Abb. 31: Western Blot Analyse von HaCaT-Zellen detektiert mit Antikörper gegen p53 und MSH2, 48h nach Bestrahlung unterschiedlicher Intensität

Auffällig bei beiden Experimenten war ein leichter Abfall der MSH2-Proteinmenge bei Bestrahlung mit 75 J/m^2 und eine deutlich höhere MSH2-Proteinmenge bei Bestrahlung mit 100 J/m^2 . Dieser Effekt war 48 h nach Bestrahlung deutlicher als 24 h nach Bestrahlung.

Die Frage, die sich direkt anschloss, war die nach der Bedeutung dieses Anstiegs von MSH2 in stärker bestrahlten Zellen. Eine bekannt wichtige Funktion von MSH2 ist die Reparatur zufälliger oder induziert eingetretener Basenfehlpaarungen oder DNA-Schäden. Sollte MSH2 in diesem Experiment DNA-Reparatur ausüben, so wäre auffällig, dass während eines konstanten Anstiegs schädigender Einflüsse die Reparatur schwächer wird und danach wieder ansteigt. Um zu überprüfen, ob tatsächlich DNA-Reparatur den Proteinanstieg bedingt, wurde der Bindungspartner von MSH2 im Mut α -Komplex, MSH6 nachgewiesen. MSH2 und MSH6 bilden ein Heterodimer, welches an der Erkennung des Mismatches entscheidend beteiligt ist. Weder MSH2 noch MSH6 alleine können diese Kaskade in Gang setzen, da das 2. Heterodimer, bestehend aus MLH1 und PMS2 nicht an eines der Einzelmoleküle binden kann.

Abbildung 32 zeigt unter gleichen Versuchsbedingungen das MSH6 Protein in einer Westenblot-Analyse.

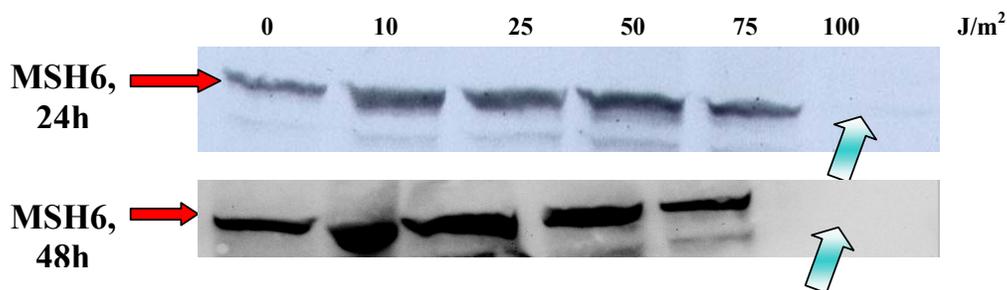


Abb. 32: Western Blot Analyse gegen MSH6 Protein, 24 und 48h nach Bestrahlung

Die Untersuchungen 24 und 48 h nach Bestrahlung zeigen, dass MSH6 nur in den weniger bestrahlten Proben nachweisbar ist. Dies deutet darauf hin, dass bei Bestrahlung mit 100 J/m^2 keine Mismatch-Reparatur mehr stattfindet und der Anstieg von MSH2 unter diesen experimentellen Bedingungen keine Zunahme der Reparaturkapazität bedeutet, da der Bindungspartner nicht vorhanden ist. Wenn MSH2 in diesem Stadium des Zellschadens aber keine Reparatur einleitet, so war die Frage was die mögliche Erklärung für diesen Anstieg darstellt. In wenigen Literaturdaten wird für die Mismatchreparaturproteine eine Funktion in der Apoptoseeinleitung beschrieben (als Übersicht siehe: Bernstein et al. 2002). Nicht geklärt ist dabei der Mechanismus, der einer Apoptosefunktion der MMR-Proteine zu Grunde liegen könnte. Um auf Proteinebene zu überprüfen, ob es bei

diesen Experimenten zu Apoptose kommt, wurde eine Detektion der Proteine BCL-2 und BAD durchgeführt. Beides sind Proteine die in der Apoptose, bzw. Antiapoptose eine wichtige Rolle spielen. Abbildung 33 zeigt die unterschiedlichen Expressionsmuster dieser Proteine.

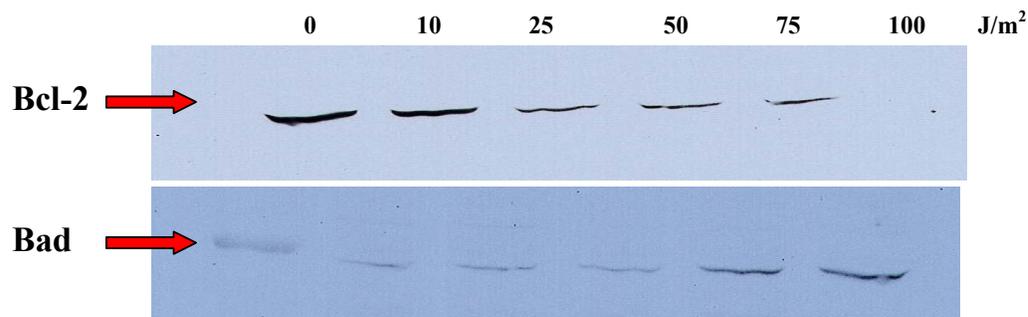


Abb. 33: Westernblot zur Detektion Apoptose-spezifischer Proteine

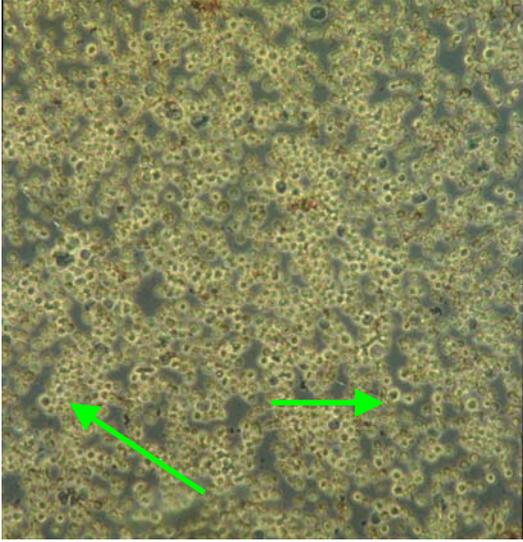
Es ergab sich, dass das Antiapoptoseprotein BCL-2 mit zunehmender Strahlendosis und damit zunehmendem DNA-Schaden abnimmt und BAD, ein apoptoseeinleitendes Protein in umgekehrtem Verhältnis zunimmt.

6. Untersuchung der Apoptoserate in Abhängigkeit von der Strahlendosis

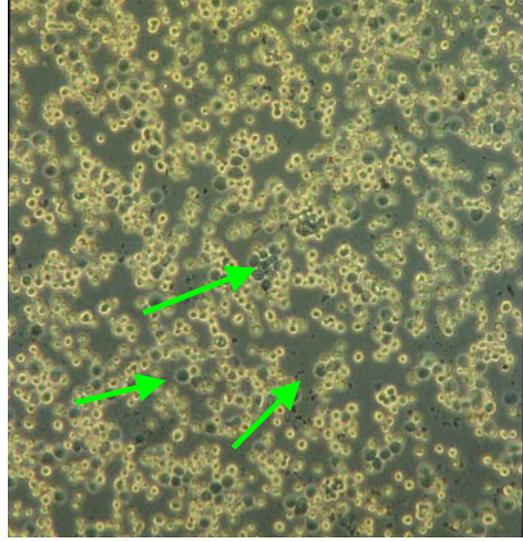
Um zu überprüfen, ob sich im Falle der stärker bestrahlten Zellen eine signifikant höhere Apoptoserate in Zusammenhang mit der erhöhten MSH2-Expression zeigt, wurden TUNEL-Untersuchungen durchgeführt (Abb. 34).

Der **TUNEL**-Test zeigt die während der Apoptose entstehenden DNA-Strangbrüche und ermöglicht so eine Identifizierung apoptotischer Zellen. Die Abkürzung TUNEL steht für "*Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling*". Bei dieser Technik werden Einzelstrangbrüche in der genomischen DNA nachgewiesen, die durch die Aktivität von Nucleasen entstehen.

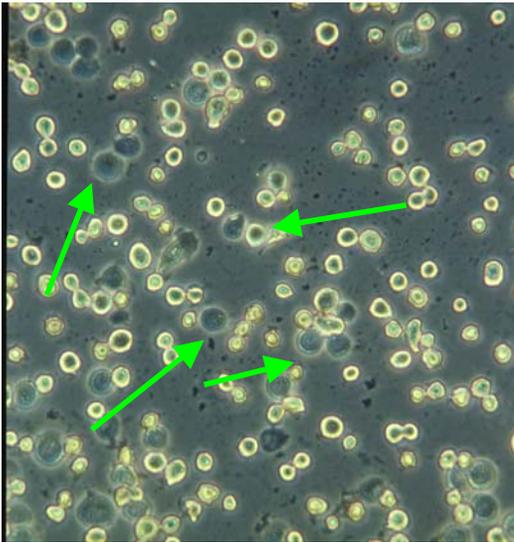
0 J/m²



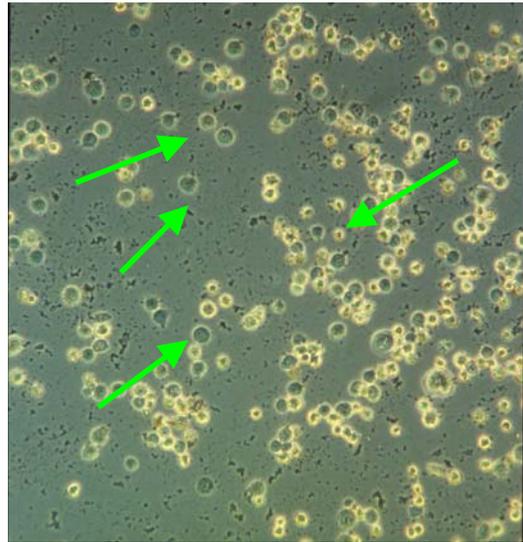
10 J/m²



25 J/m²



50 J/m²



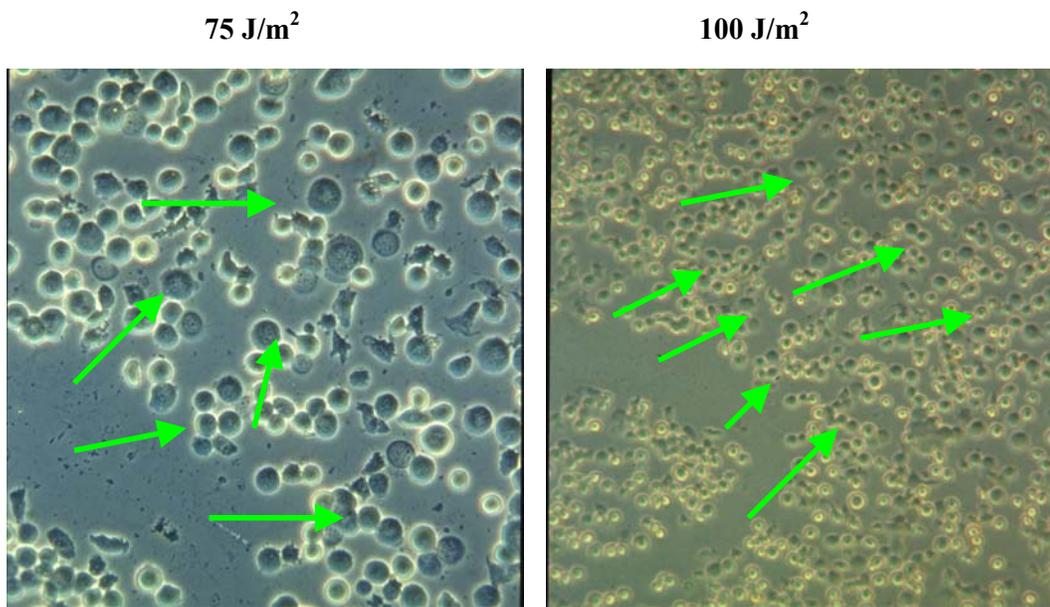


Abb. 34: TUNEL-Test an HaCaT-Zellen, bestrahlt mit unterschiedlichen UV-Dosen, Pfeile markieren die TUNEL-positiven Zellen

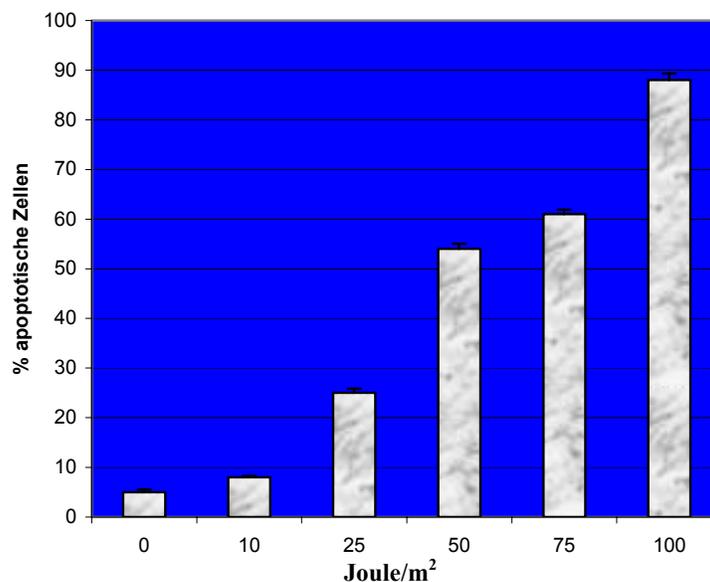


Abb. 35: Apoptoserate in Abhängigkeit der Strahlendosis, 24h nach UV-Bestrahlung

Nach Quantifizierung der apoptotischen Zellen (Abb. 35) ist eindeutig zu erkennen, dass sich bei einer UV-Strahlendosis von 100 J/m² knapp 90% der Zellen in Apoptose befinden. Dies lässt die Vermutung zu, dass die MSH2-Mehrexpression bei 100 J/m² keine Reparaturfunktion widerspiegelt.

7. Test auf Reparatureffizienz

Um sicher zu zeigen, dass in den Zellen bei UV-Bestrahlung mit 100 J/m^2 keine Reparatur mehr stattfindet, wurden Zellextrakte einem in-vitro Reparaturtest unterzogen. Es handelt sich hierbei um ein biochemisches Verfahren, bei dem viele experimentelle Schritte ablaufen und eine Art Grundlinie definiert werden muss, welche anzeigt, wann noch von Reparatur gesprochen werden kann und wann keine mehr stattfindet. Bei diesem Verfahren liegt diese Grenze bei 20%. Alle Werte, die oberhalb von 20% liegen bedeuten, dass eine Reparatur stattfindet, alles was unterhalb liegt, zeigt an, dass keine Reparatur stattgefunden hat. Aufgrund der experimentellen Komplexität muss der Test mehrfach wiederholt werden, wobei er mindestens 3 Mal unabhängig voneinander durchgeführt wurde (Abb. 36).

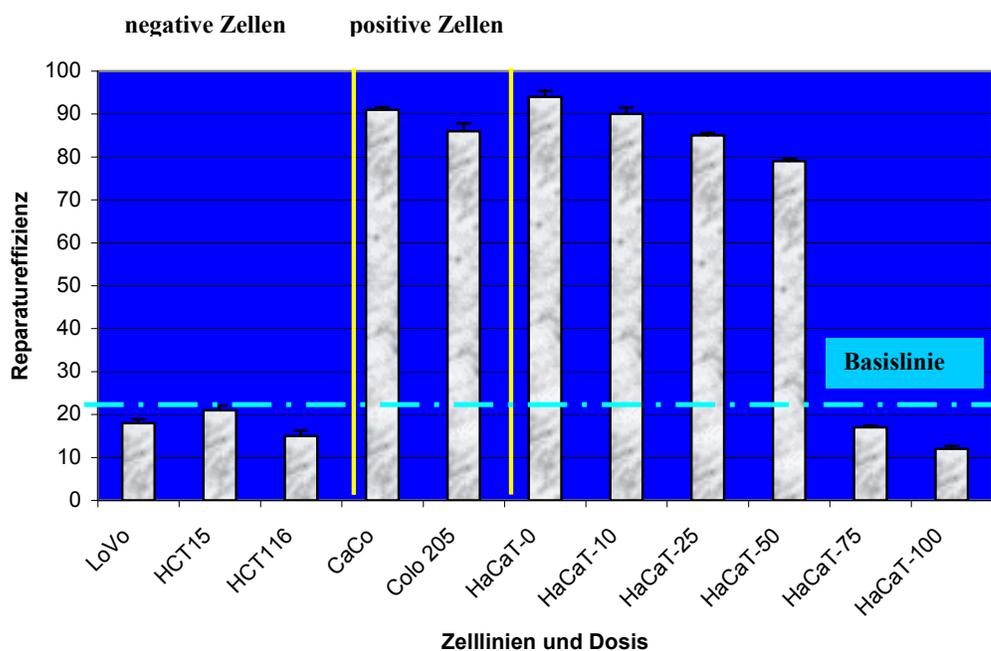


Abb. 36: Reparatureffizienz unterschiedlicher Zelllinien bei verschieden starker UV-Bestrahlung

Als Negativkontrolle dienten die Zelllinien LoVo (MSH2-defizient), HCT15 (MSH6 defizient) und HCT116 (MLH1 defizient). Diese sind aufgrund der beschriebenen genetischen Defekte nicht in der Lage eine Mismatchreparatur auszuführen. Sie zeigen im Test einen Wert unter 20%, was als Reparaturdefizienz definiert wird. Als Positivkontrolle dienten CaCo und Colo205, beides Normalzelllinien epithelialen Ursprungs. Diese zeigen im Reparaturverhalten den erwarteten positiven Verlauf und sind mit mehr als 80% klar profizient.

Die für die Untersuchungen dieser Arbeit häufig verwendete Keratinozytenzelllinie HaCaT ist bei niedrigen Bestrahlungsdosen klar zur Reparatur fähig. Diese Fähigkeit bleibt bis zu einer Strahlendosis von 50 J/m^2 erhalten, bei 75 bzw. 100 J/m^2 ist jedoch keine Reparaturfunktion mehr vorhanden. Diese Daten stimmen sehr gut mit den Apoptosedaten überein. Bei stark geschädigten Zellen war die Apoptoserate deutlich höher als bei den schwach bestrahlten Zellen. Hiermit wurde außerdem gezeigt, dass der MSH2-Proteinanstieg in den stark geschädigten Zellen kein Reparaturkorrelat findet und damit nicht von einer solchen Funktion ausgegangen werden kann. Man muss vielmehr annehmen, dass MSH2 hier apoptotische Funktion ausübt.

Anschließend wurden FACS-Analysen durchgeführt, um die Apoptose der benutzten Zellen weiter zu charakterisieren. Im Folgenden werden nur die markantesten Unterschiede zur Darstellung gebracht. Abbildung 37 zeigt die Apptoserate bei unbehandelten Zellen im Vergleich zu der behandelten Zellen (bestrahlt mit 75 und 100 J/m^2).

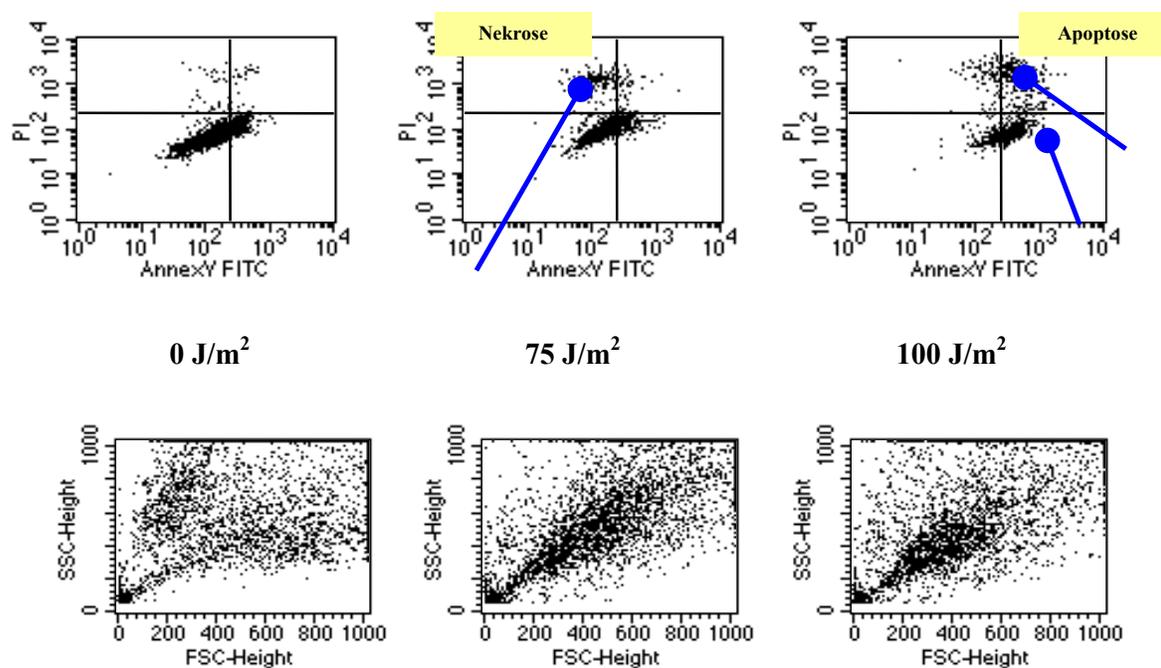


Abb. 37: Apptoserate in HaCaT-Zellen 24 h nach unterschiedlichen Dosen der UV-Exposition

Man erkennt in den Zellen der Versuche eine bei 100 J/m^2 UV-Dosis deutlich stattfindende Apoptose. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den Daten der TUNEL-Färbungen und Proteinuntersuchungen. Ob bei Bestrahlung mit 75 J/m^2 mehr Nekrose als Apoptose stattfindet, ist mit dieser Methode nicht eindeutig zu bestimmen. Hierzu bedarf es spezifischer Untersuchungen, die es erlauben

zwischen Nekrose und Apoptose zu unterscheiden. Sobald die Membran einer Zelle geschädigt ist, sind die Zellen für die Nekrose-anzeigende Propidiumiodidfärbung sensibel, die eine Apoptose-anzeigende Annexin V Färbung überlagern kann.

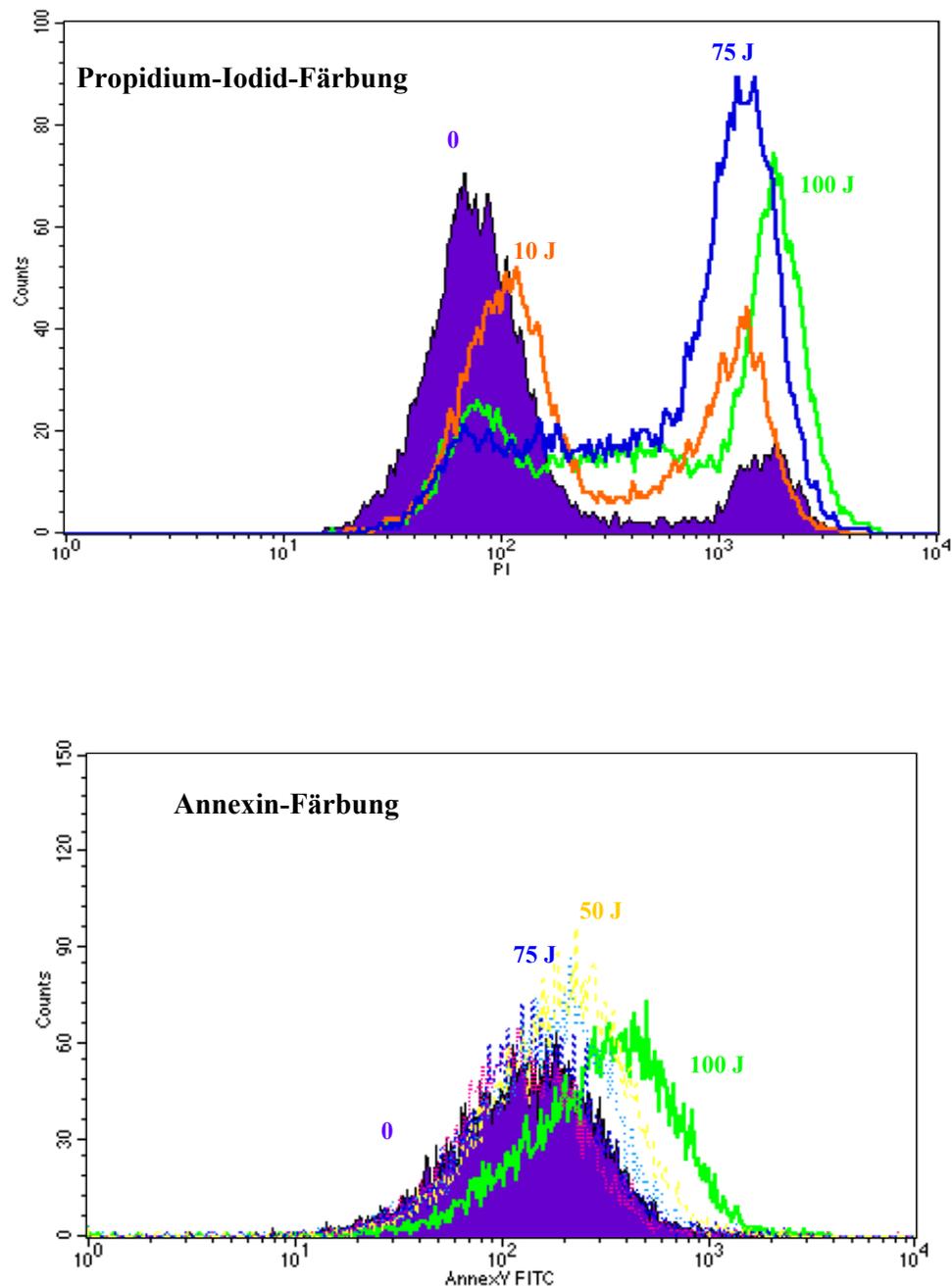
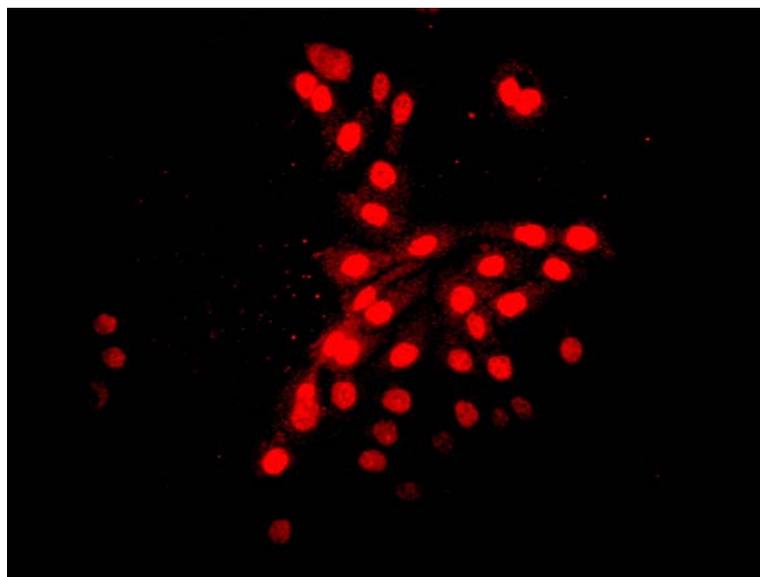


Abb. 38: Einzeldatenanalyse für Propidiumiodid und Annexin V-Färbungen: Bei Annexin V-Färbungen erzielt man den höchsten Wert bei den mit 100 J/m^2 bestrahlten Zellen, bei der Propidiumiodidfärbung bei den mit 75 J/m^2 bestrahlten Zellen (Zahlen jeweils Strahlendosis in J/m^2)

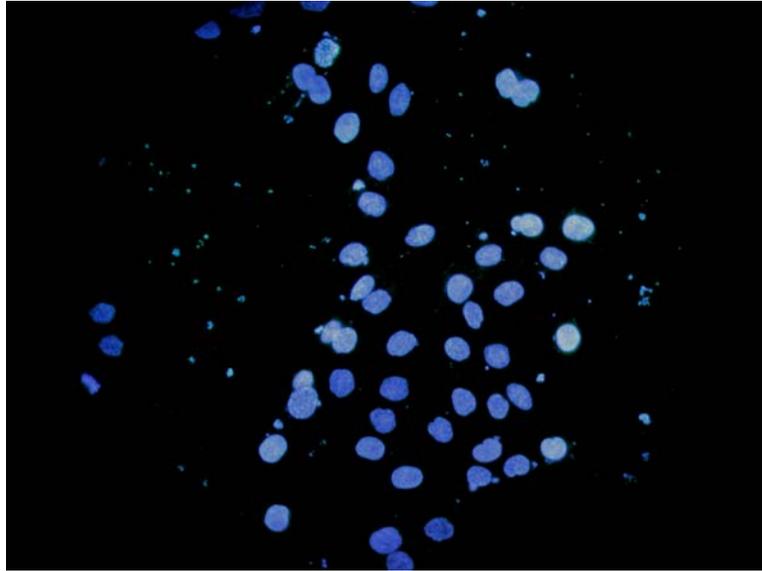
Abbildung 38 zeigt im Einzelvergleich der Daten, dass bei UV-Bestrahlung von 75 J/m^2 die Nekroserate höher ist als bei Bestrahlung mit 100 J/m^2 , während die Apoptoserate bei Bestrahlung mit 100 J/m^2 höher ist. Dies könnte das Expressionsmuster von MSH2 dergestalt erklären, dass für die Zellnekrose keines der MMR-Proteine eine Rolle spielt, für die erst bei 100 J/m^2 stattfindende Apoptose hingegen MSH2 eine Funktion ausübt.

8. Zelluläre Lokalisation von hMSH2 in Abhängigkeit von der Strahlendosis

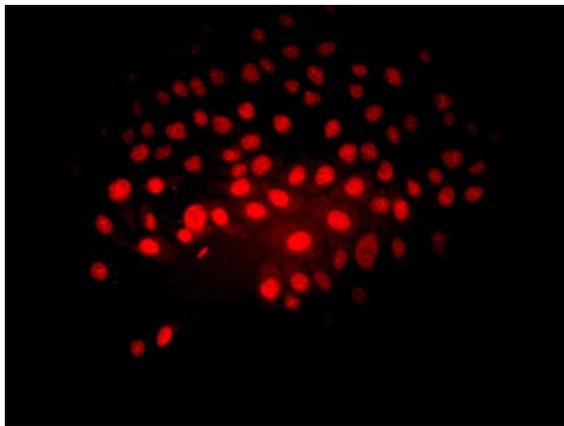
Als nächstes sollte die Frage nach der zellulären Bedeutung der MSH2-Induktion bei letaler UV-Dosis geklärt werden. Bei MSH2 handelt es sich um ein Mismatchreparaturprotein, welches zusammen mit anderen Proteinen für die Integrität und Stabilität des Genoms sorgt und Fehler der Basenpaarung repariert. Diese Reparatur findet im Zellkern statt. Bei der Apoptose ist eine Fokussierung auf ein zelluläres Kompartiment nicht bindend, jedoch geht sie in vielen Fällen zytoplasmatische Wege, z.B. über Liganden gesteuerte Apoptose oder aber über genotoxischen Stress, der in einer Zerstörung der mitochondrialen Membran endet und somit auch die Caspasen als Endpunkt anschaltet. Eine sich nun stellende Frage war, ob MSH2 in Falle einer apoptotischen Funktion eine Translokation von nukleär nach zytoplasmatisch zeigt. Dieser Frage wurde nachgegangen indem die Zellen mit verschiedenen UV-Dosen bestrahlt und diese anschließend für die Immunfluoreszenz präpariert wurden.



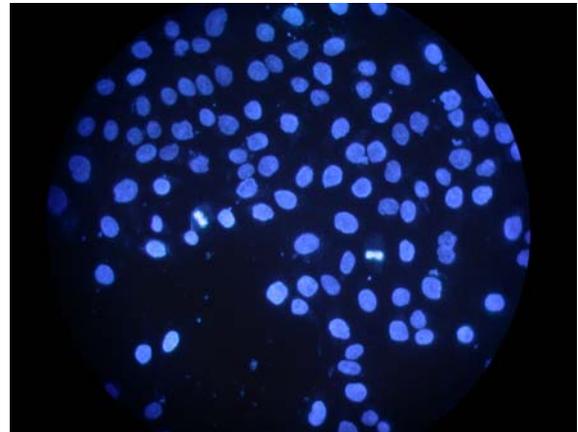
**0 J/m²
MSH2-
Färbung**



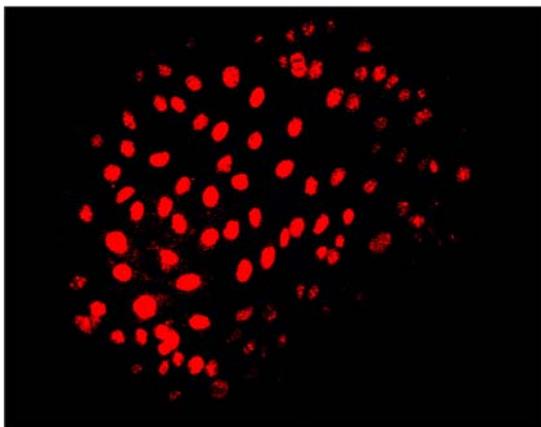
**0 J/m²
DAPI,
nukleäre
Färbung**



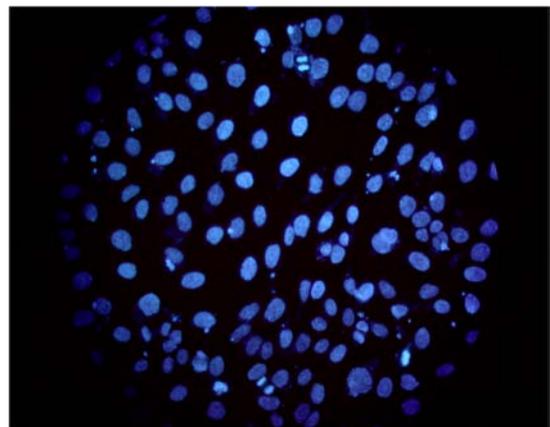
**10 J/m²
MSH2-Färbung**



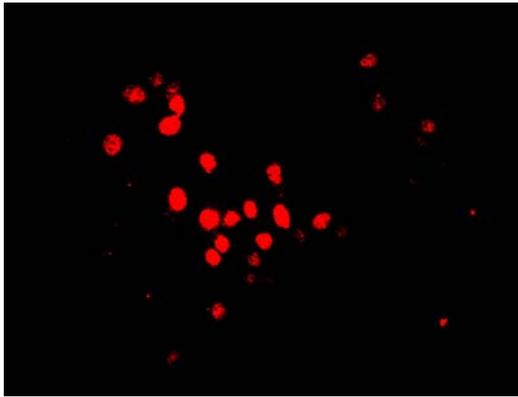
**10 J/m²
DAPI, nukleäre Färbung**



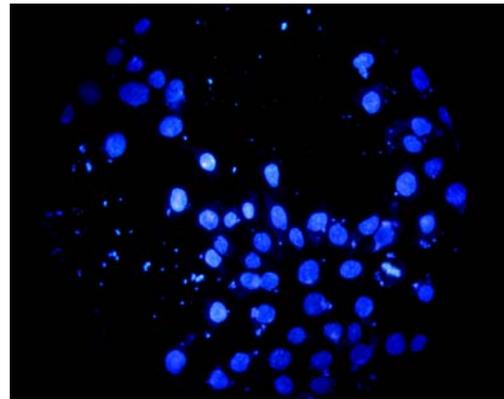
**25 J/m²
MSH2-Färbung**



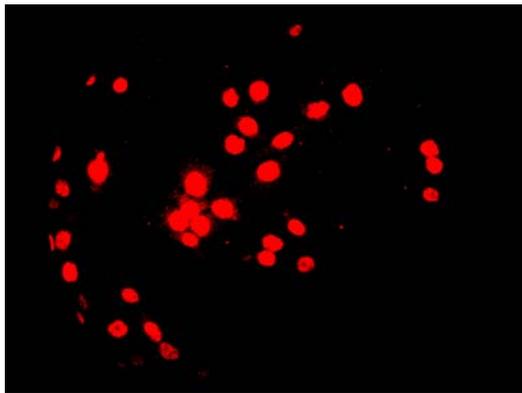
**25 J/m²
DAPI, nukleäre Färbung**



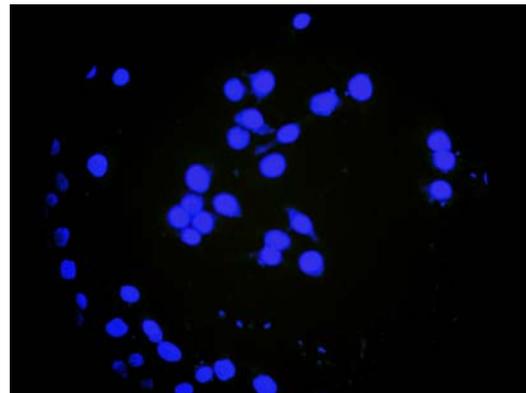
50 J/m²
MSH2-Färbung



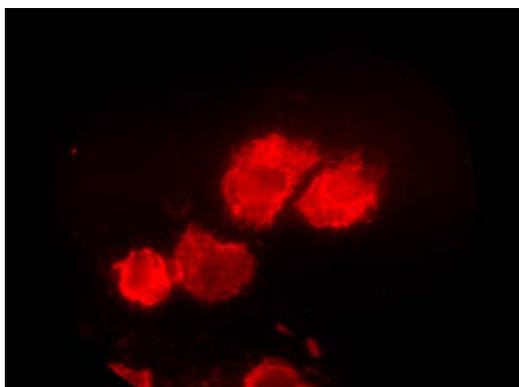
50 J/m²
DAPI, nukleäre Färbung



75 J/m²
MSH2-Färbung



75 J/m²
DAPI, nukleäre Färbung



100 J/m²
MSH2-Färbung



100 J/m²
DAPI, nukleäre Färbung

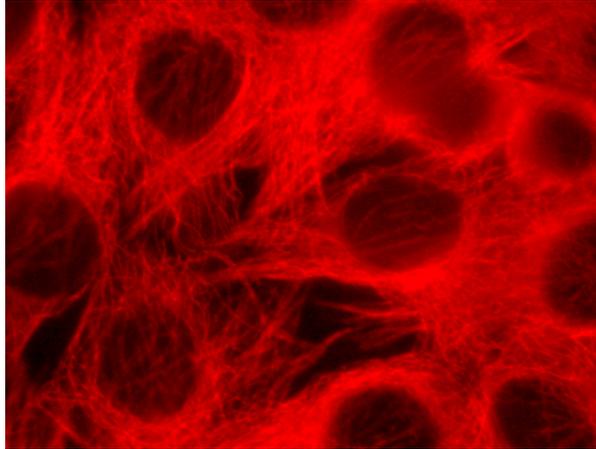
**Tubulin**

Abb. 39: Immunfluoreszenznachweis von MSH2. Lokalisation des Proteins im nukleären und zellulären Kompartiment abhängig von der Strahlendosis; Tubulin als Kontrolle des intrazellulären Kompartiments

Abb. 39 zeigt sehr deutlich, dass MSH2 eine Strahlen-dosisabhängige Lokalisation aufweist. In unbestrahlten und mit niedriger Dosis bestrahlten Zellen ist MSH2 sowohl zytoplasmatisch als auch vorwiegend nukleär zu finden. Bei Zunahme der Strahlendosis befindet sich das Protein ausschließlich im Kern. In mit 100 J/m^2 bestrahlten Zellen tritt es erneut und in höherer Konzentration ins Zytoplasma über. Diese Translokation ist ein wichtiger Hinweis, der die Apoptosefunktion von MSH2 erklären könnte.

Durch eine Verlagerung von einem Zellkompartiment in ein anderes treten für ein Protein neue Bindungspartner in Erscheinung, die im Ursprungskompartiment möglicherweise nicht vorhanden sind. So ist eine Bindung an ein pro-apoptotisches wie auch anti-apoptotisches Protein denkbar, was zu dessen Stabilisierung oder Degradation führen könnte.

IV. Diskussion

1. Die Promotorsequenz von hMSH2

Die Promotorsequenz des menschlichen MSH2 Gens enthält viele Proteinbindungsstellen, von denen einige in Abb. 6 exemplarisch beschrieben sind. TATA- oder CAAT-Boxen, typische Elemente eukaryotischer Promotoren sind im hMSH2 Promotor nicht zu lokalisieren. Wenn vorhanden dann findet man die TATA-Box in der Regel 25 bis 30 Basenpaare in 5'-Richtung vor dem Transkriptionsstart. Die Konstellation im hMSH2 Promotor ist typisch für Promotoren von „Housekeeping-Genen“. Nach Vogelstein sind, sowohl hMSH2 als auch hMLH1 die „Mutter der Housekeeping-Gene“ (Vogelstein et al. 1994).

Interessant am hMSH2-Promotor war der Befund einer potentiellen p53-Bindungsstelle zwischen den Nukleotiden -447 und -416. Bereits vor Beginn der Arbeit konnte gezeigt werden, dass p53 an ein Motiv im Promotor des hMSH2-Gens bindet. Über diese Bindung von p53 an den Promotor von hMSH2 ist eine direkte Interaktion möglich zwischen einem Tumorsuppressorgen und einem Mismatch-Reparatur-Gen. Es hat sich gezeigt, dass p53 als Tumorsuppressorgen in Tumorgenese, virale Onkogenese, chemische Onkogenese, Apoptose, Zellzyklusregulation, Medikamentenresistenz und Hypoxietoleranz involviert ist (Kenneth et al. 1996) und als Transkriptionsfaktor agieren kann. Eine zentrale Funktion des p53-Proteins ist die Steuerung des Zellzyklus und die Apoptoseeinleitung über DNA-Bindung. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass es funktionelle p53 Bindungsstellen in den Promotoren von Zellzyklus- und Apoptosegenen gibt, beispielsweise wurde publiziert, dass p21/WAF1/CIP1 im Promotor zwei p53 Bindungsstellen haben (Morris et al. 1996; Harper et al. 1993; El-Deiry et al. 1993). Desweiteren wurde nachgewiesen, dass der Anstieg von p53 im zeitlichen Zusammenhang mit der Verminderung der DNA-Synthese steht, die nach Bestrahlung von Zellen mit γ -Strahlen oder UV-bedingter DNA-Schädigung eintritt (Wang et al. 1995; Kastan et al. 1992; Lu et al. 1993; Kastan et al. 1991). Es wird vermutet, dass der p53 induzierte G1-Arrest einer Zelle die DNA-Reparatur erlaubt. Dies stellt einen möglichen Mechanismus dar, über den p53 an der genomischen Stabilität und der Verhütung der Tumorentstehung beteiligt sein könnte (Kuerbitz et al. 1992). Neuere Daten zeigen eine direkte Interaktion von p53 mit Proteinen oder Promotoren, die in die DNA-Reparatur involviert sind (Tanaka et al. 2000).

2. Regulation des hMSH2 Promotors als Reaktion auf UV-Schäden

Die vorliegende Arbeit zeigt einen funktionellen Zusammenhang zwischen UV Schäden und dem Mismatch-Reparatur-System. Wang et al. (1999) konnten

nachweisen, dass MutS α spezifisch an DNA-Schäden, die durch UV-Licht erzeugt wurden bindet. Weitere Studien belegen einen ähnlichen Effekt, indem sie zeigen, dass die Erkennung von DNA-Schäden, welche durch UV-Bestrahlung hervorgerufen wurden bei Bakterien und beim Menschen durch das MMR-System geleistet wird (Feng et al. 1991; Mu et al. 1997). Weiterhin konnte ein direkter Bezug zwischen UV-DNA-Schäden und der Bindung von MutS α an diese Stellen nachgewiesen werden (Mu et al. 1997). In einer kürzlich veröffentlichten Studie an XPA^{-/-} und MSH2^{-/-} Mäusen wurde gezeigt, dass Defizienz im MSH2-Protein mit einer hohen Rate an spontanen und UVB-induzierten Hauttumoren einhergeht. Außerdem konnten die Autoren einen Mechanismus beschreiben, bei dem MSH2 und XPA, das Xeroderma pigmentosa group A Protein, einen additiven Effekt in Bezug auf UV-bedingte Hautschäden haben (Yoshino et al. 2002). Xeroderma pigmentosa (XP) ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die durch eine extrem hohe Sensitivität der Haut gegenüber Sonnenlicht charakterisiert ist und eine Prädisposition zu Hauttumoren in sonnenexponierten Arealen darstellt. Der zugrunde liegende genetische Defekt liegt im Nukleotid-Exzissions-Reparatur-System, NER-System. Unabhängig hiervon konnte die hohe Rate an Hauttumoren in MSH2^{-/-} Mäusen auch von einer zweiten Arbeitsgruppe bestätigt werden (Meira et al. 2002), die ebenfalls eine Interaktion von Proteinen des NER-Pathways vermuteten. In der Reparatur von Holliday-Junctions, welche durch Rekombination, Replikation, DNA-Reparatur oder aber Folge von DNA-Schäden entstehen, wurde ein Synergismus zwischen P53 und dem Heterodimer aus hMSH2-hMSH6 nachgewiesen (Subramanian and Griffith, 2002). Interessanterweise wurde gezeigt, dass nach einem Methylierungsschaden p53 methyliert wird (Duckett et al. 1999). Diese Phosphorylierung funktioniert aber nur dann, wenn hMutS α und hMutL α in der Zelle vorhanden sind. In Mismatch-Reparatur defizienten Zellen konnte die Phosphorylierung nicht nachgewiesen werden. Dies zeigt ebenfalls, dass p53 und hMSH2 funktionell in vivo interagieren. Diesen Befund der p53/hMSH2-Interaktion interpretiert man als initialen Schritt der „Schadens-Signal-Kaskade“, als Checkpoint des Zellzyklus oder als Apoptoseaktivator als Antwort auf DNA-Schäden. Fishel postulierte 1999 die Einbeziehung der Mismatchreparaturgene in die Apoptoseinduktion. Abhängig vom der Art des gebundenen Adenosinphosphates, ATP oder ADP, initiiert das Heterodimer aus hMSH2 und hMSH6, hMutS α , die DNA-Reparatur durch Aktivierung weitere Proteine. Bei Abwesenheit solcher Zielproteine oder bei einem zu großen DNA-Schaden leitet hMutS α die Apoptose ein. Die Bedeutung von MMR-Genen bezüglich strahleninduzierter DNA-Schäden und auch deren Abhängigkeit von MSH2 konnte mehrfach nachgewiesen werden. Die Induktion dieser Gene zur Reparatur der Strahlenschäden war jedoch unbekannt. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion zwischen der UV-Schadenskaskade und dem Mismatch-Reparatur-System besteht.

3. DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle

P53 ist ein Transkriptionsfaktor mit offensichtlich multiplen Funktionen. Es wird durch genotoxischen Stress induziert (Stabilisierung des Proteins) und bewirkt entweder G1/S-Arrest oder, bei starker Expression in bestimmten Zelltypen (z.B. Thymozyten), Apoptose. Der G1/S-Block hat zwangsläufig zur Folge, dass präreplikative Reparatur verstärkt ablaufen kann, so dass prämutagene Mutationen sich nicht etablieren können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass p53 durch Förderung des DNA-Doppelstrangbruch-Rejoinings (Tang et al. 1999) auch direkt an der DNA-Reparatur beteiligt ist. P53 wird außerdem für die globale genomische NER benötigt (Ford und Hanawalt 1997; Smith et al. 2000; Ford et al. 1998) und soll sowohl Exonukleaseaktivität (Mummenbrauer et al. 1996), als auch Rad51 Bindungsaktivität (Süsse et al. 2000) aufweisen. Vor kurzem konnte interessanterweise gezeigt werden, dass das MMR-System wichtig für die Aktivierung des S-Phasen Kontrollpunktes als Folge von ionisierender Strahlung ist (Brown et al. 2003).

4. Kooperation von p53 und c-Jun in der Aktivierung von hMSH2

Vorliegende Arbeit konnte erstmals zeigen, dass p53 an der Regulation der Mismatch Reparaturgene beteiligt ist, wodurch es abermals als Transkriptionsfaktor charakterisiert wird, was seiner Genstruktur entspricht. Die Hypothese für die Notwendigkeit eines Kofaktors wurde evident, da selbst bei hohen Dosen an p53 ohne eine gleichzeitige Bestrahlung keine Aktivierung von MSH2 zu sehen war. Die Analyse der Promotorregion von MSH2 lässt zwei AP-1 Bindungsstellen erkennen, welche das p53-Motiv direkt flankieren. Es handelt sich hierbei um klassische AP-1 Bindungsstellen, welche die Erkennungssequenz für den ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktor c-Jun darstellen. AP-1 wird speziell nach UV-Bestrahlung als eines der ersten Gene hochreguliert und posttranslational modifiziert (Herrlich et al. 1994, Wilhelm et al. 1995). Speziell in der Haut spielt AP-1 eine wichtige Rolle (als Übersicht siehe: Angel et al. 2002). Durch Verwendung von TAM67, einer dominant negativen Variante von c-Jun, die in der Lage ist dessen Transaktivierungsdomäne zu blockieren und somit dessen Transkriptionsfaktorfunktion zu blockieren, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass c-Jun essentiell für die Transkription von MSH2 ist. Nach Transfektion des TAM67 Expressionsplasmids war der Expressionsanstieg von MSH2 vollständig blockiert. Die Transfektion eines c-Jun Expressionsplasmids führte in Abwesenheit von p53 zu einem verminderten Anstieg der MSH2-Expression. Nur die zelluläre Anwesenheit und Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren, c-Jun und p53, führt zu einem vollständigen Anstieg der zellulären Konzentration von MSH2. Somit ist die Interaktion von beiden Systemen für die Transkription von MSH2 von entscheidender Bedeutung.

Die Induktion von Reparaturgenen über AP-1 konnte bereits schon bei anderen in die Reparatur involvierte Genen gezeigt werden. Eines der am besten untersuchten induzierbaren DNA-Reparaturgene ist MGMT. Für dieses Gen wurde gezeigt, dass sowohl AP-1 (Boldogh et al. 1998) als auch p53 in dessen Regulation (Grombacher et al. 1998) involviert sind. Für ERCC-1, das älteste klonierte DNA-Reparaturgen, wurde ebenfalls eine Induktion über AP-1 nachgewiesen (Li et al. 1999). Schließlich konnte auch für die apurinische Endonuklease (APE/Ref-1) eine Induktion über ATF-2 und Jun gezeigt werden (Grösch und Kaina 1999).

Eine Verbindung zwischen c-Jun und p53 konnte in der Regulation der Zellproliferation und des Zellzyklus gezeigt werden (Schreiber et al. 1999). Bei Abwesenheit von c-Jun steigt der basale Level von P53 an, was zu einer verminderten Proliferationsrate führt. Umgekehrt reguliert eine c-Jun Überexpression die p53 Expression herunter, was vermuten lässt, dass c-Jun seine zellregulatorische Aktivität durch Repression von p53 ausübt. Dieser Befund einer negativen Interaktion von p53 und c-Jun scheint auf den ersten Blick widersprüchlich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu sein, jedoch ist es zellphysiologisch sehr wahrscheinlich, dass diese negative Interaktion eine Art Sicherheitsmechanismus darstellt um einer lang anhaltenden Überexpression von c-Jun und p53 zu begegnen und damit Zellzyklusarrest, Apoptose oder Zellproliferation zu kontrollieren (Kinzler und Vogelstein 1996). Eine UV-induzierte Expression von MSH2 wird nur möglich, wenn sowohl p53 als auch c-Jun in einem ausgeglichenen zellulären Verhältnis vorliegen. Diese Interpretation stimmt mit unseren Ergebnissen überein, da nur bei Vorhandensein von 10 ng des p53-Expressionsplasmides eine MSH2-Induktion erfolgt. Eine Erhöhung der Menge von p53, auch in Anwesenheit von c-Jun, führte nicht zu einem Expressionsanstieg von MSH2. Ähnliche Resultate wurden bei Verwendung des c-Jun Expressionsplasmids erzielt.

In der Zwischenzeit konnten klinische Studien die Kooperation von p53 und hMSH2 bestätigen. Bei Lungenkarzinomen konnte gezeigt werden, dass bei den Tumoren, die noch WT p53 enthielten, eine normale hMSH2-Expression zu finden war. Tumore, die mutiertes p53 aufwiesen, zeigten eine deutliche Reduktion von hMSH2 (Xinarianos et al. 2002). Eine weitere Arbeit an kolorektalen Karzinomen konnte eine positive Korrelation zwischen p53 Status, MSI und dem MMR Expressionsprofil feststellen (Valentini et al. 2002).

Das zellbiologische Phänomen der Induktion eines Reparaturgenes durch p53 stimmt mit Ergebnissen einer Arbeit überein, die zeigen konnte, dass p53 ein Aktivator einer Untereinheit der Ribonukleotidreduktase ist, ein Enzym das den limitierenden Schritt in der Produktion von dNTP's darstellt, welche nicht nur für die Replikation, sondern auch für die DNA-Reparatur gebraucht werden. Die

p53-regulierte Untereinheit zeigte sich als der entscheidende und limitierende Faktor (Tanaka et al. 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass p53 und MSH2 in der G1- und S-Phase kolokalisieren, in der S-Phase zusätzlich auch mit dem Rekombinationsüberwacher BRCA1. Dieses verstärkt sich wenn die Zellen bestrahlt werden. Zusätzlich zeigten sich signifikante Kolokalisationen mit Rad50 und Rad51 (Zink et al. 2002). Wang et al. zeigten, dass die Tumorsuppressoren BRCA1 und BARD1 direkt mit hMSH2 und hMSH6 interagieren (2001). BRCA1 Mutationen finden sich in einem hohen Prozentsatz in vererbten Ovarial- und Brusttumoren (Futreal et al. 1994). Biochemische Analysen zeigen die duale Rolle von BRCA1 als Teil der DNA-Reparatur und der Transkriptionsregulation (Wang et al. 2000).

Ein kompletter Verlust von MSH2 führt zu einer erhöhten Disposition für Tumore, vor allem Dickdarmkarzinome, Lymphome, Endometriumkarzinome und Hauttumore (de Wind et al. 1995; Reitmair et al. 1995; Smits et al. 2000). Das DNA Mismatch-Reparatursystem sorgt für die genomische Stabilität und Integrität. Defekte in Komponenten dieses Systems wie z.B. bei MSH2 oder MLH1 resultieren in einer erhöhten Mutationsrate (Kolodner et al. 1999). Die Beziehung zwischen MMR-System und Tumorentwicklung ist beim HNPCC-Syndrom, bei dem Mutationen in MSH2 und MLH1 für mehr als 80% der Fälle verantwortlich sind bestens beschrieben (Aaltonen et al. 1994). Durch die vorliegende Arbeit sind auch Expressionsverluste von MSH2 durch Mutationen an den Bindungsstellen von p53 und/oder c-Jun in der MSH2-Promotorregion, welche die Transkription von MSH2 verhindern bzw. Erschweren als Ursache des Tumoraufretens denkbar.

5. Modell der Interaktion von p53 und c-Jun in der Aktivierung von hMSH2

Die vorgestellten Daten stimmen mit Befunden überein, die zeigen, dass Mismatchreparaturkomplexe in die Reparatur UV-bedingter Strahlenschäden sowie in die Zellantwort auf zytotoxischen und genotoxischen Stress involviert sind. Ebenso passen sie zu Ergebnissen, die Mismatchreparaturgene als Aktivatoren oder Initiatoren der Apoptose beschreiben. Das nachfolgende Modell beschreibt zusammenfassend die vorbeschriebene neue Interaktion zwischen p53, c-Jun und hMSH2 (Abb. 37). Es zeigt die Notwendigkeit der beiden Transkriptionsfaktoren p53 und c-Jun für die Aktivierung des Mismatchreparaturgens hMSH2. Nach einem initialen Strahlenschaden wird c-Jun phosphoryliert und bindet als Dimer mit einem zweiten Molekül c-Jun an die im Promotor vorhandene AP-1 Bindungsstelle.

Für p53 existiert eine ähnliche Reaktionskaskade. Nach einem Schaden erfolgt auch hier eine Phosphorylierung, welche p53 stabilisiert und durch Blockade der MDM2 Bindung vor Abbau schützt. Im Anschluss an die Stabilisierung kommt

es zu einer Zusammenlagerung von zwei Dimeren, so dass p53 dann als Tetramer an die p53-Bindungsstelle anlagert. Diese Bindung in Kombination mit einer c-Jun Bindung an die AP-1 Stellen aktiviert die Transkription von hMSH2. Bei der bereits beschriebenen Interaktion ist es wichtig, dass p53 und c-Jun in einem ganz bestimmten Verhältnis zueinander in der Zelle vorhanden sind. Eine Überexpression von p53 resultiert ebenso wie eine Überexpression von c-Jun in einem Zellzyklusblock oder in der Apoptose. Diese fein abgestimmte Regulation geht mit der gefundenen Interaktion mit hMSH2 konform, indem dadurch die Zelle arretiert werden kann und ihr somit Zeit für die Reparatur verschafft wird. Sollte diese nicht möglich sein, so kann die Zelle nachfolgend in die Apoptose gehen. Über diese Interaktion wird die Stabilität und Integrität des Genoms gewährleistet.

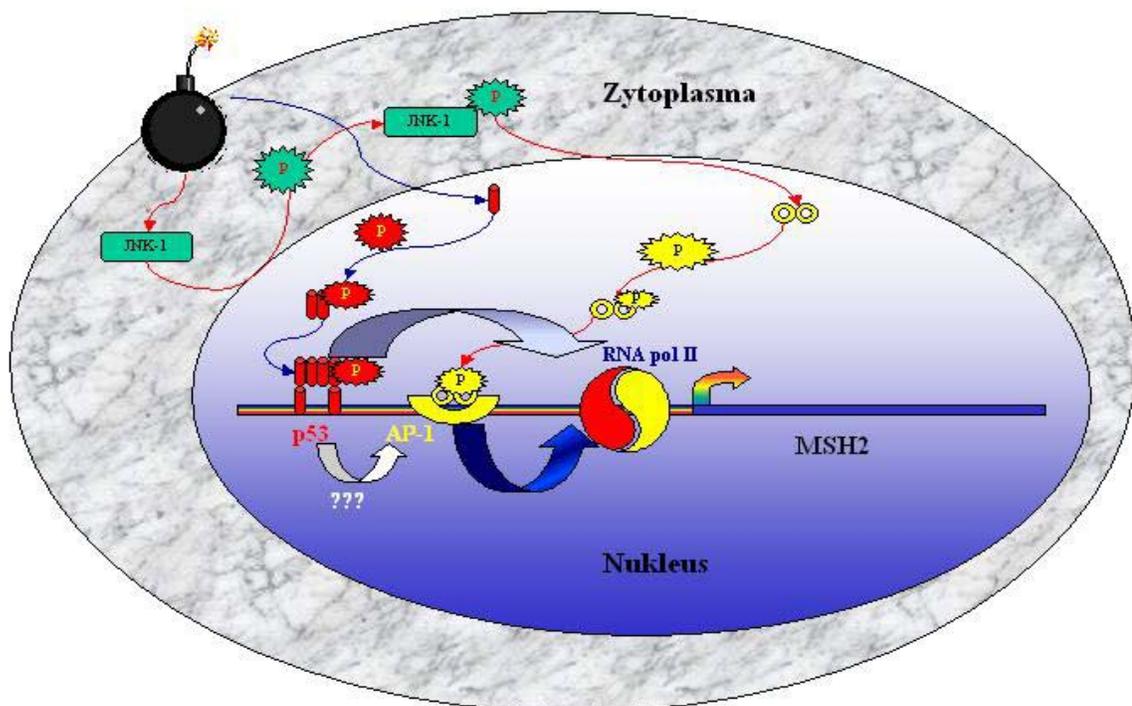


Abb. 40: Modell des funktionellen Synergismus zwischen p53, hMSH2 und c-Jun

6. Mismatch-Reparaturproteine als Proteine in der Apoptosesignalgebung

Insgesamt sind bisher 5 verschiedene DNA-Reparaturwege beschrieben. In allen konnten Proteine mit der dualen Rolle der DNA-Reparatur und des Apoptoseeinleitung identifiziert werden. Im Falle der homologen

Rekombinationsreparatur (HRR) sind dies z.B. BRCA1, ATM, ATR, WRN, BLM, Tip60 und p53. Beim „non-homologous end joining“ ist es die katalytische Untereinheit der DNA-PK und für die Nukleotid-Exzisions-Reparatur wurden XPB, XPD, p53 und p33^{ING1b} als Proteine mit dualer Funktion charakterisiert. Beim System der Basenexzision sind Ref-1/Ape, poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) und p53 präsent. Im Falle des MMR-Systems wurde MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2 eine duale Rolle zugeschrieben.

Die Analyse von MSH2 auf RNA- und Proteinebene zeigte eine zeit- und dosisabhängige Expression des Proteins. Auffällig war ein sowohl auf RNA- als auch Proteinebene undulierender Expressionsverlauf. Bis zu einer gewissen Strahlendosis steigt die MSH2-Menge an, zeigt dann einen Einbruch und erfährt einen Wiederanstieg in stark bestrahlten Zellen. Durch mehrere experimentelle Methoden konnte gezeigt werden, dass bei stark bestrahlten Zellen Apoptose und keine Reparatur stattfindet.

Im Laufe der letzten Jahre wurde immer deutlicher, dass die Korrektur fehlgepaarter Basen nicht die einzige Aufgabe des MMR-Systems ist. Weitere andere Funktionen sind die Prozessierung des DNA-Schadens, welcher durch physikalische oder chemische Agenzien hervorgerufen werden kann und die nachfolgende Induktion der Apoptose. Erste Hinweise hierfür kamen durch Beobachtungen einer Resistenz MMR-defizienter Bakterien gegenüber normalerweise tödlichen Substanzen wie MNU (N-methyl-N-nitrosourea) und MNNG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine) welches O⁶-Methylguanin produziert (Jones et al. 1981; Karran und Marinus 1982). Säugetierzellen, die defizient für MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2 sind, zeigten eine Resistenz gegenüber 6-TG (6-thioguanine), Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II) und γ -Strahlung (Buermeyer et al. 1999; Drummond et al. 1997; Modrich 1997). Eine Komplementation durch Transfer der Chromosomen für MSH2, MSH6 und MLH1 stellte die wildtypische Apoptosefunktion wieder her (Aquilina et al. 2000; Koi et al. 1994; Umar et al. 1997). Die Rolle von MSH3 in diesem Prozess ist weniger evident, denn MSH3-defiziente Zellen zeigen keine Resistenz gegenüber alkylierenden Substanzen oder 6-TG (de Wind et al. 1999; Hinz et al. 1999). Da einige dieser Substanzen und Derivate davon auch klinisch als Chemotherapeutika verwendet werden, ist es von besonderem Interesse, die Resistenzentwicklung gegenüber diesen Substanzen zu verstehen. MMR-defiziente Zellen zeigen Resistenzen gegenüber Umweltgiften wie polyzyklischen aromatischen Kohlenstoffen und aromatischen Aminen (Wu et al. 1999).

Ein weiterer Aspekt ist der „Toleranzphänotyp“ (Goldmacher et al. 1986). Dieser ist dadurch gekennzeichnet, dass Zellen Resistenz gegenüber der Zytotoxizität von O⁶-MeG in der DNA und damit gegenüber methylierenden Agenzien gewinnen, ohne dass es zu einer Aktivitätssteigerung der MGMT

kommt. Es wird angenommen, dass es durch wiederholte Versuche der MMR, diese Läsion zu reparieren, im 2. Zellzyklus zur Entstehung von DNA-Strangbrüchen und zum Tod der Zelle kommt (Karran und Bignami 1992; Kaina et al. 1997). Für MMR-defiziente Zellen wurden Defekte in der DNA-Schaden induzierten Apoptose mittlerweile schon mehrfach beschrieben (Brown et al. 2003; Carethers et al. 1996; Hawn et al. 1995; Yan et al. 2001). Damit wurden immer mehr Hinweise gefunden, die den Verdacht nahe legen, dass MMR nicht nur zur Reparatur fehlgepaarter Basen beiträgt, sondern auch eine Möglichkeit ist die DNA-Schadensinduzierte Apoptose zu aktivieren (Buermeyer et al. 1999). Studien an MMR defizienten Zelllinien von HNPCC-Tumoren und „knockout“ Mäusen zeigten ebenfalls den Verlust der Apoptose als Reaktion auf DNA schädigende Agenzien. In Zusammenschau dieser Beobachtungen ist es sehr wahrscheinlich, dass die erhöhte Mutationsrate und akzelerierte Tumorgenese eine Folge des kompletten Verlustes des MMR-Systems als Kombination der defizienten Reparatur und Apoptose ist (Fishel et al. 2001).

Die Mechanismen der Toleranz gegenüber DNA-schädigenden Substanzen scheinen zwischen Bakterien und Säugern unterschiedlich zu sein. Für das bakterielle System wird ein Modell angenommen, das einen DNA-Schaden auf dem Template Strang als Initiator der MMR-Maschinerie darstellt. Diese macht mehrere vergebliche Reparaturrunden („futile repair cycles“) und resynthetisiert den unmodifizierten Strang während der Schaden bestehen bleibt (Karran et al. 1982). Solch ein Zyklus führt zu einer Fehlfunktion und somit zu einem letalen DSB (als Übersicht siehe Fishel 2001). In Abwesenheit des MMR-Systems werden die Läsionen am Templatestrang toleriert und der Zelle erlaubt zu überleben (Karran et al. 1992).

Menschliche MMR-defiziente Zellen zeige eine ähnliche Toleranz, jedoch scheinen die Mechanismen unterschiedlich zu sein. D'Atri und Mitarbeiter konnten zeigen, dass nach der Behandlung von MutS α -defizienten und wildtypischen Zellen mit verschiedenen Agenzien, nur die wildtypischen Zellen programmierten Zelltod durchführten (D'Atri et al. 1998). Auch MutL defiziente Zellen zeigen den gleichen Effekt. Dies bestätigt gleichzeitig, dass die MMR-abhängige Apoptose nicht allein von MutS-Homologen sondern auch von mutL-Homologen abhängt (Wu et al. 1999). Ein weiterer Befund, der dies stützt ist die Tatsache, dass die Überexpression von MSH2 und MLH1 Apoptose induzieren (Zhang et al. 1999). Auch durch in vivo Studien konnte die Implikation von MSH2 in das Apoptosesignaling gezeigt werden. MSH2-Defizienz erhöhte die Resistenz gegenüber 1,2-Dimethylhydrazine induzierter Apoptose in Kryptenzellen des Dünn- und Dickdarms (Colussi et al. 2001). Die Frage die sich stellte war, welcher Mechanismus diesem Prozess in eukaryotischen Zellen zugrunde liegt.

Wie bereits besprochen, gibt es mindestens 2 Modelle für die Funktion des

MMR-Systems, das Translokationsmodell und die „Hydrolysis Sliding clamp“. Modrich und Kollegen gehen davon aus, dass die ATP-Bindung an MSH2-MSH6 und nachfolgende Hydrolyse notwendig ist für die Bildung des Translokationsloops der DNA (Blackwell et al. 1998). Das Alternativmodell von Fishel und Mitarbeiter beschreibt den MSH2-MSH6 Komplex als in ADP Form vorliegend. Durch die Bindung zu fehlgepaarten Basen erfolgt ein Austausch von ADP zu ATP (Fishel 1998; Gradia et al. 1997). Daraus resultiert eine Konformationsänderung und folglich ein Entlanggleiten des Komplexes an der DNA. Die Hydrolyse von ATP wird als erster Schritt zur Aktivierung von nachgeschalteten Faktoren und anderen Reparaturproteinen mit gleichzeitigem Recycling des MSH2-MSH6-Komplexes angesehen, der dann für eine neue Bindung an die DNA zur Verfügung stünde gesehen. Eine mögliche Erklärung und Bestätigung dieses Modells ist die Annahme, dass durch Konformationsänderung Proteinbindungsstellen frei werden, die vorher maskiert waren. Die momentan verfügbare Datenlage geht von der Tatsache aus, dass MSH2-MSH6 und MSH2-MSH3 zusammen mit MLH1-PMS2 essentiell für den Reparaturweg und MSH2-MSH6 und MLH1-PMS2 für den Apoptoseweg notwendig sind (Fishel 2001).

Geht man davon aus, dass das Translokationsmodell (Modrich et al. 1996) eine sehr realitätsnahe Beschreibung darstellt, so würden DSB zur Initiation von Apoptose führen. Es konnte aber gezeigt werden, dass DSB über p53-abhängige Wege repariert werden (Kastan et al. 1991). Es besteht nun sicherlich noch die Möglichkeit, dass auch p53-unabhängig die Apoptose eingeleitet werden kann. Das 2. Modell, die „Sliding clamp“ (Fishel et al. 1998), stellt ein alternatives Modell dar. Dieses Modell geht davon aus, dass MutS α in einer ADP-Form an der DNA entlang gleitet und durch einen Mismatch ein Austausch zu ATP erfolgt. Wenn keine Reparatur stattfindet so häufen sich MutS α -ATP-Aggregate auf der DNA. Diese wiederum aktivieren dann konzentrationsabhängig weitere Faktoren, die zum Apoptoseprogramm umschalten.

Zum derzeitigen Zeitpunkt ist es nicht komplett klar welchen apoptotischen Weg das MMR-System anschaltet oder dabei eine Rolle spielt. Es gibt mehr und mehr Daten, die zeigen, dass p53 in die MMR-assoziierte Apoptose involviert ist. Jedoch ist auch eindeutig gezeigt worden, dass neben dem p53-abhängigen Apoptoseweg auch p53-unabhängige existieren (Toft et al. 1999; Wu et al. 1999). Weiterhin konnte Gong und Mitarbeiter zeigen, dass p53 in der MMR-abhängigen Stressreaktion auf Cisplatin nicht induziert wird, jedoch wurde p73 eindeutig induziert, was von der Anwesenheit von MLH1 und der c-Abl Tyrosinkinase abhing (Gong et al. 1999).

7. Zelluläre Lokalisation von hMSH2

Die Komplexität der beschriebenen Interaktionen bedingt eine hohe funktionelle Variabilität des Proteins und eine zelluläre Beweglichkeit. In unbestrahlten Zellen findet man das Protein in Nukleus und auch in geringerer Konzentration im Zytoplasma. Werden die Zellen bestrahlt, so erfolgt eine Translokation in den Nukleus, die bis zu 75J/m^2 eindeutig beobachtet werden kann. Diese Translokation wurde auch beobachtet nach Applikation von MNNG, was die Induktion von O^6 -Methylguanin zur Folge hat und somit ein potente DNA-Schädigung darstellt (Christmann et al. 2000). Auch konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass es ein dosisabhängiges Phänomen ist von längerer Dauer, was gleichzeitig mit einer höheren G/T-Mismatch-Bindungsaktivität verbunden war. Somit konnte gezeigt werden, dass die Translokation in den Nukleus Voraussetzung für die Reparatur ist und die Konzentration im Zellkern dosisabhängig ansteigt. Die Befunde dieser Arbeit stimmen mit diesen Daten sehr gut überein.

Überraschenderweise lies sich zeigen, dass in sehr stark geschädigten Zellen eine Translokation ins Cytoplasma erfolgt. Wie auch gezeigt werden konnte ist bei diesen Strahlendosen keine Reparatur mehr möglich und die Zellen gehen nachweislich in die Apoptose. Der immunologische Nachweis des MSH2-Proteins ist ein recht sensibles Verfahren und kann mit dem gleichzeitigen Anfärben des Nukleus durch DAPI deutliche Hinweise auf die Lokalisation eines Proteins geben. Da bei sehr stark bestrahlten Zellen MSH2 wieder im Zytoplasma vorhanden ist, liegt der Verdacht nahe, dass es sich hierbei um einen möglichen Mechanismus handeln könnte, wie Apoptose von MSH2, bzw. allgemein den MMR-Proteinen induziert werden könnte. Da sich in den stark geschädigten Zellen kein nukleäres Material außerhalb des Kern nachweisen lässt, ist auch eine mögliche Membranschädigung als Grund für das zytoplasmatische Vorkommen eher unwahrscheinlich.

Eine Möglichkeit wie durch MMR-Proteine Apoptose ausgelöst werden kann, ist der mitochondriale Weg. Hierzu zeigen die Ergebnisse zur Regulation von BCL-2 und BAD einen guten Ansatzpunkt. Das antiapoptotische BCL-2 wird deutlich herunterreguliert, wohingegen das proapoptotische BAD-Protein ansteigt. Die Ergebnisse können so interpretiert werden, dass nach versuchter aber erfolgloser Reparatur die Apoptoseeinleitung erfolgt. Eine persistierender DNA-Schaden erfordert MSH2 und dessen Partner im Nukleus. Ist der Schaden jedoch zu groß, so kann es zu einer Translokation von MSH2 ins Zytoplasma und damit zu einer Aktivierung der Apoptoseprozesse kommen.

Die genomische Integrität ist konstant unter Gefahr durch Umweltfaktoren, genotoxische Agenzien, endogene Fehlerraten etc. Die Prävention des

dauerhaften DNA-Schadens erfordert die ständige Aktivität des DNA-Reparatursystems, der Zellzykluskontrolle, Transkriptionsregulation und der Apoptosepathways. In dieser Arbeit konnte erstmals eine direkte Interaktion eines Reparaturgens mit dem Tumorsuppressorgen p53 nachgewiesen werden. Die Daten stimmen mit Befunden überein, die zeigen, dass Mismatchreparaturkomplexe in die Reparatur UV-bedingter Strahlenschäden sowie in die Zellantwort auf cyto-/genotoxischen Streß involviert sind. Ebenso gehen sie konform mit Ergebnissen, die die Mismatchreparatur Gene als Aktivatoren oder Initiatoren der Apoptose beschreiben.

V. Zusammenfassung

Das menschliche *MHS2* Gen ist eine sehr gut charakterisierte Komponente des Mismatch-Reparatur-Systems (MMR) und häufig mit der HNPCC Erkrankung assoziiert. Der Mechanismus über den *MSH2* an der Karzinomentwicklung beteiligt ist, sind Defekte in der DNA-Reparatur. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in den kodierenden Regionen dieses Gens direkt in die Mikrosatelliteninstabilität involviert sind. Generell ist *MSH2* ein Teil des postreplikativen Reparatursystems der Zellen, und schützt so vor der Akkumulation von Mutationen. Dadurch wird die genetische Stabilität und Integrität gewährleistet. Ein anderer Teil der zellulären Krebsabwehr ist das *p53* Tumorsuppressorgen. Ein möglicher DNA Schaden, der in der Lage ist, *p53* zu aktivieren, ist UV-Licht. Eine weitere gut charakterisierte Komponente der zellulären UV Reaktion ist der Transkriptionsfaktor c-Jun.

Ziel der Arbeit war es die Regulation und Signalfunktion von *MSH2* näher zu charakterisieren. Dazu wurde der Promotor des Gens in ein Luziferase Promotorgenkonstrukt kloniert. Dieses Konstrukt wurde in menschliche Keratinozyten transfiziert, die nachfolgend mit UV bestrahlt wurden. Es konnte eine zeit- und dosisabhängige Hochregulation von *MSH2* gezeigt werden. Diese Transkriptionserhöhung wurde von *p53* initiiert, denn durch eine gezielte Mutation der *p53*-Bindungsstelle im *MSH2* Promotor war dieser Effekt vollkommen aufgehoben. Interessanterweise war dieser Effekt von einem zusätzlichen Faktor abhängig, ohne den keine Hochregulation erkennbar war. Verantwortlich hierfür war der Transkriptionsfaktor c-Jun. Dadurch konnte eine funktionelle Interaktion von *p53* und c-Jun in der transkriptionellen Aktivierung von *hMSH2* gezeigt werden. Dieser zeit- und dosisabhängige Effekt war sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene nachvollziehbar. Der größte Anstieg war bei 50 J/m^2 zu verzeichnen, wohin gegen bei Verwendung von 75 J/m^2 die Transkriptmenge geringer wurde, um bei 100 J/m^2 erneut anzusteigen. Um diesen erneuten Anstieg des Proteins näher zu beschreiben wurden bei den stark bestrahlten Zellen TUNEL-Untersuchungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Menge an *MSH2* Protein und an TUNEL-positiven apoptotischen Zellen. Um weiter zu zeigen, dass der zweite Anstieg des Proteins nicht mit einer Reparaturfunktion verbunden ist, wurde ein biochemisch basierter Test durchgeführt, welcher die Reparaturkapazität semiquantitativ beschreibt. Dabei konnte klar gezeigt werden, dass die mit 100 J/m^2 bestrahlten Zellen keine Reparaturfunktion mehr erfüllen. FACS-Analysen und Zellfärbungen gegen Annexin V und mit Propidiumiodid bestätigten die stattfindende Apoptose in den Zellen. Eine weitere Komponente des MMR-Systems ist *MSH6*. *MSH6* bildet mit *MSH2* ein Dimer, welches den Fehler in der DNA erkennt und das weitere Reparaturprogramm einleitet. Die Expression dieses Proteins konnte nur bis zu einer Dosis von $50\text{-}75 \text{ J/m}^2$ UV nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu *MSH2* war *MSH6* nicht in 100 J/m^2 bestrahlten

Keratinocyten detektierbar. Um über die Lokalisation dieser Proteine mehr zu erfahren wurden Immunfärbungen gegen MSH2 durchgeführt. Es zeigte sich eine Translokation des Proteins vom Kern in das Zytoplasma in Korrelation zum zunehmenden DNA-Schaden durch höhere Dosen an UV-Licht. Dies stellt eine mögliche Verbindung zwischen dem Mismatch-Reparatursystem und apoptotischen Signalwegen dar.

Diese Arbeit zeigt, dass die zellulären Funktionen des Mismatchreparatur Gens/Proteins sehr fein reguliert sind und je nachdem ob die Reparatur- oder die Apoptosefunktion benötigt wird eine zelluläre Translokation stattfinden kann.

VI. VI. Summary

MSH2 is a well-characterized component of the DNA mismatch repair system (MMR) frequently associated with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC). The mechanism of MSH2-induced cancer is via defects in DNA mismatch repair. Mutations in the coding region of the human gene (hMSH2) have been shown to be directly involved in microsatellite instability in HNPCC. The MSH2 gene is part of the post-replicative mismatch repair system that prevents the accumulation of spontaneous mutations, and thereby ensures the integrity and stability of the genome. Another component of the cancer prevention machinery is the p53 tumor suppressor. A relevant stress that activates p53 is UV-light. Another well known component of the mammalian UV response is the transcription factor c-Jun.

To study the stress regulation and signaling function of hMSH2, we cloned the promoter region of hMSH2 in a luciferase reporter gene construct. This construct was transfected in human keratinocytes. The cells were then irradiated with UV light. A time and dosage dependent upregulation of hMSH2 was seen. The transcription of the human mismatch repair gene was activated by p53. This activation was lost upon mutation of the p53 binding site. Interestingly this upregulation critically depends on functional interaction of p53 with c-Jun in the transcriptional control of the hMSH2 promoter. The same effect was seen in analyses of the endogenous hMSH2 gene on the RNA level as well as on the protein level. The highest hMSH2-expression was seen at 50 J/m². At 75 J/m² the hMSH2 expression level decreased. Surprisingly, at 100 J /m² hMSH2 expression increased again. The same dosage dependent function was seen on the protein level. To address the question of a second function of hMSH2 in cells irradiated at high dose, TUNEL-assays were performed. A positive correlation between the level of hMSH2 protein and the number of apoptotic cells was found. To study the repair function of hMSH2 in highly irradiated cells, we used a biochemical mismatch repair assay system. Cells treated with high dosage of UV showed no repair activity in contrast to non-irradiated cells. Annexin V staining and FACS analysis confirmed the apoptotic status of these cells. It is well-known that hMSH6 is necessary for dimer formation with hMSH2 (MutS α) to detect DNA mismatches. So far there are little data on a possible involvement of hMSH6 in apoptosis. Therefore was performed an analysis of hMSH6 protein levels in irradiated cells, revealed that hMSH6 was expressed at doses up to 50 – 75 J/m². In contrast no hMSH6 was detectable in UV-irradiated cells treated with 100 J/m². In addition fluorescence immuno labelling of MSH2 revealed the subcellular translocation of the protein from the nucleus to the cytoplasm in apoptotic cells. This effect may indicate a possible link between the mismatch repair system and apoptotic pathways.

These data indicate that a tight regulation of hMSH2 and hMSH6 protein levels is involved in cellular response to DNA damage and that the apoptotic function of MSH2 requires its cellular translocation.

VII. Abkürzungen, Einheiten und Symbole

A	Adenin
Abb	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumopersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Brphbl	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
cm	Zentimeter
cpm	Counts per minute
CRC	colorectal carcinoma (kolorektales Karzinom)
CTP	Cytosintriphosphat
DMF	N'N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribinuklease
dNTP	Desoxynukleotidyltriphosphat (A,T,C,G)
DTT	Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EZ	Eppendorfszentrifuge
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	fötale Serumalbumin
G	Guanosin
GIT	Gastrointestinaltrakt
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O dest	destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HNPCC	Hereditäre Nonpolypöse Colorectale Carcinome
i.d.R.	in der Regel
KCl	Kaliumchlorid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium

LJ	Lebensjahr
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mM	Milimolar
min	Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µCi	Mikro-Curie
mg	Miligramm
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N	Stickstoff
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
OD	optische Dichte bei 600nm
O/N	über Nacht (over night)
PBS	phosphate buffered saline
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
pmol	Picomol
RE	Restriktionsendonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer
T	Thymin
Tab	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris – Hydroxymethylaminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	Units
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolettes Licht

V_{\max}	maximale Geschwindigkeit
V	Volt
VE	Volumeneinheit
Wt	Wildtyp

VIII. Literaturverzeichnis

1. Aaltonen LA: Molecular epidemiology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Finland: Recent Results Cancer Res. **1998** 154: 306-11
2. Aaltonen LA, Sankila R, Mecklin JP, Jarvinen H, Pukkala E, Peltomaki P, de la Chapelle: A novel approach to estimate the proportion of hereditary nonpolyposis colorectal cancer of total colorectal cancer burden: Cancer Detect Prev **1994** 18: 57-63
3. Akiyama Y, Sato H, Yamada T et al.: Germline mutation of the hMSH6/GTBP gene in atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred : Cancer Res **1997** 57: 3920-3923
4. Alani, E: The Saccharomyces cerevisiae Msh2 and MSh6 proteins form a complex that specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs: Mol Cell Biol **1996** 16: 5604-5615
5. Al-Taie O, Mork H, Seufert J, Treis H, Jakob F, Scheuerlen M: Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC). Current review of etiology, clinical aspects, diagnosis and therapy: Med Klin. **2001** 96: 529-538. Review
6. Angel P, Karin M: The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation: Biochim Biophys Acta **1991** 1072: 129-157. Review
7. Angel P, Szabowski A: Function of AP-1 target genes in mesenchymal-epithelial cross-talk in skin: Biochem Pharmacol **2002** 64: 949-956. Review.
8. Aquilina G, Cecotti S, Martinelli S, Soddu S, Crescenzi M, Branch P, Karran P, Bignami M: Mismatch repair and p53 independently affect sensitivity to N-(2-chloroethyl)-N'-cyclohexyl-N-nitrosourea: Clin Cancer Res **2000** 6: 671-680.
9. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M: MDM2 expression is induced by wild type p53 activity: EMBO J. **1993** 12: 461-468
10. Blackwell LJ, Martik D, Bjornson ES, Modrich P.: Nucleotide-promoted release of hMutS from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism: J Biol Chem **1998** 273: 32055-32062
11. Boland CR, Troncale FJ: Familial colonic cancer without antecedent polyposis: Ann Intern Med **1984** 100: 700-701
12. Boldogh I, Ramana CV, Chen Z et al.: Regulation of expression of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signalling: Cancer Res **1998** 58: 3950-3956.
13. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreuz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line: J Cell Biol **1988** 106: 761-771
14. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: Anal Biochem. **1976** 72: 248-254
15. Brown, TA.: Gentechnologie für Einsteiger: Spektrum Akademischer Verlag: **1996**

16. Brown KD, Rathi A, Kamath R, Beardsley DI, Zhan Q, Mannino JL, Baskaran R: The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation: *Nat Genet* **2003** 33: 80-84
17. Buermeyer AB, Deschenes SM, Baker Sm, Liskay RM: Mammalian DNA mismatch repair: *Annu Rev Genet* **1999** 33:533-564. Review
18. Caelles C, Helmberg A, Karin M: p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target-genes: *Nature* **1994** 370: 220-223
19. Cawkwell L, Gray S, Murgatroyd H et al.: Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair: *Gut* **1999** 45: 409-415
20. Carr AM: Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle: *Science* **2000** 287: 1765-1766
21. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein BW: 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage: *Nature* **1999** 401: 616-620
22. Carethers JM, Hawn MT, Chauhan DP, Luce MC, Marra G, Koi M, Boland CR: Competency in mismatch repair prohibits clonal expansion of cancer cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: *J Clin Invest* **1996** 98: 199-206.
23. Chaves P, Cruz C, Lage P et al.: Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful tool for the identification of colorectal carcinoma with the mutator phenotype: *J Pathol* **2000** 191: 355-360
24. Chehab, NH, Malikzay A, Stavridi ES and Halazonetis TD: Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage: *Proc Natl Acad Sci* **1999** 96: 13777 – 13782
25. Chen PL, Chen Y, Bookstein R and Lee WH: Genetic mechanism of tumor suppression by the human p53 gene: *Science* **1990** 250: 1576 – 1580
26. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavlittich NP: Crystal structure of a p53 tumor suppressor DNA complex: understanding tumorigenic mutations: *Science* **1994** 265: 346-355
27. Christmann M, Kaina B: Nuclear translocation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 as a response of cells to alkylating agents: *J Biol Chem* **2000** 275: 36256-36262.
28. Cleaver JE, Layher SK: „If the shoe fits“: clues on structural recognition of DNA damage: *Cell* **1995** 60: 825-827
29. Colussi C, Fiumicino S, Giuliani A, Rosini S, Musini P, Macri C, Potten CS, Crescenzi M, Bignami M: 1,2-Dimethylhydrazine-induced colon carcinoma and lymphoma in msh2(-/-) mice: *J Natl Cancer Inst* **2001** 93: 1534-1540.
30. D'Atri S, Tentori L, Lacal PM, Graziani G, Pagani E, Benincasa E, Zambruno G, Bonmassar E, Jiricny J: Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis: *Mol Pharmacol* **1998** 54: 334-341.

31. de Wind N, Dekker M, Berns A, Radman M, te Riele H: Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer: *Cell*. **1995** 82: 321-330.
32. de Wind N, Dekker M, Claij N et al.: HNPCC-like cancer predisposition in mice through simultaneous loss of Msh3 and Msh6 mismatch-repair protein functions: *Nat Genet* **1999** 23: 359-362.
33. Diermann J, Hilgenfeld RU, Ewert A, Kuhly R, Henning FW: Hereditäre Tumorerkrankungen: *Berliner Ärzteblatt* **1994** 107: 391-394
34. Drummond JT, Li GM, Longley MJ, Modrich P: Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science* **1995** 268: 1909-1912.
35. Drummond JT, Genschel J, Wolf E, Modrich P: Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha: *J Biol Chem* **1998** 273: 19895-19901.
36. Duckett DR, Bronstein SM, Taya Y and Modrich P: hMutS α - and hMutL α -dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage: *Proc Natl Acad Sci* **1999** 96: 12384 – 12388
37. Dutta A, Ruppert JM, Aster JC, Winchester E: Inhibition of DNA replication factor RPA by p53: *Nature* **1993** 365: 79-82
38. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CAJ, Butel JS, Bradley A: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours: *Nature* **1992** 356: 215-221
39. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression: *Cell* **1993** 75: 817-825
40. Edelmann W, Yang K, Umar A et al.: Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility: *Cell*. **1997** 91: 467-477
41. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis: *Cell* **1990** 61:759-767
42. Feng WY, Lee EH, Hays JB: Recombinagenic processing of UV-light photoproducts in nonreplicating phage DNA by the Escherichia coli methyl-directed mismatch repair system: *Genetics* **1991** 129: 1007-1020
43. Fiorentini P, Huang KN, Tishkoff DX, Kolodner RD, Symington LS, Exonuclease 1 of *Saccharomyces cerevisiae* functions in mitotic recombination in vivo and in vitro: *Mol Cell Biol* **1997** 17: 2764-2772
44. Fishel R: Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction: *Genes Dev* **1998** 12: 2096-2101
45. Fishel R: Signalling mismatch repair in cancer: *Nature medicine* **1999** 11: 1239 – 1240
46. Fishel R: Signaling mismatch repair in cancer: *Nat Med* **1999** 5: 1239-1241.

47. Fishel R: The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis: *Cancer Res* **2001** 61: 7369-7374. Review
48. Ford JM, Hanawalt PC: Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts: *J Biol Chem* **1997** 272: 28073-28080
49. Ford JM, Baron EI, Hanawalt PC: Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation: *Cancer Res* **1998** 58:599-603
50. Freedman DA, Wu L, Levine AJ: Functions of the MDM2 oncoprotein: *Cell Mol Life Sci* **1999** 55: 96-107
51. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D et al.: BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas: *Science* **1994** 266: 120-122.
52. Genschel J, Littman SJ, Drummond JT, Modrich P, Isolation of MutS α from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutS β and MutS α : *J Biol Chem* **1998** 273: 19895-19901
53. Giaccia AJ, Kastan MB: The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals: *Genes Dev* **1998** 12: 2973-2983
54. Goldmacher VS, Cuzik RA Jr., Tilly WG: Isolation and partial characterization of human cell mutants differing in sensitivity to killing and mutation by methylnitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: *J Biol Chem* **1986** 261: 12462-12471.
55. Gong JG, Constanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG Jr, Levrero M, Wang JY: The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage: *Nature* **1999** 399: 806-809
56. Gradia S, Acharya S, Fishel R : The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch: *Cell* **1997** 91: 995-1005
57. Greene CN, Jinks-Robertson S: Frameshift intermediates in homopolymer runs are removed efficiently by yeast mismatch repair proteins: *Mol Cell Biol* **1997** 17: 2844-2850
58. Groden J, Thilveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen A, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M et al: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene: *Cell* **1991**: 66: 589-600
59. Grösch S, Kaina B: Transcriptional activation of apurinic/aprimidinic endonuclease (Ape, Ref-1) by oxidative stress requires CREB: *Biochem Biophys Res Commun* **1999** 261: 859-863
60. Grombacher T, Eichhorn U, Kaina B: p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents: *Oncogene* **1998** 17: 845-851.
61. Haber LT, Pang PP, Sobell DI, Mankovich JA, Walker GC: Nucleotide sequence of the *Salmonella typhimurium* mutS gene required for mismatch

- repair homology of MutS and HexA of *Streptococcus pneumoniae*: *J Bacteriol* **1988** 170: 197-202
62. Hainaut P, Hollstein M: p53 and human cancer: the first ten thousand mutations: *Adv Cancer Res* **2000** 77: 82-137
63. Hampson R, Humbert O, Macpherson P, Aquilina G, Karran P: Mismatch repair defects and O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression in acquired resistance to methylating agents in human cells: *J Biol Chem* **1997** 272: 28596-28606.
64. Hanahan D: techniques for transformation in *E. coli*. In Glover DM (ed.): DNA cloning – a practical approach, IL Press, Oxford, 109 – 135, **1985**
65. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ: The p21 Cdk-interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin dependent kinases: *Cell* **1993** 75: 805-816
66. Hawn MT, Umar A, Carethers JM, Marra G, Kunkel TA, Boland CR, Koi M: Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint: *Cancer Res* **1995** 55: 3721-3725.
67. He Z, Brinton BT, Grenblatt J, Hassell JA, Ingles CJ: The transactivator proteins VP16 and GAL4 bind replication factor A: *Cell* **1993** 73: 1223-1232
68. Hemminki JG, Markie D, Tomlinson I et al: A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome: *Nature*. **1998**: 391: 184-187
69. Herrlich P, Sachsenmaier C, Radler-Pohl A, Gebel S, Blattner C, Rahmsdorf HJ: The mammalian UV response: mechanism of DNA damage induced gene expression: *Adv Enzyme Regul* **1994** 34: 381-395. Review.
70. Hernandez-Boussard T, Rodriguez-Tome P, Montesano R, Hainaut P: IARC p53 mutation database: a relational database to compile and analyze p53 mutations in human tumors and cell lines. International Agency for Research on Cancer: *Hum Mutat* **1999** 14: 1-8
71. Hinz JM, Meuth M: MSH3 deficiency is not sufficient for a mutator phenotype in Chinese hamster ovary cells: *Carcinogenesis* **1999** 20: 215-220.
72. Hloch P: Die Genstruktur des menschlichen DEAD-Box-Proteins p68 und Untersuchungen zu seiner Expression sowie zur Charakterisierung der RNA-Bindeaktivität des Tumorsuppressor-Proteins p53; Shaker-Verlag, **1996**
73. Howe JR, Roth S, Ringold JC et al: Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis: *Science* **1998** 280: 1086-1088
74. Iccarino I, Marra G, Palombo F, Jirciny J: hMSH2 and hMSH6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutS α : *EMBO J* **1998** 17: 2677-2686
75. Jenne DE, Reimann H, Nezu et al: Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase: *Nat Genet* **1998** 18: 38-43
76. Johnson RE, Kovvali GK, Guzder SN, Amin NS, Holm C, Habraken Y, Sung P, Prakash L, Prakash S: Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair: *J Biol Chem* **1996** 271: 27987-27990

77. Jones M, Wagner R: N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine sensitivity of *E. coli* mutants deficient in DNA methylation and mismatch repair: *Mol Gen Genet* **1981** 184: 562-563.
78. Ju J, Pedersen-Lane J, Maley F, Chu E: Regulation of p53 expression by thymidilate synthase: *Proc Natl Aca Sci USA* **1999** 96: 3769-3774
79. Kaina B, Haas S, Kappes H: A general role for c-Fos in cellular protection against DNA-damaging carcinogens and cytostatic drugs: *Cancer Res* **1997** 57: 2721-2731.
80. Kapoor M and Lozano G: Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not γ radiation: *Proc Natl Acad Sci* **1999** 95: 2834 – 2837
81. Karin M, Liu Z, Zandi E: AP-1 function and regulation: *Curr Opin Cell Biol* **1997** 9: 240-246. Review.
82. Karran P, Marinus MG: Mismatch correction at O6-methylguanine residues in *E. coli* DNA: *Nature* **1982** 296: 86868-86869
83. Karran P, Bignami M: Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage: *Nucleic Acids Res* **1992** 20: 2933-2940
84. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage: *Cancer Res* **1991** 51: 6304-6311
85. Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr.: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-teleangiectasia: *Cell* **1992** 71: 587-597
86. Kinzler W, Kinzler KW, Vogelstein B: Life (and death) in malignant tumour: *Nature* **1996** 379: 19-20
87. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK et al.: Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21: *Science* **1991** 253: 661-665
88. Kinzler KW, Vogelstein B: Life (and death) in a malignant tumour: *Nature* **1996** 379: 19-20
89. Koi M, Umar A, Chauhan DP, Cherian Sp, Carethers JM, Kunkel TA, Boland CR: Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation: *Cancer Res* **1994** 54: 4308-4312.
90. Kolbus A, Herr I, Schreiber M, Debatin KM and Angel P: c-Jun-dependent induction of CD95L is critically involved in the induction of apoptosis by alkylating agents: *Mol Cell Biol* **1999** 20: 575 - 582
91. Kolodner RD, Hall NR, Lipford J, Kane MF, Rao MRS, Morrison P, Finan PJ, Burn J, Chapman P, Earabino C, Merchant E, Bishop DT: Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for msh2 mutations: *Genomics* **1994** 24: 516-526

92. Kolodner RD, Marsischky GT: Eukaryotic DNA mismatch repair: *Curr Opin Genet Dev* **1999** 9: 89-96. Review
93. Kolodner RD: Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair: *Genes Dev* **1996** 10: 1433-1442
94. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB: Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992** 89: 7491-7495
95. Lane DP, Crawford LV: T antigen is bound to a host protein in SV 40 transformed cells: *Nature* **1979** 278: 261-263
96. Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH: Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression: *J Biol Chem* **2000** 275: 23106-23112
97. Leach FS, Nicolaides NC and Vogelstein B: Mutations of a mutS Homolog in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer: *Cell* **1993** 75: 1215-1225
98. Levrero M, De Laurenzi V, Constanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G: The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions: *J Cell Sci* **2000** 113: 1661-1670
99. Li R; Botchan, MR.: The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication: *Cell* **1993** 73: 1207-1221
100. Li Q, Zhang L, Tsang B, Gardner K, Bostick-Bruton F, Reed E: Phorbol ester exposure activates an AP-1-mediated increase in ERCC-1 messenger RNA expression in human ovarian tumor cells: *Cell Mol Life Sci* **1999** 55: 456-666.
101. Lin YL, Shivji MK, Chen C, Kolodner R, Wood RD, Dutta A: The evolutionary conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair: *J Biol Chem* **1998** 273: 1453-1461
102. Lindahl T, Karran P, Wood RD: DNA excision repair pathways: *Curr Opin Genet Dev* **1997** 7: 158-169
103. Lindblom A, Tannergard P, Werelius B, Nordenskjolde M: Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: *Nature Genet* **1993** 5: 279-282
104. Linzer IH, Levine AJ: Characterisation of a 54k dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells: *Cell* **1979** 17: 43-52
105. Longley MJ, Pierce AJ, Modrich P: DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro: *J Biol Chem* **1997** 272: 10917-10921
106. Lothe RA: Microsatellite instability in human solid tumors: *Mol Med Today* **1997** 3: 61-8. Review
107. Lowe SW: Activation of p53 by oncogenes: *Endocr Relat Cancer* **1999** 6: 45-48

108. Lowe SW, Lin AW: Apoptosis in cancer: Carcinogenesis **2000** 21: 485-495.
109. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents *Cell* **1993** 74: 957-967
110. Lu X, Lane DP: Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes?: *Cell* **1993** 75: 765-778
111. Lynch HAT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Boman BM, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ: Hereditary Colorectal Cancer: *Semin. Oncol.* **1991** 18: 337-366
112. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch PM, Lynch JF, Cavalieri RJ, Boland CR: Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: *Gastroenterology* **1993** 104: 1535-1549
113. Lynch HT, Kimberling W, Albano WA, Lynch JF, Biscione K, Schuelke GS, Sandberg AA, Lipkin M, Deschner EE, Mikol YB: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). I. clinical description of resource: *Cancer* **1985** 56: 934-938
114. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ: Hereditary factors in cancer: *Arch Intern Med* **1966** 117: 206-212
115. Lynch HT, Krush AJ: Hereditary and adenocarcinoma of the colon: *Gastroenterology* **1967** 53: 517-527
116. Macpherson P, Humbert O, Karran P: Frameshift mismatch recognition by the human MutS α complex: *Mutat Res* **1998** 408: 55-66
117. Marin MC, Kaelin Jr. WG: p63 and p73: old members of a new family: *Biochim Biophys Acta* **2000** 1470: M93-M100
118. Marsh DJ, Coulon V, Lunetta KL et al. : Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation : *Hum Mol Genet* **1998** 7 : 507-515
119. Marsischky GT, Filosi N, Kane MF, Kolodner R: Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2 dependent mismatch repair: *Genes Dev* **1996** 10: 407-420
120. Marti TM, Kunz C, Fleck O: DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways: *J Cell Physiol.* **2002** 191:28-41. Review
121. May P, May E: Twenty years of p53 research, structural and functional aspects of the p53 protein: published erratum appears in *Oncogene* **2000** 19: 1734; *Oncogene* **2000** 18: 7621-7636
122. Mecklin JP, Ponz de Leon M: Epidemiology of HNPCC: *Anticancer Res.* **1994** 14(4B): 1625-1629. Review
123. Meek DW: Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification?: *Oncogene.* **1999** 18: 7666-7675
124. Meira LB, Cheo DL, Reis AM, Claij N, Burns DK, Riele H, Friedberg EC: Mice defective in the mismatch repair gene Msh2 show increased

- predisposition to UVB radiation-induced skin cancer: *DNA Repair* **2002** 1: 929-39.
125. Meplan C, Richard MJ, Hainaut P: Redox signalling and transition metals in the control of p53 pathway: *Biochem Pharmacol* **2000** 59: 25-33
 126. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A: p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis: *Nature* **1999** 398: 708-713
 127. Minden A, Karin M: Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases *Biochim Biophys Acta*. **1997** 1333: F85-104. Review
 128. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K et al.: Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: *Nat Genet* **1997** 17: 271-272
 129. Modrich P: Mechanisms and biological effects of mismatch repair: *Annu Rev Genet* **1991** 25: 229-253
 130. Modrich P: Mismatch Repair, Genetic Stability and Cancer: *Science* **1994** 266: 1959–1960
 131. Modrich P, Lahue R: Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology: *Annu Rev Biochem* **1996** 65: 101-133. Review
 132. Modrich P: Strand-specific mismatch repair in mammalian cells: *J Biol Chem* **1997** 272: 24727-24730
 133. Morris GF, Bischoff JR, Mathews MB: Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53: *Proc Natl Acad Sci USA* **1996** 93: 895-899
 134. Mu D, Tursun M, Duckett DR, Drummond JT, Modrich P and Sancar A: Recognition and repair of compound DNA lesions (base damage and mismatch) by human mismatch repair and excision repair systems: *Mol Cell Biol* **1997** 17: 760 – 769
 135. Mummenbrauer T, Janus F, Muller B, Wiesmuller L, Deppert W, Grosse F: p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity: *Cell* **1996** 85: 1089-1099.
 136. Nicholl DST: *Gentechnische Methoden*: Spektrum akademischer Verlag: **1995**
 137. Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM: Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer: *Nature* **1994** 371: 75-80
 138. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y et al.: Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients: **1991** 253: 665-669
 139. Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N, Taniguchi T: Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase: *J Biol Chem* **2000** 28: 22627-22630

140. Oliviero S, Robinson GS, Struhl K, Spiegelman BM: Yeast GCN4 as a probe for oncogenesis by AP-1 transcription factors: transcriptional activation through AP-1 sites is not sufficient for cellular transformation: *Genes Dev* **1992** 6: 1799-1809.
141. Olschwang S, Serova-Sinilnikova OM, Lenoir GM, Thomas G: PTEN germline mutations in juvenile polyposis coli: *Nat Genet* **1998** 18: 12-14
142. Papadopoulos P, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD: Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer: *Science* **1994** 263: 1625-1629
143. Papadopoulos P, Leach FS, Kinzler KW, Vogelstein B: Monoallelic mutation analysis (MAMA) for identifying germline mutations: *Nat Genet.* **1995** 11: 99-102.
144. Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS: Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer: *Science* **1993a** 260: 810-812
145. Peltomaki P, de la Chapelle P: Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer : *Adv Cancer Res* **1997** 71: 93-119
146. Piette J, Neel H, Marechal V: Mdm2: keeping p53 under control: *Oncogene* **1997** 15: 1001-1010
147. Plaschke J, Kruppa C, Tischler R et al.: Sequence analysis of the mismatch repair gene hMSH6 in the germline of patients with familial and sporadic colorectal cancer: *Int J Cancer* **2000** 85: 606-613
148. Pluquet O, Hainaut P: Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction : *Cancer Lett* **2001** 174: 1-15
149. Ponz de Leon, M.: Prevalence of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma: *Ann Med* **1994** 26: 53-60
150. Prives C: How loops, β sheets, and alpha helices help us to understand p53: *Cell* **1994** 78: 543-546
151. Prives C, Hall PA: The p53 pathway: *J Pathol* **1999** 187:112-126
152. Prolla TA, Abuin A, Bradley A: DNA mismatch repair deficient mice in cancer research: *Cancer Biology* **1996** 7: 241-247
153. Qian Y, Yu Y, Cheng X, Luo J, Xie H, Shen B: Molecular events after antisense inhibition of hMSH2 in a HeLa cell line: *Mutation Research* **1998** 418: 61-71
154. Reed JC: Dysregulation of apoptosis in cancer: *J Clin Oncol* **1999** 17: 2941-2953
155. Reitmair AH, Schmits R, Ewel A et al.: MSH2 deficient mice are viable and susceptible to lymphoid tumours: *Nat Genet* **1995** 11: 64-70.
156. Risinger JI, Umar A, Boyd J, Berchuk A, Kunkel TA, Barrett JC: Mutation of MSH3 in endometrial cancer and evidence for its functional role in heteroduplex repair: *Nat Genet.* **1996** 14: 102-105.
157. Rüschoff J, Bocker T, Schlegel J, Stumm G, Hofstaedter F: Microsatellite instability: new aspects in the carcinogenesis of colorectal carcinoma: *Virch Arch* **1995** 426: 215-222

158. Scherer SJ, Seib T, Seitz G, Dooley S, Welter C: Isolation and characterization of the human mismatch repair gene hMSH2 promoter region: *Hum Genet* **1996a** 97: 114-116
159. Scherer SJ, Welter C, Zang KD und Dooley S: Specific in vitro binding of p53 to the promoter region of the human mismatch repair gene hMSH2: *Biochem, Biophys. Res. Comm.* **1996b** 221: 722-728
160. Scherer SJ, Maier SM, Seifert M, Hanselmann RG, Zang KD, Mueller-Hermelink HK, Angel P, Welter C, Scharl M: p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV: *J Biol Chem.* **2000** 275:37469-37473.
161. Schreiber M, Baumann B, Cotten M, Angel P, Wagner EF: Fos is an essential component of the mammalian UV response: *EMBO J.* **1995** 14: 5338-5349.
162. Schreiber M, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Mohle-Steinlein U, Tian J, Karin M, Angel P, Wagner EF: Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent: *Genes Dev.* **1999** 13: 607-619
163. Seol DW, Chen Q, Smith ML and Zarnegar R: Regulation of the c-met Proto-oncogene Promoter by p53: *J Biol Chem* **1999** 274: 3565 – 3572
164. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J: Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumour-derived cell-line: *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1992** 89: 4495-4499
165. Sherr CJ.; Weber, AD: The ARF/p53 pathway: *Curr Opin Genet Dev* **2000** 10: 94-99
166. Sia EA, Kokoska RJ, Dominska M, Greenwell P, Petes TD: Microsatellite instability in yeast: dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes: *Mol Cell Biol* **1997** 17: 2851-2858
167. Smith ML, Ford JM, Hollander MC et al.: p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes: *Mol Cell Biol* **2000** 20: 3705-3714.
168. Smits R, Hofland N, Edelmann W et al.: Somatic Apc mutations are selected upon their capacity to inactivate the beta-catenin downregulating activity: *Genes Chromosomes Cancer* **2000** 29: 229-239.
169. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B: Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: *Int J Cancer* **1994** 57: 1-9
170. Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis: *J Mol Biol* **1975** 98: 503-517
171. Subramanian D, Griffith JD: Interactions between p53, hMSH2-hMSH6 and HMG I(Y) on Holliday junctions and bulged bases: *Nucleic Acids Res.* **2002** 30: 2427-2434.
172. Süsse S, Janz C, Janus F, Deppert W, Wiesmuller L: Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53: *Oncogene* **2000** 19: 4500-4512.
173. Szankasi P, Smith GR: A role for exonuclease 1 from *S.pombe* in mutation avoidance and mismatch correction: *Science* **1995** 267: 1166-1169

174. Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T et al.: A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **2000** 404: 42-49.
175. Tang W, Willers H, Powell SN: p53 directly enhances rejoining of DNA double-strand breaks with cohesive ends in gamma-irradiated mouse fibroblasts: *Cancer Res* **1999** 59: 2562-2565.
176. Tao W, Levine AJ: P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleoplasmatic shuttling of Mdm2: *Proc Natl Acad Sci* **1999** 96: 6937-6941
177. Tishkoff DX, Boerger AL, Bertrand P, Filosi N, Gaida GM, Kane MF, Kolodner RD: Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2: *Proc Natl Acad Sci USA* **1997** 94: 7487-7492
178. Tishkoff DX, Amin NS, Viars CS, Arden KC, Kolodner RD : Identification of a human gene encoding a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, an exonuclease implicated in mismatch repair and recombination: *Cancer Res* **1998** 58: 5027-5031
179. Toft NJ, Winton DJ, Kelly J et al.: Msh2 status modulates both apoptosis and mutation frequency in the murine small intestine: *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999** 96: 3911-3915
180. Tran HT, Gordenin DA, Resnick MA: The 3'-5' exonuclease of DNA polymerase δ and ϵ and the 5'-3' exonuclease Exo1 have major roles in postreplication mutation avoidance in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Cell Biol* **1999** 19: 2000-2007
181. Umar A, Buermeier AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, Kunkel TA: Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis: *Cell* **1996** 87: 65-73
182. Umar A, Koi M, Risinger JL, Glaab WE, Tindal KR, Kolodner RD, Boland CR, Barrett JC, Kunkel TA: Correction of hypermutability, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine resistance, and defective DNA mismatch repair by introducing chromosome 2 into human tumor cells with mutations in MSH2 and MSH6: *Cancer Res* **1997** 57: 3949-3955
183. Valentini AM, Renna L, Amentano R, Pirelli M, Di Leo A, Gentile M, Caruso ML: Mismatch repair, p53 and beta-catenin proteins in colorectal cancer: *Anticancer Res* **2002** 22: 2083-2088.
184. Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH et al.: Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis: *Gastroenterology* **1996** 110: 1020-1027
185. Verma L, Kane MF, Brassett C et al.: Mononucleotide microsatellite instability and germline MSH6 mutation analysis in early onset colorectal cancer *J Med Genet.* **1999** 36: 678-682
186. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network: *Nature* **2000** 408: 307-310

187. Vossen S, Möslein G, Katzer M et al.: Protein expression of hMSH2 and hMLH1 in HNPCC: evaluation of a prescreening method: *Langenbecks Arch Chir* **1998** 115: 1461-1463
188. Wagener C: *Molekulare Onkologie*: Thieme Verlag 1999
189. Wang H, Lawrence CW, Li GM and Hays JB: Specific binding of human MSH2-MSH6 mismatch-repair protein heterodimers to DNA incorporating thymine- or uracil-containing UV light photoproducts opposite mismatched bases: *J Biol Chem* **1999** 274: 16894 – 16900
190. Wang XW, Yeh H, Schaeffer L, Roy R, Moncollin V, Egly JM, Wang Z, Freidberg EC, Evans MK, Taffe BG: p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity: *Nat Genet* **1995** 10: 188-195
191. Wang Q, Zhang H, Guerette S et al.: Adenosine nucleotide modulates the physical interaction between hMSH2 and BRCA1: *Oncogene* **2001** 20: 4640-4649.
192. Wang Q, Zhang H, Fishel R, Greene ML: BRCA1 and cell signalling: *Oncogene* **2000** 19: 6152-6158. Review.
193. Weintraub H, Hauschka S, Tapscott SJ: The MCK enhancer contains a p53 responsive element: *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1991** 88: 4570-4571
194. Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H et al. : Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations *Nat Genet.* **1999** 23: 142-144
195. Wilhelm D, van Dam H, Herr I, Baumann B, Herrlich P, Angel P: Both ATF-2 and c-Jun are phosphorylated by stress-activated protein kinases in response to UV irradiation: *Immunobiology* **1995** 193: 143-148. Review
196. Wilson DMR, Carney JP, Coleman MA, Adamson AW, Christensen M, Lamerdin JE: Hex1: a new human Rad2 nuclease family member with homology to yeast exonuclease 1: *Nucleic Acids Res* **1998** 26: 3762-3768
197. Wong H, Anderson WD, Cheng T, Riabowol KT: Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the "primer-dropping" method: *Anal Biochem.* **1994** 223: 251-258
198. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T: Human DNA Repair Genes **2001** 291: 1284-1289
199. Wu X, Bayle H, Olson D, Levine AJ: The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop: *Genes Dev.* **1993** 7: 1126-1132
200. Wu Y, Berends MJ, Mensink RG et al.: Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations: *Am J Hum Genet* **1999** 65: 1291-1298
201. Xie Y, Counter C, Alani E: Characterization of the repeat-tract instability and mutator phenotypes conferred by a Tn3 insertion in RFC1, the large subunit of the yeast clamp loader: *Genetics* **1999** 151: 499-509
202. Xinarianos G, Liloglou T, Prime W et al.: p53 status correlates with the differential expression of the DNA mismatch repair protein MSH2 in non-small cell lung carcinoma: *Int J Cancer* **2002** 101: 248-252.

203. Yan T, Schupp JE, Hwang Hs et al.: Loss of DNA mismatch repair imparts defective cdc2 signaling and G(2) arrest responses without altering survival after ionizing radiation: *Cancer Res* **2001** 61: 8290-8297.
204. Yang A, Waker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkers P, Sharpe A, McKeon F, Caput D: p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumors: *Nature* **2000** 404: 99-103
205. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M: Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6: *Nature* **1991** 352: 345-347
206. Yoshino M, Nakatsu Y, Riele H, Hirota S, Kitamura Y, Tanaka K : Additive roles of XPA and MSH2 genes in UVB-induced skin tumorigenesis in mice: *DNA Repair* **2002** 1: 935-940
207. Zambetti GP, Bargonetti J, Walker K, Prives C, Levine AJ: Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element *Genes Dev.* **1992** 6: 1143-1152
208. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. : ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4 a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways: *Cell* **1998** 92: 725-734
209. Zhang H, Richards B, Wilson T, Lloyd M, Cranston A, Thornburn A, Fishel R, Meuth M: Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMLH1: *Cancer Res* **1999** 59: 3021-3027
210. Zink D, Mayr C, Janz C, Wiesmuller L: Association of p53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S phase: *Oncogene* **2002** 21: 4788-4800.

IX. Publikationen

1. S J Scherer, T Seib, G Seitz, S Dooley and C Welter:
Isolation and Characterisation of the human mismatch repair gene hMSH2 promoter region; Human Genetics 97 : 114-116, 1996
2. S J Scherer, T Seib, G Seitz, C Welter and S Dooley:
Specific in Vitro Binding of p53 to the Promoter Region of the Human Mismatch Repair Gene hMSH2; Biochemical and Biophysical Research Communications 221, 722-728, 1996
3. SJ Scherer, SM Maier, M Seifert, RG Hanselmann, KD Zang, HK Müller-Hermelink, P Angel, C Welter and M Scharl
p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV; Journal of Biological Chemistry 275: 37469 – 37373, 2000
4. S Chen, Y Hong, SJ Scherer and M Scharl:
Lack of ultraviolet-light inducibility of the medakafish (*Oryzias latipes*) tumor suppressor gene p53; Gene 264: 197-203, 2001
5. N Lauer, SM Maier, M Oberringer, M Schulte, RG Hanselmann, M Scharl, SJ Scherer and R J Wirbel
Absence of telomerase activity in Malignant Bone Tumors and Soft Tissue Sarcomas“; Sarcoma 6: 43 – 46, 2002
6. J Meyer, SJ Scherer, R Mossner and KP Lesch
Reply concerning KIAA0027 (WKL1, MLC1) and psychosis: white matters. Mol Psychiatry. 2002;7(10):1037-8.

Abstracts

1. S. J. Scherer, T. Seib, G. Seitz, S. Dooley, C. Welter:
 „Isolation and Characterisation of the human mismatch repair gene hMSH2 promoter region“;
 DNA REPAIR, Hamburg, 20. – 23.2.1996
 Abstract 605
2. S. J. Scherer, T. Seib, G. Seitz, S. Dooley, C. Welter:
 „Isolation and Characterisation of the human mismatch repair gene hMSH2 promoter region“;
 8. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, 6. - 9. 3. 1996 in
 Göttingen,
 Abstract P4-2, Medizinische Genetik, 8. Jahrgang, März 1996, Vol. 1, S. 107
3. S. Dooley, S. Scherer, C. Welter, W. Tilgen, J. Reichrath:
 „UVB irradiation, mismatch repair and cutaneous melanoma“
 Skin Cancer and UV Radiation, Bochum, 3. - 6.10.96
 Abstract P01.1 Melanoma Research, Vol 6, Supp.1, Sept. 96, S. 59
4. S.J. Scherer, S. Dooley, G. Seitz, K.D. Zang und C.Welter
 „Isolierung und Charakterisierung der Promotorregion des hMSH2-Gens und
 Nachweis einer p53-Bindungsstelle“
 Aktuelle Ergebnisse der genetischen Forschung hereditärer gastrointestinaler
 Erkrankungen für Therapie und Praxis, 06.-07.12. 1996; Robert-Rössle-
 Klinik am Max-Delbrück-Centrum Berlin-Buch; Abstractband S.8
5. S. Scherer, S. Dooley, K.D. Zang und C. Welter
 „Spezifische Bindungsaktivität von p53 zur Promotorregion des
 menschlichen Mismatch-Repair-Gens hMSH2“
 5. Workshop der Deutschen Sektion des DNA-Repair Network; 03.-06. März
 1998, Mainz; Abstract Nr. 31
6. S. Jacob, S. Schlageter, D. Schmitt-Köppler, M. Weber, S. Scherer, W. Renn,
 H. Keller, G. Weissmann, H.-J. Augustin, W. Maerz, H.-D. Klimm
 „Impairment of Glucose Tolerance in Patients with Myocardial Infarction –
 First Results of the MI-Kid-Study“
 58th scientific sessions, 13. – 16. 06. 1998, Chicago, Illinois; diabetes May
 1998, Vol 47, Suppl. 1, Abstract 1499, page A389

7. S. Jacob, H-D. Klimm, S. Scherer, A. Volk, K. Rett, W. Renn, H. Keller, G. Weismann, H-J. Augustin, W. März and H.-U. Häring
„ Impairment of glucose tolerance in survivors of myocardial infarction (MI) and in their first degree relatives (FDR)“
Progress in research on vascular systems; 30.09.- 03.10. 1998, Tübingen;
Clinical hemorheology and microcirculation in press
8. H-D Klimm, S Jacob, S Schlageter, D Schmitt-Köppler, M Weber, S Scherer, A Volk, K Rett, W Renn, H Keller, G Weismann, H-J Augustin, W März, and H-U Häring, MI-Kid Center, Univ. of Heidelberg, Mannheim, Freiburg and Tübingen, Germany
„Impairment of glucose tolerance in survivors of myocardial infarction (MI) and in their first degree relatives (FDR)“
34th Annual meeting of the EASD Barcelona, Spain, 8-12 September 1998
Diabetologia, Vol. 41, Suppl. 1, August 1998, Abstract 753, page A193
9. S.J. Scherer, S.M. Maier, M. Seifert, R.G. Hanselmann, H.K. Müller-Hermelink, C.Welter and M. Scharthl
„ The Repair-Gen hMSH2 as a new p53 Target Gen“
An AACR Special Conference in Cancer Research: DNA Repair Defects;
14.–18. 01. 2000, San Diego, Abstract No.: 58
10. Stefan J. Scherer, Sandra M. Maier, Markus Seifert, Cornelius Welter, Peter Angel and Manfred Scharthl
“Synergism Between p53 and c-Jun in the Regulation of the DNA Repair Gene hMSH2 in Response to UV”
AACR 92nd Annual Meeting; 24. – 28. März 2001, New Orleans;
Proceedings AACR, Vol. 42: 734 March 2001, Abstract No: 3945
11. Stefan J. Scherer, Sandra M. Maier, Markus Seifert, Cornelius Welter, Peter Angel and Manfred Scharthl
“Synergism Between p53 and c-Jun in the Regulation of the DNA Repair Gene hMSH2 in Response to UV”
AEK 2001, 04. - 06. April 2001 Heidelberg, Abstract No: SY 14; J Can Res Clin Oncol, Vol 127, Suppl 1: 14, 2001
12. Sandra M. Maier, Stefan J. Scherer, Nina K. Lauer, Martin Oberringer, Wolf Mutschler, Rainer G. Hanselmann, Reiner J. Wirbel and Manfred Scharthl
“Absence of Telomerase Activity in Malignant Bone Tumors and Soft-Tissue Sarcomas”
AEK 2001, 04 .- 06. April 2001 Heidelberg, Abstract No: MB 26; J Can Res Clin Oncol, Vol 127, Suppl 1: 25, 2001

13. S. J. Scherer, S. Maier, C. Kaiser, H. Müller-Hermelink, C. Welter, P. Angel, M. Scharl
„Evidence for Function of hMSH2 in Induction of Apoptosis“
AEK 2002, 10. - 14. März 2002 Berlin, Abstract No: P401; J Can Res Clin Oncol, Vol 128, Suppl 1: S79, 2002
14. C. Kaiser, F. Rauscher, W. Bernhardt, H. Müller-Hermelink, M. Scharl, S. J. Scherer, B. Kneitz
„Isolation and Characterization of the mouse MLH1 promoter Region, and Transcriptional Regulation“
AEK 2002, 10. - 14. März 2002 Berlin, Abstract No: P405; J Can Res Clin Oncol, Vol 128, Suppl 1: S80, 2002
15. S. J. Scherer, S. Maier, C. Kaiser, H. Müller-Hermelink, C. Welter, P. Angel, M. Scharl
„Evidence for Function of hMSH2 in Induction of Apoptosis“
AACR 2002, 06. – 10. April 2002 San Francisco, Abstract No: 5079; Proceedings of AACR, Vol 43, March 2002
16. Sandra M. Maier, Nina K. Lauer, Martin Oberringer, Rainer Hanselmann, Reiner J. Wirbel, Stefan J. Scherer, M. Scharl
„Telomerase Activity in malignant bone tumors and soft tissue sarcomas according to classification“
AACR 2002, 06. – 10. April 2002 San Francisco, Abstract No: 4493; Proceedings of AACR, Vol 43, March 2002

X. Danksagung

Danken möchte ich an dieser Stelle an denjenigen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Scharl für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, sowie für viele fruchtbare und freundschaftliche Diskussionen, welche mir für den Fortgang und die Fertigstellung der Arbeit außerordentlich hilfreich waren.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. H.K. Müller-Hermelink für die wohlwollende Unterstützung während meiner Zeit am Institut für Physiologische Chemie I und meiner Zeit als MD/Ph.D-Stipendiat. Des weiteren auch für fruchtbare Diskussionen und seine Bereitschaft als Zweitgutachter für die vorgelegte Arbeit zu fungieren..

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie I für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die stetige Unterstützung. Ausdrücklich möchte ich mich bei Dr. Jacqueline Deflgauuw, Dr. C. Wellbrock, Dr. B. Kneitz und bei Frau Petra Fischer, Frau Christin Weisser, Frau Ute Hornung als auch bei Frau Cornelia Körting für die Einweisung in molekularbiologische Arbeitstechniken bedanken sowie für viele gesellige Stunden.

Auch möchte ich Herrn Dr. P. Angel und PD. Dr. K. Roemer danken für die Bereitstellung einiger Vektoren für p53 und AP-1, sowohl als auch für einige dieser Mutanten. Beiden möchte ich auch meinen ausdrücklichen Dank aussprechen für zahlreiche Diskussionen, die für den Fortgang des Projektes von entscheidender Bedeutung waren. Ebenfalls möchte ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. Edelman, Albert-Einstein-College of Medicine, New York, USA für die Möglichkeit zur Erlernung des Mismatch-Reparatur-Assays bedanken, als auch für viele wertvolle Anregungen, die sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses aufwendige Studium und diese Arbeit ermöglichten.

Ganz ausdrücklich möchte ich meiner Freundin Sandra Dank sagen für ihr Verständnis, das sie mir entgegen brachte und für viele Stunden des Korrekturlesens.

XI. Lebenslauf

Name: Scherer, Dr. med.
Vorname: Stefan Johannes
Geburtsort: Ludwigshafen
Geburtsdatum: 13.08.1967
Adresse: Bertha-von-Suttner-Str. 17
 97218 Gerbrunn

Schulbildung:
 1974-78: Grundschule Rödersheim
 1978-88: Staatl. Gymnasium im Schulzentrum
 Schifferstadt
 1988: Abitur

Wehrdienst:
 7/88-9/89: Sanitätsakademie München und
 Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz

Studium:
 WS 1989/90 - WS 1996/97: Humanmedizin an der Universität des
 Saarlandes
 SS 1997 - WS 1997/98: Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-
 Universität Freiburg
 05/1998: 3. Staatsexamen
 06/99 – 08/2002: Promotionsstudium der Universität Würzburg
 der Fakultät für Biologie
 02/2000 – 12/2000: Postgraduelle Weiterbildung Bioinformatik
 6/2000: Approbation

Beruf:
 06/98 – 05/99: AiP an der Universität des Saarlandes, Homburg,
 Abtl. f. Unfallchirurgie; Dir. Prof. Dr. W.
 Mutschler, chirurgische Intensivstation
 06/99 – 08/02: MD/Ph.D-Stipendiat des Interdisziplinären
 Zentrums für klinische Forschung, Universität
 Würzburg; Physiologische Chemie I,
 Biozentrum; Dir. Prof. Dr. M. Scharthl
 05/2000: Fachkundenachweis „Rettungsdienst“
 06/2000: Approbation
 03/2001: Promotion zum Doktor der Medizin am
 Institut für Humangenetik der Universität des
 Saarlandes

seit 09/02: Stipendium der Deutschen Krebshilfe am Albert-Einstein-College of Medicine, New York, USA

Preise:

2000: Travel Award der American Association of Cancer Research

2001: Wissenschaftspreis der Stadt Homburg

XII. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und dabei keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass ich die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 2003

Dr. med. Stefan Scherer